

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie
Direktor: Prof. Dr. med. S. Endres

*Medizinische Klinik und Poliklinik IV
Klinikum der Universität
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke*



Das Chemokin CCL22 – Mechanismen der Induktion und Rolle für die Funktion dendritischer Zellen

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

vorgelegt von
Viola Katharina Vetter
aus
Frankfurt am Main

2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. David Anz

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Andreas Eigler
Prof. Dr. Markus Guba
PD Dr. Alexy Dashkevich

**Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:** Prof. Dr. med. Stefan Endres

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

Tag der mündlichen Prüfung: 26.05.2020

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

Das Chemokin CCL22 – Mechanismen der Induktion und Rolle für die Funktion dendritischer Zellen

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.

Zürich, 1. Juni 2020

Ort, Datum

Viola Vetter

Unterschrift Doktorandin

Meinen Großeltern Monika und Ulrich Gottstein

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Versicherung	i
Widmung	iii
1 Einleitung	1
1.1 Immuntherapie von Tumorerkrankungen	1
1.2 Das Immunsystem	1
1.2.1 Das angeborene Immunsystem	2
1.2.2 Das adaptive Immunsystem	2
1.3 Dendritische Zellen	4
1.3.1 Aktivierung von dendritischen Zellen und Induktion einer Immunantwort	4
1.3.2 Antigenprozessierung	5
1.3.3 Subtypen von dendritischen Zellen	5
1.4 Regulatorische T-Zellen	6
1.5 Zytokine	7
1.6 Chemokine	9
1.6.1 Das Chemokin CCL22	9
1.7 Tumormunologie	10
1.8 Fragestellung	12
2 Materialien und Methoden	15
2.1 Materialien	15
2.1.1 Geräte	15
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	16
2.1.3 Chemikalien, Enzyme und Reagenzien	16
2.1.4 Rekombinante Zytokine, Chemokine und TLR-Agonisten	17
2.1.5 siRNA	18
2.1.6 Reagenzienansätze	18
2.1.7 Materialien für Durchflusszytometrie	19
2.1.8 Primer und Sonden	20
2.1.9 Zelllinien	21
2.1.10 Materialien für die Zellkultur	21
2.1.11 Puffer	22
2.1.12 Software	23
2.2 Tierexperimentelle Methoden	23
2.2.1 Mäuse	23
2.2.2 Entnahme von Organen	23
2.2.3 Herstellung von Einzelzellsuspensionen	24
2.2.4 Generieren von dendritischen Zellen aus Knochenmark	24

2.2.5	Organlysate und Bestimmung der Proteinkonzentration	25
2.2.6	Behandlung mit GM-CSF	25
2.2.7	Adoptiver Transfer und <i>in-vivo-Tracking</i> von dendritischen Zellen	26
2.2.8	Murine Tumormodelle	26
2.3	Zelluläre Methoden	28
2.3.1	Allgemeine Bedingungen in der Zellkultur	28
2.3.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	28
2.3.3	Bestimmung von Zellviabilität- und zahl	28
2.3.4	Magnetische Zellseparation	29
2.3.5	Isolation von peripheren mononukleären Zellen aus Vollblut	29
2.3.6	Proliferationsassay	30
2.3.7	Migrationsassay	31
2.3.8	siRNA-Knockdown	31
2.3.9	Kultivierung von Immunzellen in konditioniertem Medium	31
2.4	Immunologische Methoden	32
2.4.1	Bestimmung von Zytokin- und Chemokinkonzentrationen mittels ELISA	32
2.4.2	Durchflusszytometrie	33
2.5	Molekularbiologische Methoden	36
2.5.1	RNA-Isolation	36
2.5.2	cDNA-Synthese	37
2.5.3	Quantitative Real-Time-PCR	37
2.5.4	Lentivirale Transduktion	38
2.6	Statistische Analyse	39
3	Ergebnisse	41
3.1	Induktion von CCL22 durch IL-1-sezernierende Tumorzellen	41
3.1.1	CCL22-induzierende Tumorzelllinien exprimieren IL-1	41
3.1.2	siRNA-Knockdown von IL-1 α hebt Tumorzell-induzierte CCL22-Induktion in humanen Immunzellen auf	42
3.1.3	siRNA-Knockdown von IL-1 reduziert Tumorzell-induzierte CCL22-Induktion in murinen Splenozyten	44
3.1.4	Blockade von IL-1 durch Anakinra im 4T1-Tumormodell	45
3.1.5	Blockade von IL-1 durch Anakinra im Hepa1-6 Tumormodell	47
3.2	CCL22-Induktion durch GM-CSF	49
3.2.1	GM-CSF induziert CCL22 in Splenozyten <i>in vitro</i>	50
3.2.2	Applikation von GM-CSF induziert CCL22 <i>in vivo</i>	50
3.2.3	Generierung einer Doxycyclin-abhängig GM-CSF-exprimierenden Tumorzelllinie	51
3.2.4	GM-CSF-überexprimierende Tumore induzieren CCL22 <i>in vivo</i>	52
3.3	Charakterisierung von CCL22-defizienten dendritischen Zellen	53
3.3.1	Expression von kostimulatorischen Markern und MHC-II auf dendritischen Zellen ist unabhängig von CCL22	54
3.3.2	Fähigkeit der Antigenpräsentation und -prozessierung von dendritischen Zellen ist unabhängig von CCL22	55
3.3.3	Migration und Überleben von dendritischen Zellen <i>in vivo</i> ist unabhängig von CCL22	56
3.3.4	Verminderte Migration von regulatorischen T-Zellen zu Überständen von CCL22-defizienten dendritischen Zellen	58
3.3.5	CCL22-Expression in Subtypen von dendritischen Zellen	60

4 Diskussion	63
4.1 CCL22-Induktion durch intratumorales IL-1	63
4.1.1 Tumoreigenes IL-1 induziert CCL22	63
4.1.2 IL-1 als therapeutischer Angriffspunkt in der Tumorthherapie	65
4.2 CCL22-Induktion durch GM-CSF	67
4.3 CCL22 in murinen dendritischen Zellen	70
Zusammenfassung	73
Literaturverzeichnis	75
Abkürzungsverzeichnis	95
Veröffentlichungen	99
Danksagung	101

1 Einleitung

1.1 Immuntherapie von Tumorerkrankungen

Tumorerkrankungen stellen laut aktuellen Daten der WHO nach kardiovaskulären Erkrankungen weltweit die zweithäufigste Todesursache dar. Die Behandlung von Tumorerkrankungen ist daher eine immense medizinische Herausforderung. Die wichtigsten Säulen der Tumorthherapie waren über lange Zeit die operative Tumorentfernung, Chemo- sowie Strahlentherapie. In den letzten Jahren hat jedoch zunehmend die Immuntherapie von Tumorerkrankungen an Bedeutung gewonnen. Ein wichtiger Meilenstein war dabei die Zulassung des sogenannten Checkpoint-Inhibitors Ipilimumab für die Therapie des malignen Melanoms (Hodi et al. 2010). Ipilimumab und andere Checkpoint-Inhibitoren enthemmen dabei das körpereigene Immunsystem, so dass es den Tumor selber erkennen und bekämpfen kann. Darüber hinaus werden kontinuierlich weitere therapeutische Ansatzpunkte entwickelt und klinisch erprobt. Hierfür, aber auch zur Verbesserung bestehender Immuntherapien ist ein Verständnis der Interaktion zwischen unserem Immunsystem und malignen Tumoren von essentieller Bedeutung (Sharma et al. 2015).

1.2 Das Immunsystem

Der Mensch ist dauerhaft von einer Vielzahl an Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten umgeben. Selten führt dieser ständige Kontakt mit potentiell krankheitserregenden Mikroorganismen jedoch tatsächlich zu einer Infektionskrankheit. Das Immunsystem schützt den Körper vor Infektionen, in dem es Erreger erkennt und eliminiert. Gleichzeitig muss es allerdings zuverlässig zwischen *fremd* und *selbst* unterscheiden, um Autoimmunität zu vermeiden. Die Balance zwischen effizienter Erregerbekämpfung und der Vermeidung von überschießenden, schädigenden Immunreaktionen wird durch das komplexe Zusammenspiel verschiedener Immunzellen und löslicher Faktoren bewältigt.

Das Immunsystem lässt sich in zwei Subsysteme gliedern, das angeborene und das adaptive Immun-

system. Das phylogenetisch ältere, angeborene Immunsystem ist für die sofortige Bekämpfung eines breiten Erregerspektrums verantwortlich. Die Funktion des adaptiven Immunsystems setzt erst mit einer gewissen Zeitverzögerung ein, ist jedoch hochspezifisch, effizient und führt zur Ausbildung des immunologischen Gedächtnisses. Beide Systeme agieren nicht unabhängig von einander, sondern sind funktionell eng miteinander verknüpft (Murphy et al. 2017).

1.2.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem nutzt ein breites Spektrum an Mechanismen zur sofortigen Erregerabwehr. Gelingt es einem Erreger durch die mechanischen und chemischen Barrieren der Körperoberfläche einzudringen, wird er durch das angeborene Immunsystem erkannt. Die Erkennung beruht auf evolutionär hoch konservierten Merkmalen, welche kennzeichnend für ein breites Spektrum an Mikroorganismen sind. Diese Merkmale sind beispielsweise Bestandteile der bakteriellen Zellwand oder der viralen DNA und werden als PAMP (*pathogen-associated molecular pattern*) bezeichnet. PAMP werden durch eine begrenzte Zahl an Rezeptoren, den sogenannten PRR (*pattern recognition receptors*) erkannt (Takeuchi et al. 2010; Akira et al. 2003). Die bekannteste Gruppe der PRR sind die Toll-like-Rezeptoren (TLR). Zum Beispiel bindet der Rezeptor TLR4 Lipopolysaccharid der bakteriellen Zellwand (Poltorak et al. 1998), TLR9 bindet unmethylierte CpG-Motive, welche in viraler DNA enthalten sind (Hemmi et al. 2000).

Die Erkennung eines Erregers und Aktivierung der angeborenen Immunantwort führt zunächst zu einer Entzündungsreaktion. Dabei werden Entzündungsmediatoren, wie Eicosanoide, Zytokine und Chemokine, ausgeschüttet und Effektorzellen an den Ort der Infektion gelockt. Eine wichtige Aufgabe dieser Zellen ist die direkte Eliminierung des Erregers. So können Phagozyten, wie neutrophile Granulozyten, Makrophagen und dendritische Zellen Erreger mittels Phagozytose abtöten. Darüber hinaus tragen auch weitere Effektorzellen, wie basophile und eosinophile Granulozyten oder NK-Zellen, sowie lösliche Faktoren, wie das Komplementsystem, zur Erregerabwehr bei. Trotz dieser vielfältigen Mechanismen, gelingt es dem angeborenen Immunsystem nicht immer, einen Erreger vollständig zu eliminieren. Zudem hinterlässt es kein immunologisches Gedächtnis. Eine weitere wichtige Funktion des angeborenen Immunsystems ist daher die Initiierung der adaptiven Immunantwort (Murphy et al. 2017).

1.2.2 Das adaptive Immunsystem

Die Hauptkomponente des adaptiven Immunsystems sind die antigenspezifischen Lymphozyten, welche Antigene mittels eines Antigenrezeptors erkennen. Durch den Mechanismus der DNA-Re-

kombination werden während der Entwicklung der Lymphozyten eine große Zahl an verschiedenen Rezeptorvarianten generiert, wobei jeder Lymphozyt eine einzige Rezeptorvariante trägt. Dieses große Repertoire an Rezeptoren macht es möglich, dass theoretisch jeder potentieller Erreger erkannt und bekämpft werden kann. Lymphozyten, welche mit ihrem Rezeptor Eigenantigene erkennen, werden jedoch während Reifungsprozess eliminiert (Nemazee 2000). Die restliche reifen Lymphozyten werden zunächst als naive Lymphozyten bezeichnet, sind inaktiv und zirkulieren im Blut und durch die peripheren lymphatischen Organe wie Lymphknoten, Milz und MALT (*mucosa associated lymphatic tissue*). Erst nach Kontakt mit dem passenden Antigen werden die Lymphozyten aktiviert und die adaptive Immunantwort initiiert. In der Folge proliferiert der Lymphozyt und durchläuft weitere Differenzierungsschritte, so dass eine Vielzahl identischer Effektorlymphozyten entstehen (Murphy et al. 2017; Gowans et al. 1964).

Es werden zwei Haupttypen von Lymphozyten unterschieden – B-Zellen und T-Zellen. B-Zellen produzieren Antikörper und sind somit insbesondere für die humorale adaptive Immunantwort verantwortlich. T-Zellen reifen im Thymus und haben eine Schlüsselfunktion in der zellulären Immunantwort. Im Gegensatz zum B-Zell-Rezeptor bindet der T-Zell-Rezeptor kein natives Antigen, sondern Antigenfragmente, welche prozessiert wurden und mittels MHC-Proteinkomplexen (*Major histocompatibility complex*) auf der Zelloberfläche anderer Zellen präsentiert werden.

Eine grobe Einteilung der T-Zellen erfolgt anhand der zwei Oberflächenmarker CD4 und CD8, zwei Korezeptoren des T-Zell-Rezeptors. CD8-positive T-Zellen werden als zytotoxische T-Zellen bezeichnet. Sie induzieren bei Virus-infizierten oder anderweitig geschädigten Zellen den Zelltod. Dabei erkennen sie Peptidfragmente, die aus intrazellulären, zytosolischen Antigenen prozessiert wurden und mittels MHC-I präsentiert werden. CD4-positive T-Zellen sind nicht in der Lage, Erreger direkt zu eliminieren, sondern modulieren, insbesondere durch die Interaktion mit anderen Immunzellen, die Immunantwort. Sie erkennen Antigenfragmente, welche aus intrazellulären Vesikeln von antigenpräsentierenden Zellen wie dendritischen Zellen, B-Zellen und Makrophagen stammen und über MHC-II präsentiert werden (Murphy et al. 2017).

Die CD4-positiven T-Helfer-Zellen differenzieren nach dem ersten Antigenkontakt in verschiedene Hauptklassen, welche charakteristische Transkriptionsfaktoren und Zytokinsekretionsmuster aufweisen (Zhu et al. 2010; Mosmann et al. 1996). T_{H1}-Zellen sezernieren Interferon- γ und aktivieren Makrophagen. T_{H2}-Zellen, die unter anderem IL-4 und IL-5 sezernieren, spielen eine Rolle in der Abwehr von Parasiten, aber auch bei der Pathogenese allergischer Krankheiten. T_{H17}-Zellen induzieren über die Sekretion von IL-17 indirekt die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten

(Tesmer et al. 2008). T_{FH}-Zellen unterstützen die Funktion der B-Zellen im Lymphfollikel (Reinhardt et al. 2009). Neben diesen aktivierenden, konventionellen T-Helfer-Zellen, existiert eine weitere Subklasse von CD4-positiven Zellen, die sogenannten regulatorischen T-Zellen, welche immunsuppressive Eigenschaften aufweisen.

Die Aktivierung von naiven T-Zellen wird als *Priming* bezeichnet und erfolgt im peripheren lymphatischen Gewebe durch antigenpräsentierende Zellen. Dabei sind insgesamt drei Signale nötig. Das erste Signal erfolgt, wenn der T-Zell-Rezeptor das passende, über MHC präsentierte, Antigen bindet. Das zweite Signal kommt durch kostimulatorische Moleküle auf antigenpräsentierenden Zellen zustande. Hierbei interagiert beispielsweise CD28 auf T-Zellen mit CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) (Keir et al. 2005; Lenschow et al. 1996). Dies führt zur Proliferation und Expansion der T-Zellen, was insbesondere durch autokrin sezerniertes IL-2 vermittelt wird (Boyman et al. 2012). Wenn das zweite, kostimulatorische Signal hingegen fehlt, werden die T-Zellen nicht aktiviert, sondern sterben oder werden anerg, reagieren also nicht mehr auf erneuten Antigenkontakt (Schwartz 2003). Das dritte Signal bewirkt bei CD4-Zellen über verschiedene Zytokinmuster die Differenzierung in die verschiedenen Klassen von Effektorlymphozyten (Curtsinger et al. 1999). Nach der Aktivierung zu Effektorlymphozyten können diese bei Kontakt mit ihrem Antigen auch ohne weitere kostimulatorische Signale ihre Effektorfunktionen ausüben.

1.3 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DC) nehmen als antigenpräsentierende Zellen eine essentielle Rolle in der Verknüpfung von angeborener und adaptiver Immunantwort ein. Sie entstehen im Knochenmark und werden zu den Zellen des angeborenen Immunsystems gezählt. Ihre Name ist auf ihre Morphologie zurückzuführen, da sie lange Ausläufer aufweisen, welche den Dendriten von Neuronen ähneln (Steinman et al. 1973; Steinman et al. 2006).

1.3.1 Aktivierung von dendritischen Zellen und Induktion einer Immunantwort

Die zentrale Funktion von DC ist das *Priming* von T-Zellen. Dabei bestimmen DC maßgeblich, ob gegen ein Antigen eine effiziente adaptive Immunantwort oder eine Toleranzreaktion induziert wird (Shortman et al. 2001; Steinman et al. 2002). Unreife DC halten sich im peripheren Gewebe auf, wo sie dauerhaft große Mengen an Antigen aufnehmen. Kommt es zu einer Infektion, werden die DC über PRR, Gewebeschäden oder Entzündungsmediatoren aktiviert. Während die unreifen DC nicht in der Lage sind naive T-Zellen zu aktivieren, kommt es durch die Aktivierung zur Hochregu-

lierung von MHC und kostimulatorischen Molekülen, wie B7. Zudem wandern die aktivierten DC, vermittelt durch die Expression von CCR7, vom peripheren Gewebe in den Lymphknoten (Caux et al. 2000; Banchereau et al. 2000). Dort sind sie, als reife DC, in der Lage, antigenspezifische T-Zellen zu aktivieren und damit die adaptive Immunantwort zu initiieren (Théry et al. 2001). DC, welche nicht durch die Erregererkennungsmechanismen des angeborenen Immunsystems aktiviert wurden, exprimieren hingegen keine kostimulatorischen Moleküle und induzieren bei Kontakt mit bindenden T-Zellen Anergie. Dies ist essentiell um Immunantworten gegen Eigenantigene zu verhindern (Steinman et al. 2003).

1.3.2 Antigenprozessierung

DC können auf verschiedene Arten Antigen aufnehmen, prozessieren und präsentieren. Extrazelluläre Pathogene, wie Bakterien oder lösliche Antigene werden mittels Phagozytose oder Makropinozytose in das endozytotische System aufgenommen und über MHC-II CD4-positiven Zellen präsentiert. Zytosolische Antigene, die beispielsweise von Viren stammen, die DC infizieren, werden über MHC-I CD8-positiven Zellen präsentiert. Dies sind die beiden klassischen Wege der Antigenprozessierung (Guermontprez et al. 2002). Daneben können durch den Prozess der Kreuzpräsentation (*cross-presentation*) jedoch auch extrazelluläre Antigene nach Aufnahme in das endozytäre System über MHC-I CD8-positiven Zellen präsentiert werden (Joffre et al. 2012).

1.3.3 Subtypen von dendritischen Zellen

Es werden zwei Hauptgruppen von DC unterschieden: konventionelle dendritische Zellen (cDC) sowie plasmazytoide dendritische Zellen (pDC). Ein Überblick über die Oberflächenmarker der murinen DC-Subtypen findet sich in Tabelle 1.1.

Die cDC werden wiederum in weitere Subtypen eingeteilt, deren genaue funktionelle Charakterisierung Gegenstand aktueller Forschung ist (Merad et al. 2013; Heath et al. 2009; Mildner et al. 2014). Unter den DC, welche sich dauerhaft in lymphatischen Organen aufhalten, unterscheidet man im murinen Immunsystem eine CD8⁺ CD11b⁻ von einer CD8⁻ CD11b⁺ Population. Dabei scheinen CD8⁺ cDC insbesondere für die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen und für die Kreuzpräsentation von Antigenen zuständig zu sein (Haan et al. 2000). Die Funktion der CD11b⁺ cDC ist schlechter verstanden, ihr zentrale Aufgabe ist wohl die Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen (Dudziak et al. 2007; Merad et al. 2013). In nicht-lymphatischen Organen existieren funktionell äquivalente Zellpopulationen, welche jedoch zusätzlich durch den Oberflächenmarker CD103 charakterisiert werden. Im nicht-lymphatischen Geweben unterscheidet man dabei CD11b⁻ CD103⁺ cDC, welche

äquivalent zu den CD8⁺ cDC im lymphatischen Gewebe sind (Edelson et al. 2010), von CD11b⁺ cDC. In der Lamina propria des Darm existiert zudem eine Untergruppe der CD11b⁺ cDC, welche zusätzlich CD103 exprimieren (Bogunovic et al. 2009).

Neben dieser Einteilung existiert in Lymphknoten zudem die Gruppe der *tissue-migratory dendritic cells*. Dabei handelt es sich um cDC aus nicht-lymphatischen Geweben, welche durch das Lymphsystem in den drainierenden Lymphknoten gewandert sind (Merad et al. 2013; Randolph et al. 2005). Eine weitere, unabhängige Untergruppe von cDC stellen die Langerhans-Zellen dar, welche sich in der Epidermis der Haut befinden (Merad et al. 2008).

Im Gegensatz zu cDC spielen pDC nur eine untergeordnete Rolle in der T-Zell-Aktivierung. Vielmehr zeichnen sie sich durch die Expression bestimmter PRR und die starke Produktion von Typ-I Interferonen aus und scheinen eine Bedeutung in der frühen Bekämpfung viraler Infekte zu haben (Cella et al. 1999; Reizis et al. 2011). Darüber hinaus unterstützen sie cDC bei der Aufrechterhaltung eines proinflammatorischen Phänotyps (Kuwajima et al. 2006).

		CD11c	B220	CD11b	CD8	CD103
cDC	des lymphatischen Gewebes	+	-	-	+	(+)
		+	-	+	-	-
	des nicht-lymphatischen Gewebes	+	-	-	-	+
		+	-	+	-	(+)
pDC		+	+	-	(+)	-

Tabelle 1.1: Oberflächenmarker auf DC-Subtypen, adaptiert nach Merad et al. 2013

1.4 Regulatorische T-Zellen

Regulatorische T-Zellen (T_{reg}) sind ein Subtyp von CD4⁺ T-Zellen, welche durch die Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 charakterisiert sind. Im Gegensatz zu konventionellen T-Zellen zeichnen sie sich durch eine immunsuppressive Wirkung aus und haben eine wichtige Funktion bei der Ausbildung von Toleranz gegenüber Selbst-Antigenen (Hori 2003).

Es werden zwei Subtypen von T_{reg} unterschieden, die natürlichen regulatorischen T-Zellen (nT_{reg}) und die induzierten regulatorischen T-Zellen (iT_{reg}). Dabei entstehen nT_{reg} während der T-Zell-Reifung im Thymus aus potentiell autoreaktiven T-Zellen, welche T-Zell-Rezeptoren mit einer hohen Affinität für Selbstantigene aufweisen. iT_{reg} differenzieren dagegen in der Peripherie aus naiven T-Zellen unter dem Einfluss von TGF- β und der Abwesenheit von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-6 (Chen et al. 2003; Bettelli et al. 2006; Sakaguchi et al. 2008). Beide Subtypen von T_{reg} haben immunsuppressive Eigenschaften und unterdrücken in der Peripherie die Proliferation

und Differenzierung von konventionellen T-Zellen. Für die Funktion der T_{reg} wurden zahlreiche Mechanismen beschrieben, wichtige Prinzipien sind in Abbildung 1.1 dargestellt. Zentral ist dabei die Interaktion von T_{reg} mit antigenpräsentierenden Zellen, insbesondere mit DC (Sakaguchi et al. 2009). T_{reg} konkurrieren dabei mit konventionellen T-Zellen um die Bindung an DC. Durch die Aggregation von T_{reg} um die DC wird folglich die Bindung von konventionellen T-Zellen vermindert (Onishi et al. 2008; Tadokoro et al. 2006). Zudem verhindern T_{reg} aktivierende und kostimulatorische Signale der antigenpräsentierenden Zelle an die T-Zellen. So weisen T_{reg} eine starke Expression von CTLA-4 auf, welches die kostimulatorischen Moleküle CD80/CD86 bindet (Wing et al. 2008). Des Weiteren exprimieren T_{reg} CD25, die hoch-affine α -Kette des IL-2-Rezeptors. Die Bindung von IL-2 durch T_{reg} hat zur Folge, dass weniger IL-2 zur T-Zell-Aktivierung zur Verfügung steht (Fontenot et al. 2005; Boyman et al. 2012). Ein weiterer wichtiger Mechanismus ist die Produktion von immunsuppressiven Zytokinen, wie IL-10 und TGF- β , sowie die Sekretion von zytotoxischen Granzymen und Perforinen (Asseman et al. 1999; Cao et al. 2007; Sakaguchi et al. 2009).

Durch diese Eigenschaften nehmen T_{reg} eine zentrale Rolle in der Regulation von Immunantworten ein. Auf der einen Seite tragen sie effizient zur Verhinderung von Autoimmunität bei. So führen Mutationen von FoxP3 zum IPEX-Syndrom, dem X-chromosomalen Immundysregulation-, Polyendokrinopathie-, Enteropathiesyndrom, einer schweren Autoimmunerkrankung, welche multiple Organsysteme betrifft und in der Regel früh zum Tod führt (Ochs et al. 2005). Auf anderen Seite sind T_{reg} jedoch auch an einer unzureichenden Immunantwort gegen Tumore beteiligt (Nishikawa et al. 2010).

1.5 Zytokine

Zytokine sind eine heterogene Gruppe kleiner Signalproteine, welche eine zentrale Rolle in der interzellulären Kommunikation einnehmen und unter anderem Wachstum, Differenzierung und Migration von Immunzellen und anderen Körperzellen steuern. Sie werden von einer Vielzahl von Zellen produziert. Sie binden an spezifische Zytokinrezeptoren und wirken autokrin, also auf die produzierende Zelle selbst, parakrin, auf benachbarte Zellen und selten endokrin, über den Blutweg auf weiter entfernte Zellen (Murphy et al. 2017). Einzelne Zytokine weisen ein weites Spektrum an biologischen Funktionen auf. Daneben können bestimmte Effekte in der Regel durch verschiedene Zytokine erzielt werden, das System ist also durch eine ausgeprägte Redundanz gekennzeichnet (Kishimoto et al. 1994).

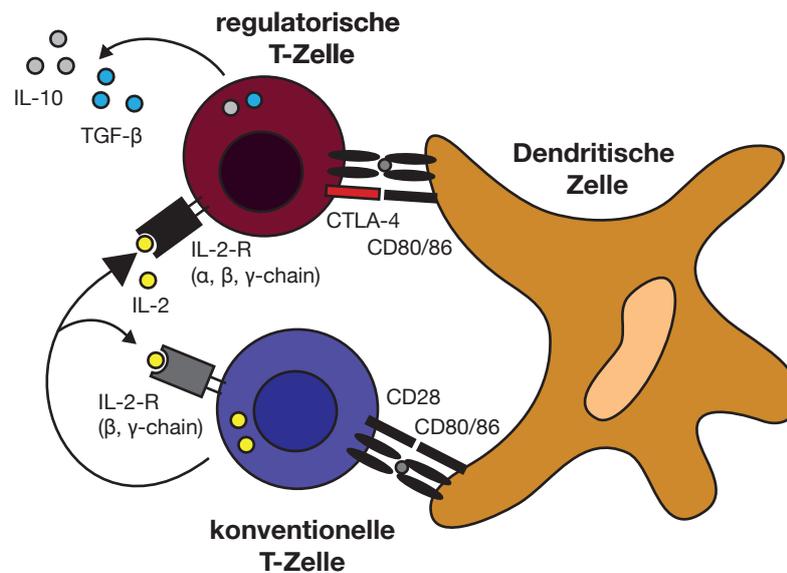


Abbildung 1.1: Zentrale Mechanismen der Suppression von konventionellen T-Zellen durch T_{reg} : (i) Kontakt mit dendritischen Zellen, (ii) Expression von CTLA-4, welches die kostimulatorischen Moleküle CD80/CD86 bindet, (iii) Expression der α -Kette des IL-2-Rezeptors (IL-2-R), welcher hoch-affin IL-2 bindet, (iv) Produktion immunsuppressiver Zytokine, wie IL-10 und TGF- β .

Zytokine lassen sich in fünf Hauptgruppen einteilen: Interleukine, Interferone, koloniestimulierende Faktoren, Tumornekrosefaktoren und Chemokine (chemotaktische Zytokine, siehe Abschnitt 1.6). Beispiele für Interleukine sind IL-1 α und IL-1 β , die eine Rolle in der Entstehung von Fieber, sowie dem Ablauf verschiedener Immunantworten spielen (Dinarello 2009), IL-2, welches eine T-Zell-Proliferation und -Differenzierung bewirkt (Boyman et al. 2012), das Akute-Phase-Protein IL-6 oder das immunsuppressive IL-10. Dabei werden einige Interleukine anhand von strukturellen Ähnlichkeiten in verschiedene Familien gruppiert, die häufig auch funktionelle Ähnlichkeiten aufweisen. So werden beispielsweise elf Zytokine, darunter IL-1 α , IL-1 β und IL-18 zur IL-1-Familie zusammengefasst (Dinarello 2013).

Zu den Interferonen gehören zum einen die antiviral wirksamen Typ-I Interferone IFN- α und IFN- β , sowie das Makrophagen-aktivierende IFN- γ (McNab et al. 2015). Einer der am längsten bekannten Tumornekrosefaktoren ist das Akute-Phase-Protein TNF- α .

Koloniestimulierende Faktoren (CSF, engl. *colony-stimulating factor*), sind Wachstumsfaktoren, welche Wachstum, Differenzierung und Aktivität von hämatopoetischen Zellen stimulieren. Wichtige Vertreter sind dabei der Granulozyten-stimulierende G-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor*), der Makrophagen-stimulierende M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*), sowie GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), welcher die myelomonozytäre Zellreihe und

insbesondere DC stimuliert (Metcalf 1986; Laar et al. 2012).

1.6 Chemokine

Für den Ablauf einer adäquaten Immunreaktion ist das komplexe Zusammenspiel vieler Immunzellen nötig, welche zur richtigen Zeit am richtigen Ort sein müssen. So müssen Immunzellen während der Lymphozytenentwicklung, der Immunhomöostase, der Ausbildung einer Immunantwort, sowie der Rekrutierung zum Ort der Entzündung kontinuierlich Wanderungsbewegungen durchführen. Die Migration und gezielte Positionierung von Immunzellen wird insbesondere durch Chemokine gesteuert (Griffith et al. 2014).

Chemokine sind eine Gruppe kleiner Signalproteine, die chemotaktische Eigenschaften aufweisen. Sie können von einer Vielzahl von Zellen sezerniert werden und binden klassischerweise an G-Protein-gekoppelte Chemokinrezeptoren. Die Bindung führt auf der Zielzelle zu Veränderungen der zellulären Adhäsionsmoleküle und des zellulären Zytoskeletts und damit zur gerichteten Migration entlang des Konzentrationsgradienten des Chemokins (Johnston et al. 2002).

Die Chemokine werden in vier Hauptfamilie unterteilt: Die CC-, CXC-, CX3C- und XC-Familie. Diese Unterteilung erfolgt anhand der Position und Zahl der N-terminalen Zysteinreste in der Aminosäurekette. CC-Chemokine weisen am N-Terminus zwei unmittelbar benachbarte Zysteine auf, bei den CXC-Chemokinen werden die beiden Zysteine von einem Aminosäurerest, bei den CX3C-Chemokinen von drei Aminosäurereste getrennt. XC-Chemokine weisen N-terminal lediglich einen Zysteinrest auf. In der systematischen Nomenklatur werden die Chemokine, also die Liganden, mit dem Buchstaben L gekennzeichnet, die Chemokinrezeptoren mit dem Buchstaben R. Dabei können verschiedene Chemokine an verschiedene Rezeptoren binden. Beispielsweise binden die beiden Chemokine CCL17 und CCL22 an den Rezeptor CCR4 (Charo et al. 2006; Mantovani 1999).

1.6.1 Das Chemokin CCL22

Das Chemokin CCL22 wurde Ende der 1990er-Jahre erstmals von Godiska et al. aus humanen Makrophagen isoliert und ursprünglich als *macrophage-derived chemokine* (MDC) bezeichnet (Godiska et al. 1997). Ein Jahr später erfolgte die Erstbeschreibung des analogen murinen Proteins, dessen Aminosäuresequenz zu 83 % mit dem humanen Protein übereinstimmt (Schaniel et al. 1998).

CCL22 wird insbesondere in lymphatischen Organen wie Thymus, Lymphknoten und Milz exprimiert, zu geringeren Mengen auch in Darm und Lunge (Godiska et al. 1997; Schaniel et al. 1998;

Chang et al. 1997). Der wichtigste Produzent von CCL22 sind DC (Tang et al. 1999; Vulcano et al. 2001). Daneben wurde eine Produktion durch Makrophagen (Godiska et al. 1997), aktivierte B-Zellen (Schaniel et al. 1998), aktivierte T-Zellen (Iellem et al. 2000) und NK-Zellen (Andrew et al. 1998), sowie durch medulläre Epithelzellen des Thymus (Chantry et al. 1999), Epithelzellen des Darms (Berin et al. 2001) und Keratinozyten (Fujii-Maeda et al. 2004) beschrieben.

Neben einer homöostatischen Produktion kann die Expression von CCL22 durch verschiedene Stimuli reguliert werden. Beispielsweise wird die Produktion durch pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 und TNF- α und mikrobiellen Produkte wie LPS (Rodenburg et al. 1998; Vulcano et al. 2001) stimuliert. So führt auch die Ausreifung von DC zur starken Steigerung der CCL22-Produktion (Vulcano et al. 2001; Sallusto et al. 1999). Daneben wird die Produktion von CCL22 durch T_{H2}-assoziierten Zytokinen wie IL-4 und IL-13 stimuliert, inhibierend wirkt beispielsweise Interferon- γ (Bonecchi et al. 1998b).

Der einzige bekannte Rezeptor für CCL22 ist CCR4, so dass CCL22 die Migration von CCR4-exprimierenden Zellen bewirkt. Neben CCL22 bindet CCR4 zudem das Chemokin CCL17 (Imai et al. 1998). CCR4 wird vorrangig von bestimmten Subtypen von T-Zellen exprimiert, darunter insbesondere T_{H2}-Zellen (Bonecchi et al. 1998a), T_{reg} (Iellem et al. 2001), Haut-spezifischen T-Zellen, sogenannten *skin-homing*-Lymphozyten (Soler et al. 2003), aber auch T_{H17}-Zellen (Lim et al. 2008). Iellem et al. konnten zeigen, dass CCL22 eine potente Migration von T_{reg} bewirkt und stellten die Hypothese auf, dass es als „regulatorisches Chemokin“ zur Kontrolle von überschießender Immunität beitragen könnte (Iellem et al. 2001).

Durch die Wirkung auf die oben beschriebenen T-Zell-Subtypen wird die Rolle von CCL22 in verschiedenen Erkrankungen diskutiert. So konnten beispielsweise erhöhte CCL22-Level bei verschiedenen T_{H2}-assoziierten, allergischen Erkrankungen, wie atopischer Dermatitis (Kakinuma et al. 2002), Asthma (Yang et al. 2017) oder allergischer Rhinitis (Campbell et al. 2002) nachgewiesen werden. Die Rekrutierung von T_{reg} könnte auf der einen Seite zur Aufrechterhaltung von Immuntoleranz und der Verhinderung von Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantation (Lee et al. 2005), auf der anderen Seite zur Ausbildung eines immunsuppressiven Tumormilieus beitragen.

1.7 Tumormimmunologie

Jeder maligne Tumor geht aus einer einzelnen Zelle hervor, welche durch die progressive Anhäufung von Mutation von einer normalen Zelle zu einer maligne entarteten Tumorzelle transformiert.

Neben der Bekämpfung von Infektionen ist es eine Aufgabe des Immunsystems, entartete Zellen zu erkennen und zu eliminieren. Die Hypothese der *immune surveillance* wurde in den 1950er Jahren von Burnet und Thomas aufgestellt und seither kontinuierlich weiterentwickelt (Burnet 1957). Mittlerweile geht man von drei Phasen der *immune surveillance* aus. In einer ersten Phase, der *elimination phase*, wird eine Tumorzelle durch verschiedene Typen von Immunzellen, wie T-Zellen und NK-Zellen, erfolgreich erkannt und beseitigt. In der zweiten Phase, der *equilibrium phase* kommt es dadurch jedoch zu einem Selektionsdruck, welche die Entstehung von immunresistenten Varianten begünstigt. In der dritten Phase, der *escape phase*, hat der entartete Tumor schließlich genügend Mutationen angehäuft, um der Kontrolle durch das Immunsystem zu entgehen. In der Folge kann der Tumor progressiv wachsen und wird klinisch apparent (Dunn et al. 2004).

Es wurde eine Vielzahl von Mechanismen beschrieben, welche von Tumoren genutzt werden, um der Kontrolle durch das Immunsystem zu entgehen (Schreiber et al. 2011; Drake et al. 2006; Gajewski et al. 2013; Murphy et al. 2017). Einige Tumore weisen zunächst eine geringe Immunogenität auf, da sie anfangs oft keine tumorspezifischen Antigene exprimieren, welche von dem Immunsystem als fremd erkannt werden können. Zudem können eine reduzierte Antigenpräsentation über MHC-I oder fehlende kostimulatorische Signale zu einer ungenügenden Stimulation von T-Zellen führen (Koopman et al. 2000; Cabrera et al. 1996; Dong et al. 2002). Darüber hinaus können Tumore durch die Sekretion von Stoffen wie Kollagen eine mechanische Barriere schaffen um sich vor einer ausreichenden Infiltration durch Immunzellen zu schützen (Salmon et al. 2012). Schließlich generieren viele Tumore ein immunsuppressives Mikromilieu, welches die ausreichende Bekämpfung des Tumors durch das Immunsystem unterdrückt (Rabinovich et al. 2007).

Die Bestandteile des immunsuppressiven Mikromilieus sind vielfältig. Einige Tumore sezernieren immunsuppressive Zytokine, wie TGF- β (Wrzesinski et al. 2007) oder produzieren das Enzym Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO), welches die Produktion des immunsuppressiven Kynurenin katabolisiert (Uyttenhove et al. 2003). Diese Faktoren hemmen die Funktion von T-Zellen, TGF- β induziert zudem T_{reg}. Daneben exprimieren manche Tumore Proteine auf ihrer Zelloberfläche wie PD-L1, das den inhibitorischen Rezeptor PD-1 auf aktivierten T-Zellen bindet (Blank et al. 2004). Schließlich tragen verschiedene suppressive Immunzellpopulationen, wie MDSC (*myeloid-derived suppressor cells*), Tumor-assoziierte Makrophagen und T_{reg}, zum immunsuppressiven Tumormilieu bei (Movahedi et al. 2008; Noy et al. 2014).

T_{reg} nehmen eine essentielle Rolle im immunsuppressiven Tumormilieu ein, wo sie tumorspezifische Effektor-T-Zellen unterdrücken. So konnten erhöhte Zahlen von T_{reg} in einer Vielzahl an

humanen Tumorentitäten nachgewiesen werden, wie zum Beispiel in verschiedenen gastrointestinalen Tumoren, Pankreas-, Leber-, Lungen- und Brustkrebs, sowie im malignen Melanom. In manchen Tumorentitäten, wie dem Ovarial-, Magen- und Mammakarzinom, ist ein erhöhter Anteil an T_{reg} an den tumorinfiltrierenden Lymphozyten zudem mit einer schlechteren Prognose verbunden (Nishikawa et al. 2010). In Mausmodellen konnte zudem gezeigt werden, dass eine Depletion von $CD25^+ T_{reg}$ zu einer verstärkten Abstoßung von Tumoren führte (Onizuka et al. 1999). Auch beim Menschen ist die Depletion von T_{reg} für die Tumorthherapie relevant. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass die Funktion des Anti-CTLA-4-Antikörpers Ipilimumab, welcher als Checkpoint-Inhibitor zur Therapie des malignen Melanoms zugelassen ist, sich unter anderem durch die Depletion von CTLA-4-exprimierenden T_{reg} erklären lässt (Nishikawa et al. 2014).

Die Migration von T_{reg} in den Tumor wird von Chemokinen vermittelt. Curiel et al. zeigten 2004 erstmals am Beispiel des Ovarialkarzinoms, dass die Akkumulation von CCR4-exprimierenden T_{reg} im Tumorgewebe durch CCL22 vermittelt wird (Curiel et al. 2004). Inzwischen konnten in verschiedenen Tumorentitäten hohe CCL22-Konzentrationen nachgewiesen werden, beispielsweise im Magenkarzinom (Wu et al. 2018; Mizukami et al. 2008), im Mammakarzinom (Faget et al. 2011; Gobert et al. 2009), sowie bei hämatologischen Neoplasien (Ishida et al. 2006).

1.8 Fragestellung

Tumore nutzen eine Vielfalt von Mechanismen, um eine effektive antitumorale Immunantwort zu unterdrücken. Dabei spielt die intratumorale Akkumulation von immunsuppressiven T_{reg} eine wichtige Rolle. Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass die Migration von T_{reg} in den Tumor durch das Chemokin CCL22 vermittelt werden kann. CCL22 ist in einer Vielzahl von Tumorentitäten exprimiert und stellt ein potentiell Ziel antitumoraler Immuntherapie dar (Curiel et al. 2004; Gobert et al. 2009; Anz et al. 2015). Es ist daher essentiell, zu verstehen, wie genau es im Tumorgewebe zu einer Induktion von CCL22 kommt. Während *in vitro* die Induktion von CCL22 durch verschiedene Zytokine nachgewiesen wurde, ist über die genauen Mechanismen der intratumoralen CCL22-Induktion wenig bekannt.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte die intratumorale CCL22-Induktion durch zwei Zytokine, IL-1 und GM-CSF, untersucht werden. IL-1 ist ein Zytokin, welches im tumoralen Immunmilieu enthalten ist (Mantovani et al. 2018) und *in vitro* CCL22 induzieren kann (Rodenburg et al. 1998). Es sollte analysiert werden, ob IL-1 von Tumorzelllinien exprimiert wird und diese CCL22 induzieren können. Weiter sollte untersucht werden, ob sich durch eine Reduktion des intratumoralen

IL-1 *in vitro* und *in vivo* die CCL22-Produktion beeinflussen lässt. GM-CSF ist ein Zytokin, das auf der einen Seite wegen seiner immunstimulierende Effekte in der antitumoralen Immuntherapie erprobt wird, auf der anderen Seite jedoch auch immunregulatorische Eigenschaften aufweist (Bhattacharya et al. 2015). Es sollte untersucht werden, ob GM-CSF die CCL22-Ausschüttung stimulieren kann und ob in Folge die Sekretion von GM-CSF durch Tumore zu einer gesteigerten CCL22-Produktion führen kann.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte die Funktion von CCL22 in dendritischen Zellen (DC) genauer analysiert werden. DC nehmen eine zentrale Rolle im Immunsystem ein und tragen maßgeblich dazu bei, ob eine Immunantwort oder eine Toleranzreaktion ausgelöst wird (Banchereau et al. 2000; Steinman et al. 2002). Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass das Fehlen von CCL22 in DC zu einem immunstimulierenden Phänotyp führt. Eine Vakzinierung von Mäusen mit Ovalbumin-beladenen, CCL22-defizienten DC führte dabei zu einer deutlich stärkeren Impfantwort als die Vakzinierung mit CCL22-exprimierenden DC (Rapp et al. 2019). Ziel dieser Arbeit war es die CCL22-defizienten DC genauer zu charakterisieren, um mögliche Mechanismen für den beobachteten Phänotyp zu identifizieren. Insbesondere sollten dafür wichtige Funktionen von DC untersucht werden, wie Antigenprozessierung und -präsentation, Verhalten *in vivo*, sowie Anlockung von T_{reg}. Weiterhin sollte untersucht werden, welche Subtypen von DC CCL22 exprimieren.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

CO ₂ -Inkubator (BD6220)	Heraeus, ThermoFisherScientific (Waltham, USA)
FACS Aria	BD Biosciences (New Jersey, USA)
FACS Canto II	BD Biosciences (New Jersey, USA)
FACS LSRFortessa	BD Biosciences (New Jersey, USA)
Lichtmikroskope PrimoVert, Axiovert 25 und Axiovert 40	Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
MACS-Magnete MiniMACS, QuadroMACS	Miltenyi (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Minizentrifuge Sprout	Biozym (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
Mithras LB940 Multilable plate reader	Berthold Technologies (Bad Wildbad, Deutschland)
Multifuge 3L-R, X3R und 4KR	Heraeus, ThermoFischerScientific (Massachusetts, USA)
Mr. Frosty™ Kryobehälter	ThermoFisherScientific (Waltham, USA)
Nanodrop 2000c Spectrophotometer	ThermoFisherScientific (Waltham, USA)
Neubauerzählkammer Improved	Assistent® Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG (Sondheim/Rhön, Deutschland)
Schüttler Shaker DOS-10L	NeoLAB (Heidelberg, Deutschland)
Sterilbank (Flow) HeraSafe KS	ThermoFisherScientific (Waltham, USA)
pH-Meter	WTW (Weilheim, Deutschland)
T3 Thermocycler	Biometra (Göttingen, Deutschland)

Thermomixer compact	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Ultrazentrifuge (Optima max-xp)	Beckmann Coulter (California, USA)
Vortexer Vortex Genie 2TM	Scientific Industries (New York, USA)
Vortexer VF2	Janke & Kunkel KG (Staufen, Deutschland)
Waagen Kern KB und ALJ	Kern & Sohn GmbH (Balingen, Deutschland)
Wärme- und Trockenschrank Heraeus	ThermoFisherScientific (Waltham, USA)
Rollenmischer CAT RM 5	Karl Hecht KG (Sondheim, Deutschland)
Zentrifuge Rotina 420R	Hettich GmbH (Tuttlingen, Deutschland)
Zentrifuge Heraeus Pico17 und Fresco17	ThermoFisherScientific (Waltham, USA)
Zentrifuge 5415R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

MACS-Säulen MS, LS, LD	Miltenyi (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Transwellplatten (Polycarbonat Membran 3 µm Porengröße)	Corning (Corning, USA)
Zellsiebe MACS Smartstrainers 30 µm, 70 µm, 100 µm	Miltenyi (Bergisch Gladbach, Deutschland)

Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur wurden von Corning (Corning, USA), Greiner (Frickenhäusen, Deutschland), Eppendorf (Hamburg, Deutschland) und Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) bezogen, Zellscraper bei Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland), ELISA Mikrotiterplatten bei Corning (Corning, USA), Mikrotiterplatten für qRT-PCR bei Biozym Scientific (Hessisch Oldendorf, Deutschland), Spritzen und Kanülen bei Becton, Dickson & Company (Drogheda, Irland).

2.1.3 Chemikalien, Enzyme und Reagenzien

Anakinra Kineret® 100 mg/0,67 ml	Sobi (Stockholm, Schweden)
BD Pharm Lyse Lysepuffer	BD Biosciences (San Diego, CA, USA)
Biocoll Trennlösung (1,077 g/ml)	Biochrom (Berlin, Deutschland)
Bovines Serumalbumin (BSA), Albumin Fraktion V	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Chloroform/Trichlormethanol	Roth (Karlsruhe, Deutschland)

DNAse I (Deoxyribonuklease I von bovinem Pankreas)	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Easycoll Trennlösung (Dichte 1,124 g/ml)	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol 100 %	Apotheke Innenstadt, LMU München
Ethanol absolut, AnalaR Normapur	VWR Chemicals (Fontenay-sous-Bois, Frankreich)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Flüssiger Stickstoff	Linde AG (Pullach, Deutschland)
Heparin-Natrium 25.000 IE/5 ml	Ratiopharm (Ulm, Deutschland)
Imject Alum Adjuvant	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Isofluran	CP-Pharma (Burgdorf, Deutschland)
Isopropanol 100 %	Apotheke Innenstadt, LMU München
Iso-(2)-Propanol absolut, EMSURE	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Kollagenase-D (von Clostridium histolyticum)	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
NaCl 0,9 %, Spüllösung	Baxter (Unterschleißheim, Deutschland)
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natronlauge (NaOH) 1 N	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ovalbumin (Albumin from chicken egg)	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Ovalbumin OVA257-264 Peptid (SIINFEKL)	Invitrogen (Toulouse, Frankreich)
Paraformaldehyd (PFA)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Phosphate Buffered Saline (PBS), steril	Lonza (Basel, Schweiz)
PBS Dulbecco, Pulver	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
Polybren	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Nuklease-freies Wasser	Promega (Madison, WI, USA)
Salzsäure (HCl) 1 N	Apotheke Innenstadt, LMU München
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄) 2 N	Apotheke Innenstadt, LMU München
Tris	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Trypanblau	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Tween 20	Roth (Karlsruhe, Deutschland)

2.1.4 Rekombinante Zytokine, Chemokine und TLR-Agonisten

Murines IL-4	Peprtech (Hamburg, Deutschland)
--------------	---------------------------------

Murines GM-CSF	Peprotech (Hamburg, Deutschland) oder Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
CpG oligonucleotide ODN 1826	InvivoGen (Toulouse, Frankreich)

2.1.5 siRNA

IL1A (ID 3552) Trilencer-27 Human siRNA	Origene (Rockville, USA)
Il1a (ID 16175) Trilencer-27 Mouse siRNA	Origene (Rockville, USA)
Il1b (ID 16176) Trilencer-27 Mouse siRNA	Origene (Rockville, USA)

2.1.6 Reagenzienansätze

2.1.6.1 Organlysate und Bradford-Assay

DC™ Protein Assay	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)
Bio-Plex Cell Lysis Kit	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)

2.1.6.2 Transfektionsreagenzien

GeneJuice® Transfection Reagent	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Lipofectamine® RNAiMAX Transfection Reagent	ThermoFisherScientific (Waltham, USA)

2.1.6.3 RNA-Isolation, cDNA-Synthese und qRT-PCR

KAPA PROBE FAST qPCR Master Mix (2X) Universal	Kapa Biosystems, Inc. (Wilmington, USA)
peqGOLD TriFast™	Peqlab, VWR International GmbH (Erlangen, Deutschland)
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	ThermoFisherScientific (Waltham, USA)

2.1.6.4 ELISA-Kits und Reagenzien

Human CCL22/MDC DuoSet®	R&D Systems (Minneapolis, USA)
-------------------------	--------------------------------

Mouse CCL22/MDC DuoSet®	R&D Systems (Minneapolis, USA)
Mouse GM-CSF ELISA MAX™	BioLegend (San Diego, USA)
Mouse IFN-γ ELISA MAX™	BioLegend (San Diego, USA)
TMB Substrate Reagent Set	BD Bioscience (San Diego, CA, USA)

2.1.6.5 Zellseparationskits

CD11c MicroBeads mouse	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
------------------------	--

2.1.7 Materialien für Durchflusszytometrie

Propidium-Iodid (PI)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Zombie Aqua™ Fixable Viability	BioLegend (San Diego, USA)
CountBright™ Absolute Counting Beads	Life Technologies (Eugene, USA)
FACSFlow, FACSSafe, FACSClean	BD Biosciences (San Jose, CA, USA)
Foxp3 Staining Buffer Set	eBioscience (San Diego, USA)
CFSE Cell Division Tracker Kit	BioLegend (San Diego, USA)
Cell Proliferation Dye eFluor® 450	eBioscience (San Diego, USA)

2.1.7.1 FACS Antikörper

FACS Antikörper wurden von BioLegend (San Diego, USA), eBioscience (San Diego, USA) oder BD Bioscience (San Jose, CA, USA) bezogen.

Antigen	Klon	Verwendete Fluorochrome	Hersteller
CD3	145-2C11	PE, APC, PE/Cy7	BioLegend
	17A2	FITC	BioLegend
CD4	RM4-5	FITC	BioLegend
	GK1.5	PE, Pacific Blue, APC/Cy7	BioLegend
CD8	53-6.7	FITC, APC, PerCP, APC/Cy7, PE	BioLegend
CD11c	N418	APC, FITC, PerCP	BioLegend
CD80	16-10A1	PE, APC	BioLegend
CD86	GL-1	PE, FITC	BioLegend

FoxP3	MF-14	PE, Pacific Blue	BioLegend
	FJK-16s	eFluor 450, PE	eBioscience
CD103	2E7	FITC, APC	BioLegend
B220/CD45R	RA3-6B2	PE/Cy, Pacific Blue	BioLegend
	16A	FITC	BD Bioscience
I-Ab (MHC-II)	AF6-120.1	FITC	BioLegend

2.1.8 Primer und Sonden

Für qRT-PCR-Analysen wurden Primer von Metabion (Martinsried, Deutschland) und Eurofins (Ebersberg, Deutschland) bezogen, Sonden der *Universal Probe Library* (UPL) von Roche (Mannheim, Deutschland).

2.1.8.1 Primer und Sonden für murine Proben

Gen	Primer	UPL Sonde
β-Actin	forward: 5' CTA AGG CCA ACC GTG AAA AG 3'	64
	reverse: 5' ACC AGA GGC ATA CAG GGA CA 3'	
IL-1α	forward: 5' TTG GTT AAA TGA CCT GCA ACA 3'	52
	reverse: 5' GAG CGC TCA CGA ACA GTT G 3'	
IL-1β	forward: 5' AGT TGA CGG ACC CCA AAA G 3'	38
	reverse: 5' AGC TGG ATG CTC TCA TCA GG 3'	
CCL22	forward: 5' TCT TGC TGT GGC AAT TCA GA 3'	74
	reverse: 5' GCA GAG GGT GAC GGA TGT AG 3'	

2.1.8.2 Primer und Sonden für humane Proben

Gen	Primer	UPL Sonde
β-Actin	forward: 5' CCA ACC GCG AGA AGA TGA 3'	64
	reverse: 5' CCA GAG GCG TAC AGG GAT AG 3'	
IL-1α	forward: 5' GGT TGA GTT TAA GCC AAT CCA 3'	6
	reverse: 5' TGC TGA CCT AGG CTT GAT GA 3'	
IL-1β	forward: 5' TAC CTG TCC TGC GTG TTG AA 3'	78
	reverse: 5' TCT TTG GGT AAT TTT TGG GAT CT 3'	

2.1.9 Zelllinien

Zelllinie	Zellart (Hintergrund)	Herkunft
4T1	Murine Mammakarzinom-Zelllinie (BALB/c)	ATCC (Manassas, VA, USA)
CT26	Murine Kolonkarzinom-Zelllinie (BALB/c)	ATCC (Manassas, VA, USA)
HEK293T	Humane embryonale Nierenzelllinie	ATCC (Manassas, VA, USA)
Hepa 1-6	Murine Hepatom-Zelllinie (C57L)	Mike Helms, Sanofi-Aventis (Frankfurt, Deutschland)
PaTu-8988T	Humane Pankreaskarzinom-Zelllinie	Prof. Michl (Marburg, Deutschland)

2.1.10 Materialien für die Zellkultur

DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)	Lonza (Basel, Schweiz)
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco, Life Technologies (Grand Island, NY, USA)
L-Glutamin 200 mM	Lonza (Basel, Schweiz)
MEM Non-essential amino acids (NEAA, 100 x)	Gibco, Life Technologies (Grand Island, NY, USA)
MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit	Lonza (Basel, Schweiz)
Natrium-Pyruvat	Biochrom (Berlin, Deutschland)
Opti-MEM	Gibco, Life Technologies (Grand Island, NY, USA)
Penicillin/Streptomycin (100 x)	Lonza (Basel, Schweiz)
Plasmocure™	InvivoGen (San Diego, USA)
Puromycin	InvivoGen (San Diego, USA)
RPMI 1640 (Roswell Park Memory Institute)	Lonza (Basel, Schweiz)
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Trypsin (10 x)	Lonza (Basel, Schweiz)
VLE (Very Low Endotoxin) RPMI	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
Ziegenserum (Normal goat serum)	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)

2.1.10.1 Zellkultur-Medien

DMEM-Vollmedium

in DMEM: 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin

Medium für dendritische Zellen (DC-Medium)

in RPMI: 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin

Kryomedium

in FCS: 10 % DMSO

T-Zell-Medium

in RPMI: 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin,
1 mM Natrium-Pyruvat, 1 % MEM NEAA

Proliferation-Assay-Medium

in VLE RPMI: 10 % FCS, 2 mM L-Glutamine, 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin,
1 mM Natrium-Pyruvat, 1 % MEM NEAA, 50 µm 2-Mercaptoethanol

2.1.11 Puffer

ELISA-Coating-Buffer (für BioLegend ELISA)

8,4 g NaHCO₃, 3,56 g Na₂CO₃, in H₂O; pH 9,5

ELISA-Verdünnungspuffer

1 % BSA in PBS oder 10 % FCS in PBS

ELISA-Waschpuffer

0,05 % Tween 20 in PBS; pH 7,2 bis 7,4

Erylyse-Puffer

10 % BD Pharm Lyse in in H₂O

Kollagenase-DNAse

in RPMI 1640: 1 mg/ml Kollagenase-D, 0,05 mg/ml DNAse I

MACS-Puffer

2 mM EDTA, 0,5 % BSA in PBS

Puffer zum Fixieren von FACS-Färbungen

1 % PFA (Paraformaldehyd) in PBS

TEN-Puffer

Tris 50 mM, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM in H₂O, pH 7,4

Die angegebenen pH-Werte wurden mit NaOH und HCl am pH-Meter eingestellt.

2.1.12 Software

Adobe Creative Suite	Adobe Systems (San Jose, USA)
FlowJo	Tree Star (Ashland OR, USA)
GraphPad Prism®	GraphPad Software, Inc. (La Jolla, USA)
Microsoft Office	Microsoft (Redmond, USA)
Sublime Text	Sublime HQ Pty Ltd (Sydney, Australien)

2.2 Tierexperimentelle Methoden**2.2.1 Mäuse**

Zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns waren die weiblichen und männlichen Versuchstiere sechs Wochen bis sechs Monate alt. Die Versuche wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt. C57BL/6 und BALB/c Wildtyp-Mäuse (WT) wurden von Janvier (Genest Saint Isle, Frankreich) bezogen. CCL22-*Knockout*-Mäusen (CCL22-KO) kamen aus der eigenen Zucht und wurden ursprünglich über das *Knockout-Mouse*-Projekt des *National Institute of Health* bestellt (Rapp 2013). OT1-Mäuse wurden freundlicherweise von Prof. Endres, PD Kobold (Abteilung für Klinische Pharmakologie, München) zur Verfügung gestellt. Die CCL22-KO- und OT1-Mäuse wiesen einen BL/6-Hintergrund auf.

2.2.2 Entnahme von Organen

Die Tötung der Mäuse erfolgte durch zervikale Dislokation unter Isoflurananästhesie oder durch Begasung mit hochprozentigem CO₂. Nach Desinfektion des Bauchfells mit Ethanol wurden je nach Versuchsziel Milz, periphere (brachiale, axilläre, inguinale) und mesenterische Lymphknoten, oder Femur und Tibia entnommen. Zur Entnahme von Femur und Tibia wurde das Fell vom Bein abpräpariert, Muskulatur, Bänder und Bindegewebe entfernt und die Knochen an Hüft-, Knie- und

Sprunggelenk luxiert.

Organe, aus denen im Folgenden Einzelzellsuspensionen hergestellt werden sollten, wurden in PBS auf Eis gelagert. Proben für Organlysate wurden in Alufolie in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80° gelagert.

2.2.3 Herstellung von Einzelzellsuspensionen

2.2.3.1 Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus der Milz

Zur Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus einer Milz wurde diese in eine Petrischale gelegt, mit einer Pinzette fixiert und durch mehrfaches Einstechen mit einer Spritze mit 5 bis 10 ml T-Zell-Medium oder PBS (supplementiert mit FCS) gespült. Die Spüllösung wurde daraufhin durch ein Zellsieb mit $30\ \mu\text{m}$ Porengröße gegeben, die gespülte Milz durch selbiges Sieb mit einem Spritzenstempel gedrückt und das Sieb ausgiebig mit PBS oder 0,9 % NaCl-Lösung gespült. Nach einer Zentrifugation (400 g, 5 bis 10 Minuten, 4°) wurde zur Lyse der Erythrozyten 3 ml hypotoner Erylyse-Puffer hinzugegeben, 3 Minuten inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 40 ml PBS oder 0,9 % NaCl-Lösung abgestoppt. Nach erneuter Zentrifugation, wurden die isolierten Splenocyten in ein geeignetes Medium oder Puffer aufgenommen.

2.2.3.2 Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus Lymphknoten

Hierfür wurden die Lymphknoten mit einem Spritzenstempel durch ein Zellsieb mit $30\ \mu\text{m}$ Porengröße gedrückt, das Sieb mit PBS oder 0,9 % NaCl-Lösung gespült und die isolierten Zellen nach einer Zentrifugation (400 g, 5 bis 10 Minuten, 4°) in ein geeignetes Medium oder Puffer aufgenommen.

2.2.4 Generieren von dendritischen Zellen aus Knochenmark

Die Herstellung von dendritischen Zellen aus dem Knochenmark, sogenannten *bone marrow-derived dendritic cells* (BMDC), erfolgte durch Differenzierung von isolierten Knochenmark-Zellen mit GM-CSF und IL-4. Hierfür wurden Femur und Tibia entnommen, mit einem Skalpell die Knochenepiphysen entfernt und die so eröffnete Markhöhle mit einer Spritze (27 G Kanüle) mit DC-Medium gespült. Knochenmark und Medium wurden zur Entfernung von Knochenresten durch ein Zellsieb mit $30\ \mu\text{m}$ Porengröße gegeben, das Sieb im Anschluss mit Medium gespült. Nach einer Zentrifugation (400 g, 5 bis 10 Minuten, 4°) wurde zur Lyse der Erythrozyten 3 ml hypotoner Erylyse-Puffer hinzugegeben, nach 3-minütiger Inkubation die Reaktion durch Zugabe von 40 ml

PBS oder 0,9 % NaCl-Lösung abgestoppt und erneut zentrifugiert. Die isolierten Knochenmarkzellen wurden daraufhin in DC-Medium, supplementiert mit 20 ng/ml GM-CSF und 20 ng/ml IL-4, aufgenommen (4 bis 10×10^6 Zellen pro 10 ml Medium) und für 7 Tage in 10 cm-Schalen oder Zellkulturflaschen im Brutschrank inkubiert. Innerhalb dieser Zeit wurde ein- bis zweimal frisches Medium hinzugegeben. Nach Abschluss der Inkubationszeit wurden adhärenente BMDC mit Hilfe eines Zellscrapers vom Schalen- oder Flaschenboden gelöst und gemeinsam mit den Suspensionszellen für weitere Versuche verwendet. Die Differenzierung zu BMDC wurde durchflusszytometrisch durch Färbung von CD11c überprüft. Bei der weiteren Kultur der BMDC wurde dem Medium weiterhin 20 ng/ml GM-CSF und 20 ng/ml IL-4 zugefügt.

2.2.5 Organlysate und Bestimmung der Proteinkonzentration

Organe wurden mit flüssigem Stickstoff gefroren und in einem Mörserschälchen zu einem feinen Pulver verarbeitet. Nach Zugabe von 25 bis 150 μ l Bio-Plex Lyse Puffer, wurden die Proben 30 Sekunden gevortext, 15 Minuten auf Eis inkubiert, abermals 30 Sekunden gevortext, 15 Minuten bei 4° und 10.000 bis 15.000 g abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Lysate bis zur weiteren Verwendung bei -80° eingefroren.

Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration in den Organlysaten erfolgte mit dem kolorimetrischen DC™ Protein Assay, welcher der Proteinbestimmung nach Lowry ähnelt. Die Reaktion verläuft in zwei Schritten. Zunächst werden unter alkalischem pH die Peptidbindungen des Proteins mit Kupfer-(II)-Ionen komplexiert, wodurch in einem zweiten Schritt das gelbe Folin zu einem blau-gefärbten Produkt reduziert wird (Peterson 1979). Für den Assay wurden 6 μ l Probe oder Standard und 25 μ l A*-Lösung in eine Mikrotiterplatte gegeben, im Anschluss 200 μ l B-Lösung zugegeben. Nach circa 15 Minuten Inkubationszeit konnte nun die optische Dichte des Farbumschlags mit Hilfe des Multilable Plate Readers bei 750 nm bestimmt werden. Zur Bestimmung der absoluten Proteinkonzentration wurde die optische Dichte der Proben mit einer Standardreihe mit bekannter Proteinkonzentration verglichen. Der Standard wurde dabei aus BSA, PBS und Lysepuffer hergestellt.

2.2.6 Behandlung mit GM-CSF

Die Behandlung von WT- und CCL22-KO-Mäusen erfolgte als fünftägiger Therapiezyklus. Dabei wurden an fünf aufeinanderfolgenden Tagen jeweils 2 μ g rekombinantes murines GM-CSF (in PBS gelöst) intraperitoneal injiziert (Behandlungsschema nach Bhattacharya et al. 2011). Den Versuchstiere der Kontrollgruppe wurde eine entsprechende Menge an PBS injiziert.

2.2.7 Adoptiver Transfer und *in-vivo*-Tracking von dendritischen Zellen

Zur Untersuchung der Migration von DC *in vivo* wurden BMDC mit einem Proliferation Dye (eFluor 450) gefärbt. Hierfür wurden 5×10^6 bis 20×10^6 Zellen/ml in PBS resuspendiert und unter Vortexen 1:1 mit dem in PBS verdünnten Farbstoff gemischt (Endkonzentration des Farbstoffs: $10 \mu\text{M}$). Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Färbung durch Zugabe von serumhaltigen Medium abgestoppt und die gefärbten Zellen vor der Injektion mit PBS gewaschen. Während der Färbung wurde auf eine möglichst geringe Lichteinwirkung geachtet. Die Färbung der Zellen wurde daraufhin durchflusszytometrisch überprüft, eFluor450 gefärbte Zellen erschienen als blau-fluoreszierend (Pacific-Blue-positiv).

Um die Zellen *in vivo* verfolgen zu können wurden 4×10^6 bis 5×10^6 gefärbte BMDC mit $6 \mu\text{g/ml}$ CpG für 4 Stunden maturiert, gewaschen, in PBS resuspendiert und unter Isoflurananästhesie, gemeinsam mit $10 \mu\text{g}$ CpG pro Maus, subkutan in beide Oberschenkel der Empfängermaus injiziert. Zudem wurden pro Maus $50 \mu\text{l}$ Imject Alum Adjuvanz intraperitoneal appliziert. Nach 36 Stunden wurden periphere Lymphknoten und Milz entnommen und die Migration der gefärbten Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

2.2.8 Murine Tumormodelle

Die Tumorzelllinien wurden zwischen Auftauen und Injektion mindestens eine Woche kultiviert. Vor der Injektion wurden die Tumorzellen durch Trypsinierung aus der Zellkulturflasche gelöst, drei mal mit PBS gewaschen, gezählt und die gewünschte Zellzahl pro Maus in $100 \mu\text{l}$ PBS eingestellt. Die Tumorzellen wurden unter Isoflurannarkose subkutan in die Flanke der Versuchstiere injiziert. Im Verlauf wurde alle 2 bis 3 Tage das Tumorstadium gemessen und die Tumorphäche (Länge x Breite) bestimmt. Die Beurteilung des Tumorstadiums erfolgte verblindet. Für Therapieversuche wurden die Mäuse nach Tumorstadium gepaart, in eine Therapie- und eine Kontrollgruppe eingeteilt, sodass die durchschnittliche Tumorstadium in beiden Gruppen zu Therapiebeginn identisch war. Die injizierte Zellzahlen bei den verwendeten Tumormodelle sind in folgender Tabelle beschrieben.

Zelllinie	Injizierte Zellzahl pro Maus
4T1	$1,25 \times 10^5$
Hepa1-6	2×10^6
rtTA-CSF2-CT26	$2,5 \times 10^5$

2.2.8.1 Anakinra-Therapie

Für die Anakinra-Therapie wurde den Mäusen ab einer durchschnittlichen Tumorgröße von 10 bis 20 mm² bis zum Versuchsende täglich 0,5 mg Anakinra (verdünnt in 100 µl PBS) subkutan injiziert, den Kontrolltieren ein äquivalentes Volumen PBS.

2.2.8.2 Doxycyclin-Behandlung

Die Doxycyclin-Behandlung von Mäusen mit subkutanen rtTA-CSF2-CT26-Tumoren erfolgte über das Trinkwasser. Hierfür wurde Doxycyclin mit einer Konzentration von 1 mg/ml dem ungesüßten Trinkwasser zugegeben. Es wurden lichtgeschützte Trinkwasserflaschen verwendet.

2.2.8.3 Isolierung der Tumor-infiltrierenden Leukozyten

Die Isolierung der Tumor-infiltrierenden Leukozyten erfolgte mit Hilfe eines Easycoll-Dichtegradienten. Zunächst wurde hierfür der Tumor nach der Entnahme mit einem Skalpell homogenisiert, in 1 ml Kollagenase/DNase aufgenommen und 30 Minuten bei 37° und 400 bis 1000 rpm in einem Thermoschüttler inkubiert. Das verdaute Tumorgewebe wurde im Anschluss zuerst durch ein Zellsieb mit 100 µm Porengröße, dann durch ein 30 µm-Sieb gegeben und die Siebe ausgiebig mit 0,9 % NaCl-Lösung gespült. Nach einer Zentrifugation (400 g, 7 Minuten) wurde der Überstand verworfen und das Tumorpellet in 5 ml PBS aufgenommen. Für den Dichtegradienten wurde in einem 50 ml Falcon 9 ml 44 % Easycoll (in PBS) gegeben und dies mit 6 ml 67 % Easycoll (in PBS) vorsichtig unterschichtet. Dabei betrug die Dichte der unverdünnten Easycoll-Lösung 1,124 g/ml. Auf den so hergestellten Gradienten wurde vorsichtig das resuspendierte Tumorgewebe aufgeschichtet. Der Gradient wurde im Folgenden 30 Minuten bei 1000 g und 21° zentrifugiert. Um eine Vermischung des Gradienten zu vermeiden, erfolgte das Auslaufen der Zentrifuge ohne Bremse. Nach der Zentrifugation lagen die Tumorzellen weiterhin oben auf, während die Tumor-infiltrierenden Leukozyten, welche eine höhere Dichte aufweisen, als Ring zwischen den beiden Easycoll-Schichten zu finden waren. Dieser Ring (circa 6 bis 8 ml) wurde vorsichtig mit einem Pipetuss abgenommen, 30 ml PBS zugegeben und nach einer Zentrifugation (400 g, 7 Minuten) das Pellet in PBS resuspendiert. Die isolierten Tumor-infiltrierenden Leukozyten wurden im Anschluss mittels Durchflusszytometrie analysiert.

2.3 Zelluläre Methoden

2.3.1 Allgemeine Bedingungen in der Zellkultur

Die Kultivierung von Tumorzelllinien sowie die hier beschriebenen Experimente wurden unter sterilen Bedingungen an einer biologischen Sicherheitswerkbank mit laminarem Luftstrom durchgeführt. Die Zelllinien wurden in 25 cm², 75 cm² oder 175 cm² Zellkulturflaschen (Arbeitsvolumina: 5 ml, 12 ml, 20 ml) in einem CO₂-Brutschrank bei 37°, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchte kultiviert. Zum Ausschluss von bakteriellen Kontaminationen und zur Beurteilung des Wachstums der Zellen wurden diese regelmäßig unter einem Lichtmikroskop betrachtet. Zudem wurden die Zelllinien regelmäßig mit dem MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit auf Mycoplasmenbefall getestet und bei Kontamination 3 Wochen mit Plasmocure therapiert. Je nach Bedarf wurden die Zelllinien 2 bis 3 mal wöchentlich passagiert. Hierfür wurde das verbrauchte Medium entfernt und die Flasche mit 0,9 %-NaCl-Lösung gespült, um Medienrückstände zu entfernen. Um die Zellen vom Flaschenboden abzulösen, wurden diese wenige Minuten bei 37° mit Trypsin inkubiert und durch vorsichtiges Klopfen weiter vereinzelt. Durch Zugabe von FCS-haltigem Medium wurde die proteolytische Trypsinreaktion abgestoppt, woraufhin die Zellen 5 Minuten bei 400 g zentrifugiert und ein Teil der Zellen zurück in die Kulturflasche gegeben wurden. Alle Tumorzelllinien und die humane embryonale Nierenzelllinie HEK293T wurden in DMEM-Vollmedium kultiviert.

2.3.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren von Zellen wurden circa 5×10^6 Zellen in 1 ml Kryomedium (90 % FCS, 10 % DMSO) in ein Kryoröhrchen gegeben, welches in einem Mister Frosty mit -1°/Minute auf -80° abgekühlt wurde. Eingefrorene Zellen wurden langfristig in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Auftauen der Zellen wurden diese mit auf 37° vorgewärmten Kulturmedium resuspendiert, zum Entfernen des verbliebenen DMSO abzentrifugiert und in eine Zellkulturflasche gegeben.

2.3.3 Bestimmung von Zellviabilität- und zahl

Die Bestimmung der Zellkonzentration von Suspensionen von kultivierten Zelllinien oder primären Immunzellen erfolgte mit der Trypanblau-Exklusionsmethode. Trypanblau ist ein blauer Azofarbstoff, der von toten Zellen aufgenommen wird, welche daraufhin lichtmikroskopisch blau erscheinen, lebende Zellen bleiben hingegen farblos (Schmitz 2011). Dies ermöglicht zum einen die Untersuchung der Viabilität von Zellen, zum anderen deren Quantifizierung. Hierfür werden Zellsuspensionen mit Trypanblau (2,5 g/l Trypanblau in PBS) verdünnt (Verdünnungsfaktor V)

und auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Dort wird die Zellzahl Z in den vier großen Eckquadraten ausgezählt. Da ein Eckquadrat einem Volumen von $0,1 \mu\text{l}$ ($1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 0,1 \text{ mm}$) entspricht, lässt sich die Zellzahl pro ml in der ursprünglichen Zellsuspension wie folgt errechnen: $Z/4 * V * 10^4$.

2.3.4 Magnetische Zellseparation

Die MACS-Technologie (*magnetic cell separation* oder *magnetic-activated cell sorting*) der Firma Miltenyi Biotech wurde zur magnetischen Auftrennung von Immunzellpopulationen eingesetzt. Dabei werden Immunzellen über spezifische Oberflächenmoleküle mit Antikörpern gebunden und an paramagnetische Mikropartikel (Microbeads) gekoppelt. Die Zellen werden daraufhin auf eine Säule gegeben, die von einem starken Magneten umgeben wird. Hierdurch werden die markierte Zellen in der Säule zurückgehalten, während unmarkierte Zellen die Säule durchfließen können. Bei Entfernung der Säule aus dem magnetischen Feld können die markierten Zellen leicht aus der Säule gespült werden (Miltenyi et al. 1990). Die Durchführung der Zellseparation erfolgte weitgehend nach dem Herstellerprotokoll.

Zur Aufreinigung von murinen CD11c⁺ DC wurden Splenozyten in MACS-Puffer resuspendiert ($340 \mu\text{l}$ pro 10^8 Zellen), mit CD11c-Microbeads (MicroBeads, welche mit einem monoklonalen anti-mouse CD11c-Antikörper gekoppelt sind, $85 \mu\text{l}$ pro 10^8 Zellen) gemischt und 15 Minuten bei 4° inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit MACS-Puffer gewaschen (Zentrifugation für 10 Minuten bei 200 g) und erneut in MACS-Puffer resuspendiert ($500 \mu\text{l}$ pro 10^8 Zellen). Die Zellsuspension wurde nun auf eine passende, gespülte Säule gegeben, welche zuvor in das Magnetfeld gebracht wurde, und die Säule zum Entfernen der unmarkierten Zellen mehrfach mit MACS-Puffer gewaschen. Schließlich wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und die aufgereinigten CD11⁺ Zellen ausgespült.

Nach einer magnetischen Zellseparation wurden die Zellen für weiter Experimente oder Analysen in ein geeignetes Medium oder einen Puffer aufgenommen. Die Reinheit der angereicherten Zellpopulation wurde durchflusszytometrisch überprüft.

2.3.5 Isolation von peripheren mononukleären Zellen aus Vollblut

Die Aufreinigung von mononukleäre Zellen des peripheren Bluts (PBMC, engl. *peripheral blood mononuclear cells*) aus humanen Vollblut erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation. Zunächst wurde einem Spender heparinisiertes Vollblut entnommen ($0,5 \text{ ml}$ Heparin pro 50 ml -Spritze), wel-

ches 1:1 mit 0,9 % NaCl-Lösung verdünnt wurde. In 50 ml-Falcons wurden jeweils 10 ml Biocoll Trennlösung (Dichte: 1,077 g/ml) vorsichtig mit 20 ml verdünntem Blut überschichtet, der resultierende Gradient bei 1000 g und 20° 30 Minuten ohne Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der PBMC-Ring, welcher zwischen Trennlösung und Plasma zu liegen kommt, vorsichtig abgenommen. Im Anschluss wurden die isolierten PBMC mehrfach mit 0,9 % NaCl-Lösung gewaschen, bei Verunreinigung mit Erythrozyten wurde eine Lyse der Erythrozyten durch Inkubation mit 3 ml Erylyse-Puffer für 3 Minuten und erneutem Waschen mit 0,9 % NaCl-Lösung durchgeführt. Die isolierten PBMC wurden für die folgenden Experimente in T-Zell-Medium resuspendiert.

2.3.6 Proliferationsassay

Die Proliferation von murinen Immunzellen wurde mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs CFSE (Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester) analysiert. Durch die CFSE-Färbung werden intrazelluläre Moleküle mit dem fluoreszierenden Carboxyfluorescein kovalent markiert. Mit jeder Zellteilung einer CFSE-markierten Zelle wird der Fluoreszenzfarbstoff auf die beiden Tochterzellen aufgeteilt, so dass in der Durchflusszytometrie eine Reduktion der Fluoreszenz beobachtet werden kann (Lyons et al. 1994).

Für die CFSE-Färbung wurden 5×10^6 bis 20×10^6 Splenozyten in PBS resuspendiert und im Anschluss unter Vortexen 1:1 mit in PBS verdünnten CFSE gemischt. Die CFSE-Endkonzentration betrug dabei 750 nM. Nach einer 9-minütigen Inkubation unter kontinuierlichem Rollen auf einem Rollenmischer bei 4° wurde die Färbung durch Zugabe von FCS oder FCS-haltigem Medium abgestoppt, die Zellen mit PBS gewaschen und in Proliferation-Assay-Medium aufgenommen. Während der Färbung wurde auf eine möglichst geringe Lichteinwirkung geachtet. Die Färbung der Zellen wurde im Anschluss durchflusszytometrisch überprüft, die CFSE-gefärbten Zellen erschienen grün-fluoreszierend (FITC-positiv, 488 nm).

Für den Proliferationsassay wurden 1×10^5 CFSE-gefärbte Splenozyten im 96-Well-Format in 200 µl Proliferation-Assay-Medium ausplattiert. Bei den Kokultorexperimenten wurden zusätzlich 5×10^3 BMDC zugegeben. Die Proliferation wurde nach 3 bis 4 Tagen Inkubation im CO₂-Brutschrank durchflusszytometrisch analysiert.

2.3.7 Migrationsassay

Die Migration von murinen Immunzellen wurde mit Hilfe eines Transwell-Migrationsassays untersucht. Hierbei wird ein Well durch einen Membraneinsatz in ein oberes und ein unteres Kompartiment aufgeteilt, wobei die Immunzellen vom oberen Kompartiment in Richtung des Chemokin-haltigen unteren Kompartiments migrieren. Für den Migrationsassay im 96-Well-Format (Porengröße 3 μm) wurde zunächst das untere Kompartiment mit 225 μl Zellüberstand oder reinem Medium (beides serumfrei, Opti-MEM) befüllt, dann 1×10^6 frisch isolierte Splenozyten in 70 μl Opti-MEM in das obere Kompartiment gegeben. Dabei wurde mit Hilfe eines Lichtmikroskops überprüft, dass keine Luftblasen entstanden waren, welche die Migration behindern könnten. Nach 6 Stunden Inkubationszeit im Brutschrank wurden die migrierten Zellen aus dem unteren Kompartiment entnommen, gegen CD3, CD4, CD8 und FoxP3 gefärbt und die absolute Zellzahl der migrierten Zellen mit Hilfe von Counting Beads durchflusszytometrisch bestimmt.

2.3.8 siRNA-Knockdown

Für die Knockdown-Experimente wurden $0,5 \times 10^5$ bis 2×10^5 Tumorzellen (4T1 oder PaTu-8988T) in 3 ml DMEM-Vollmedium ausplattiert und über Nacht adhärent werden lassen. Vor der siRNA-Transfektion wurde das Medium mit 2,5 ml frischem DMEM-Vollmedium ersetzt. Zur Herstellung der siRNA-Lipid-Komplexe wurden die siRNA (25 pmol bei PaTu-8988T, 200 pmol bzw. bei Kombinationen 2×100 pmol bei 4T1) und 7,5 μl Lipofectamin RNAiMAX jeweils in 125 μl Opti-MEM resuspendiert. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde beides gemischt, weiter 25 Minuten inkubiert und schließlich tropfenweise auf die Zellen gegeben. 24 und 48 Stunden nach Transfektion wurde das Medium erneut gewechselt (je 3 ml DMEM-Vollmedium). Insgesamt 72 Stunden (4T1) bzw. 96 Stunden (PaTu-8988T) nach der Transfektion wurden die Zellüberstände abgenommen, und der siRNA Knockdown in den Tumorzellen mittels qRT-PCR bestätigt.

2.3.9 Kultivierung von Immunzellen in konditioniertem Medium

Im 96-Well-Format wurden 2×10^5 Splenozyten oder PBMC in 50 μl T-Zell-Medium resuspendiert und 150 μl konditioniertes Medium (z. B. Überstände von Tumorzellen nach siRNA Knockdown) bzw. 150 μl DMEM-Vollmedium hinzugegeben. Nach 48 Stunden Inkubation im Brutschrank wurden die Zellüberstände abgenommen und für weitere Analysen eingefroren.

Zur Generierung des konditionierten Mediums wurden Tumorzellen kultiviert und nach einer gewissen Inkubationszeit das Kultivationsmedium abgenommen. Durch Zentrifugation (5 Minuten,

400 g) wurden Zellreste pelletiert und die zellfreien Überstände gewonnen.

2.4 Immunologische Methoden

2.4.1 Bestimmung von Zytokin- und Chemokinkonzentrationen mittels ELISA

Zur Messung von Zytokin- und Chemokinkonzentrationen in Zellüberständen oder Organlysaten wurde ein *Sandwich*-ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) durchgeführt.

Hierfür wurde eine Polystyren-Mikrotiterplatte zunächst mit 50 µl *Capture*-Antikörper gegen das gesuchte Zytokin beschichtet und über Nacht inkubiert. Nach einem Waschschrift erfolgte zur Blockade von unspezifischen Bindungsstellen auf der Platte eine mindestens einstündige Inkubation mit 150 µl serumhaltiger ELISA-Verdünnungspuffer. Im Anschluss wurde nach erneutem Waschen 50 µl der Probe oder der Standard-Lösung zugegeben und für 2 Stunden inkubiert, so dass das in der Probe enthaltene Antigen den *Capture*-Antikörper auf der Platte binden konnte. Nach einem weiteren Waschschrift wurde 50 µl *Detection*-Antikörper, welcher ein anderes Epitop des Zytokins bindet, für 1 bis 2 Stunden zugegeben. Hierdurch entsteht ein *Sandwich*-Komplex aus *Capture*-Antikörper, Antigen und *Detection*-Antikörper. Nach einer Inkubationszeit von 1 bis 2 Stunden und Entfernung des überschüssigen Antikörpers durch Waschen wurde 50 µl Streptavidin-HRP (*Horseradish peroxidase*) als Reporterenzym hinzugegeben, welches über einen Avidin-Biotin-Komplex den biotinylierten *Detection*-Antikörper bindet. Nach einer Inkubationszeit von 20 bis 30 Minuten und Entfernung des überschüssigen Enzyms durch Waschen wurde 50 µl Substrat (1:1 Mischung von Lösung A, Wasserstoffperoxid und Lösung B, TMB: 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) zugegeben. Die an den Antikörper-Antigen-Komplex gebundene Peroxidase konnte nun die Oxidation des chromogenen TMB zu einem farbigen Produkt katalysieren (Luttmann et al. 2014). Dabei ist der Farbumschlag umso größer, je mehr Antigen in der Probe enthalten ist. Die Reaktion wurde nach maximal 30 Minuten Inkubation im Dunklen durch Zugabe von 25 µl Schwefelsäure (2N) abgestoppt, wodurch ein Farbwechsel des TMB von blau nach gelb erfolgte. Die optische Dichte jedes Wells wurde unmittelbar im Anschluss bei 450 nm mit Hilfe eines Multilabel Plate Readers bestimmt.

Zur Bestimmung der absoluten Zytokinkonzentration in den Proben wurde die optische Dichte der Proben mit einer Standardreihe mit bekannter Zytokinkonzentration verglichen. Die Standardreihe wurde durch sechs serielle 1:1 Verdünnungen einer Stock-Lösung bekannter Zytokinkonzentration mit ELISA-Verdünnungspuffer hergestellt und auf jeder Platte mitgeführt. Proben, welche

eine hohe Zytokinkonzentration aufwiesen, wurden mit ELISA-Verdünnungspuffer so verdünnt, dass die optische Dichte im Bereich der gemessenen Standardkurve lag.

Zum Entfernen von ungebundenen Reagenzien wurden die Platte nach jedem Schritt jeweils mindestens 3 mal mit ELISA-Waschpuffer gewaschen und nach jedem Waschschrift durch vorsichtiges Klopfen getrocknet. Außer wenn anders angegeben, erfolgten alle Inkubationsschritte bei Raumtemperatur auf einem Plattenschüttler. Die Verdünnung der Reagenzien erfolgte nach Herstellerangaben, weitere Details können der folgenden Tabelle entnommen werden.

	BioLegend	R&D
gemessene Zytokine	Interferon- γ , GM-CSF	CCL22 (human und murin)
Detection-Antikörper	in ELISA-Coating-Buffer, Inkubation bei 4°	in PBS, Inkubation bei Raumtemperatur
Capture-Antikörper	in ELISA-Verdünnungspuffer, 1 Stunde Inkubation	in ELISA-Verdünnungspuffer, 2 Stunden Inkubation
Streptavidin-HRP	in ELISA-Verdünnungspuffer 20 Minuten Inkubation	in ELISA-Verdünnungspuffer 30 Minuten Inkubation im Dunklen
höchste Konzentration der Standardreihe	Interferon- γ : 1000 pg/ml GM-CSF: 2000 pg/ml	hCCL22: 500 pg/ml mCCL22: 500 pg/ml

Wurden Zytokinkonzentrationen in Organlysaten bestimmt, wurde in diesen zunächst die Gesamtproteinkonzentration mittels DC™ Protein Assay bestimmt, wie in Abschnitt 2.2.5 beschrieben. Die Proben wurden dann so mit Lysepuffer (Bio-Plex) verdünnt, dass sie, so fern möglich, eine einheitliche Gesamtproteinkonzentration aufwiesen. Im Anschluss wurden zu 17 μ l verdünnter Probe 38 μ l Ziegenserum zugegeben. Die darin enthaltene Zytokinmenge wurde dann wie oben beschrieben mittels ELISA bestimmt und pro mg Gesamtprotein angegeben.

2.4.2 Durchflusszytometrie

2.4.2.1 Prinzip

Die Durchflusszytometrie wurde für verschiedene funktionelle Untersuchungen, wie z. B. Migrations- und Proliferationsassays, sowie für die Charakterisierung von Immunzellpopulationen eingesetzt. Bei der Durchflusszytometrie wird eine Zellsuspension durch eine feine Kapillare aufgesogen und in einen laminaren Flüssigkeitsstrom gebracht, so dass einzelne Zellen von einem La-

ser erfasst werden können. Treten die Zellen durch den Laserstrahl, wird das auftreffende Licht gestreut, die Größe der Zellen beeinflusst dabei das Vorwärtsstreulicht (FSC: *forwardscatter*), die Granularität der Zellen das Seitwärtsstreulicht (SSC: *sidescatter*). Zudem können Zellen zuvor mit Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt werden oder verschiedene extrazelluläre und intrazelluläre Antigene mit Fluoreszenz-gekoppelten monoklonale Antikörpern markiert werden. Bei der Anregung mit Laserlicht der passenden Wellenlänge (Absorptionsspektrum) emittieren die Fluorochrome dann Fluoreszenzlicht in unterschiedlichen Emissionsspektren. Durch die Färbung mehrerer Immunzellmarker mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen können verschiedene Immunzellpopulationen unterschieden werden (Rothe 2006).

Bei der gleichzeitigen Färbung von Proben mit mehreren Fluoreszenzfarbstoffen wurden zusätzlich zu den Proben Einfärbungen vorbereitet. Diese wurden zur Anpassung der Kompensations- und Lasereinstellungen eingesetzt, um falsch positive Signale durch die überlappenden Emissionsspektren mancher Fluorochrome zu vermeiden.

Die Wahl der Messfenster (*Gates*) erfolgte je nach experimentellen Design. Bei jedem Experiment wurde jedoch zunächst in einem Dot-Plot FSC und SSC aufgetragen, um die weiteren Analysen auf vitale Immunzellen zu beschränken und Zelltrümmer zu exkludieren, siehe Abbildung 2.1A. Zudem wurden Zelldubletten aus der Analyse ausgeschlossen. Dies erfolgte durch die Darstellung von FSC-H (Höhe des FSC-Spannungspulses) und FSC-A (*Area*, das Integral der Höhe des FSC-Spannungspulses über die Zeit) in einem Dot-Plot. Während bei Einzelzellen FSC-A und FSC-H korrelieren, weisen Dubletten bei gleichem FSC-H-Wert einem höheren FSC-A Wert auf, da sie über eine längere Zeitdauer den Laserstrahl durchqueren (Shapiro 2005). Das Gating zur Exklusion der Dubletten wird in Abbildung 2.1B gezeigt.

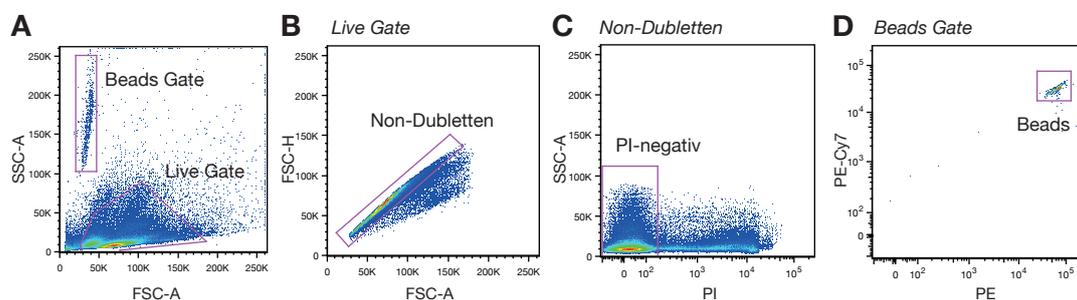


Abbildung 2.1: Gating Strategie für durchflusszytometrische Analysen **A** Zunächst wurde im FSC-SSC-Plot ein *Live-Gate* und ein *Gate* zur Identifikation der Counting-Beads gewählt. **B** Ausgehend vom *Live Gate* wurden im Folgenden die Dubletten exkludiert. **C** Zum Ausschluss toter Zellen wurde zum Beispiel eine Färbung mit Propidium-Iodid (PI) vorgenommen und nur PI-negative Zellen ausgewählt. **D** Die Counting-Beads zeigen eine starke Fluoreszenz in einem breiten Farbspektrum (hier sind PE und PE-Cy7 abgebildet).

2.4.2.2 Färbung von extrazellulären Antigenen

Für die Färbung von extrazellulären Antigenen wurden 10^5 bis 10^7 Zellen mit PBS gewaschen, in 50 μ l PBS resuspendiert und 0,3 bis 0,5 μ l Fluorochrom-gekoppelter Antikörper hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei 4° wurden die gefärbten Zellen erneut ein- bis zweimal mit PBS gewaschen und anschließend direkt analysiert. Sollten die Zellen nach der Extrazellulärfärbung fixiert werden, erfolgte dies mit 1 % PFA in PBS.

2.4.2.3 Färbung von intrazellulären Antigenen

Für die zusätzliche Färbung von intrazellulären Antigenen, wie dem T_{reg}-Marker FoxP3, wurden die Zellen nach der Extrazellulärfärbung mit Hilfe des Foxp3 Staining Buffer Sets (eBioscience) fixiert und permeabilisiert. Hierfür wurden die Zellen nach dem letzten Waschschrift der Extrazellulärfärbung in 200 μ l Fixierungs-Permeabilisierungs-Reagenz (ein Teil Fixation/Permeabilization Concentrate verdünnt mit drei Teilen Fixation/Permeabilization Diluent) aufgenommen und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 7 Minuten bei 400 g wurde der Überstand verworfen, die Zellen zweimal mit 200 μ l Permeabilisierungs-Puffer (Permeabilization Buffer (10 x) 1:10 verdünnt mit destilliertem Wasser) gewaschen und die Überstände jeweils verworfen. Im Anschluss wurden 0,5 μ l Antikörper hinzugegeben, 40 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert und erneut mit 200 μ l Permeabilisierungs-Puffer gewaschen. Zur Analyse am Durchflusszytometer wurden die Zellen in PBS aufgenommen.

2.4.2.4 Zellviabilitätsnachweis

Zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen kamen zwei verschiedene Methoden zum Einsatz: die Färbung mit Propidium Iodid (PI) erfolgte nur bei unfixierten Zellen, während die Färbung mit einem *Zombie Dye* Farbstoff bei fixierten Proben eingesetzt wurde.

PI ist ein rot-fluoreszierender, DNA-interkalierender Farbstoff, der aufgrund der gestörten Plasmamembranintegrität in tote Zellen eindringen kann und diese anfärbt (Sasaki et al. 1987). Die Färbung erfolgte unmittelbar vor der durchflusszytometrischen Analyse der Zellen durch Zugabe von 1 μ l PI zu den in PBS resuspendierten Zellen. Eine beispielhafte PI-Färbung ist in Abbildung 2.1C gezeigt.

Zombie Dye Farbstoffe binden laut Herstellerangaben an primäre Aminogruppen von Proteinen. Bei lebenden Zellen werden hierbei nur plasmamembranständige Proteine angefärbt, bei toten Zellen kann der Farbstoff hingegen die Plasmamembran passieren und auch intrazelluläre Prote-

ine färben, so dass tote Zellen ein stärkeres Fluoreszenzsignal aufweisen. Vor der Extrazellulärfärbung wurde hierfür Zombie Dye 1:1000 verdünnt zu den in PBS resuspendierten Zellen zugegeben, 5 bis 10 Minuten bei 4° inkubiert und im Anschluss (ohne weitere Waschschrte) die Antikörper für die Extrazellulärfärbung zugegeben. Zum Abstoppen der Färbung wurde nach der Extrazellulärfärbung ein Waschschrte mit serumhaltigen Puffer durchgeführt.

2.4.2.5 Ermittlung von absoluten Zellzahlen mittels Counting Beads

Zur Ermittlung der absoluten Zellzahl in einer Probe wurden vor der durchflusszytometrischen Analyse Counting Beads hinzugegeben. Diese zeichnen sich in der FACS Analyse durch einen starke Fluoreszenz in einem breiten Farbspektrum und einem hohen SSC-Wert aus. Das Gating der Counting Beads wird in Abbildung 2.1A und 2.1D gezeigt. Die Berechnung der absoluten Zellzahl erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Absolute Zellzahl} = \frac{\text{Events Zellpopulation}}{\text{Events Beads}} * \frac{\text{Konzentration Beads}}{\text{eingesetzte Menge Beads}}$$

Die verwendeten Counting Beads hatten eine Konzentration von 52000 Beads pro 50 µl, dabei wurden jeweils 2,5 µl pro Probe eingesetzt.

2.4.2.6 FACS-Sort

Beim FACS-Sort (FACS: *fluorescence activated cell sorting*) wurden Zellen anhand ihrer Fluoreszenz und ihrer Darstellung im FSC und SSC sortiert. Dies geschieht durch die elektrostatische Ablenkung von Tropfen, welche einzelne, zuvor analysierte Zellen enthalten. Die Probenaufbereitung und Färbung erfolgte wie bei der gewöhnlichen Durchflusszytometrie. Die sortierten Zellen wurden in PBS (mit 4 % FCS) oder reinem FSC aufgefangen. Nach dem Sort wurde die Reinheit der sortierten Zellpopulation durchflusszytometrisch überprüft.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 RNA-Isolation

Die Extraktion von RNA aus kultivierten Tumorzellen sowie aus primären Immunzellen erfolgte mit der Phenol-Chloroform-Methode. Hierfür wurden 10^5 bis 10^7 Zellen in 1 ml Trizol Reagenz (PeqLab, TriFast) resuspendiert, nach 5 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur 0,2 ml Chloroform hinzugefügt, dies 15 Sekunden geschüttelt, weitere 2 bis 3 Minuten inkubiert und schließlich bei 12000 g für 15 Minuten bei 4° zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die wässrige

Oberphase, welche die RNA enthält, abgenommen, die Phenol-Phase sowie die Interphase verworfen. Zur Ausfällung der RNA wurden 0,5 ml Isopropanol hinzugegeben, dies 10 Minuten bei Raumtemperatur oder mindestens zwei Stunden bei -20° inkubiert und erneut bei 12000 g und 4° für 10 Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation liegt die RNA als Pellet vor, der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Im Anschluss wurden 1 ml 75 % Ethanol hinzugefügt, gevortext, bei 7500 g und 4° 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand erneut komplett abgenommen und verworfen. Das RNA-Pellet wurde hieraufhin 5 bis 10 Minuten an der Luft trocknen gelassen, im Anschluss in 25 bis 40 μ l Nuklease-freiem Wasser resuspendiert und 10 Minuten bei 55° inkubiert. Nach der Aufreinigung wurden Konzentration und Reinheit der RNA mit Hilfe eines Nanophotometers bestimmt. Die isolierte RNA wurde in der Regel direkt im Anschluss an die RNA-Isolation in cDNA transkribiert, oder bis zur weiteren Verarbeitung bei -20° oder -80° zwischengelagert.

2.5.2 cDNA-Synthese

Der reverse Transkription der RNA in cDNA erfolgt mit dem RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit nach Herstellerprotokoll. Ein typischer Reaktionsansatz enthielt die folgenden Bestandteile:

Inhalt	Menge
RNA	500 ng bis 1 μ g
Reaction Buffer	4 μ l
dNTP Mix (10 mM)	2 μ l
Oligo(dT) ₁₈ (100 μ m)	1 μ l
RiboLock RNase Inhibitor (20 U/ μ l)	1 μ l
RevertAid RT (200 U/ μ l)	1 μ l
RNAse-freies Wasser	Ad 20 μ l

Innerhalb eines Experiments wurde von jeder Probe die gleich Menge RNA eingesetzt. Alle Reagenzien außer Wasser und RNA wurden als Mastermix angesetzt. Die Reaktion erfolgte in einem Thermocycler durch eine 60-minütige Inkubation bei 42° mit einer abschließenden Erhitzung auf 70° für 5 Minuten. Die so generierte cDNA wurde zur quantitativen *Real-time*-PCR eingesetzt.

2.5.3 Quantitative Real-Time-PCR

Die Bestimmung von mRNA-Expressionsniveaus erfolgte mittels quantitativer *Real-time*-PCR (qRT-PCR). Primer und Sonden wurden mit Hilfe des *Universal Probe Library - Assay Design Cen-*

ter, Roche, entworfen. Es wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

Inhalt	Menge
cDNA	1 bis 2 μl
KAPA PROBE FAST qPCR Master Mix	5 μl
Genspezifischer Primer 1	0,4 μl
Genspezifischer Primer 2	0,4 μl
Genspezifische Sonde	0,2 μl
Wasser	Ad 10 μl

Pro Gen wurde ein Mastermix angesetzt und nur die cDNA einzeln pipettiert. Pro Probe und Gen wurden jeweils technische Duplikate angefertigt. Vor der PCR wurde die Platte jeweils wenige Minuten bei 500 bis 1000 g abzentrifugiert, um sicher zu stellen, dass Mastermix und cDNA sich am Boden des Wells befinden. Die qRT-PCR erfolgte in einem LightCycler 480 über 40 Zyklen mit dem Standard Roche Protokoll *Monocolor Hydrolysis Probe, UPL Probe II*. Um die relative Genexpression zu berechnen, wurde die Expression des Zielgens jeweils auf ein Referenzgen, ein so genanntes *housekeeping* Gen, wie β -Actin normiert.

2.5.4 Lentivirale Transduktion

Die lentivirale Transduktion wurde zur stabilen genomischen Integration des rtTA-CSF2-Konstrukts (mit Puromycin-Resistenz) in die murine Kolonkarzinom-Zelllinie CT26 eingesetzt.

Zur Herstellung der rekombinanten Lentiviren wurden zunächst HEK293T transient mit dem viralem Konstrukt, sowie Plasmiden, welche für virale Verpackungsproteine und die Virushülle kodieren, transfiziert. Hierfür wurden HEK293T im 96-Well-Format in antibiotikafreiem DMEM-Vollmedium ausgesät (2×10^4 Zellen in 100 μl pro Well), nach 6 Stunden erfolgte die Transfektion mit Hilfe von GeneJuice. Der Transfektionsansatz (pro Well) war wie folgt zusammengestellt:

Inhalt	Menge
GeneJuice (Novagen)	0,6 μl
Delta 8.9 Plasmid (kodiert unter anderem für viralen Gene gag, rev)	100 ng
VSV-G Plasmid (kodiert für Virushülle)	10 ng
rtTA-CSF2-Plasmid	100 ng
Opti-MEM	Ad 25 μl

Die Plasmide VSV-G und Delta 8.9 wurden freundlicherweise von der Prof. Endres, PD Kobold, Abteilung für Klinische Pharmakologie, zur Verfügung gestellt. Die Bestandteile wurden vorsichtig gemischt, 25 Minuten inkubiert und schließlich 25 µl Komplexlösung pro Well zu den HEK293T gegeben. 24 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium gewechselt und nach insgesamt 72 Stunden die virushaltigen Zellüberstände abgenommen und zur Entfernung von Zellresten durch eine 0,45 µl Filter gegeben. Im Anschluss wurden die virushaltigen Zellüberstände mittels Ultrazentrifugation konzentriert. Hierfür wurden 40 % Sucrose 1:1 mit TEN-Puffer gemischt, 2 ml der Mischung in ein Zentrifugationsröhrchen gegeben, 3 ml des virushaltigen Zellüberstandes aufgeschichtet und 2 Stunden mit 27.000 rpm bei 4° zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde der konzentrierte Virus in 100 µl DMEM-Vollmedium aufgenommen.

Im nächsten Schritt erfolgte die Transduktion der CT26, also die stabile genomische Integration des rtTA-CSF2-Konstrukts, durch die zuvor synthetisierten Lentiviren. Die CT26 wurden im 96-Well-Format in DMEM-Vollmedium ausgesät und über Nacht adhären lassen, sodass die Zellen zum Zeitpunkt der Viruszugabe eine Konfluenz von 60 bis 80 % aufwiesen. Am nächsten Tag wurde der Zellüberstand verworfen und zur Titration der Virusmenge pro Well je 100 µl Virusmedium in verschiedenen Verdünnungen (100 %, 50 %, 25 %, 12,5 %), sowie 8 µg/ml Polybren zugegeben. 24 Stunden nach Viruszugabe erfolgte zur Entfernung der Viren ein Mediumwechsel. Zur Selektion der erfolgreich transduzierten Zellen wurde schließlich 36 Stunden nach Transduktion Puromycin zugegeben (zunächst 2 µg/ml, später 4 µg/ml). Die Selektion erfolgt für insgesamt 10 Tage, bis alle Zellen in der nicht transduzierten Kontrollkondition durch das Puromycin abgetötet worden waren.

2.6 Statistische Analyse

Die Daten in dieser Arbeit sind jeweils mit Mittelwert und Standardfehler (*standard error of the mean*, SEM) dargestellt. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz wurden der zweiseitige t-Test, sowie bei gepaarten, nicht normalverteilte Daten der Wilcoxon-Test verwendet. Ein p-Wert <0,05 wurde als signifikant angesehen. Signifikante p-Werte wurden in den Abbildungen durch die Symbole * (p < 0,05), ** (p < 0,01), *** (p < 0,001) gekennzeichnet. Die statistischen Analysen wurden mit Hilfe des Programms GraphPad Prism durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Induktion von CCL22 durch IL-1-sezernierende Tumorzellen

Das Chemokin CCL22 wird in einer Vielzahl von Tumorentitäten produziert, darunter zum Beispiel im Mammakarzinom (Gobert et al. 2009) und in verschiedenen gastrointestinalen Tumoren (Maruyama et al. 2010; Mizukami et al. 2008). Auch Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass *in vitro* die Zellüberstände verschiedener humaner sowie muriner Tumorzelllinien auf Immunzellen zu einer Induktion von CCL22 führen (Wiedemann et al. 2016). Es ist beschrieben, dass das Zytokin IL-1 eine Rolle im immunologischen Mikromilieu von Tumoren spielt (Mantovani et al. 2018) und *in vitro* zu einer CCL22-Induktion führen kann (Rodenburg et al. 1998). Im Folgenden Abschnitt dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, welche Rolle IL-1 bei der tumoralen CCL22-Induktion einnimmt.

3.1.1 CCL22-induzierende Tumorzelllinien exprimieren IL-1

Um den Mechanismus der tumoralen CCL22-Induktion zu untersuchen, wurde ein humanes, sowie ein murines Tumormodell eingesetzt: die Tumorzelllinien PaTu-8988T (PaTu), eine humane Pankreaskarzinomzelllinie, und 4T1, eine murine Mammakarzinomzelllinie auf BALB/c Hintergrund.

Zunächst sollte bestätigt werden, dass auch diese Zelllinien eine CCL22-Induktion in Immunzellen herbeiführen. Hierfür wurden humane PBMC und murine Splenozyten mit den Zellüberständen der Tumorzelllinien oder, als Kontrollkondition, mit unconditioniertem Medium kultiviert und die Menge von CCL22 in den Kulturüberständen gemessen. In der Tat zeigte sich in beiden Modellen eine signifikant höhere CCL22-Sekretion nach Kultivierung mit den Tumorzellüberständen als mit Medium (Abbildung 3.1A und 3.1B).

Um zu untersuchen, ob die verwendeten Tumorzelllinien IL-1 produzieren, wurde aus den Tumor-

zelllysaten RNA isoliert und mittels qRT-PCR die Expression von IL-1 α und IL-1 β gemessen. Es zeigte sich, dass PaTu-8988T und 4T1 auf mRNA-Ebene IL-1 α sowie IL-1 β exprimieren (Abbildung 3.1 C).

3.1.2 siRNA-Knockdown von IL-1 α hebt Tumorzell-induzierte CCL22-Induktion in humanen Immunzellen auf

Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob das von den Tumorzellen exprimierte IL-1 unmittelbar für die CCL22-Induktion verantwortlich ist. Um die Bedeutung der tumoreigenen IL-1-Produktion zu analysieren, sollte untersucht werden, ob eine reduzierte IL-1-Produktion der Tumorzellen die CCL22-Induktion durch die Tumorüberstände beeinflusst. Hierfür wurde zunächst im humanen PaTu-8988T-Modell ein siRNA-Knockdown von IL-1 α durchgeführt. Um unspezifische Effekte zu minimieren, wurden die Tumorzellen mit drei verschiedenen siRNA gegen IL-1 α transfiziert, als Kontrolle wurde eine unspezifische, vom Hersteller mitgelieferte, Kontroll-siRNA eingesetzt. Die so transfizierten Tumorzellen wurden zur Gewinnung von konditionierten Zellüberständen kultiviert und im Anschluss, 96 Stunden nach Transfektion, in den lysierten Zellen die IL-1 α -Expression mittels qRT-PCR überprüft. Schließlich wurden humane PBMC mit unkonditioniertem Medium oder konditionierten Tumorzellüberständen inkubiert und nach 48 Stunden die CCL22-Proteinmenge in den Kulturüberständen mittels ELSIA gemessen.

Die qRT-PCR-Analyse der lysierten Tumorzellen 96 Stunden nach der Transfektion mit den verschiedenen siRNA zeigte, dass die Transfektion mit siRNA A und siRNA B zu einer deutlichen Reduktion der IL-1 α mRNA-Menge im Vergleich zur Kontroll-siRNA führt. Die Transfektion mit siRNA C führte hingegen zu keiner deutlichen Abnahme der IL-1 α Expression (Abbildung 3.2A). Vorversuche hatten gezeigt, dass der IL-1 α -Knockdown durch siRNA A und B bereits nach 48 Stunden zu einer reduzierten IL-1 α -Expression führte (Daten nicht gezeigt). Man kann also davon ausgehen, dass während der gesamten Zeit, in welcher der Zellüberstand generiert wurde (48 bis 96 Stunden nach Transfektion), die mit siRNA A und B transfizierten Tumorzellen im Vergleich zu der Kontroll-siRNA und der siRNA C Kondition, eine verringerte IL-1 α Expression aufwiesen.

Wie zu erwarten führte die Inkubation der PBMC mit Tumorüberständen der Kontroll-siRNA-transfizierten PaTu im Vergleich zu Medium zu einer signifikanten Erhöhung der CCL22-Level in den Zellüberständen. Interessanterweise war die CCL22-Menge jedoch nach Inkubation mit Überständen der PaTu, welche mit siRNA A und B transfiziert wurden, vergleichbar mit der Medikation und signifikant reduziert im Vergleich zur Kontroll-siRNA-Kondition. Die CCL22-

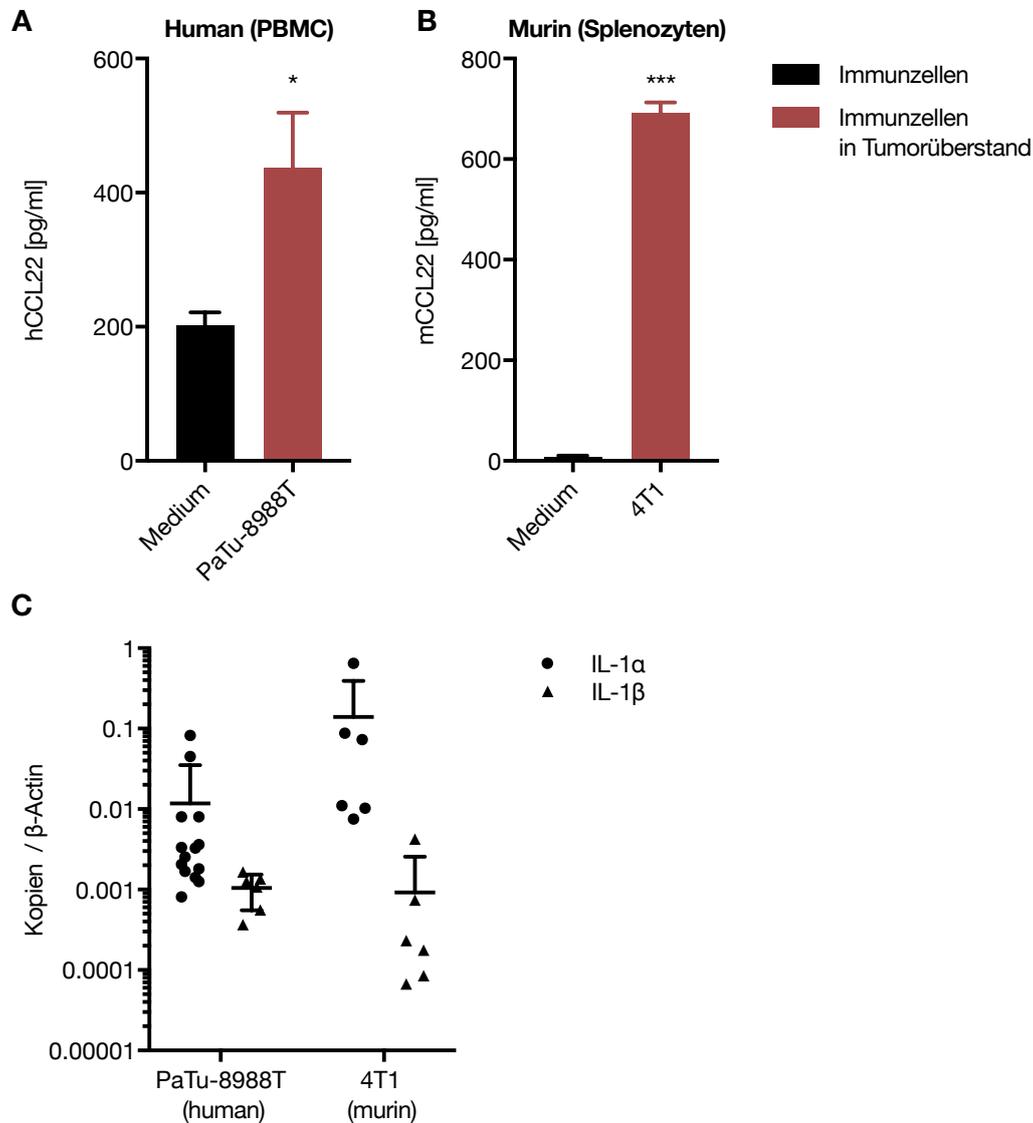


Abbildung 3.1: CCL22 in Kulturüberständen von Immunzellen nach Kultivierung mit Tumorzellüberständen und IL-1-Expression der verwendeten Tumorzellen (A,B) 0,5 bis 2×10^5 PaTu-8988T (A) oder 4T1 (B) wurden ausgesät, nach 48 Stunden das Medium verworfen, neues Medium hinzugegeben und für weitere 48 Stunden (PaTu-8988T) oder 24 Stunden (4T1) Überstände gesammelt. 2×10^5 humane PBMC (A) oder murine Splenozyten (B) wurden mit DMEM-Vollmedium oder den Tumorzellüberständen inkubiert. Nach 48 Stunden wurde CCL22-Proteinmengen in den Kulturüberständen mittels ELISA gemessen. Dargestellt sind in (A) der Mittelwert von $n = 6$ Donoren (Zellüberstände aus drei unabhängigen Experimenten) und in (B) der Mittelwert aus Triplikaten (Daten repräsentativ für drei Experimente), jeweils + SEM. P-Werte wurden mittels zweiseitigen t-Test bestimmt (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$). **(C)** Aus PaTu-8988T und 4T1 wurden, nachdem die Zellen mindestens 24 Stunden (bis maximal 96 Stunden) in Kultur waren, RNA isoliert. IL-1 α - und IL-1 β -mRNA-Mengen wurden mittels qRT-PCR bestimmt, als Referenzgen wurde β -Actin gemessen. Dargestellt sind Mittelwert + SEM.

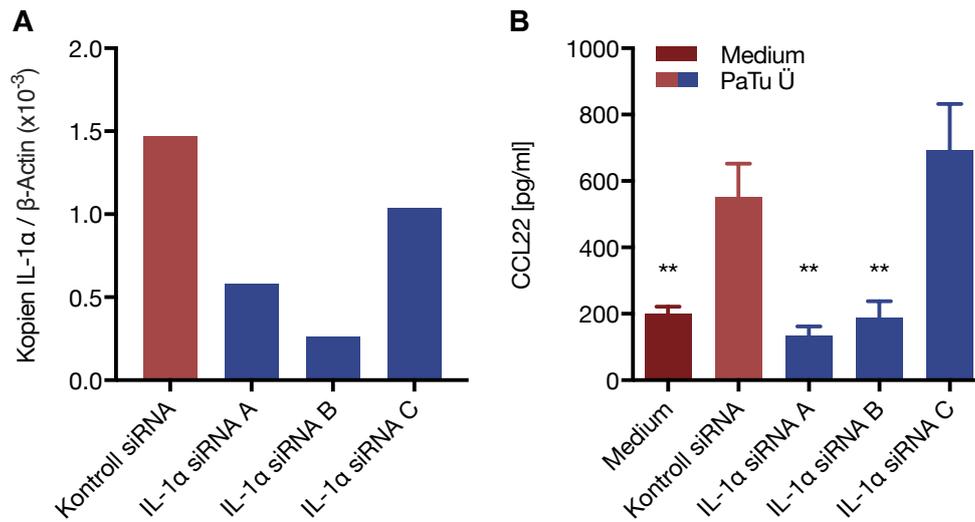


Abbildung 3.2: CCL22 in Kulturüberständen von PBMC nach Kultivierung mit Tumorzellüberständen von Kontroll- oder IL-1 α -siRNA-transfizierten PaTu-8988T 1 bis 2×10^5 PaTu-8988T (PaTu) wurden mit Kontroll-siRNA oder drei verschiedenen siRNA gegen IL-1 α transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium gewechselt und der Zellüberstand für weitere 48 Stunden gesammelt. **(A)** 96 Stunden nach der Transfektion wurde aus den transfizierten PaTu RNA isoliert und die IL-1 α -mRNA-Menge mittels qRT-PCR bestimmt, als Referenzgen wurde β -Actin gemessen. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. **(B)** 1 bis 2×10^5 PBMC wurden mit den Zellüberständen (PaTu Ü) oder DMEM-Vollmedium inkubiert, nach 48 Stunden wurden in den Kulturüberständen CCL22-Proteinmengen mittels ELISA gemessen. Dargestellt sind Mittelwert ($n = 6$ PBMC-Donoren) + SEM, PaTu-Zellüberstände wurden in drei unabhängigen Experimenten generiert. P-Werte wurden im Vergleich zur Kontroll-siRNA-Kondition mittels zweiseitigen t-Test bestimmt (** $p < 0,01$).

Menge nach Inkubation mit Überständen der PaTu, die mit siRNA C transfizierten wurden, unterschied sich nicht von der Kontroll-siRNA-Kondition (Abbildung 3.2B).

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass ein Knockdown von IL-1 α die CCL22-Induktion in PBMC durch die Zellüberstände von PaTu-8988T aufhebt. Diese Daten zeigen, dass in dem PaTu-8988T-Modell tumoreigenes IL-1 α die CCL22 Sekretion von humanen PBMC induziert.

3.1.3 siRNA-Knockdown von IL-1 reduziert Tumorzell-induzierte CCL22-Induktion in murinen Splenozyten

Nachdem gezeigt werden konnte, dass im humanen PaTu-8988T-Modell tumoreigenes IL-1 zu einer CCL22-Hochregulierung auf Immunzellen führt, sollte im Anschluss überprüft werden, ob dieser Mechanismus auch im murinen 4T1-Modell relevant ist. Es sollte, ähnlich wie im humanen Modell, untersucht werden ob eine mittels siRNA-Knockdown reduzierte IL-1-Expression die CCL22-Induktion auf Immunzellen durch die Tumorzellüberstände beeinflusst.

Hierfür wurden die 4T1 mit zwei verschiedenen siRNA gegen IL-1 α (A und B), zwei verschiede-

nen siRNA gegen IL-1 β (A und B), sowie einer Kombination aus zwei siRNA, die gegen IL-1 α und IL-1 β gerichtet sind, transfiziert, als Kontrollkondition erfolgte eine Transfektion mit unspezifischer Kontroll-siRNA. Um eine Vergleichbarkeit zwischen den Konditionen zu gewährleisten, wurde bei der Kondition, in der zwei siRNA gleichzeitig transfiziert wurden, jeweils nur die halbe Menge der einzelnen siRNA verwendet, sodass die Gesamtmenge an transfizierter siRNA in jeder Kondition gleich war. Der Versuchsablauf verlief größtenteils analog zum humanen Modell. Die transfizierten Tumorzellen wurden kultiviert, im Zeitraum 48 Stunden bis 72 Stunden nach Transfektion Tumorzellüberstand gesammelt und die Expression von IL-1 α sowie IL-1 β in den Tumorzellen 72h nach Transfektion mittels qRT-PCR analysiert. Murine Splenozyten wurden mit den konditionierten Tumorzellüberständen oder Medium inkubiert und schließlich in den Zellüberständen nach 48 Stunden die CCL22 Proteinmenge mittels ELISA gemessen.

Die qRT-PCR Analyse (Abbildung 3.3A und 3.3B) zeigte eine erfolgreiche Reduktion der Expression von IL-1 α sowie IL-1 β in den verschiedenen Konditionen im Vergleich zur Kontroll-siRNA-Transfektion. Abermals führte die Inkubation von Splenozyten mit Tumorüberständen der Kontroll-siRNA-transfizierten 4T1 im Vergleich zu Medium zu einer starken, signifikanten, Steigerung der CCL22 Menge in den Kulturüberständen (Abbildung 3.3C). Die Inkubation mit Überständen der verschiedenen IL-1 α - oder IL-1 β -Knockdown-Konditionen führte im Vergleich zur Kontroll-siRNA-Kondition zu reduzierten CCL22 Proteinlevel in den Splenozytenüberständen, teils war ein signifikanter Unterschied, teils nur ein Trend zu beobachten.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass ein Knockdown von IL-1 α oder IL-1 β zu einer reduzierten CCL22-Induktion in murinen Splenozyten durch 4T1-Tumorüberstände führt. Im Vergleich zum humanen PaTu-8988T-Modell konnte die CCL22-Induktion jedoch nur reduziert, nicht jedoch komplett aufgehoben werden. Dies lässt vermuten, dass tumoreigenes IL-1 im murinen Modell zwar eine Rolle in der tumoralen CCL22-Hochregulierung auf Immunzellen spielt, wohl aber noch zusätzliche andere Faktoren involviert sind.

3.1.4 Blockade von IL-1 durch Anakinra im 4T1-Tumormodell

Nachdem in den vorherigen Experimenten die Rolle von IL-1 für die tumorale CCL22-Induktion *in vitro* festgestellt werden konnte, war es nun von Interesse, ob dieser Mechanismus auch *in vivo*, also bei tumortragenden Mäusen, relevant ist. Es sollte daher untersucht werden, ob eine verminderte IL-1 Wirkung zu veränderten tumoralen CCL22-Level führt und ob dies einen Einfluss auf die Infiltration des Tumors durch T_{reg} und das Tumorwachstum hat. Um die IL-1-Wirkung *in vivo*

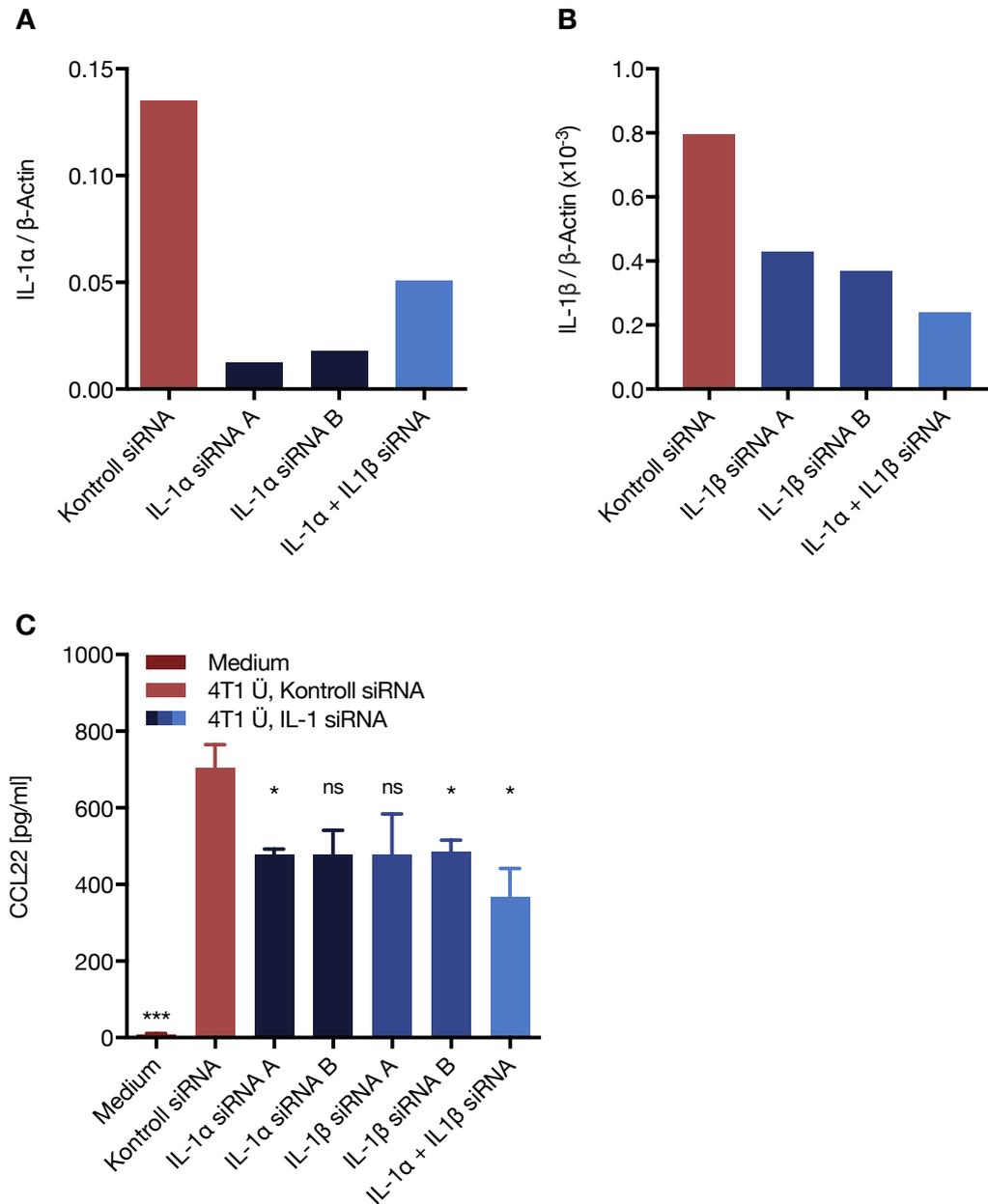


Abbildung 3.3: CCL22 in den Kulturüberständen von murinen Splenozyten nach Kultivierung mit Tumorüberständen von Kontroll- oder IL-1-siRNA-transfizierten 4T1 0,5 bis 2×10^5 4T1 wurden mit Kontroll-siRNA, je zwei verschiedenen siRNA gegen IL-1 α oder IL-1 β oder mit einer Kombination aus zwei siRNA gegen IL-1 α und IL-1 β transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium gewechselt und der Zellüberstand für weitere 24 Stunden gesammelt. **(A,B)** 72 Stunden nach der Transfektion wurde aus den transfizierten 4T1 RNA isoliert und die IL-1 α - (A) und IL-1 β - (B) mRNA-Mengen mittels qRT-PCR bestimmt, als Referenzgen wurde β -Actin gemessen. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. **(C)** 3 Wells mit 2×10^5 murinen Splenozyten wurden mit den Kulturüberständen (4T1 Ü) oder DMEM-Vollmedium inkubiert, nach 48 Stunden wurden in den Kulturüberständen CCL22 Proteinmengen mittels ELISA gemessen. Dargestellt sind der Mittelwert aus Triplikaten + SEM. P-Werte wurden im Vergleich zur Kontroll-siRNA Kondition mittels zweiseitigen t-Test bestimmt (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, ns nicht signifikant). Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

modulieren zu können, wurde Anakinra eingesetzt. Anakinra ist ein rekombinanter humaner IL-1-Rezeptorantagonist, der kompetitiv an den Interleukin-1 Typ I Rezeptor bindet und dadurch die Wirkung von sowohl IL-1 α , als auch IL-1 β hemmt (Dinarello et al. 2012).

Um den Einfluss von Anakinra zu untersuchen wurden BALB/c Mäusen subkutane 4T1-Tumore gesetzt und, sobald die Tumore gut tastbar waren, zwei Gruppen gebildet. Einer Gruppe wurde im Anschluss täglich 0,5 mg Anakinra subkutan injiziert, die Kontrollgruppe erhielt eine äquivalente Menge PBS. Nach 20 Tagen wurde der Versuch beendet, die Versuchstiere getötet und mittels ELISA die CCL22-Menge in den Lysaten der Tumore analysiert. Zudem wurden mittels Durchflusszytometrie die tumorinfiltrierenden T-Zell-Populationen analysiert.

Die durchschnittliche TumorgroÙe war in Behandlungs- und Kontrollgruppe während des gesamten Beobachtungszeitraum vergleichbar (Abbildung 3.4A). Die Tumore der Mäuse, welche mit Anakinra behandelt wurden, zeigten tendenziell eine verringerte tumorale CCL22-Menge im Vergleich zur Kontrollgruppe, dieser Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant (Abbildung 3.4B). Der Anteil von CD4 $^{+}$ und CD8 $^{+}$ T-Zellen an den tumorinfiltrierenden CD3 $^{+}$ T-Zellen blieb durch die Anakinra-Therapie unverändert, insbesondere zeigte sich kein veränderter Anteil an CD4 $^{+}$ FoxP3 $^{+}$ T $_{reg}$ (Abbildung 3.4C).

Zusammenfassend weisen die Daten darauf hin, dass auch *in vivo* eine Verminderung der IL-1-Wirkung zu einer reduzierten intratumoralen CCL22-Sekretion führen könnte, auch wenn hier keine statistische Signifikanz erreicht wurde. Dies müsste mit einer größeren Gruppe an Versuchstieren bestätigt werden. Auf das Tumorwachstum scheint Anakinra im 4T1-Modell hingegen keinen Einfluss zu haben. Interessanterweise blieben trotz der tendenziell verminderten CCL22-Level der Anteil an tumorinfiltrierenden T $_{reg}$ unverändert.

3.1.5 Blockade von IL-1 durch Anakinra im Hepa1-6 Tumormodell

Nachdem zuvor die Wirkung von Anakinra im 4T1-Modell analysiert wurde, sollte nun überprüft werden, ob die Effekte in einem anderen Modell vergleichbar sind. Hierfür wurde das Hepa1-6 Modell, eine murine Hepatom-Zelllinie, gewählt. Im Gegensatz zu 4T1 exprimieren die Zellen *in vitro*, auf qRT-PCR-Ebene, weder IL-1 α noch IL-1 β (Daten nicht gezeigt). Das Modell könnte sich also eher zur Analyse von systemischen IL-1-Effekten eignen. Wie im vorherigen Experiment, sollte überprüft werden, welchen Einfluss eine Anakinra-Behandlung auf das Tumorwachstum, sowie auf die CCL22-Menge in Tumor und Lymphknoten hat.

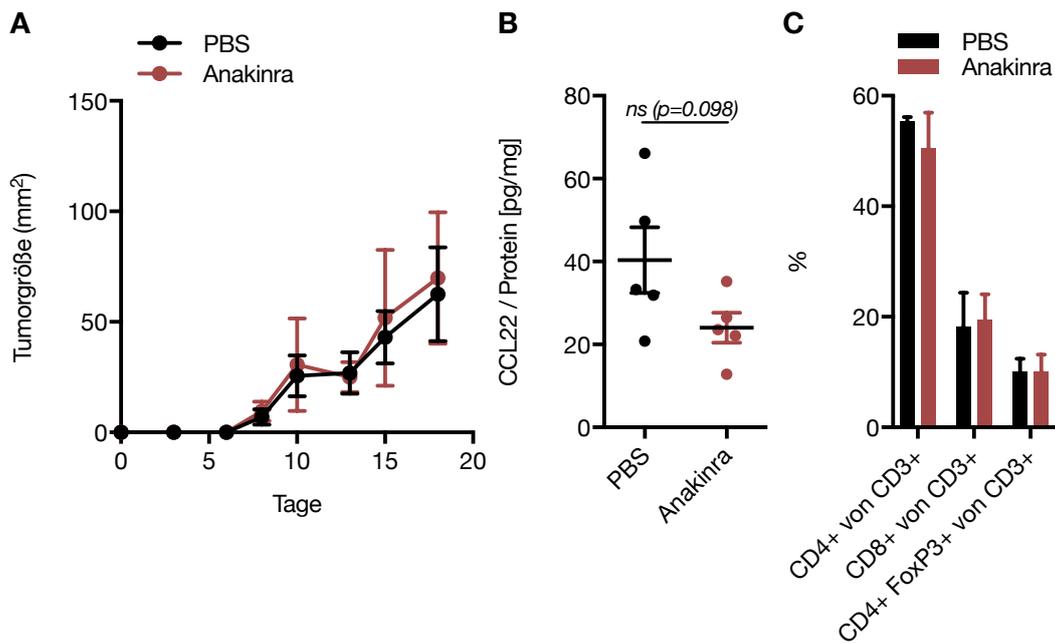


Abbildung 3.4: Intratumorale CCL22-Level, T-Zell-Infiltration und Wachstumskurven von Anakinra-behandelten, 4T1-tumortragenden Mäusen Weiblichen BALB/c Mäusen mit subkutanen 4T1-Tumoren wurde ab dem 9. Tag nach der Tumorinduktion täglich 0,5 mg Anakinra subkutan appliziert (n = 5), den Kontrolltieren eine äquivalente Menge PBS (n = 5). **(A)** Die Tumorfäche wurde alle 2 bis 3 Tage gemessen. **(B)** Die Mäuse wurden an Tag 20 nach Tumorinduktion getötet, die Hälfte des Tumorgewebes lysiert und CCL22-Mengen in den Lysaten mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind Mittelwert + SEM, p-Werte wurden mittels zweiseitigen t-Test bestimmt (ns nicht signifikant). **(C)** Aus dem restlichen Tumorgewebe wurden die tumorinfiltrierenden Leukozyten isoliert, gefärbt und die relativen T-Zell-Population mittels Durchflusszytometrie analysiert (jeweils n = 3).

Hierfür wurden C57BL/6 Mäusen subkutane Hepa1-6-Tumore gesetzt und wiederum eine Anakinra-Behandlungsgruppe und eine PBS-Kontrollgruppe gebildet. Den Mäusen der Behandlungsgruppe wurde ab einer durchschnittlichen Tumorgroße von 10 bis 20 mm² täglich 0,5 mg Anakinra injiziert. Bei Erreichen einer durchschnittlichen Tumorgroße von 80 bis 120 mm² wurden der Versuch beendet, Tumoren und Lymphknoten lysiert, und die CCL22-Level mittels ELISA analysiert.

Wie im 4T1-Modell ließ sich kein Unterschied in den durchschnittlichen Tumorgroßen der beiden Gruppen beobachten (Abbildung 3.5A). Während die CCL22 Mengen in den Tumorlysaten der beiden Gruppen vergleichbar waren, wiesen die Lysate der Lymphknoten der Anakinragruppe tendenziell niedrigere CCL22 Level auf als die der Kontrollgruppe, der Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant (Abbildung 3.5B).

Auch im Hepa1-6 Modell hat Anakinra also keinen Einfluss auf das Tumorwachstum. Die Hemmung der IL-1-Wirkung könnte jedoch systemisch, wie zum Beispiel im Lymphknoten, die CCL22-Produktion verringern.

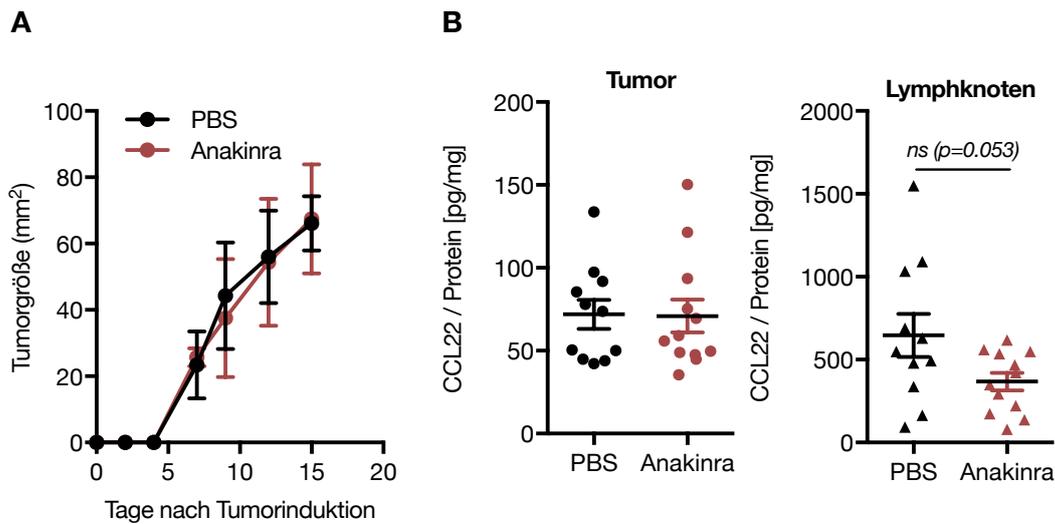


Abbildung 3.5: CCL22 in Tumor und Lymphknoten sowie Wachstumskurven von Anakinra-behandelten, Hepa1-6-tumortragenden Mäusen Weiblichen C57BL/6 Mäusen mit subkutanen Hepa1-6-Tumoren wurde ab einer durchschnittlichen Tumorgroße von 10 bis 20 mm² täglich 0,5 mg Anakinra subkutan appliziert, den Kontrolltieren eine äquivalente Menge PBS. **(A)** Die Tumorfleichen wurden alle 2 bis 3 Tage gemessen, die abgebildete Tumorkurve ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente, dargestellt sind Mittelwert (n = 5) + SEM. **(B)** Die Mäuse wurden bei einer durchschnittlichen Tumorgroße von 80 bis 120 mm² getötet, Tumore und periphere Lymphknoten lysiert und CCL22-Mengen in den Lysaten mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Messwerte aus drei Experimenten (n=12 in der Anakinra-Gruppe und n=11 in der PBS-Gruppe) mit Mittelwert + SEM, p-Werte wurden mittels zweiseitigen t-Test bestimmt (ns nicht signifikant).

3.2 CCL22-Induktion durch GM-CSF

Im vorangegangenen Abschnitt dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CCL22 im Tumor durch tumoreigenes IL-1 induziert werden kann. Die Daten aus den verwendeten murinen Modellen weisen jedoch darauf hin, dass dies nicht der einzige Mechanismus der intratumoralen CCL22-Induktion ist. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde daher die CCL22-Induktion durch verschiedene andere Zytokine *in vitro* gescreent. Dabei konnte das Zytokin GM-CSF als möglicher potenter CCL22-Induktor identifiziert werden (unveröffentlichte Daten). Die Rolle von GM-CSF sollte im Folgenden genauer analysiert werden.

GM-CSF ist ein Zytokin aus der Familie der koloniestimulierenden Faktoren. Aufgrund seiner immunstimulierenden Wirkung wird der Einsatz von GM-CSF in antitumoralen Immuntherapien erprobt. Es werden jedoch zunehmend auch protumorale und immunregulatorische Eigenschaften von GM-CSF beschrieben, darunter die Expansion von T_{reg} (Bhattacharya et al. 2015; Bhattacharya et al. 2011).

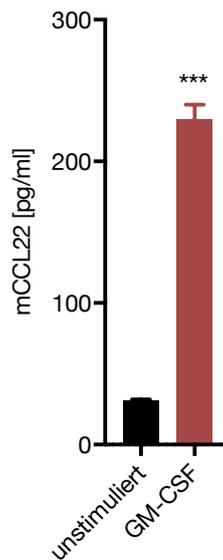


Abbildung 3.6: CCL22 in den Kulturüberständen muriner Splenozyten nach Stimulation mit rekombinalem GM-CSF 1×10^6 murine Splenozyten wurden in $200 \mu\text{l}$ T-Zell-Medium kultiviert und mit 20 ng/ml rekombinalem GM-CSF stimuliert oder unstimuliert belassen. Nach 24 Stunden wurden die Zellüberstände abgenommen und die CCL22-Proteinmenge mittels ELISA gemessen. Dargestellt sind der Mittelwert aus Triplikaten + SEM, der p-Wert wurde mittels zweiseitigem t-Test bestimmt (***) $p < 0,001$). Die gezeigten Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

3.2.1 GM-CSF induziert CCL22 in Splenozyten *in vitro*

In einem ersten Schritt sollte untersucht werden, ob rekombinantes GM-CSF zu einer Induktion von CCL22 in murinen Immunzellen führt. Hierfür wurden murine Splenozyten mit 20 ng/ml GM-CSF stimuliert und die CCL22-Menge in den Zellüberständen gemessen (Abbildung 3.6). Es konnte gezeigt werden, dass die Stimulation mit GM-CSF eine potente Steigerung der CCL22-Sekretion *in vitro* bewirkt.

3.2.2 Applikation von GM-CSF induziert CCL22 *in vivo*

Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob GM-CSF auch *in vivo* zu einer Stimulation der CCL22-Produktion führt. Hierfür wurden C57BL/6 Mäuse 5 Tage mit GM-CSF behandelt, Kontrolliere mit dem gleichen Volumen PBS. Im Anschluss wurde die CCL22-Proteinmenge in den Organlysaten mittels ELISA gemessen (Abbildung 3.7). In der Tat führte eine Behandlung mit GM-CSF im Vergleich zu PBS zu einer signifikanten Steigerung der CCL22-Produktion in den mesenterischen Lymphknoten. In Milz, sowie peripheren Lymphknoten ließ sich eine tendenziell erhöhte CCL22 Produktion beobachten, der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Es ist durchaus denkbar, dass der ausgeprägtere Effekt im mesenterischen Lymphknoten auf die intraperitoneale Applikation zurückzuführen ist.

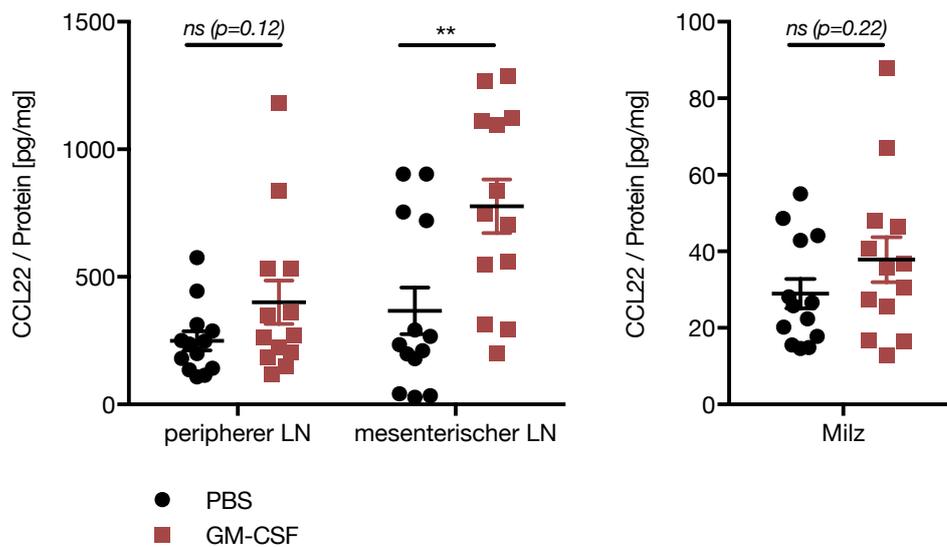


Abbildung 3.7: CCL22 in Organlysaten von GM-CSF- und PBS-behandelten Tieren C57BL/6 Mäusen wurden über einen Zeitraum von 5 Tagen täglich 2 µg GM-CSF intraperitoneal injiziert, Kontrolltiere erhielten täglich äquivalente PBS-Injektionen. 24 Stunden nach der letzten Injektion wurden die Tiere getötet, periphere Lymphknoten (LN), mesenterische LN, und Milz entnommen und lysiert. In den Organlysaten wurden mittels ELISA die CCL22-Proteinmengen bestimmt. Dargestellt sind Mittelwert (n = 13) + SEM, die Daten sind gepoolt aus drei unabhängigen Experimenten. P-Werte wurden mittels zweiseitigem t-Test bestimmt (** p < 0,01, ns nicht signifikant).

3.2.3 Generierung einer Doxycyclin-abhängig GM-CSF-exprimierenden Tumorzelllinie

Nachdem gezeigt werden konnte, dass GM-CSF *in vitro* wie *in vivo* zu einer CCL22-Induktion führt, sollte im Anschluss untersucht werden, ob diese Mechanismen auch im Tumormodell eine Rolle spielen. Hierfür sollte eine Tumorzelllinie generiert werden, in der sich die GM-CSF-Produktion gezielt induzieren lässt. Wir wählten ein induzierbares Modell anstatt eines stabil überexprimierenden Modells, um ein Anwachsen der subkutanen Tumore *in vivo* ohne den Einfluss von GM-CSF gewährleisten zu können. Dies ist relevant, da Vorversuche gezeigt hatten, dass GM-CSF überexprimierende Tumore teilweise bereits vor dem Anwachsen abgestoßen werden. Als Tumorzelllinie wurde CT26 gewählt, eine murine Kolonkarzinom-Zelllinie auf BALB/c-Hintergrund. Zur induzierbaren Expression von GM-CSF wurde das Prinzip der Tetracyclin-gesteuerten Genregulation verwendet (Gossen et al. 1995), welches in unserer Arbeitsgruppe bereits zuvor etabliert wurde (Rapp 2013).

Bei dem eingesetzten *Tet-On*-System wird die Genexpression des Gens *Csf2*, welches für GM-CSF kodiert, in Anwesenheit von Doxycyclin, einem Antibiotikum aus der Klasse der Tetracycline, ak-

tiviert. Die Genexpression ist dabei von dem Promotor P_{tet} abhängig. Dieser Promotor wird durch das Binden von rtTA (*reverse tetracyclin controlled transactivator*) aktiviert. Bei Abwesenheit von Doxycyclin kann rtTA nicht an den Promotor binden, so dass die Genexpression unterdrückt wird. Bei Anwesenheit von Doxycyclin kommt es hingegen zu einer Konformationsänderung des rtTA, so dass es an die Bindungsstellen des Promotors binden kann und die Genexpression aktiviert wird.

Dieses System sollte mittels eines viralen Konstrukts in die Tumorzelllinie integriert werden. Das Konstrukt enthält dabei zum einen rtTA, welches durch einen CMV Promotor reguliert und dadurch konstitutiv exprimiert wird. Zum anderen enthält es den P_{tet} -Promotor, welches die Genexpression von *Csf2* steuert. Das beschriebene Plasmid war bereits während Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe kloniert worden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Konstrukt mittels lentiviraler Transduktion stabil in die CT26 Tumorzelllinien integriert. Die generierte Tumorzelllinie wurde als rtTA-CSF2-CT26 bezeichnet.

Zunächst sollte die Transduktion und die Funktion des *Tet-On-Systems* *in vitro* überprüft werden. Hierfür wurden die generierten rtTA-CSF2-CT26 mit unterschiedlichen Mengen von Doxycyclin inkubiert und die GM-CSF-Produktion mittels ELISA in den Zellüberständen gemessen. Als Inkubationsmedium wurde dabei das serumfreie Medium Opti-MEM verwendet, da FSC-haltige Medien Tetracyclin-Verunreinigungen aufweisen können. In der Tat konnte gezeigt werden, dass in den rtTA-CSF2-CT26 GM-CSF Doxycyclin-abhängig induziert werden kann und dass steigende Doxycyclin-Dosen zu einer steigenden GM-CSF-Produktion führen (Abbildung 3.8). Dies bestätigte die erfolgreiche Generierung einer Tumorzelllinie mit induzierbarer GM-CSF-Expression.

3.2.4 GM-CSF-überexprimierende Tumore induzieren CCL22 *in vivo*

Die zuvor generierte Tumorzelllinie rtTA-CSF2-CT26 sollte in einem nächsten Schritt im Mausmodell eingesetzt werden. Dabei sollte zunächst die Funktionsfähigkeit des Systems überprüft werden. Es sollte daher untersucht werden, ob die Tumorzellen im Mausmodell als subkutane Tumore anwachsen und ob auch *in vivo* eine Induktion von GM-CSF möglich ist. Zudem sollte in einem weiteren Schritt untersucht werden, ob die GM-CSF-Produktion durch den Tumor zu einer CCL22-Induktion führt.

Hierfür wurden BALB/c Mäuse subkutane rtTA-CSF2-CT26-Tumore gesetzt. Nach dem sicheren Anwachsen der Tumore wurde die Hälfte der Mäuse mit Doxycyclin behandelt. Das Doxycyclin wurde dabei dem Trinkwasser der Tiere zugesetzt. Nach einer Behandlungsdauer von drei Tagen wurden die Tiere getötet und GM-CSF- sowie CCL22-Proteinlevel in den Organen analysiert.

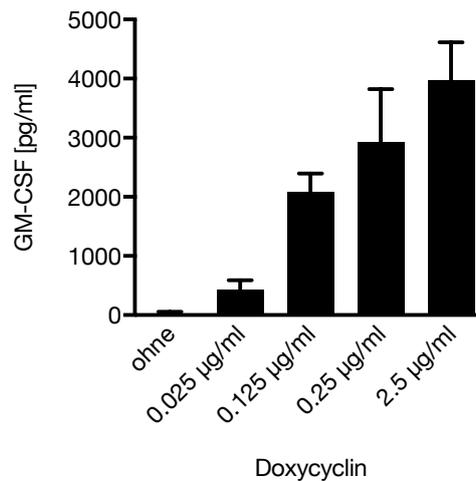


Abbildung 3.8: GM-CSF in Zellüberständen von rtTA-CSF2-CT26 nach Titration von Doxycyclin
 5×10^4 rtTA-CSF2-CT26 wurden in 1 ml Opti-MEM ausgesät und mit verschiedenen Konzentrationen von Doxycyclin (0,025 µg/ml, 0,125 µg/ml, 0,25 µg/ml, 2,5 µg/ml) inkubiert oder unstimuliert belassen. Nach 24 Stunden wurden die Zellüberstände abgenommen und die GM-CSF Proteinmengen in den Überständen mittels ELISA gemessen. Dargestellt sind der Mittelwert aus Triplikaten + SEM, die gezeigten Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

Es konnte gezeigt werden, dass die neu generierte Tumorzelllinie rtTA-CSF2-CT26 *in vivo* anwächst (Abbildung 3.9A) und die Doxycyclin-Behandlung zu einer GM-CSF-Produktion durch die Tumore führt (Abbildung 3.9B). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass in Tumor und peripheren Lymphknoten die CCL22-Menge durch die Doxycyclin-Behandlung signifikant gesteigert werden konnte. In der Milz konnte ebenfalls eine Steigerung der CCL22-Menge beobachtet werden, der Unterschied war jedoch nicht signifikant (Abbildung 3.9C). Dies impliziert, dass eine tumorale GM-CSF-Produktion zu einer lokalen, sowie systemischen CCL22-Induktion führt.

Ausblickend müssten diese Ergebnisse in einer Wiederholung des Versuches bestätigt werden. Zum besseren Verständnis des Modells wäre es relevant, Dauer und Dosis der Doxycyclin-Behandlung zu modulieren. Darüber hinaus wäre es jedoch insbesondere interessant, die Auswirkung der GM-CSF-Induktion auf das Tumorwachstum bei einem längeren Versuchsverlauf zu analysieren. Es sollte zudem untersucht werden, ob die gesteigerten CCL22-Level einen Einfluss auf die Infiltration durch T_{reg} hat.

3.3 Charakterisierung von CCL22-defizienten dendritischen Zellen

Neben den Mechanismen der tumoralen CCL22-Induktion, sollte im nächsten Abschnitt dieser Arbeit die Rolle von CCL22 in DC untersucht werden. DC sind unter homöostatischen Bedin-

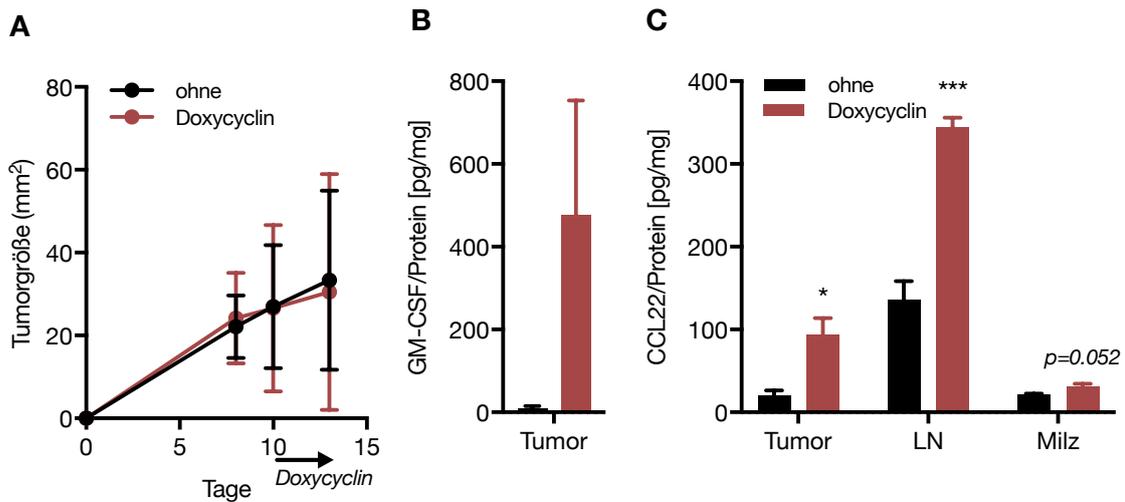


Abbildung 3.9: Doxycyclin-Behandlung von rtTA-CSF2-CT26-tumortragenden Mäusen

(A) Weibliche BALB/c Mäuse mit subkutanen rtTA-CSF2-CT26 Tumoren wurden ab Tag 10 nach Tumorinduktion mit 1 mg/ml Doxycyclin im Trinkwasser behandelt (n = 5), Kontrolltiere erhielten normales Trinkwasser ohne Doxycyclin (n = 5). Die Tumorfläche wurde alle 2 bis 3 Tage gemessen. (B, C) Nach 3 Tagen Doxycyclin-Behandlung wurden die Mäuse getötet, Tumor, Milz und periphere Lymphknoten (LN) entnommen, die Organe lysiert und mittels ELISA die Proteinmengen von GM-CSF (B) und CCL22 (C) in den Organlysaten gemessen. Dargestellt sind Mittelwert + SEM, p-Werte wurden mittels zweiseitigen t-Test bestimmt (* p < 0,05, *** p < 0,001).

gungen die Hauptproduzenten von CCL22 (Vulcano et al. 2001). In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte zudem gezeigt werden, dass BMDC (*bone marrow-derived dendritic cells*), welche mittels GM-CSF und IL-4 aus dem Knochenmark von CCL22-KO-Mäusen generiert wurden, in Vakzinierungsexperimenten eine stärkere Immunantwort bewirken als BMDC aus WT-Mäusen. Dabei waren WT-Mäuse mit Ovalbumin-beladenen WT- und CCL22-KO-BMDC geimpft worden. Eine Vakzinierung mit CCL22-KO-BMDC resultierte dabei in einem deutlich höheren Anteil an Ovalbumin-spezifischen und Interferon- γ -positiven zytotoxischen T-Zellen (Rapp et al. 2019). Im Folgenden sollten mögliche Mechanismen für den immunstimulierenden Phänotyp von CCL22-KO-BMDC identifiziert werden.

3.3.1 Expression von kostimulatorischen Markern und MHC-II auf dendritischen Zellen ist unabhängig von CCL22

In einem ersten Schritt sollte überprüft werden, ob der immunstimulierende Phänotyp von CCL22-KO-BMDC auf die Expression von kostimulatorischen Markern CD80 und CD86 oder MHC-II zurückzuführen ist, da diese Oberflächenmoleküle eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von T-Zellen durch DC spielen.

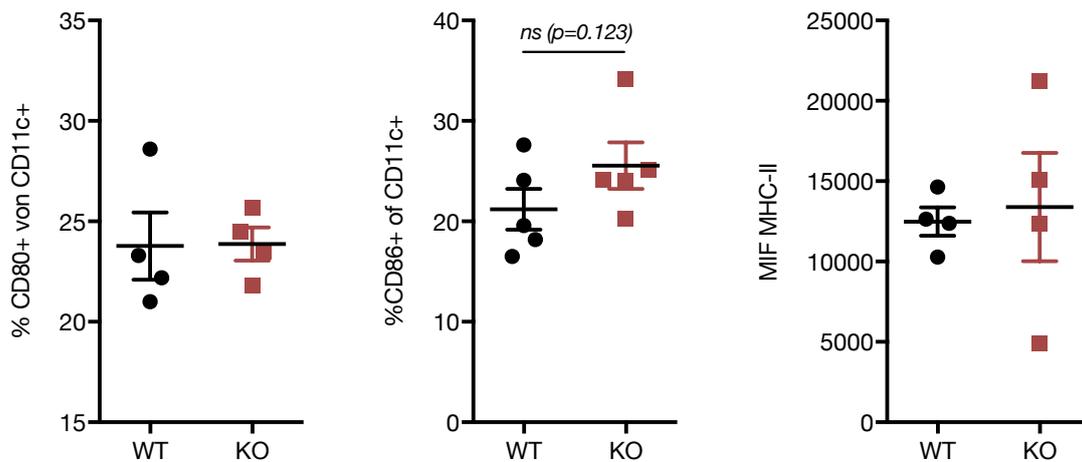


Abbildung 3.10: Expression kostimulatorischer Marker und MHC-II auf WT- und CCL22-KO-BMDC
 Aus dem Knochenmark von WT- und CCL22-KO-Mäusen wurden BMDC generiert. Die Expression der kostimulatorischen Marker CD80 und CD86, sowie MHC-II auf CD11c+ Zellen wurden durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind Mittelwert (n = 4 unabhängig generierte BMDC) + SEM, p-Wert wurde mittels zweiseitigen t-Test berechnet (ns nicht signifikant).

Hierfür wurden aus dem Knochenmark von WT- und CCL22-KO-Mäusen BMDC generiert und mittels Durchflusszytometrie der Anteil von CD80- und CD86-positiven Zellen sowie die Expression von MHC-II gemessen. Da sich bei der Färbung von MHC-II keine klaren Populationen unterscheiden ließen, wurde die mittlere Fluoreszenz der Färbung (MIF: *Mean Intensity Fluorescence*) bestimmt. Es zeigten sich bei keinem der analysierten Marker signifikante Unterschiede (Abbildung 3.10). Die Daten zeigen, dass CD80, CD86 und MHC-II unabhängig von CCL22 exprimiert werden.

3.3.2 Fähigkeit der Antigenpräsentation und -prozessierung von dendritischen Zellen ist unabhängig von CCL22

In einem nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob sich die Fähigkeit der Antigenpräsentation und Antigenprozessierung von WT- und CCL22-KO-BMDC unterscheidet und dies für die stärkere Immunantwort bei der Vakzinierung mit CCL22-KO-BMDC verantwortlich sein könnte. Als Maß dafür sollte die Proliferation und Interferon- γ -Produktion von T-Zellen nach Kontakt mit BMDC analysiert werden. Hierfür wurden Splenozyten von OT-1 Mäusen eingesetzt. Diese exprimieren einen transgenen T-Zell-Rezeptor, welcher über MHC-I präsentiertes Ovalbumin erkennt, sodass die CD8+ T-Zellen in diesem Modell Ovalbumin-spezifisch sind (Clarke et al. 2000). Der Kontakt mit Ovalbumin-präsentierenden DC führt also in diesem Modell zu einer Aktivierung

und damit zu Proliferation und Interferon- γ -Produktion der T-Zellen.

WT- und CCL22-KO-BMDC wurden auf zwei verschiedene Arten mit Antigen beladen und mittels des TLR9-Ligand CpG maturiert. Um die Fähigkeit zur Antigenpräsentation zu analysieren wurden die BMDC zum einen 6 Stunden mit SIINFEKL inkubiert. Dies ist ein Ovalbumin-Peptid, welches über MHC-I präsentiert wird. Zum anderen wurden BMDC mit dem Ovalbumin-Vollprotein inkubiert, welches von den DC zunächst aufgenommen und prozessiert werden muss um schließlich über MHC-I präsentiert werden zu können. In einer dritten Kontroll-Kondition wurden die BMDC nicht mit Antigen beladen. Nach der Inkubation mit dem Antigen wurden die BMDC mehrfach gewaschen, um ungebundenes, gelöstes Antigen so weit möglich zu entfernen. Die Zellen wurden daraufhin drei bis vier Tage mit CFSE-gefärbten OT-1 Splenozyten kultiviert. Durch die CFSE-Färbung ließ sich im Anschluss durchflusszytometrisch die Proliferation analysieren, da der fluoreszierende Farbstoff bei jeder Zellteilung auf beide Tochterzellen aufgeteilt wird und somit zu einer Reduktion der Fluoreszenz führt. Zudem wurde mittels ELISA in den Überständen die Interferon- γ -Menge gemessen.

Es konnte gezeigt werden, dass die Inkubation der OT-1 Splenozyten mit antigenpräsentierenden BMDC zu einer starken Proliferation (Abbildung 3.11A, Histogramme der CFSE-Dilution in Abbildung 3.11C) und Interferon- γ -Produktion (Abbildung 3.11B) führte. Im Vergleich dazu war die Aktivierung durch unbeladene BMDC deutlich schwächer, Splenozyten ohne BMDC-Kontakt zeigten keine Proliferation. Es konnte jedoch kein Unterschied zwischen WT- und CCL22-KO-BMDC Konditionen festgestellt werden. Die Fähigkeit der BMDC zur Antigenpräsentation und -prozessierung ist also offensichtlich unabhängig von CCL22.

3.3.3 Migration und Überleben von dendritischen Zellen *in vivo* ist unabhängig von CCL22

Im Anschluss sollte überprüft werden, ob WT- und CCL22-KO-BMDC *in vivo* ein unterschiedliches Migrationsverhalten oder Überleben aufweisen. Hierfür wurde ein adoptiver Transfer von gefärbten BMDC durchgeführt, welche durch ihre Fluoreszenz mittels Durchflusszytometrie wiedererkannt und somit *in vivo* verfolgt werden konnten.

Dabei wurden WT- und CCL22-KO-BMDC mit dem blauen Fluoreszenzfarbstoff eFluor 450 gefärbt und jeweils 4 bis 5×10^6 BMDC subkutan in die Oberschenkel von C57BL/6 Mäusen injiziert. Um vergleichbare Bedingungen wie in dem Vakzinierungsexperimenten herzustellen, erfolgte zudem eine Injektion mit dem Adjuvanz Alum und dem TLR-Agonisten CpG (Rapp et al. 2019).

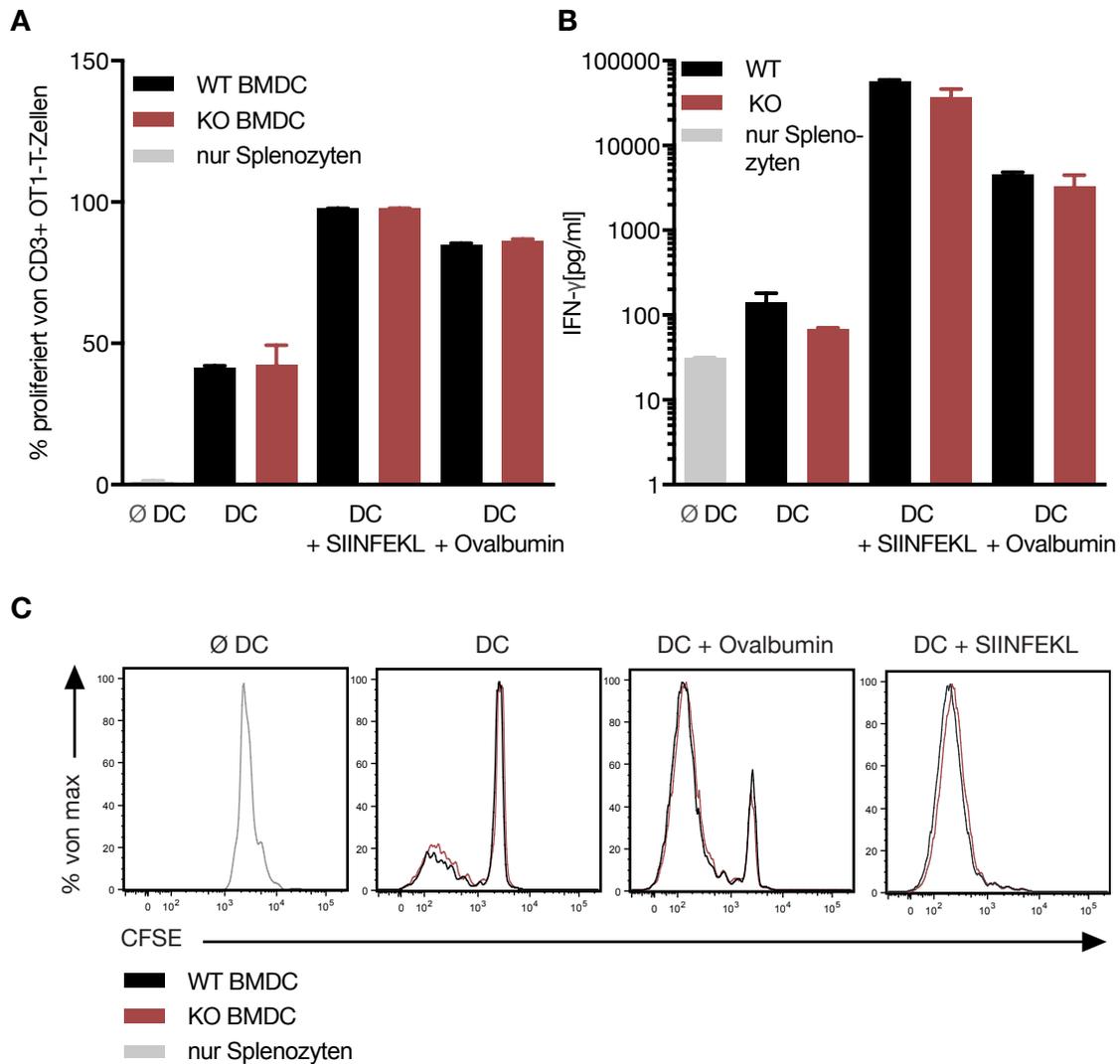


Abbildung 3.11: Proliferation und Interferon- γ -Produktion von OT-1-Splenozyten durch Kokultur mit WT- und CCL22-KO-BMDC Aus dem Knochenmark von WT und CCL22-KO-Mäusen wurden BMDC (DC) generiert. 10^6 BMDC/ml wurden 6 Stunden mit 100 nM SIINFEKL oder 100 μ g/ml Ovalbumin-Vollprotein beladen oder unbeladen gelassen. Eine Stunde nach Beginn der Inkubation mit dem Antigen wurde zusätzlich mit CpG 1826 (6 μ g/ml) stimuliert. Pro Kondition wurde in 3 Wells 10^5 CFSE-markierte OT-1-Splenozyten mit 5×10^3 stimulierten BMDC kokultiviert, als Kontrolle wurden 10^5 Splenozyten ohne DC kultiviert (Ø DC). **(A, C)** Nach 3 Tagen wurde die Zellen gegen CD3 gefärbt und die Proliferation durchflusszytometrisch analysiert. In (C) sind repräsentative Histogramme der CFSE-Dilution der CD3+ OT1-T-Zellen dargestellt. **(B)** In den Überständen der Kokultur wurde die Interferon- γ -Menge (IFN- γ) mittels ELISA gemessen. Dargestellt sind Mittelwert (aus Triplikaten) + SEM, Daten sind repräsentativ für zwei ähnliche, unabhängige Experimente.

Nach 36 Stunden wurden die Empfängermäuse getötet und mittels Durchflusszytometrie die Zahl der migrierten, blau fluoreszierenden, BMDC im ipsilateralen Lymphknoten bestimmt. Mittels PI-Färbung wurde zudem der Anteil der vitalen Zellen ermittelt.

Die Analyse im ipsilateralen inguinalen Lymphknoten erfolgte, nachdem in einem Vorversuch zunächst untersucht worden war, wohin BMDC nach subkutaner Injektion in den Oberschenkel migrieren. Wie in den FACS-Plots in Abbildung 3.12A zu sehen ist, ließen sich insbesondere im ipsilateralen inguinalen Lymphknoten die gefärbten BMDC wiederfinden. Es fand keine Migration in den kontralateralen inguinalen Lymphknoten und in die Milz statt. Die Migration in die axillären Lymphknoten war vernachlässigbar gering.

In den ipsilateralen inguinalen Lymphknoten konnte kein Unterschied bei der Zahl der migrierten, fluoreszierenden Zellen zwischen den Mäusen, welchen WT-BMDC injiziert worden waren und den Mäusen, welchen CCL22-KO-BMDC injiziert worden waren, festgestellt werden. Der Anteil an PI-negativen, also vitalen, BMDC an den migrierten Zellen unterschied sich ebenfalls nicht. Migration und Überleben der BMDC *in vivo* scheinen also unabhängig von CCL22 zu sein.

3.3.4 Verminderte Migration von regulatorischen T-Zellen zu Überständen von CCL22-defizienten dendritischen Zellen

Zuletzt sollte untersucht, ob der unterschiedliche Phänotyp von WT- und CCL22-KO-BMDC bei dem Vakzinierungsversuchen auf eine unterschiedliche Attraktion von Immunzellen zurückzuführen ist. In einem Transwell-Migrationsassay sollte dabei das Migrationsverhalten von T-Zellen in Richtung von Überständen von BMDC analysiert werden. Dabei waren insbesondere die folgenden drei T-Zellpopulationen von Interesse: CD8⁺ zytotoxische T-Zellen, CD4⁺ FoxP3⁻ konventionelle T-Zellen, sowie CD4⁺ FoxP3⁺ T_{reg}.

Für die Generierung der zellfreien Überstände wurden WT- und CCL22-KO-BMDC für 24 Stunden in Opti-MEM kultiviert. Opti-MEM wurde als serumfreies Medium gewählt, um den möglichen Einfluss von chemoattraktiven Proteinen, die in FCS enthalten sind, zu vermeiden. Die Migration von T-Zellen wurde mittels eines Transwell-Migrationsassays analysiert. Hierbei wird die Migration von Zellen, welche von einem oberen Kompartiment durch eine poröse Membran in Richtung eines unteren Kompartiments migrieren, beobachtet. Im oberen Kompartiment wurden 10⁶ frisch isolierte Splenozyten eingesetzt, im unteren Kompartiment unkonditioniertes Medium (Opti-MEM) oder Zellüberstände von WT- oder CCL22-KO-BMDC. Nach 6h wurden mittels Durchflusszytometrie die migrierten T-Zell-Populationen untersucht.

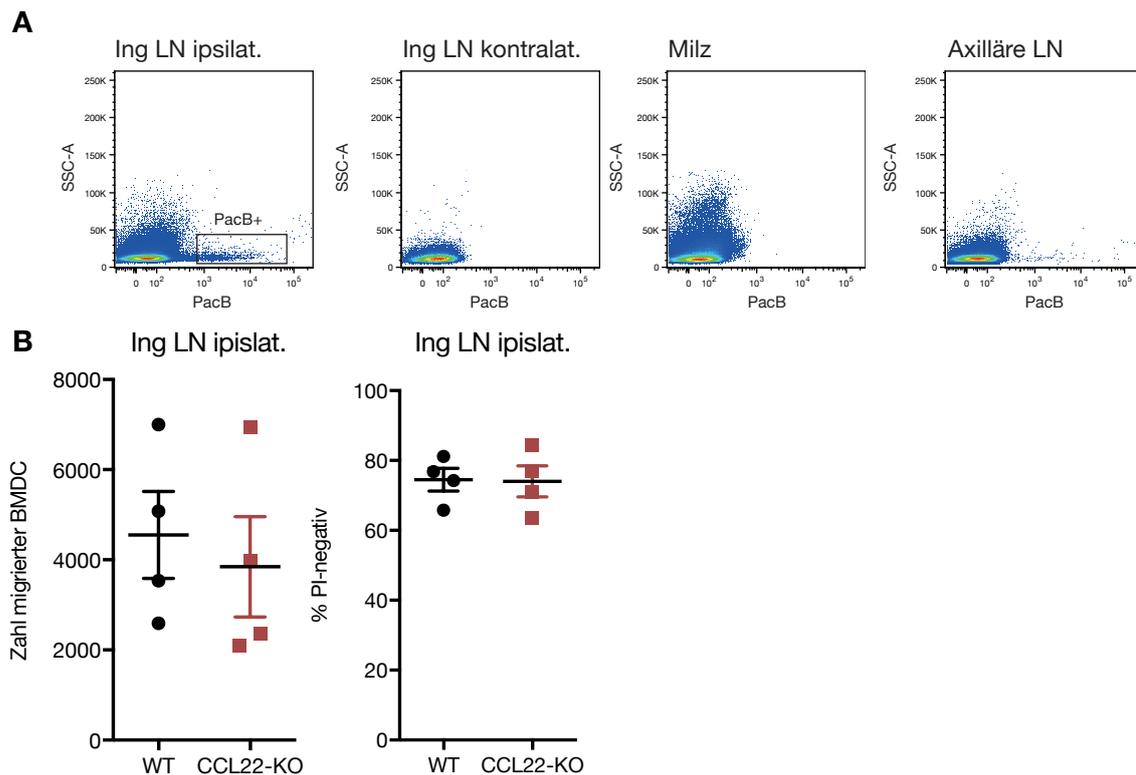


Abbildung 3.12: Migration und Überleben von WT- und CCL22-KO-BMDC *in vivo* Aus dem Knochenmark von Wildtyp (WT) und CCL22-KO Mäusen wurden BMDC generiert, maturiert, eFluor 450 gefärbt und 4 bis 5×10^6 BMDC subkutan in die Oberschenkel von C57BL/6 Mäusen injiziert. **(A)** Gefärbte BMDC wurden in einen Oberschenkel einer C57BL/6 Maus injiziert. Nach 36 Stunden wurde die Migration der Zellen in den ipsilateralen und kontralateralen inguinalen Lymphknoten (ing LN), die Milz und die axillären Lymphknoten (LN) durchflusszytometrisch analysiert. Die migrierten Zellen stellten sich dabei als Pacific-Blue-positive (PacB+) Zellen dar. **(B)** Gefärbte BMDC wurden in beide Oberschenkel von C57BL/6 Mäusen injiziert (2 Mäuse erhielten WT-BMDC, 2 weitere Mäuse CCL22-KO-BMDC) und nach 36 Stunden die Migration in den ipsilateralen inguinalen Lymphknoten durchflusszytometrisch untersucht. Die absolute Zahl der migrierten PacB+ BMDC wurde mit Hilfe von Counting Beads berechnet. Durch Propidium-Iodid-Färbung wurde der Anteil der vitalen, PI-negativen an den migrierten PacB+ BMDC bestimmt. Dargestellt sind Mittelwert + SEM, die Daten sind repräsentativ für zwei ähnliche, unabhängige Experimente.

Es konnte gezeigt werden, dass eine signifikant höhere Anzahl an T_{reg} in Richtung den Überständen von WT-BMDC im Vergleich zu den Überständen von CCL22-KO-BMDC migrierten. Bei der Zahl der migrierten konventionellen T-Zellen (T_{conv}), sowie der migrierten zytotoxischen T-Zellen (CTL) ließ sich hingegen kein signifikanter Unterschied beobachten. (Abbildung 3.13B). Auch der relative Anteil von FoxP3+ T_{reg} an den migrierten CD3+ T-Zellen war bei der Migration in Richtung von WT-BMDC-Überständen signifikant höher als bei der Migration in Richtung von CCL22-KO-BMDC-Überständen (Abbildung 3.13A). Mittels CCL22-ELISA konnte bestätigt werden, dass in den Überständen der WT-BMDC CCL22 vorhanden war, während die Überstände der CCL22-KO-BMDC, wie zu erwarten, kein CCL22 enthielten (Abbildung 3.13C).

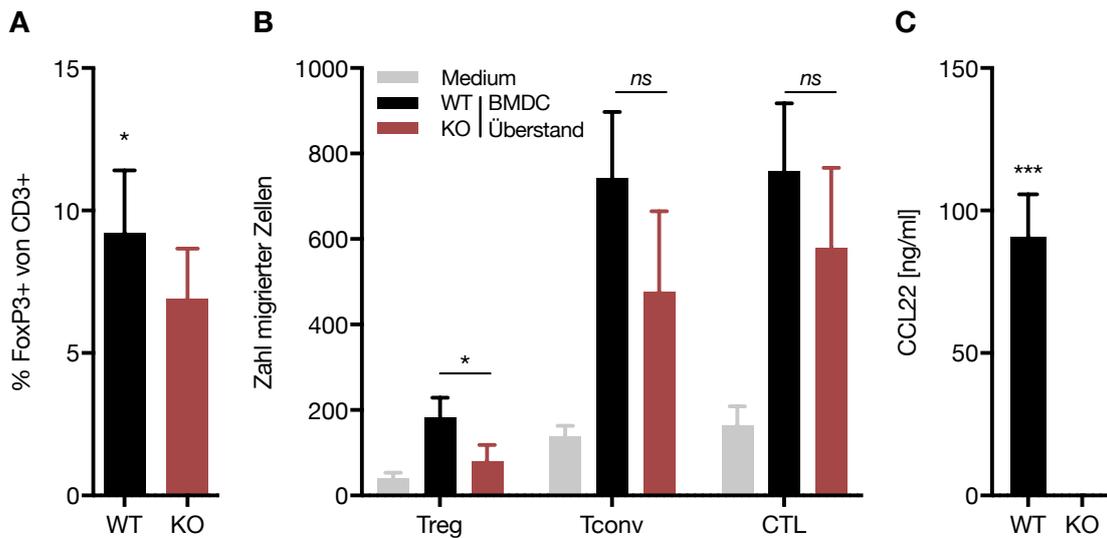


Abbildung 3.13: Migration muriner T-Zellen in Richtung der Überstände von WT- und CCL22-KO-BMDC (A, B) Aus dem Knochenmark von Wildtyp- (WT) und CCL22-KO- (KO) Mäusen wurden BMDC generiert, mit einer Konzentration von 10^6 Zellen/ml ausgesät und nach 24 Stunden die Überstände abgenommen. In einem Transwell-Migrationsassay wurde die Migration von murinen WT-Splenozyten in Richtung der Überstände untersucht. Relative (A) und absolute Zellzahlen (B) der migrierten T-Zellen wurden durchflusszytometrisch analysiert. Dabei wurden die Populationen $CD3^+ CD4^+ FoxP3^+ T_{reg}$, $CD3^+ CD4^+ FoxP3^- T_{conv}$ (konventionelle T-Zellen) und $CD3^+ CD8^+ CTL$ (zytotoxische T-Zellen) untersucht. Dargestellt sind Mittelwert ($n = 6$ unabhängige Experimente, $n = 3$ für die Kondition Medium) + SEM. Die p-Werte wurden mittels Wilcoxon Test berechnet (* $p < 0,05$, ns nicht signifikant) (C) In den eingesetzten Überständen der WT- und CCL22-KO-BMDC wurde mittels ELISA die CCL22 Menge gemessen. Abgebildet sind Mittelwert ($n = 4$) + SEM, p-Werte wurden mittels zweiseitigen t-Test bestimmt (***) $p < 0,001$.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Überstände von CCL22-KO-BMDC zu einer reduzierten Migration von T_{reg} führen als die der WT-BMDC. Die verminderte Migration der T_{reg} könnte dazu beitragen, dass CCL22-KO-BMDC eine stärkere T-Zell-Immunität hervorrufen.

3.3.5 CCL22-Expression in Subtypen von dendritischen Zellen

In vorangegangenen Teilen dieser Arbeit wurde insbesondere die Funktion von BMDC als *in-vitro*-Modell für DC analysiert. Physiologischerweise sind jedoch eine Vielzahl von Subtypen von DC bekannt, welche unterschiedliche Funktionen aufweisen (Merad et al. 2013). Um die Funktion von CCL22 besser verstehen zu können, war es daher zusätzlich von Interesse, welcher Subtyp von DC in lymphatischen Geweben für die Produktion von CCL22 verantwortlich ist. Hierfür sollten mittels FACS-Sort fünf verschiedene Subpopulationen von $CD11c^+$ Zellen aufgereinigt werden und mittels qRT-PCR die CCL22 Expression gemessen werden.

Zur Aufreinigung wurden aus Milz, peripheren sowie mesenterischen Lymphknoten von C57BL/6 Mäusen zunächst mittels MACS-Technik $CD11c^+$ Zellen isoliert. Die Sorting-Strategie beim an-

schließenden FACS-Sort ist in Abbildung 3.14A dargestellt: In einem ersten Schritt wurden nur CD11c⁺ Zellen ausgewählt, schließlich wurden fünf Subpopulationen *gated*: zunächst wurden B220⁻ cDC von B220⁺ pDC getrennt. Unter den cDC wurden weiterhin zwei Subtypen unterschieden: CD8⁺ CD11b⁻ cDC sowie CD8⁻ CD11b⁺ cDC. Unabhängig davon wurden unter den CD11c⁺ DC zudem zwei Populationen anhand des Oberflächenproteins CD103 aufgereinigt: Die CD103⁺ DC, sowie die CD103⁻ DC.

Die CCL22-Expression, welche im Anschluss mittels qRT-PCR in den Lysaten der Subpopulationen gemessen wurden, ist in Abbildung 3.14B dargestellt. Es zeigte sich, dass alle analysierten Subpopulationen CCL22 exprimierten. Interessanterweise zeigten die CD103⁺ DC die stärkste CCL22-Expression, wohingegen die CD103⁻ DC sowie B220⁺ pDC nur eine deutlich geringere CCL22-Expression aufwiesen. Diese Daten zeigen, dass die unterschiedlichen Subtypen von DC nicht gleichermaßen CCL22 produzieren.

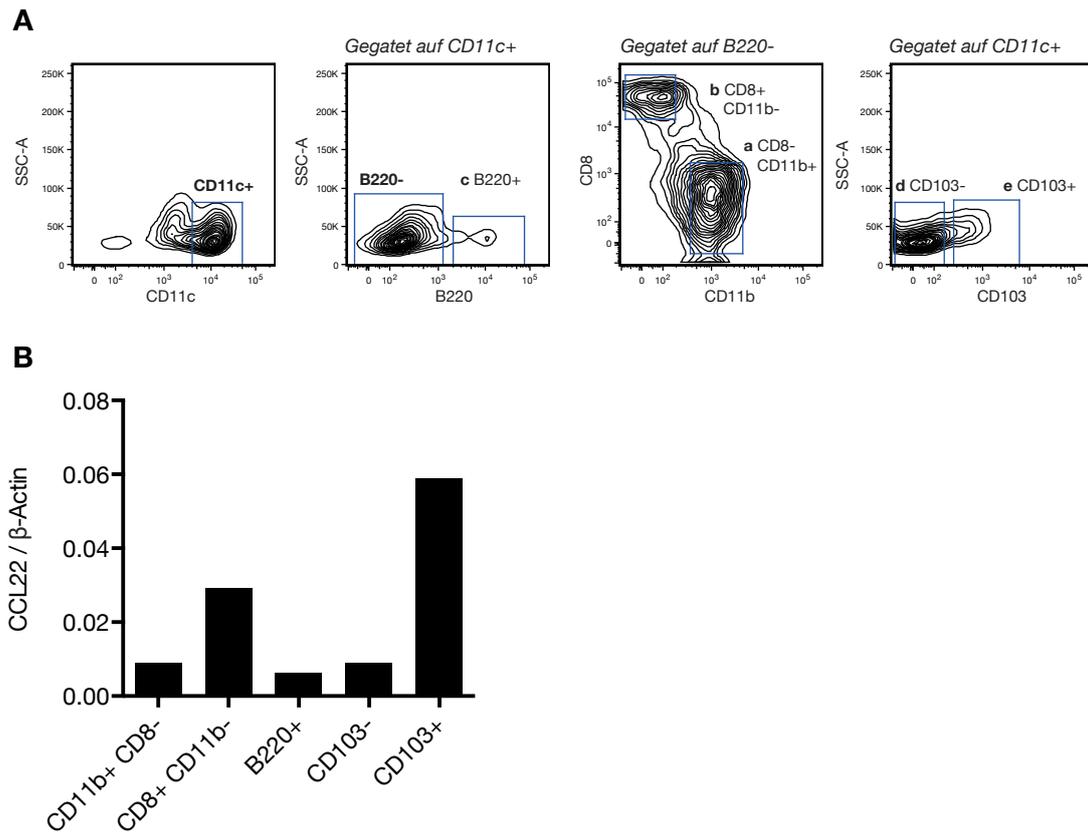


Abbildung 3.14: CCL22-Expression von DC-Subtypen Aus Einzelzellsuspensionen von Milzen sowie peripheren und mesenterischen Lymphknoten von zehn weiblichen C57BL/6 Mäusen wurden mittels MACS-Technik CD11c+ DC angereichert. **(A)** Aus diesen wurden durch FACS-Sort fünf verschiedene Subtypen von DC aufgereinigt: a) CD11c+ B220- CD11b+ CD8-, b) CD11c+ B220- CD11b- CD8+, c) CD11c+ B220+, d) CD11c+ CD103-, e) CD11c+ CD103+. **(B)** Aus den aufgereinigten Zellen wurde mit Hilfe der Trizol Methode RNA isoliert und mittels qRT-PCR die CCL22-mRNA-Menge gemessen, Referenzgen war dabei β -Actin. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige, ähnliche Experimente.

4 Diskussion

4.1 CCL22-Induktion durch intratumorales IL-1

4.1.1 Tumoreigenes IL-1 induziert CCL22

Maligne Tumore nutzen eine Vielzahl von Mechanismen, um der Erkennung und Bekämpfung durch das Immunsystem zu entgehen. Wichtiger Bestandteil des Tumormilieus sind T_{reg} , ein spezieller Subtyp von T-Zellen mit immunsuppressiven Eigenschaften. Die Infiltration des Tumorgewebes durch T_{reg} wurde für eine Vielzahl von Tumorentitäten beschrieben. Dabei ist eine hohe T_{reg} -Infiltration häufig mit einer schlechten Prognose assoziiert (Tanaka et al. 2016). Das Chemokin CCL22 bewirkt die Migration von T_{reg} über den Rezeptor CCR4 (Iellem et al. 2001). So wurde bereits durch verschiedene Autoren gezeigt, dass die Akkumulation von T_{reg} in Tumor durch CCL22 vermittelt werden kann (Curiel et al. 2004; Anz et al. 2015). In der Tat weisen verschiedene humane Tumore eine erhöhte CCL22-Produktion auf, darunter zum Beispiel das Ovarialkarzinom (Curiel et al. 2004), das Mammakarzinom (Gobert et al. 2009; Ohara et al. 2009; Faget et al. 2011), das Magenkarzinom (Mizukami et al. 2008), das kolorektale Karzinom (Wågsäter et al. 2008), das Ösophaguskarzinom (Maruyama et al. 2010) oder das Hodgkin-Lymphom (Ishida et al. 2006). In mehreren Studien konnte dabei eine Korrelation zwischen CCL22-Level und Treg-Infiltration nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde CCL22 bereits als negativer prognostischer Faktor bei Brustkrebs (Li et al. 2013) und Magenkarzinom (Wu et al. 2018) beschrieben.

Über die Mechanismen der intratumoralen CCL22-Induktion ist bisher wenig bekannt. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Induktion von CCL22 durch IL-1 α und IL-1 β untersucht. IL-1 α und IL-1 β sind Teil der IL-1-Zytokinfamilie und nehmen eine zentrale Position bei dem Ablauf von Entzündungsreaktionen ein (Dinarello 2013). Neben der Rolle bei autoimmunen und autoinflammatorischen Erkrankungen wird zunehmend eine Beteiligung von IL-1 im immunologischen Tumormilieu diskutiert (Mantovani et al. 2018; Dinarello 2010).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die humane Pankreaskarzinom-Zelllinie PaTu-8988T, sowie die murine Mammakarzinom-Zelllinie 4T1 sowohl IL-1 α , als auch IL-1 β exprimieren. Die Inkubation von humanen PBMC sowie murinen Splenozyten mit den Überständen der IL-1-exprimierenden Tumorzelllinien führte zu einer starken Induktion der CCL22-Sekretion. In der Folge konnte ein effizienter siRNA-Knockdown von IL-1 in beiden Tumorzelllinien etabliert werden. Die Blockade der IL-1-Expression bewirkte sowohl im humanen, als auch im murinen Modell eine Reduktion der CCL22-Sekretion durch die Immunzellen nach Inkubation mit den Tumorzellüberständen. Bemerkenswerterweise konnte die CCL22-Induktion im humanen PaTu-8988T-Modell durch die Blockade des intratumoralen IL-1 α komplett aufgehoben werden. Im murinen 4T1-Modell war eine Reduktion der CCL22-Sekretion insbesondere durch die gemeinsame Blockade von IL-1 α und IL-1 β nachweisbar, jedoch war der Effekt weniger ausgeprägt als im humanen Modell. Hier sind möglicherweise zusätzliche Mechanismen der CCL22-Induktion beteiligt.

Es ist bereits länger aus verschiedenen *in vitro* Arbeiten bekannt, dass Zytokine der IL-1-Familie die Produktion von CCL22 stimulieren können. So konnte die Stimulation mit rekombinanten IL-1 α und IL-1 β die CCL22-Expression und Sekretion auf verschiedenen Immunzellpopulationen (Rodenburg et al. 1998; Andrew et al. 1998; Vulcano et al. 2001) und Epithelzellen (Berin et al. 2001) induzieren. Auch IL-33, ein weiteres Mitglied der IL-1-Familie kann eine CCL22-Induktion bewirken (Kurokawa et al. 2013). Zudem konnte gezeigt werden, dass rekombinantes IL-1 α zur Aktivierung des CCL22-Promotors führt (Wiedemann et al. 2016).

Während die Stimulation und Inhibition der CCL22-Sekretion durch verschiedene Zytokine und mikrobielle Produkte *in vitro* vielfach untersucht wurde (Mantovani et al. 2000), ist über die Mechanismen der CCL22-Induktion im Tumorgewebe nur wenig bekannt. Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass sowohl die Kokultur von Immunzellen und Tumorzellen, als auch die Kultur von Immunzellen in zellfreien Tumorüberständen zu einer starken CCL22-Sekretion führen (Wiedemann et al. 2016; Wiedemann 2014). Die Experimente dieser Arbeit konnten diese Beobachtung mit Überständen der Tumorzelllinien 4T1 und PaTu-8988T validieren.

Über die Quelle des intratumoralen CCL22 herrscht in der Literatur Uneinigkeit. Einige Autoren beschreiben, dass CCL22 durch die Tumorzellen selbst (Faget et al. 2011; Yang et al. 2012) produziert werden kann. Mehrere Studien identifizierten jedoch Immunzellen, insbesondere intratumorale DC als Hauptproduzenten von CCL22 (Wiedemann et al. 2016; Anz et al. 2015; Xia et al. 2014; Hanks et al. 2013). Als mögliche Faktoren, welche für die intratumorale CCL22-Sekretion durch Immunzellen verantwortlich sein könnten, wurden dabei IL-27 (Xia et al. 2014) und TGF- β (Hanks

et al. 2013) identifiziert. Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Arbeit die IL-1-Produktion durch Tumorzellen als neuer Mechanismus der intratumoralen CCL22-Induktion identifiziert werden (Abbildung 4.1).

Die Produktion von IL-1 durch Tumore ist bereits mehrfach beschrieben worden. So konnten eine tumorale IL-1-Expression sowohl in verschiedenen Tumorzelllinien (Elaraj et al. 2006; Singer et al. 2006; Watari et al. 2014), als auch in humanen Tumorbiopsien, beispielsweise im malignen Melanom, kolorektalem Karzinom, nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (Elaraj et al. 2006; Gemma et al. 2001), Magenkarzinom (Tomimatsu et al. 2001), Brustkrebs (Jin et al. 1997), sowie Kopf-Hals-Karzinomen (Chen et al. 1999) nachgewiesen werden. Mitunter ist die IL-1-Produktion des Tumors mit einem aggressiven Tumorphänotyp assoziiert (Gemma et al. 2001; Jin et al. 1997).

In der aktuellen Literatur werden eine Vielzahl von IL-1-vermittelten Effekten diskutiert, welche Karzinogenese, Tumorwachstum, sowie -metastasierung begünstigen könnten (Mantovani et al. 2018). Als mögliche protumorale Mechanismen wurden beispielsweise die IL-1-vermittelte Angiogenese (Voronov et al. 2003) und die Akkumulation von immunsuppressiven myeloiden Zellen, wie MDSC im Tumormilieu (Elkabets et al. 2010) beschrieben. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass intratumorales IL-1 zu einer Induktion von CCL22 führt. Es ist bekannt, dass intratumorales CCL22 die Akkumulation von immunsuppressiven T_{reg} vermitteln kann (Curiel et al. 2004; Anz et al. 2015). Die CCL22-Induktion durch IL-1 könnte einen weiteren, neuen Mechanismus für die protumorale Effekte von IL-1 darstellen.

4.1.2 IL-1 als therapeutischer Angriffspunkt in der Tumorthherapie

Im Anbetracht der Rolle von CCL22 im immunsuppressiven Tumormilieu stellte sich die Frage, ob sich der neu beschriebene Mechanismus der intratumoralen CCL22-Induktion durch IL-1 auch als therapeutischer Angriffspunkt nutzen lassen könnte. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher tumortragende Mäuse mit dem IL-1-Rezeptorantagonist Anakinra behandelt.

Die IL-1-Blockade bewirkte im 4T1-Tumormodell im Trend eine Reduktion der intratumoralen CCL22-Level. Eine Beeinflussung der intratumoralen CCL22-Induktion durch IL-1-Blockade scheint insgesamt also nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* möglich. Die Behandlung mit Anakinra hatte jedoch keinen Einfluss auf die Tumordinfiltration durch T_{reg} .

Im Hepa1-6 Tumormodell, welches *in vitro*, im Gegensatz zum 4T1-Modell, kein IL-1 exprimiert, blieben die CCL22-Mengen im Tumor durch die Anakinra-Behandlung hingegen unverändert. Es

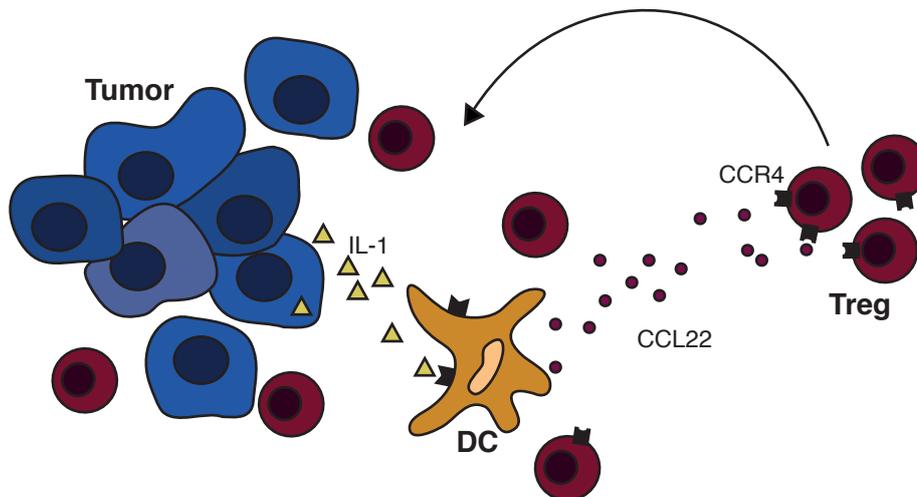


Abbildung 4.1: Mechanismus intratumoraler CCL22-Sekretion: Tumorzellen sezernieren IL-1, welches zur Induktion von CCL22 in dendritischen Zellen (DC) führt (Wiedemann et al. 2016). CCL22 kann über den Rezeptor CCR4 die Migration regulatorischer T-Zellen (Treg) bewirken (Iellem et al. 2001; Curiel et al. 2004).

ist also denkbar, dass der Einfluss von Anakinra auf die intratumoralen CCL22-Level von dem IL-1-Expressionsstatus des Tumors abhängt. Interessanterweise hatte die IL-1-Blockade mittels Anakinra jedoch in keinem der beiden Modelle einen Einfluss auf das Tumorstadium.

Es wurde bereits mehrfach gezeigt, dass die Blockade von IL-1 das Wachstum von Tumoren begrenzen kann (Bar et al. 2004; Elaraj et al. 2006). Elaraj et al. hatten dabei in einem humanen Xenograft-Tumormodell in athymischen Nacktmäusen zeigen können, dass die Applikation des IL-1-Rezeptorantagonists Anakinra das Wachstum von IL-1-exprimierenden Tumoren inhibiert. Anakinra hatte hingegen keinen Einfluss auf das Wachstum von Tumoren, welche kein IL-1 produzierten (Elaraj et al. 2006). Diese Daten stehen im Kontrast zu den Tumorexperimenten in dieser Arbeit, bei denen Anakinra auch im IL-1-exprimierenden 4T1-Modell keinen Einfluss auf das Tumorstadium hatte. Elaraj et al. hatten jedoch deutlich höhere Dosen Anakinra (2,4 bis 5 mg pro Tag) eingesetzt und die Therapie schon mit Injektion der Tumorzellen begonnen, während in dieser Arbeit lediglich 0,5 mg pro Tag injiziert wurden. Zudem wurde die Therapie erst bei bereits tastbaren Tumoren begonnen, so dass das Anwachsen der Tumore nicht beeinflusst wurde. Womöglich spielt IL-1 in den murinen Tumormodellen, welche in dieser Arbeit untersucht wurden, jedoch eine geringere Rolle für das Tumorstadium als in humanen Tumoren.

Es ist denkbar, dass eine effizientere IL-1-Blockade durch höhere Dosen von Anakinra oder eine andere Art der Applikation auch eine deutlichere CCL22-Suppression bewirken könnte. Darüber hinaus ist aber anzunehmen, dass in murinen Tumormodellen auch weitere, IL-1-unabhängige Mechanismen zur intratumorale CCL22-Induktion beitragen. Weiterhin ist davon auszugehen, dass die Anreicherung von T_{reg} im Tumorgewebe neben der IL-1-abhängigen CCL22-Induktion auch durch andere Faktoren reguliert wird. In der Tat ist es bekannt, dass die Migration von T_{reg} auch durch andere Chemokine, wie CCL1 oder CCL17, vermittelt wird (Tellem et al. 2001).

Aus kürzlich erschienen klinischen Studien gibt es erste Hinweise, dass die Blockade von IL-1 einen vorteilhaften Effekt in der Tumorthherapie haben könnte. So führte in einer Phase-I-Studie die Behandlung von Patienten mit metastasiertem Tumorleiden mit einem neutralisierenden, gegen IL-1- α gerichteten, monoklonalen Antikörper zu einer verminderten Tumorkachexie (Hong et al. 2014). Die IL-1-Blockade mittels Anakinra bewirkte bei Patienten mit *Smoldering Myeloma* ein verlängertes progressionsfreies Überleben (Lust et al. 2009). Darüber hinaus beobachtete Ridker et al. in einer großen randomisierten, kontrollierten Studie mit Arteriosklerose Patienten, dass Patienten, welche mit dem IL-1 β -Antikörper Canakinumab behandelt wurden, eine reduzierte Lungenkrebs-Inzidenz, sowie eine reduzierte Lungenkrebs-Mortalität aufwiesen (Ridker et al. 2017).

Zusammenfassend stellt IL-1 also einen vielversprechenden therapeutischen Angriffspunkt in der Tumorthherapie dar. Die Daten dieser Arbeit liefern dabei Hinweise darauf, dass IL-1 nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* zur intratumoralen Induktion von CCL22 beiträgt, welches wiederum eine wichtige Rolle im immunsuppressiven Tumormilieu spielt.

4.2 CCL22-Induktion durch GM-CSF

CCL22 stellt einen wichtigen Bestandteil des immunsuppressiven Tumormilieus dar. Es ist daher wichtig, ein besseres Verständnis über die Mechanismen der intratumoralen Induktion zu erlangen. Neben der IL-1-abhängigen CCL22-Induktion, welche im vorangegangenen Abschnitt beschrieben ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit zudem die Induktion von CCL22 durch das Zytokin GM-CSF untersucht. GM-CSF gehört zur Zytokinfamilie der koloniestimulierenden Faktoren. Ursprünglich wurde GM-CSF lediglich als hämatopoetischer Wachstumsfaktor charakterisiert, welcher die Differenzierung und Proliferation von Granulozyten und Makrophagen aus hämatopoetischen Vorläuferzellen des Knochenmarks stimuliert (Burgess et al. 1980). Inzwischen ist es jedoch bekannt, dass GM-CSF auch auf eine Vielzahl von reifen myeloischen Zellen wirkt (Hamilton 2008). Insbesondere begünstigt GM-CSF die Entstehung von DC, sowie deren Ausreifung, Aktivierung und

die Expression von kostimulatorischen Molekülen (Inaba et al. 1992; Daro et al. 2000; Vremec et al. 1997; Mach et al. 2000). Während GM-CSF klassischerweise als proinflammatorisches Zytokin gilt, werden zunehmend auch immunregulatorische Effekte durch GM-CSF beschrieben (Hamilton 2008; Bhattacharya et al. 2011; Shiomi et al. 2015; Bhattacharya et al. 2015).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass rekombinantes GM-CSF zu einer starken Induktion von CCL22 führt. Dies konnte zum einen *in vitro* durch die Stimulation von murinen Splenozyten, zum anderen *in vivo* durch die Behandlung von C57BL/6-Mäusen mit rekombinanten GM-CSF beobachtet werden. Auch intratumoral führte die induzierbare Überexpression von GM-CSF zu einer verstärkten CCL22-Produktion in Tumor und Lymphknoten.

In der Literatur existieren bisher lediglich vage Hinweise darauf, dass GM-CSF ein Induktor von CCL22 sein könnte. So beobachteten Andrew et al. eine fragliche CCL22-Induktion nach Inkubation von humanen Monozyten mit GM-CSF (Andrew et al. 1998). Hirata et al. beschrieben zudem, dass bei GM-CSF-defizienten Mäusen die CCL22-Hochregulierung im Darmepithel nach einer Infektion mit Darmpathogenen ausbleibt (Hirata et al. 2010). Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen somit erstmals eindeutig die Rolle von GM-CSF als Induktor von CCL22 im murinen Immunsystem und als möglichen Faktor der intratumoralen CCL22-Induktion.

Die Rolle von GM-CSF in Tumorbiologie und Tumor-Immuntherapie wird kontrovers diskutiert (Bhattacharya et al. 2015; Yan et al. 2017; Hong 2016; Parmiani et al. 2007). Aufgrund der bekannten pro-inflammatorischen Charakteristika sowie der aktivierenden Wirkung auf DC gilt GM-CSF als potenter Aktivator der antitumoralen Immunität (Mach et al. 2000; Dranoff et al. 1993). Der Einsatz von GM-CSF wird daher in verschiedenen Tumorummuntherapien erprobt und inzwischen sind zwei GM-CSF-basierende Immuntherapien zugelassen: Sipuleucel-T, ein zelluläres Therapieverfahren des metastasierten Prostatakarzinoms mit DC, welche *ex vivo* mit einem GM-CSF-PAP-Fusionsprotein inkubiert wurden (Cheever et al. 2011) sowie Talimogene laherparepvec, ein onkolytisches, GM-CSF-sezernierendes Virus beim metastasierten malignen Melanom (Andtbacka et al. 2015). Darüber hinaus wird die Vakzinierung mit GM-CSF-überexprimierenden Tumorzellen untersucht. So hatten Dranoff et al. bereits 1993 zeigen können, dass die Vakzinierung mit GM-CSF-überexprimierende B16-Melanomzellen im Mausmodell eine starke antitumorale Immunantwort hervorruft (Dranoff et al. 1993). Die Vakzinierung mit GM-CSF-sezernierenden, bestrahlten Tumorzellen zeigte auch in ersten klinischen Studien vielversprechende Ergebnisse (Soiffer et al. 1998; Salgia et al. 2003; Lutz et al. 2011). Jedoch gibt es zunehmend Daten, darunter auch große Phase-III-Studien, welche auf schädliche Effekte von GM-CSF-basierten Tumorthérapien hinweise (Lassi et

al. 2010; Faries et al. 2009), so dass zunehmend protumorale, sowie immunsuppressive Funktionen von GM-CSF untersucht werden (Yan et al. 2017; Bhattacharya et al. 2015).

So konnte beispielsweise die Expression von GM-CSF durch verschiedene Tumore nachgewiesen werden (Rokhlin et al. 1996; Pylayeva-Gupta et al. 2012). Dabei kann die Expression von GM-CSF Tumorprogression oder einer verschlechterten Prognose verknüpft sein (Revoltella et al. 2012; Ninck et al. 2003), in manchen Studien zeigten sich jedoch auch antitumorale GM-CSF-Effekte (Urdinguio et al. 2013). Mechanistisch konnten unter anderen immunsuppressive Effekte von intratumoralen GM-CSF nachgewiesen werden, wie die Akkumulation von MDSC (Bronte et al. 1999; Morales et al. 2010; Dufait et al. 2015) oder T_{reg} (Jinushi et al. 2007). Allgemein existieren zunehmende Hinweise auf tolerogene Effekte durch GM-CSF, insbesondere durch die Induktion von tolerogenen DC und die Expansion von T_{reg} (Bhattacharya et al. 2011; Gangi et al. 2005; Gaudreau et al. 2007; Vasu et al. 2003).

Zusammenfassend sind die genauen Mechanismen der inflammatorischen und tolerogenen Wirkungen von GM-CSF noch nicht abschließend verstanden. In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass GM-CSF ein starker Induktor von CCL22 ist und auch intratumoral zu einer Hochregulierung von CCL22 führt. Die CCL22 Induktion könnte zu einer verstärkten Rekrutierung von T_{reg} führen. Dies wäre ein möglicher Mechanismus für immunsuppressive Effekte von GM-CSF und könnte die Wirksamkeit von GM-CSF-enthaltenden Tumormimmuntherapien begrenzen. Unter Umständen könnten diese Therapien durch eine simultane Blockade von CCL22 verbessert werden. Interessanterweise zeigten verschiedene Studien bereits, dass GM-CSF-basierte Immuntherapien durch die zusätzliche Inhibition oder Depletion von T_{reg} verbessert werden können (Hodi et al. 2014; Liang et al. 2013).

Ein wichtiger Bestandteil dieser Arbeit war die erfolgreiche Etablierung eines Tumormodells, in dem sich GM-CSF Doxycyclin-abhängig induzieren lässt. Die gezeigten Daten der tumortragenden Mäuse in dieser Arbeit sind aufgrund der kleinen Zahl an behandelten Tieren sicherlich eher als explorativ anzusehen und weitere Experimente sind nötig, um diese zu bestätigen und mögliche Konsequenzen der GM-CSF-abhängigen CCL22-Induktion zu analysieren. So wäre es von großem Interesse zu untersuchen, ob die CCL22-Induktion zu einer veränderten Tumordinfiltration durch T_{reg} führt. Darüber hinaus sind längere Beobachtungszeiträume nötig, um mögliche Effekte der GM-CSF-Überexpression auf das Tumorwachstum zu beobachten. Um zu untersuchen, ob die CCL22-Induktion tatsächlich ein relevanter Mechanismus der immunsuppressiven GM-CSF-Wirkung ist, sollten zudem Experimente mit GM-CSF-überexprimierenden Tumoren in CCL22-

defizienten Mäusen durchgeführt werden.

4.3 CCL22 in murinen dendritischen Zellen

DC nehmen eine zentrale Rolle bei der Entstehung einer Immunantwort ein und haben maßgeblichen Einfluss darauf, ob gegen ein spezifisches Antigen eine Immun- oder Toleranzreaktion ausgelöst wird. Das Chemokin CCL22 wird vorrangig von DC produziert (Vulcano et al. 2001; Tang et al. 1999). Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass die Vakzinierung mit CCL22-*Knockout*-DC (CCL22-KO-DC) eine wesentlich stärkere Immunantwort auslöst, als die Vakzinierung mit Wildtyp-DC (WT-DC) (Rapp et al. 2019). Dies deutet daraufhin, dass CCL22 in DC eine immunregulatorische Funktion einnimmt und CCL22-defiziente DC einen immunstimulierenden Phänotyp aufweisen. Im Rahmen des dritten Teils dieser Arbeit wurden mögliche Mechanismen für diesen Phänotyp untersucht und die Eigenschaften von CCL22-KO-DC charakterisiert.

Es konnte gezeigt werden, dass CCL22-KO-DC im Vergleich zu WT-DC keine Unterschiede bei der Expression von kostimulatorischen Molekülen, der Antigenpräsentation- und prozessierung, sowie dem Migrationsverhalten und Überleben *in vivo* aufweisen. Überstände von CCL22-KO-DC bewirkten jedoch eine verringerte Migration von T_{reg} .

Es wurde bereits mehrfach beschrieben, dass das Chemokin CCL22 die Migration von T_{reg} bewirkt (Iellem et al. 2001; Layseca-Espinosa et al. 2013; Curiel et al. 2004). Auch zur Bedeutung von CCL22 für die Migration von T_{reg} in Richtung von DC existieren bereits mehrere Untersuchungen (Kang et al. 2010; Layseca-Espinosa et al. 2013; Muthuswamy et al. 2008; Iellem et al. 2001). So hatten Kang et al. DC mittels IL-4 und GM-CSF aus humanen Monozyten generiert und zeigen können, dass der selektive Knockdown von CCL22 mittels siRNA in DC die Migration von T_{reg} in Richtung der DC-Überstände reduziert. Darüber hinaus konnte mehrfach gezeigt werden, dass die Migration von T_{reg} in Richtung von humanen DC-Überständen durch den Einsatz von CCL22-blockierenden Antikörpern gehemmt werden kann (Kang et al. 2010; Iellem et al. 2001). Auch im Mausmodell beobachteten Layseca-Espinosa et al. eine reduzierte Migration von T_{reg} in Richtung von CD8+ DC aus G-CSF behandelten Mäusen nachdem CCL22 mittels intra- oder extrazellulärer Antikörper blockiert wurde (Layseca-Espinosa et al. 2013).

Neben der Anziehung von T_{reg} kann CCL22 aus DC jedoch auch auf eine Vielzahl anderer Immunzellen wirken, darunter insbesondere auf T_{H2} -Zellen (Bonecchi et al. 1998b; Imai et al. 1999; Lebre et al. 2005) sowie auf aktivierte T-Zellen (Chang et al. 1997; Schaniel et al. 1998; Tang et al. 1999).

Interessanterweise zeigten Wu et al., dass die Bindung von aktivierten T-Zellen an DC durch die Zugabe von CCL22-blockierenden Antikörpern inhibiert werden kann (Wu et al. 2001). Im Kontrast zu den Experimenten unserer Arbeitsgruppe stehen außerdem die Daten einer Publikation von Kikuchi et al., welche mittels eines Adenoviruses humanes CCL22 in murinen DC überexprimierten. Vakzinierung von Mäusen mit Antigen-beladenen CCL22-überexprimierenden DC schützten besser vor einer Infektion der Tiere mit *Pseudomonas aeruginosa*. Die CCL22-überexprimierenden DC wiesen darüber hinaus erhöhte Level an kostimulatorischen Molekülen und MHC-II auf (Kikuchi et al. 2001). In der Zusammenschau ist es denkbar, dass unter immunhomöostatischen Bedingungen CCL22 insbesondere die DC- T_{reg} -Interaktion vermittelt, während beispielsweise unter allergischen oder infektiösen Rahmenbedingungen oder durch einen Exzess an CCL22 die Wirkung auf andere Immunzellpopulationen zunimmt.

Unsere Analysen unterstreichen die Rolle von CCL22 für die Migration von T_{reg} in Richtung von DC. Im Vergleich zu den oben beschriebenen Studien, welche mit siRNA oder blockierenden Antikörpern gearbeitet hatten, stellt der Einsatz von DC aus CCL22-*Knockout*-Mäusen einen neuen experimentellen Ansatz dar. Neben der eingeschränkten T_{reg} -Migration konnten keine weiteren phänotypischen Unterschiede zwischen CCL22-KO- und WT-DC festgestellt werden. Weitere Experimente unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass *in vitro* wie *in vivo* CCL22-defiziente DC verminderte Kontakte zu T_{reg} ausbilden (Wintergerst 2017; Kunz 2017). Es ist bekannt, dass der Kontakt zwischen T_{reg} und DC essentiell für die Immunsuppression durch T_{reg} ist (Sakaguchi et al. 2009). Die verminderte Migration und Kontaktbildung mit T_{reg} ist daher eine plausible Erklärung für den immunstimulierenden Phänotyp von CCL22-defizienten DC in den oben beschriebenen Vakzinierungsexperimenten.

Für die oben beschriebene Experimente mit CCL22-KO-DC wurden *in vitro* generierte BMDC eingesetzt. Interessanterweise wurde in dieser Arbeit aber auch beobachtet, dass im lymphatischen Gewebe verschiedene Subtypen von DC eine unterschiedliche CCL22-Expression aufwiesen. Dabei konnte gezeigt werden, dass CCL22 am stärksten von CD103⁺ DC, besonders schwach von B220⁺ pDC exprimiert wurde.

In der Literatur ist die unterschiedliche Chemokin-Produktion von DC-Subtypen bereits teilweise beschrieben. So zeigten Penna et al., dass pDC besonders wenig CCL22 im Vergleich zu konventionellen DC produzieren (Penna et al. 2002). Ebenso wurde bereits für CD103⁺ DC, welche *in vitro* aus Knochenmark generiert wurden (Rio et al. 2008), für CD8⁺ CD103⁺ DC aus der Milz (Hao et al. 2016), sowie für CD103⁺ DC im Lungengewebe (Beaty et al. 2007) eine gesteigerte CCL22-

Produktion beschrieben. Die Daten dieser Arbeit bestätigten dies nun für CD103+ DC, welche aus Milz und Lymphknoten isoliert wurden.

Die genaue Einteilung und funktionelle Bedeutung der verschiedenen Subtypen von DC ist Gegenstand intensiver Forschung (Merad et al. 2013; Mildner et al. 2014; Heath et al. 2009). CD103+ DC lassen sich in einer Vielzahl von nicht-lymphatischen Geweben, aber auch in Lymphknoten und Milz finden (Rio et al. 2010). Funktionell nehmen sie eine wichtige Rolle in der Kreuzpräsentation von viralen Antigenen, aber auch von Eigenantigenen ein (Bedoui et al. 2009; Rio et al. 2007; Lukens et al. 2009; Henri et al. 2010). Darüber hinaus werden zunehmend immunregulatorische und T_{reg}-induzierende Eigenschaften von CD103+ DC beschrieben (Rio et al. 2010; Scott et al. 2011; Evers et al. 2016; Khare et al. 2013). So können CD103+ DC, welche aus dem Darm in die mesenterischen Lymphknoten migriert sind, die Entstehung von T_{reg} induzieren (Coombes et al. 2007) und scheinen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung eines tolerogenen Milieus im Darm einzunehmen (Jaensson et al. 2008; Annacker et al. 2005; Iliev et al. 2009). CD8+ CD103+ DC in der Milz tragen zur Beseitigung von apoptotischen Zellen und zur Aufrechterhaltung der Toleranz gegen Eigenantigene bei (Qiu et al. 2009; Hao et al. 2016). Hingegen wurde für CD103- DC eine verstärkte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen beschrieben (Rio et al. 2008; Beaty et al. 2007). Unsere Daten zeigen eine verstärkte Sekretion von CCL22 durch CD103+ im Vergleich zu CD103- DC in Milz und Lymphknoten. Dies stellt einen weiteren möglichen Mechanismus für den beschriebenen immunregulatorischen Phänotyp von CD103+ DC dar.

In der Zusammenschau liefern die Daten dieser Arbeit wichtige Hinweise, dass CCL22 in DC immunregulatorische Eigenschaften einnimmt. Mechanistisch wird dies über die Anlockung und Kontaktbildung mit T_{reg} vermittelt. Da sich DC zunehmend in klinischer Erprobung befinden, sei es zur Vakzinierung im Rahmen von Tumorthérapien oder zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen oder Transplantatabstoßungen (Steinman et al. 2007; Gilboa 2007; Van Brussel et al. 2014; Li et al. 2015), ist es von essentieller Bedeutung die Mechanismen von Immuninduktion und -regulation durch DC zu verstehen.

Zusammenfassung

Maligne Tumore entgehen einer effektiven Elimination durch das Immunsystem, indem sie ein immunsuppressives Mikromilieu generieren. Ein wichtiger Mechanismus ist dabei die intratumorale Akkumulation von immunsuppressiven regulatorischen T-Zellen. Das Chemokin CCL22, welches vorrangig von dendritischen Zellen produziert wird, kann die Migration von regulatorischen T-Zellen in den Tumor vermitteln. Erhöhte Mengen von CCL22 konnten in einer Vielzahl von Tumorentitäten nachgewiesen werden, mitunter war CCL22 dabei ein negativer prognostischer Faktor. Über die Mechanismen der intratumoralen CCL22-Induktion ist jedoch wenig bekannt.

Ziel dieser Arbeit war es, die intratumorale Induktion von CCL22 durch die Zytokine IL-1 und GM-CSF zu analysieren. Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe hatten zudem gezeigt, dass CCL22-defiziente dendritische Zellen in Vakzinierungsexperimenten immunstimulierende Eigenschaften aufweisen. Weiterhin sollte daher die Rolle von CCL22 für die Funktion von dendritischen Zellen genauer untersucht werden.

Es konnte zunächst gezeigt werden, dass IL-1 von einer humanen Pankreaskarzinom-, sowie von einer murinen Mammakarzinom-Zelllinie exprimiert wird und dass Überstände dieser Tumorzellen *in vitro* zu einer Induktion von CCL22 auf Immunzellen führt. Diese CCL22-Induktion konnte effizient inhibiert werden, wenn die IL-1-Expression der Tumorzellen mittels siRNA blockiert wurde. Die Behandlung von tumortragenden Mäusen mit dem IL-1-Rezeptorantagonist Anakinra hatte jedoch keinen Einfluss auf das Tumorstadium.

Im nächsten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch GM-CSF CCL22 induzieren kann. Rekombinantes GM-CSF führte dabei *in vitro* und nach Applikation *in vivo* zu einer gesteigerten CCL22-Produktion. Um den Einfluss intratumoralen GM-CSF *in vivo* analysieren zu können, wurde eine murine Kolonkarzinomzelllinie generiert, die GM-CSF induzierbar überexprimieren kann. Die intratumorale Überexpression von GM-CSF führte bei tumortragenden Mäusen zu erhöhten CCL22-Niveaus in Tumor und Lymphknoten. Somit konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* intra-

tumoral eine Induktion von CCL22 durch GM-CSF gezeigt werden.

Die Charakterisierung von dendritische Zellen aus Wildtyp- und CCL22-*Knockout*-Mäusen zeigte, dass CCL22-defiziente dendritische Zellen *in vitro* eine verminderte Migration von regulatorischen T-Zellen bewirken. Hingegen zeigten sich im Bezug auf Antigenprozessierung und -präsentation, Expression kostimulatorischer Marker oder Migration und Überleben *in vivo* keine Unterschied zwischen CCL22-defizienten und CCL22-exprimierenden dendritischen Zellen. Unter den verschiedenen Subtypen von dendritischen Zellen konnten CD103+ dendritische Zellen, für die immunregulatorische Eigenschaften beschrieben sind, als wichtigste Produzenten von CCL22 identifiziert werden.

Zusammenfassend konnte die IL-1-Produktion durch Tumorzellen als neuer Mechanismus der intratumoralen CCL22-Induktion identifiziert werden. Auch konnte eine potente CCL22-Induktion durch GM-CSF nachgewiesen werden. Die Beobachtung, dass CCL22 in dendritischen Zellen für die Anlockung von regulatorischen T-Zellen zuständig ist, und besonders von CD103+ dendritischen Zellen exprimiert wird, unterstreicht die immunregulatorische Rolle von CCL22. Die Erkenntnisse dieser Arbeit tragen zum Verständnis des immunsuppressiven Tumormilieus bei und beschreiben CCL22, IL-1 und GM-CSF als wichtige Targets potentieller Immuntherapien.

Literaturverzeichnis

Akira S, Hemmi H (2003). Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol Lett* 85.2, 85–95

Andrew DP, Chang MS, McNinch J, Wathen ST, Rihaneck M, Tseng J, Spellberg JP, Elias 3rd CG (1998). STCP-1 (MDC) CC chemokine acts specifically on chronically activated Th2 lymphocytes and is produced by monocytes on stimulation with Th2 cytokines IL-4 and IL-13. *J Immunol* 161.9, 5027–38

Andtbacka RHI, Kaufman HL, Collichio F, Amatruda T, Senzer N, Chesney J, Delman KA, Spitler LE, Puzanov I, Agarwala SS, Milhem M, Cranmer L, Curti B, Lewis K, Ross M, Guthrie T, Linette GP, Daniels GA, Harrington K, Middleton MR, Miller Jr WH, Zager JS, Ye Y, Yao B, Li A, Doleman S, VanderWalde A, Gansert J, Coffin RS (2015). Talimogene laherparepvec improves durable response rate in patients with advanced melanoma. *J Clin Oncol* 33.25, 2780–8

Annacker O, Coombes JL, Malmstrom V, Uhlig HH, Bourne T, Johansson-Lindbom B, Agace WW, Parker CM, Powrie F (2005). Essential role for CD103 in the T cell-mediated regulation of experimental colitis. *J Exp Med* 202.8, 1051–61

Anz D, Rapp M, Eiber S, Koelzer VH, Thaler R, Haubner S, Knott M, Nagel S, Golic M, Wiedemann GM, Bauernfeind F, Wurzenberger C, Hornung V, Scholz C, Mayr D, Rothenfusser S, Endres S, Bourquin C (2015). Suppression of intratumoral CCL22 by type I interferon inhibits migration of regulatory T cells and blocks cancer progression. *Cancer Res* 75.21, 4483–93

Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL, Powrie F (1999). An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med* 190.7, 995–1004

Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18, 767–811

- Bar D, Apte RN, Voronov E, Dinarello CA, Cohen S (2004). A continuous delivery system of IL-1 receptor antagonist reduces angiogenesis and inhibits tumor development. *FASEB J* 18.1, 161–3
- Beatty SR, Rose Jr CE, Sung SSJ (2007). Diverse and potent chemokine production by lung CD11b^{high} dendritic cells in homeostasis and in allergic lung inflammation. *J Immunol* 178.3, 1882–95
- Bedoui S, Whitney PG, Waithman J, Eidsmo L, Wakim L, Caminschi I, Allan RS, Wojtasiak M, Shortman K, Carbone FR, Brooks AG, Heath WR (2009). Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103⁺ dendritic cells. *Nat Immunol* 10.5, 488–95
- Berin MC, Dwinell MB, Eckmann L, Kagnoff MF (2001). Production of MDC/CCL22 by human intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280.6, G1217–26
- Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441.7090, 235–8
- Bhattacharya P, Budnick I, Singh M, Thirupathi M, Alharshawi K, Elshabrawy H, Holterman MJ, Prabhakar BS (2015). Dual role of GM-CSF as a pro-inflammatory and a regulatory cytokine: implications for immune therapy. *J Interferon Cytokine Res* 35.8, 585–99
- Bhattacharya P, Gopisetty A, Ganesh BB, Sheng JR, Prabhakar BS (2011). GM-CSF-induced, bone-marrow-derived dendritic cells can expand natural Tregs and induce adaptive Tregs by different mechanisms. *J Leukoc Biol* 89.2, 235–49
- Blank C, Brown I, Peterson AC, Spiotto M, Iwai Y, Honjo T, Gajewski TF (2004). PD-L1/B7H-1 inhibits the effector phase of tumor rejection by T cell receptor (TCR) transgenic CD8⁺ T cells. *Cancer Res* 64.3, 1140–5
- Bogunovic M, Ginhoux F, Helft J, Shang L, Hashimoto D, Greter M, Liu K, Jakubzick C, Ingersoll MA, Leboeuf M, Stanley ER, Nussenzweig M, Lira SA, Randolph GJ, Merad M (2009). Origin of the lamina propria dendritic cell network. *Immunity* 31.3, 513–25
- Bonecchi R, Bianchi G, Bordignon PP, D'Ambrosio D, Lang R, Borsatti A, Sozzani S, Allavena P, Gray PA, Mantovani A, Sinigaglia F (1998a). Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med* 187.1, 129–34
- Bonecchi R, Sozzani S, Stine JT, Luini W, D'Amico G, Allavena P, Chantry D, Mantovani A (1998b). Divergent effects of interleukin-4 and interferon-gamma on macrophage-derived chemokine production: an amplification circuit of polarized T helper 2 responses. *Blood* 92.8, 2668–71

- Boyman O, Sprent J (2012). The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat Rev Immunol* 12.3, 180–90
- Bronte V, Chappell DB, Apolloni E, Cabrelle A, Wang M, Hwu P, Restifo NP (1999). Unopposed production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by tumors inhibits CD8+ T cell responses by dysregulating antigen-presenting cell maturation. *J Immunol* 162.10, 5728–37
- Burgess AW, Metcalf D (1980). The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors. *Blood* 56.6, 947–58
- Burnet M (1957). Cancer; a biological approach. I. The processes of control. *Br Med J* 1.5022, 779–786
- Cabrera T, Angustias Fernandez M, Sierra A, Garrido A, Herruzo A, Escobedo A, Fabra A, Garrido F (1996). High frequency of altered HLA class I phenotypes in invasive breast carcinomas. *Hum Immunol* 50.2, 127–34
- Campbell JD, Stinson MJ, Simons FER, HayGlass KT (2002). Systemic chemokine and chemokine receptor responses are divergent in allergic versus non-allergic humans. *Int Immunol* 14.11, 1255–62
- Cao X, Cai SF, Fehniger TA, Song J, Collins LI, Piwnica-Worms DR, Ley TJ (2007). Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity* 27.4, 635–46
- Caux C, Ait-Yahia S, Chemin K, Bouteiller O de, Dieu-Nosjean MC, Homey B, Massacrier C, Vanbervliet B, Zlotnik A, Vicari A (2000). Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines. *Springer Semin Immunopathol* 22.4, 345–69
- Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, Alebardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A, Colonna M (1999). Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* 5.8, 919–23
- Chang Ms, McNinch J, Elias 3rd C, Manthey CL, Grosshans D, Meng T, Boone T, Andrew DP (1997). Molecular cloning and functional characterization of a novel CC chemokine, stimulated T cell chemotactic protein (STCP-1) that specifically acts on activated T lymphocytes. *J Biol Chem* 272.40, 25229–37
- Chantry D, Romagnani P, Raport CJ, Wood CL, Epp A, Romagnani S, Gray PW (1999). Macrophage-derived chemokine is localized to thymic medullary epithelial cells and is a chemoattractant for CD3(+), CD4(+), CD8(low) thymocytes. *Blood* 94.6, 1890–8
- Charo IF, Ransohoff RM (2006). The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 354.6, 610–21

- Cheever MA, Higano CS (2011). PROVENGE (Sipuleucel-T) in prostate cancer: the first FDA-approved therapeutic cancer vaccine. *Clin Cancer Res* 17.11, 3520–6
- Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM (2003). Conversion of peripheral CD4⁺ CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 198.12, 1875–86
- Chen Z, Malhotra PS, Thomas GR, Ondrey FG, Duffey DC, Smith CW, Enamorado I, Yeh NT, Kroog GS, Rudy S, McCullagh L, Mousa S, Quezado M, Herscher LL, Van Waes C (1999). Expression of proinflammatory and proangiogenic cytokines in patients with head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 5.6, 1369–79
- Clarke SR, Barnden M, Kurts C, Carbone FR, Miller JF, Heath WR (2000). Characterization of the ovalbumin-specific TCR transgenic line OT-I: MHC elements for positive and negative selection. *Immunol Cell Biol* 78.2, 110–7
- Coombes JL, Siddiqui KRR, Arancibia-Cárcamo CV, Hall J, Sun CM, Belkaid Y, Powrie F (2007). A functionally specialized population of mucosal CD103⁺ DCs induces Foxp3⁺ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med* 204.8, 1757–64
- Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, Conejo-Garcia JR, Zhang L, Burow M, Zhu Y, Wei S, Kryczek I, Daniel B, Gordon A, Myers L, Lackner A, Disis ML, Knutson KL, 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, 942–9
- Curtsinger JM, Schmidt CS, Mondino A, Lins DC, Kedl RM, Jenkins MK, Mescher MF (1999). Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *J Immunol* 162.6, 3256–62
- Daro E, Pulendran B, Brasel K, Teepe M, Pettit D, Lynch DH, Vremec D, Robb L, Shortman K, McKenna HJ, Maliszewski CR, Maraskovsky E (2000). Polyethylene glycol-modified GM-CSF expands CD11b(high) CD11c(high) but not CD11b(low) CD11c(high) murine dendritic cells in vivo: a comparative analysis with Flt3 ligand. *J Immunol* 165.1, 49–58
- Dinarello CA (2009). Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* 27, 519–50
- Dinarello CA (2010). Why not treat human cancer with interleukin-1 blockade? *Cancer Metastasis Rev* 29.2, 317–29
- Dinarello CA (2013). Overview of the interleukin-1 family of ligands and receptors. *Semin Immunol* 25.6, 389–93

- Dinareello CA, Simon A, Meer JWM van der (2012). Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nat Rev Drug Discov* 11.8, 633–52
- Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, Roche PC, Lu J, Zhu G, Tamada K, Lennon VA, Celis E, Chen L (2002). Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 8.8, 793–800
- Drake CG, Jaffee E, Pardoll DM (2006). Mechanisms of immune evasion by tumors. *Adv Immunol* 90, 51–81
- Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A, Golumbek P, Levitsky H, Brose K, Jackson V, Hamada H, Pardoll D, Mulligan RC (1993). Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90.8, 3539–43
- Dudziak D, Kamphorst AO, Heidkamp GF, Buchholz VR, Trumfheller C, Yamazaki S, Cheong C, Liu K, Lee HW, Park CG, Steinman RM, Nussenzweig MC (2007). Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science* 315.5808, 107–11
- Dufait I, Schwarze JK, Liechtenstein T, Leonard W, Jiang H, Escors D, De Ridder M, Breckpot K (2015). Ex vivo generation of myeloid-derived suppressor cells that model the tumor immunosuppressive environment in colorectal cancer. *Oncotarget* 6.14, 12369–82
- Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD (2004). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 21.2, 137–148
- Edelson BT, KC W, Juang R, Kohyama M, Benoit LA, Klekotka PA, Moon C, Albring JC, Ise W, Michael DG, Bhattacharya D, Stappenbeck TS, Holtzman MJ, Sung SSJ, Murphy TL, Hildner K, Murphy KM (2010). Peripheral CD103+ dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8alpha+ conventional dendritic cells. *J Exp Med* 207.4, 823–36
- Elaraj DM, Weinreich DM, Varghese S, Puhlmann M, Hewitt SM, Carroll NM, Feldman ED, Turner EM, Alexander HR (2006). The role of interleukin 1 in growth and metastasis of human cancer xenografts. *Clin Cancer Res* 12.4, 1088–96
- Elkabets M, Ribeiro VSG, Dinareello CA, Ostrand-Rosenberg S, Di Santo JP, Apte RN, Vosshenrich CAJ (2010). IL-1 β regulates a novel myeloid-derived suppressor cell subset that impairs NK cell development and function. *Eur J Immunol* 40.12, 3347–57
- Evers BDG, Engel DR, Böhner AMC, Tittel AP, Krause TA, Heuser C, Garbi N, Kastenmüller W, Mack M, Tiegs G, Panzer U, Boor P, Ludwig-Portugall I, Kurts C (2016). CD103+ kidney dendritic cells protect against crescentic GN by maintaining IL-10-producing regulatory T cells. *J Am Soc Nephrol* 27.11, 3368–3382

- Faget J, Biota C, Bachelot T, Gobert M, Treilleux I, Goutagny N, Durand I, Léon-Goddard S, Blay JY, Caux C, Ménétrier-Caux C (2011). Early detection of tumor cells by innate immune cells leads to T(reg) recruitment through CCL22 production by tumor cells. *Cancer Res* 71.19, 6143–52
- Faries MB, Hsueh EC, Ye X, Hoban M, Morton DL (2009). Effect of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on vaccination with an allogeneic whole-cell melanoma vaccine. *Clin Cancer Res* 15.22, 7029–35
- Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA, Rudensky AY (2005). A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol* 6.11, 1142–51
- Fujii-Maeda S, Kajiwara K, Ikizawa K, Shinazawa M, Yu B, Koga T, Furue M, Yanagihara Y (2004). Reciprocal regulation of thymus and activation-regulated chemokine/macrophage-derived chemokine production by interleukin (IL)-4/IL-13 and interferon-gamma in HaCaT keratinocytes is mediated by alternations in E-cadherin distribution. *J Invest Dermatol* 122.1, 20–8
- Gajewski TF, Schreiber H, Fu YX (2013). Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol* 14.10, 1014–22
- Gangi E, Vasu C, Cheatem D, Prabhakar BS (2005). IL-10-producing CD4+CD25+ regulatory T cells play a critical role in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced suppression of experimental autoimmune thyroiditis. *J Immunol* 174.11, 7006–13
- Gaudreau S, Guindi C, Ménard M, Besin G, Dupuis G, Amrani A (2007). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor prevents diabetes development in NOD mice by inducing tolerogenic dendritic cells that sustain the suppressive function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 179.6, 3638–47
- Gemma A, Takenaka K, Hosoya Y, Matuda K, Seike M, Kurimoto E, Ono Y, Uematsu K, Takeda Y, Hibino S, Yoshimura A, Shibuya M, Kudoh S (2001). Altered expression of several genes in highly metastatic subpopulations of a human pulmonary adenocarcinoma cell line. *Eur J Cancer* 37.12, 1554–61
- Gilboa E (2007). DC-based cancer vaccines. *J Clin Invest* 117.5, 1195–203
- Gobert M, Treilleux I, Bendriss-Vermare N, Bachelot T, Goddard-Leon S, Arfi V, Biota C, Doffin AC, Durand I, Olive D, Perez S, Pasqual N, Faure C, Ray-Coquard I, Puisieux A, Caux C, Blay JY, Menétrier-Caux C (2009). Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an

- adverse clinical outcome selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer Research* 69.5, 2000–2009
- Godiska R, Chantry D, Raport CJ, Sozzani S, Allavena P, Leviten D, Mantovani A, Gray PW (1997). Human macrophage-derived chemokine (MDC), a novel chemoattractant for monocytes, monocyte-derived dendritic cells, and natural killer cells. *J Exp Med* 185.9, 1595–604
- Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Muller G, Hillen W, Bujard H (1995). Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 268.5218, 1766–1769
- Gowans JL, Knight EJ (1964). The route of re-circulation of lymphocytes in the rat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 159, 257–82
- Griffith JW, Sokol CL, Luster AD (2014). Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annu Rev Immunol* 32, 659–702
- Guermontez P, Valladeau J, Zitvogel L, Théry C, Amigorena S (2002). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 20, 621–67
- Haan JM den, Lehar SM, Bevan MJ (2000). CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *J Exp Med* 192.12, 1685–96
- Hamilton JA (2008). Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 8.7, 533–44
- Hanks BA, Holtzhausen A, Evans KS, Jamieson R, Gimpel P, Campbell OM, Hector-Greene M, Sun L, Tewari A, George A, Starr M, Nixon A, Augustine C, Beasley G, Tyler DS, Osada T, Morse MA, Ling L, Lyerly HK, Blobel GC (2013). Type III TGF- β receptor downregulation generates an immunotolerant tumor microenvironment. *J Clin Invest* 123.9, 3925–40
- Hao S, Han X, Wang D, Yang Y, Li Q, Li X, Qiu CH (2016). Critical role of CCL22/CCR4 axis in the maintenance of immune homeostasis during apoptotic cell clearance by splenic CD8 α (+) CD103(+) dendritic cells. *Immunology* 148.2, 174–86
- Heath WR, Carbone FR (2009). Dendritic cell subsets in primary and secondary T cell responses at body surfaces. *Nat Immunol* 10.12, 1237–44
- Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408.6813, 740–5
- Henri S, Poulin LF, Tamoutounour S, Ardouin L, Williams M, Bovis B de, Devilard E, Viret C, Azukizawa H, Kissenpfennig A, Malissen B (2010). CD207+ CD103+ dermal dendritic cells cross-present keratinocyte-derived antigens irrespective of the presence of Langerhans cells. *J Exp Med* 207.1, 189–206

- Hirata Y, Egea L, Dann SM, Eckmann L, Kagnoff MF (2010). GM-CSF-facilitated dendritic cell recruitment and survival govern the intestinal mucosal response to a mouse enteric bacterial pathogen. *Cell Host Microbe* 7.2, 151–63
- Hodi FS, Lee S, McDermott DE, Rao UN, Butterfield LH, Tarhini AA, Leming P, Puzanov I, Shin D, Kirkwood JM (2014). Ipilimumab plus sargramostim vs ipilimumab alone for treatment of metastatic melanoma: a randomized clinical trial. *JAMA* 312.17, 1744–53
- Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DE, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, Akerley W, Eertwegh AJM van den, Lutzky J, Lorigan P, Vaubel JM, Linette GP, Hogg D, Ottensmeier CH, Lebbé C, Peschel C, Quirt I, Clark JI, Wolchok JD, Weber JS, Tian J, Yellin MJ, Nichol GM, Hoos A, Urba WJ (2010). Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 363.8, 711–23
- Hong DS, Hui D, Bruera E, Janku F, Naing A, Falchook GS, Piha-Paul S, Wheler JJ, Fu S, Tsimberidou AM, Stecher M, Mohanty P, Simard J, Kurzrock R (2014). MABp1, a first-in-class true human antibody targeting interleukin-1 α in refractory cancers: an open-label, phase 1 dose-escalation and expansion study. *Lancet Oncol* 15.6, 656–66
- Hong IS (2016). Stimulatory versus suppressive effects of GM-CSF on tumor progression in multiple cancer types. *Exp Mol Med* 48.7, e242
- Hori S (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299.5609, 1057–1061
- Illem A, Colantonio L, Bhakta S, Sozzani S, Mantovani A, Sinigaglia F, D'Ambrosio D (2000). Inhibition by IL-12 and IFN- α of I-309 and macrophage-derived chemokine production upon TCR triggering of human Th1 cells. *Eur J Immunol* 30.4, 1030–9
- Illem A, Mariani M, Lang R, Recalde H, Panina-Bordignon P, Sinigaglia F, D'Ambrosio D (2001). Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med* 194.6, 847–53
- Iliev ID, Mileti E, Matteoli G, Chieppa M, Rescigno M (2009). Intestinal epithelial cells promote colitis-protective regulatory T-cell differentiation through dendritic cell conditioning. *Mucosal Immunol* 2.4, 340–50
- Imai T, Chantry D, Raport CJ, Wood CL, Nishimura M, Godiska R, Yoshie O, Gray PW (1998). Macrophage-derived chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor 4. *J Biol Chem* 273.3, 1764–8
- Imai T, Nagira M, Takagi S, Kakizaki M, Nishimura M, Wang J, Gray PW, Matsushima K, Yoshie O (1999). Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting

- cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine. *Int Immunol* 11.1, 81–8
- Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, Muramatsu S, Steinman RM (1992). Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 176.6, 1693–702
- Ishida T, Ishii T, Inagaki A, Yano H, Komatsu H, Iida S, Inagaki H, Ueda R (2006). Specific recruitment of CC chemokine receptor 4-positive regulatory T cells in Hodgkin lymphoma fosters immune privilege. *Cancer Res* 66.11, 5716–22
- Jaensson E, Uronen-Hansson H, Pabst O, Eksteen B, Tian J, Coombes JL, Berg PL, Davidsson T, Powrie F, Johansson-Lindbom B, Agace WW (2008). Small intestinal CD103+ dendritic cells display unique functional properties that are conserved between mice and humans. *J Exp Med* 205.9, 2139–49
- Jin L, Yuan RQ, Fuchs A, Yao Y, Joseph A, Schwall R, Schnitt SJ, Guida A, Hastings HM, Andres J, Turkel G, Polverini PJ, Goldberg ID, Rosen EM (1997). Expression of interleukin-1beta in human breast carcinoma. *Cancer* 80.3, 421–34
- Jinushi M, Nakazaki Y, Dougan M, Carrasco DR, Mihm M, Dranoff G (2007). MFG-E8-mediated uptake of apoptotic cells by APCs links the pro- and antiinflammatory activities of GM-CSF. *J Clin Invest* 117.7, 1902–13
- Joffre OP, Segura E, Savina A, Amigorena S (2012). Cross-presentation by dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 12.8, 557–69
- Johnston B, Butcher EC (2002). Chemokines in rapid leukocyte adhesion triggering and migration. *Semin Immunol* 14.2, 83–92
- Kakinuma T, Nakamura K, Wakugawa M, Mitsui H, Tada Y, Saeki H, Torii H, Komine M, Asahina A, Tamaki K (2002). Serum macrophage-derived chemokine (MDC) levels are closely related with the disease activity of atopic dermatitis. *Clin Exp Immunol* 127.2, 270–3
- Kang S, Xie J, Ma S, Liao W, Zhang J, Luo R (2010). Targeted knock down of CCL22 and CCL17 by siRNA during DC differentiation and maturation affects the recruitment of T subsets. *Immunobiology* 215.2, 153–62
- Keir ME, Sharpe AH (2005). The B7/CD28 costimulatory family in autoimmunity. *Immunol Rev* 204, 128–43

- Khare A, Krishnamoorthy N, Oriss TB, Fei M, Ray P, Ray A (2013). Cutting edge: inhaled antigen upregulates retinaldehyde dehydrogenase in lung CD103+ but not plasmacytoid dendritic cells to induce Foxp3 de novo in CD4+ T cells and promote airway tolerance. *J Immunol* 191.1, 25–9
- Kikuchi T, Crystal RG (2001). Antigen-pulsed dendritic cells expressing macrophage-derived chemokine elicit Th2 responses and promote specific humoral immunity. *J Clin Invest* 108.6, 917–27
- Kishimoto T, Taga T, Akira S (1994). Cytokine signal transduction. *Cell* 76.2, 253–62
- Koopman LA, Corver WE, Slik AR van der, Giphart MJ, Fleuren GJ (2000). Multiple genetic alterations cause frequent and heterogeneous human histocompatibility leukocyte antigen class I loss in cervical cancer. *J Exp Med* 191.6, 961–76
- Kunz W (2017). The role of the chemokine CCL22 in the interaction of dendritic cells and regulatory T cells. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München
- Kurokawa M, Matsukura S, Kawaguchi M, Ieki K, Suzuki S, Watanabe S, Homma T, Yamaguchi M, Takeuchi H, Adachi M (2013). Interleukin-33-activated dendritic cells induce the production of thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine. *Int Arch Allergy Immunol* 161 Suppl 2, 52–7
- Kuwajima S, Sato T, Ishida K, Tada H, Tezuka H, Ohteki T (2006). Interleukin 15-dependent crosstalk between conventional and plasmacytoid dendritic cells is essential for CpG-induced immune activation. *Nat Immunol* 7.7, 740–6
- Laar L van de, Coffey PJ, Woltman AM (2012). Regulation of dendritic cell development by GM-CSF: molecular control and implications for immune homeostasis and therapy. *Blood* 119.15, 3383–93
- Lassi K, Dawson NA (2010). Update on castrate-resistant prostate cancer: 2010. *Curr Opin Oncol* 22.3, 263–7
- Layseca-Espinosa E, Korniotis S, Montandon R, Gras C, Bouillie M, Gonzalez-Amaro R, Dy M, Zavala F (2013). CCL22-producing CD8 α - myeloid dendritic cells mediate regulatory T cell recruitment in response to G-CSF treatment. *J Immunol* 191.5, 2266–72
- Lebre MC, Burwell T, Vieira PL, Lora J, Coyle AJ, Kapsenberg ML, Clausen BE, De Jong EC (2005). Differential expression of inflammatory chemokines by Th1- and Th2-cell promoting dendritic cells: a role for different mature dendritic cell populations in attracting appropriate effector cells to peripheral sites of inflammation. *Immunol Cell Biol* 83.5, 525–35

- Lee I, Wang L, Wells AD, Dorf ME, Ozkaynak E, Hancock WW (2005). Recruitment of Foxp3+ T regulatory cells mediating allograft tolerance depends on the CCR4 chemokine receptor. *J Exp Med* 201.7, 1037–44
- Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA (1996). CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 14, 233–58
- Li H, Shi B (2015). Tolerogenic dendritic cells and their applications in transplantation. *Cell Mol Immunol* 12.1, 24–30
- Li YQ, Liu FF, Zhang XM, Guo XJ, Ren MJ, Fu L (2013). Tumor secretion of CCL22 activates intratumoral Treg infiltration and is independent prognostic predictor of breast cancer. *PLoS One* 8.10, e76379
- Liang SC, Moskalenko M, Van Roey M, Jooss K (2013). Depletion of regulatory T cells by targeting folate receptor 4 enhances the potency of a GM-CSF-secreting tumor cell immunotherapy. *Clin Immunol* 148.2, 287–98
- Lim HW, Lee J, Hillsamer P, Kim CH (2008). Human Th17 cells share major trafficking receptors with both polarized effector T cells and FOXP3+ regulatory T cells. *J Immunol* 180.1, 122–9
- Lukens MV, Kruijssen D, Coenjaerts FEJ, Kimpen JLL, Bleek GM van (2009). Respiratory syncytial virus-induced activation and migration of respiratory dendritic cells and subsequent antigen presentation in the lung-draining lymph node. *J Virol* 83.14, 7235–43
- Lust JA, Lacy MQ, Zeldenrust SR, Dispenzieri A, Gertz MA, Witzig TE, Kumar S, Hayman SR, Russell SJ, Buadi FK, Geyer SM, Campbell ME, Kyle RA, Rajkumar SV, Greipp PR, Kline MP, Xiong Y, Moon-Tasson LL, Donovan KA (2009). Induction of a chronic disease state in patients with smoldering or indolent multiple myeloma by targeting interleukin 1beta-induced interleukin 6 production and the myeloma proliferative component. *Mayo Clin Proc* 84.2, 114–22
- Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D (2014). Quantitative Immunoassays. *Der Experimentator: Immunologie*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 103–131
- Lutz E, Yeo CJ, Lillemoe KD, Biedrzycki B, Kobrin B, Herman J, Sugar E, Piantadosi S, Cameron JL, Solt S, Onners B, Tartakovsky I, Choi M, Sharma R, Illei PB, Hruban RH, Abrams RA, Le D, Jaffee E, Laheru D (2011). A lethally irradiated allogeneic granulocyte-macrophage colony stimulating factor-secreting tumor vaccine for pancreatic adenocarcinoma. A Phase II trial of safety, efficacy, and immune activation. *Ann Surg* 253.2, 328–35

- Lyons AB, Parish CR (1994). Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *eng. J Immunol Methods* 171.1, 131–137
- Mach N, Gillessen S, Wilson SB, Sheehan C, Mihm M, Dranoff G (2000). Differences in dendritic cells stimulated in vivo by tumors engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or Flt3-ligand. *Cancer Res* 60.12, 3239–46
- Mantovani A (1999). The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunol Today* 20.6, 254–7
- Mantovani A, Gray PA, Van Damme J, Sozzani S (2000). Macrophage-derived chemokine (MDC). *J Leukoc Biol* 68.3, 400–4
- Mantovani A, Barajon I, Garlanda C (2018). IL-1 and IL-1 regulatory pathways in cancer progression and therapy. *Immunol Rev* 281.1, 57–61
- Maruyama T, Kono K, Izawa S, Mizukami Y, Kawaguchi Y, Mimura K, Watanabe M, Fujii H (2010). CCL17 and CCL22 chemokines within tumor microenvironment are related to infiltration of regulatory T cells in esophageal squamous cell carcinoma. *Diseases of the Esophagus*, 422–429
- McNab F, Mayer-Barber K, Sher A, Wack A, O’Garra A (2015). Type I interferons in infectious disease. *Nat Rev Immunol* 15.2, 87–103
- Merad M, Ginhoux F, Collin M (2008). Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 8.12, 935–47
- Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A (2013). The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol* 31, 563–604
- Metcalf D (1986). The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. *Blood* 67.2, 257–67
- Mildner A, Jung S (2014). Development and function of dendritic cell subsets. *Immunity* 40.5, 642–56
- Miltenyi S, Muller W, Weichel W, Radbruch A (1990). High gradient magnetic cell separation with MACS. *eng. Cytometry* 11.2, 231–238
- Mizukami Y, Kono K, Kawaguchi Y, Akaike H, Kamimura K, Sugai H, Fujii H (2008). CCL17 and CCL22 chemokines within tumor microenvironment are related to accumulation of Foxp3+ regulatory T cells in gastric cancer. *Int J Cancer* 122.10, 2286–93
- Morales JK, Kmiecik M, Knutson KL, Bear HD, Manjili MH (2010). GM-CSF is one of the main breast tumor-derived soluble factors involved in the differentiation of CD11b-Gr1- bone

- marrow progenitor cells into myeloid-derived suppressor cells. *Breast Cancer Res Treat* 123.1, 39–49
- Mosmann TR, Sad S (1996). The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 17.3, 138–46
- Movahedi K, Williams M, Van den Bossche J, Van den Bergh R, Gysemans C, Beschin A, De Baetselier P, Van Ginderachter JA (2008). Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood* 111.8, 4233–44
- Murphy K, Weaver C (2017). *Janeway's Immunobiology*. Taylor & Francis Group
- Muthuswamy R, Urban J, Lee JJ, Reinhart TA, Bartlett D, Kalinski P (2008). Ability of mature dendritic cells to interact with regulatory T cells is imprinted during maturation. *Cancer Res* 68.14, 5972–8
- Nemazee D (2000). Receptor selection in B and T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 18, 19–51
- Ninck S, Reisser C, Dyckhoff G, Helmke B, Bauer H, Herold-Mende C (2003). Expression profiles of angiogenic growth factors in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int J Cancer* 106.1, 34–44
- Nishikawa H, Sakaguchi S (2010). Regulatory T cells in tumor immunity. *International Journal of Cancer* 127.4, 759–767
- Nishikawa H, Sakaguchi S (2014). Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Current Opinion in Immunology* 27, 1–7
- Noy R, Pollard JW (2014). Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity* 41.1, 49–61
- Ochs HD, Ziegler SF, Torgerson TR (2005). FOXP3 acts as a rheostat of the immune response. *Immunol Rev* 203, 156–64
- Ohara M, Yamaguchi Y, Matsuura K, Murakami S, Arihiro K, Okada M (2009). Possible involvement of regulatory T cells in tumor onset and progression in primary breast cancer. *Cancer Immunol Immunother* 58.3, 441–7
- Onishi Y, Fehervari Z, Yamaguchi T, Sakaguchi S (2008). Foxp3+ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105.29, 10113–8
- Onizuka S, Tawara I, Shimizu J, Sakaguchi S, Fujita T, Nakayama E (1999). Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res.* 59.13, 3128–3133

- Parmiani G, Castelli C, Pilla L, Santinami M, Colombo MP, Rivoltini L (2007). Opposite immune functions of GM-CSF administered as vaccine adjuvant in cancer patients. *Ann Oncol* 18.2, 226–32
- Penna G, Vulcano M, Roncari A, Facchetti F, Sozzani S, Adorini L (2002). Cutting edge: differential chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 169.12, 6673–6
- Peterson GL (1979). Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Anal. Biochem.* 100.2, 201–220
- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282.5396, 2085–8
- Pylayeva-Gupta Y, Lee KE, Hajdu CH, Miller G, Bar-Sagi D (2012). Oncogenic Kras-induced GM-CSF production promotes the development of pancreatic neoplasia. *Cancer Cell* 21.6, 836–47
- Qiu CH, Miyake Y, Kaise H, Kitamura H, Ohara O, Tanaka M (2009). Novel subset of CD8alpha+ dendritic cells localized in the marginal zone is responsible for tolerance to cell-associated antigens. *J Immunol* 182.7, 4127–36
- Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM (2007). Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol* 25, 267–96
- Randolph GJ, Angeli V, Swartz MA (2005). Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat Rev Immunol* 5.8, 617–28
- Rapp M (2013). The influence of the chemokine CCL22 on tumor development and growth. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München
- Rapp M, Wintergerst MW, Kunz WG, Vetter VK, Knott MM, Lisowski D, Haubner S, Moder S, Thaler R, Eiber S, Meyer B, Röhrle N, Piseddu I, Grassmann S, Layritz P, Kühnemuth B, Stutte S, Bourquin C, Andrian UH von, Endres S, Anz D (2019). CCL22 controls immunity by promoting regulatory T cell communication with dendritic cells in lymph nodes. *The Journal of Experimental Medicine* 216.5, 1170–1181
- Reinhardt RL, Liang HE, Locksley RM (2009). Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire. *Nat Immunol* 10.4, 385–93
- Reizis B, Bunin A, Ghosh HS, Lewis KL, Sisirak V (2011). Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. *Annu Rev Immunol* 29, 163–83

- Revoltella RP, Menicagli M, Campani D (2012). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as an autocrine survival-growth factor in human gliomas. *Cytokine* 57.3, 347–59
- Ridker PM, MacFadyen JG, Thuren T, Everett BM, Libby P, Glynn RJ, CANTOS Trial Group (2017). Effect of interleukin-1 β inhibition with canakinumab on incident lung cancer in patients with atherosclerosis: exploratory results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 390.10105, 1833–1842
- Rio ML del, Bernhardt G, Rodriguez-Barbosa JI, Förster R (2010). Development and functional specialization of CD103+ dendritic cells. *Immunol Rev* 234.1, 268–81
- Rio ML del, Rodriguez-Barbosa JI, Bölter J, Ballmaier M, Dittrich-Breiholz O, Kracht M, Jung S, Förster R (2008). CX3CR1+ c-kit+ bone marrow cells give rise to CD103+ and CD103- dendritic cells with distinct functional properties. *J Immunol* 181.9, 6178–88
- Rio ML del, Rodriguez-Barbosa JI, Kremmer E, Förster R (2007). CD103- and CD103+ bronchial lymph node dendritic cells are specialized in presenting and cross-presenting innocuous antigen to CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol* 178.11, 6861–6
- Rodenburg RJ, Brinkhuis RF, Peek R, Westphal JR, Van Den Hoogen FH, Venrooij WJ van, Putte LB van de (1998). Expression of macrophage-derived chemokine (MDC) mRNA in macrophages is enhanced by interleukin-1beta, tumor necrosis factor alpha, and lipopolysaccharide. *J Leukoc Biol* 63.5, 606–11
- Rokhlin OW, Griebeling TL, Karassina NV, Raines MA, Cohen MB (1996). Human prostate carcinoma cell lines secrete GM-CSF and express GM-CSF-receptor on their cell surface. *Anticancer Res* 16.2, 557–63
- Rothe G (2006). Technische und methodische Grundlagen der Durchflusszytometrie. *Zelluläre Diagnostik*. S. Karger AG, 27–70
- Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T (2009). Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *Int Immunol* 21.10, 1105–11
- Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M (2008). Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133.5, 775–87
- Salgia R, Lynch T, Skarin A, Lucca J, Lynch C, Jung K, Hodi FS, Jaklitsch M, Mentzer S, Swanson S, Lukanich J, Bueno R, Wain J, Mathisen D, Wright C, Fidias P, Donahue D, Clift S, Hardy S, Neuberg D, Mulligan R, Webb I, Sugarbaker D, Mihm M, Dranoff G (2003). Vaccination with irradiated autologous tumor cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augments antitumor immunity in some patients with metastatic non-small-cell lung carcinoma. *J Clin Oncol* 21.4, 624–30

- Sallusto F, Palermo B, Lenig D, Miettinen M, Matikainen S, Julkunen I, Forster R, Burgstahler R, Lipp M, Lanzavecchia A (1999). Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. *Eur J Immunol* 29.5, 1617–25
- Salmon H, Franciszkievicz K, Damotte D, Dieu-Nosjean MC, Validire P, Trautmann A, Mami-Chouaib F, Donnadieu E (2012). Matrix architecture defines the preferential localization and migration of T cells into the stroma of human lung tumors. *J Clin Invest* 122.3, 899–910
- Sasaki DT, Dumas SE, Engleman EG (1987). Discrimination of viable and non-viable cells using propidium iodide in two color immunofluorescence. *Cytometry* 8.4, 413–420
- Schaniel C, Pardali E, Sallusto F, Speletas M, Ruedl C, Shimizu T, Seidl T, Andersson J, Melchers F, Rolink AG, Sideras P (1998). Activated murine B lymphocytes and dendritic cells produce a novel CC chemokine which acts selectively on activated T cells. *J Exp Med* 188.3, 451–63
- Schmitz S (2011). Zellbiologische und Routinemethoden. *Der Experimentator: Zellkultur*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 205–222
- Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ (2011). Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 331.6024, 1565–70
- Schwartz RH (2003). T cell anergy. *Annu Rev Immunol* 21, 305–34
- Scott CL, Aumeunier AM, Mowat AM (2011). Intestinal CD103+ dendritic cells: master regulators of tolerance? *Trends Immunol* 32.9, 412–9
- Shapiro HM (2005). Parameters and probes. *Practical Flow Cytometry*. John Wiley and Sons, Inc., 273–410
- Sharma P, Allison JP (2015). The future of immune checkpoint therapy. *Science* 348.6230, 56–61
- Shiomi A, Usui T (2015). Pivotal roles of GM-CSF in autoimmunity and inflammation. *Mediators Inflamm* 2015, 568543
- Shortman K, Heath WR (2001). Immunity or tolerance? That is the question for dendritic cells. *Nat Immunol* 2.11, 988–9
- Singer CF, Hudelist G, Gschwantler-Kaulich D, Fink-Retter A, Mueller R, Walter I, Czerwenka K, Kubista E (2006). Interleukin-1alpha protein secretion in breast cancer is associated with poor differentiation and estrogen receptor alpha negativity. *Int J Gynecol Cancer* 16 Suppl 2, 556–9
- Soiffer R, Lynch T, Mihm M, Jung K, Rhuda C, Schmollinger JC, Hodi FS, Liebster L, Lam P, Mentzer S, Singer S, Tanabe KK, Cosimi AB, Duda R, Sober A, Bhan A, Daley J, Neuberg D, Parry G, Rokovich J, Richards L, Drayer J, Berns A, Clift S, Cohen LK, Mulligan RC, Dranoff G (1998). Vaccination with irradiated autologous melanoma cells engineered to secrete human

- granulocyte-macrophage colony-stimulating factor generates potent antitumor immunity in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95.22, 13141–6
- Soler D, Humphreys TL, Spinola SM, Campbell JJ (2003). CCR4 versus CCR10 in human cutaneous TH lymphocyte trafficking. *Blood* 101.5, 1677–82
- Steinman RM, Cohn ZA (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 137.5, 1142–62
- Steinman RM, Hemmi H (2006). Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* 311, 17–58
- Steinman RM, Banchereau J (2007). Taking dendritic cells into medicine. *Nature* 449.7161, 419–26
- Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC (2003). Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 21, 685–711
- Steinman RM, Nussenzweig MC (2002). Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99.1, 351–8
- Tadokoro CE, Shakhar G, Shen S, Ding Y, Lino AC, Maraver A, Lafaille JJ, Dustin ML (2006). Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo. *J Exp Med* 203.3, 505–11
- Takeuchi O, Akira S (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140.6, 805–20
- Tanaka A, Sakaguchi S (2016). Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Cell Research* 27.1, 109–118
- Tang HL, Cyster JG (1999). Chemokine up-regulation and activated T cell attraction by maturing dendritic cells. *Science* 284.5415, 819–22
- Tesmer LA, Lundy SK, Sarkar S, Fox DA (2008). Th17 cells in human disease. *Immunol Rev* 223, 87–113
- Théry C, Amigorena S (2001). The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 13.1, 45–51
- Tomimatsu S, Ichikura T, Mochizuki H (2001). Significant correlation between expression of interleukin-1alpha and liver metastasis in gastric carcinoma. *Cancer* 91.7, 1272–6
- Urduingui RG, Fernandez AF, Moncada-Pazos A, Huidobro C, Rodriguez RM, Ferrero C, Martinez-Cambor P, Obaya AJ, Bernal T, Parra-Blanco A, Rodrigo L, Santacana M, Matias-Guiu X, Soldevilla B, Dominguez G, Bonilla F, Cal S, Lopez-Otin C, Fraga MF (2013). Immune-dependent and independent antitumor activity of GM-CSF aberrantly expressed by mouse and human colorectal tumors. *Cancer Res* 73.1, 395–405

- Uyttenhove C, Pilotte L, Théate I, Stroobant V, Colau D, Parmentier N, Boon T, Van den Eynde BJ (2003). Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med* 9.10, 1269–74
- Van Brussel I, Lee WP, Rombouts M, Nuyts AH, Heylen M, De Winter BY, Cools N, Schrijvers DM (2014). Tolerogenic dendritic cell vaccines to treat autoimmune diseases: can the unattainable dream turn into reality? *Autoimmun Rev* 13.2, 138–50
- Vasu C, Dogan RNE, Holterman MJ, Prabhakar BS (2003). Selective induction of dendritic cells using granulocyte macrophage-colony stimulating factor, but not fms-like tyrosine kinase receptor 3-ligand, activates thyroglobulin-specific CD4+/CD25+ T cells and suppresses experimental autoimmune thyroiditis. *J Immunol* 170.11, 5511–22
- Voronov E, Shouval DS, Krelin Y, Cagnano E, Benharroch D, Iwakura Y, Dinarello CA, Apte RN (2003). IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100.5, 2645–50
- Vremec D, Lieschke GJ, Dunn AR, Robb L, Metcalf D, Shortman K (1997). The influence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on dendritic cell levels in mouse lymphoid organs. *Eur J Immunol* 27.1, 40–4
- Vulcano M, Albanesi C, Stoppacciaro A, Bagnati R, D'Amico G, Struyf S, Transidico P, Bonocchi R, Del Prete A, Allavena P, Ruco LP, Chiabrando C, Girolomoni G, Mantovani A, Sozzani S (2001). Dendritic cells as a major source of macrophage-derived chemokine/CCL22 in vitro and in vivo. *Eur J Immunol* 31.3, 812–22
- Wågsäter D, Dienus O, Löfgren S, Hugander A, Dimberg J (2008). Quantification of the chemokines CCL17 and CCL22 in human colorectal adenocarcinomas. *Mol Med Rep* 1.2, 211–7
- Watari K, Shibata T, Kawahara A, Sata Ki, Nabeshima H, Shinoda A, Abe H, Azuma K, Murakami Y, Izumi H, Takahashi T, Kage M, Kuwano M, Ono M (2014). Tumor-derived interleukin-1 promotes lymphangiogenesis and lymph node metastasis through M2-type macrophages. *PLoS One* 9.6, e99568
- Wiedemann G (2014). Tumorzell-induzierte Hochregulation des Chemokins CCL22 in Immunzellen. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München
- Wiedemann GM, Knott MML, Vetter VK, Rapp M, Haubner S, Fessler J, Kühnemuth B, Layritz P, Thaler R, Kruger S, Ormanns S, Mayr D, Endres S, Anz D (2016). Cancer cell-derived IL-1 α induces CCL22 and the recruitment of regulatory T cells. *Oncoimmunology* 5.9, e1175794
- Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, Nomura T, Sakaguchi S (2008). CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* 322.5899, 271–5

- Wintergerst M (2017). Regulation der Immunantwort: CCL22 und CCL17 vermitteln die Interaktion zwischen dendritischen Zellen und regulatorischen T-Zellen. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München
- Wrzesinski SH, Wan YY, Flavell RA (2007). Transforming growth factor-beta and the immune response: implications for anticancer therapy. *Clin Cancer Res* 13.18 Pt 1, 5262–70
- Wu M, Fang H, Hwang ST (2001). Cutting edge: CCR4 mediates antigen-primed T cell binding to activated dendritic cells. *J Immunol* 167.9, 4791–5
- Wu S, He H, Liu H, Cao Y, Li R, Zhang H, Li H, Shen Z, Qin J, Xu J (2018). C-C motif chemokine 22 predicts postoperative prognosis and adjuvant chemotherapeutic benefits in patients with stage II/III gastric cancer. *Oncoimmunology* 7.6, e1433517
- Xia S, Wei J, Wang J, Sun H, Zheng W, Li Y, Sun Y, Zhao H, Zhang S, Wen T, Zhou X, Gao JX, Wang P, Wu Z, Zhao L, Yin Z (2014). A requirement of dendritic cell-derived interleukin-27 for the tumor infiltration of regulatory T cells. *J Leukoc Biol* 95.5, 733–742
- Yan WL, Shen KY, Tien CY, Chen YA, Liu SJ (2017). Recent progress in GM-CSF-based cancer immunotherapy. *Immunotherapy* 9.4, 347–360
- Yang P, Li QJ, Feng Y, Zhang Y, Markowitz GJ, Ning S, Deng Y, Zhao J, Jiang S, Yuan Y, Wang HY, Cheng SQ, Xie D, Wang XF (2012). TGF- β -miR-34a-CCL22 signaling-induced Treg cell recruitment promotes venous metastases of HBV-positive hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell* 22.3, 291–303
- Yang T, Li Y, Lyu Z, Huang K, Corrigan CJ, Ying S, Wang W, Wang C (2017). Characteristics of proinflammatory cytokines and chemokines in airways of asthmatics: relationships with disease severity and infiltration of inflammatory cells. *Chin Med J (Engl)* 130.17, 2033–2040
- Zhu J, Yamane H, Paul WE (2010). Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu Rev Immunol* 28, 445–89

Abkürzungsverzeichnis

APC	Allophycocyanin
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BMDC	<i>Bone marrow-derived dendritic cells</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CCL	Chemokin-Ligand
CCL22-KO	<i>CCL22-Knockout</i>
CCR	Chemokin-Rezeptor
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>Copy-Desoxyribonukleinsäure</i>
cDC	Konventionelle dendritische Zelle
CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester
CMV	Zytomegalievirus
CpG	Oligonukleotide mit Cytosin-(Phosphat)-Guanin-Motiven
CSF	<i>Colony-stimulating factor</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4</i>
CTL	Zytotoxische T-Zelle
DC	Dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Deoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dT	Desoxythymidin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>

FACS	<i>Fluorescent-activated cell sorting</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FoxP3	<i>Forkhead box P3</i>
FSC	<i>Forwardscatter</i>
FSC-A	FSC-area
FSC-H	FSC-Höhe
G-CSF	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IL-2-R	Interleukin-2-Rezeptor
iT _{reg}	Induzierte regulatorische T-Zelle
KO	<i>Knockout</i>
LN	Lymphknoten
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	<i>Magnetic-activated cell sorting</i>
MALT	<i>Mucosa-associated lymphatic tissue</i>
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
MDC	<i>Macrophage-derived chemokine</i>
MDSC	<i>Myeloid-derived suppressor cells</i>
MEM	<i>Minimum essential medium</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MIF	<i>Mean intensity fluorescence</i>
mRNA	<i>Messenger-RNA</i>
n	Größe der Stichprobe
NEAA	<i>Non-essential amino acids</i>
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
ns	Nicht signifikant
nT _{reg}	Natürliche regulatorische T-Zelle
ODN	Oligodesoxynukleotide

OVA	Ovalbumin
PacB	Pacific Blue
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PaTu	PaTu-8988T, humane Pankreaskarzinom-Zelllinie
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PD-1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
PD-L1	<i>Programmed cell death 1 ligand 1</i>
pDC	Plasmazytoide dendritische Zelle
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidium Iodid
PRR	<i>Pattern recognition receptors</i>
qRT-PCR	Quantitative <i>real-time</i> -PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	<i>Rounds per minute</i>
RPMI	Roswell Park Memory Institute
rtTA	<i>Reverse tetracycline-controlled transactivator</i>
SEM	Standardfehler
SIINFEKL	Ovalbumin OVA257-264 Peptid
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SSC	<i>Sidescatter</i>
SSC-A	<i>SSC-Area</i>
T _{conv}	Konventionelle T-Zelle
TGF-β	<i>Transforming growth factor β</i>
T _H	T-Helfer-Zelle
TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor α</i>
T _{reg}	Regulatorische T-Zelle
UPL	<i>Universal probe library</i>

VLE	<i>Very low</i> Endotoxin
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp

Veröffentlichungen

Kongressbeiträge

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Teilen auf folgenden Kongressen vorgestellt und als Abstract oder Poster veröffentlicht:

1. **Vetter V**, Knott M, Layritz P, Kühnemuth B, Endres S, Anz D.
Tolerogenic effects of GM-CSF through expansion of regulatory T-cells and induction of the Treg-associated chemokine CCL22.
14th CIMT Annual Meeting (2016), Mainz, Deutschland
2. Knott M, Wiedemann G, **Vetter V**, Layritz P, Kühnemuth B, Rapp M, Endres S, Anz D.
Tumor-derived IL-1 mediates intratumoral immunosuppression via the Treg-attracting chemokine CCL22.
14th CIMT Annual Meeting (2016), Mainz, Deutschland
3. Anz D, Wiedemann G, Knott M, **Vetter V**, Rapp M, Haubner S, Fessler J, Endres S.
IL-1 Sekretion durch Tumorzellen induziert CCL22 und vermittelt die Migration von regulatorischen T-Zellen im Hepatozellulären Karzinom.
Viszeralmedizin 2016, 71. Jahrestagung der DGVS (2016), Hamburg, Deutschland
Z Gastroenterol 54.08 (2016)

Originalarbeiten

1. Wiedemann GM, Knott MML, **Vetter VK**, Rapp M, Haubner S, Fessler J, Kühnemuth B, Layritz P, Thaler R, Kruger S, Ormanns S, Mayr D, Endres S, Anz D.
Cancer cell-derived IL-1 α induces CCL22 and the recruitment of regulatory T cells.
Oncoimmunology 5.9 (2016), e1175794.
JIF²⁰¹⁶ 7,7

2. Rapp M, Wintergerst M, Kunz WG, Vetter VK, Knott ML, Lisowski D, Haubner S, Moder S, Thaler R, Eiber S, Meyer B, Röhrle N, Piseddu I, Grassmann S, Layritz P, Kühnemuth B, Stutte S, Bourquin C, von Andrian UH, Endres S, Anz D.

CCL22 controls immunity by promoting regulatory T cell communication with dendritic cells in lymph nodes.

The Journal of Experimental Medicine 216.5 (2019), 1170–1181.

JIF²⁰¹⁸ 10,8

Danksagung

An erster Stelle geht mein Dank an Prof. Stefan Endres für die Möglichkeit, in der Abteilung für Klinische Pharmakologie promovieren zu können. Er hat dort einen Ort der äußerst kollegialen, wissenschaftlichen Zusammenarbeit geschaffen, an dem ich zu jeder Zeit gerne gearbeitet habe.

Ganz herzlich möchte ich mich bei PD David Anz für die Überlassung dieses vielseitigen und spannenden Promotionsprojekts, die engagierte Betreuung über die letzten Jahre, und seinen unerschütterlichen Optimismus bedanken.

Mein besonderer Dank gilt weiterhin den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe, insbesondere Benjamin Kühnemuth, Max Knott und Patrick Layritz, für die vielen wertvollen Diskussionen, die tatkräftige Unterstützung und den ausgesprochen guten Zusammenhalt. Auch dem restlichen Team der Abteilung danke ich für die positive Arbeitsatmosphäre und den wichtigen wissenschaftlichen und methodischen Austausch.

Zuletzt danke ich von Herzen meiner Familie, meinen Freunden und besonders Dominik Schröder für ihre Unterstützung, Nachsicht und ihr immer offenes Ohr.

