

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

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



Regulation und Bedeutung der immunregulatorischen Chemokine CCL1 und CCL22 im Kontext immunologischer Homöostase und Tumor-vermittelter Immunsuppression

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

vorgelegt von
Ignazio Piseddu

aus
Lahr (Schwarzwald)

Jahr
2021

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. David Anz

Mitberichterstatter:

Priv. Doz. Dr. Robert Kammerer apl.
Prof. Dr. rer. nat. Elfriede Nößner
Priv. Doz. Dr. rer. nat. Heike Pohla

**Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:**

Prof. Dr. med. Stefan Endres

Dekan:

Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung:

08.07.2021

Meiner Familie

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, Ignazio Piseddu, an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Regulation und Bedeutung der immunregulatorischen Chemokine CCL1 und CCL22 im Kontext immunologischer Homöostase und Tumor-vermittelter Immunsuppression“

eigenständig verfasst, mich außer der angegeben 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 vorliegende Dissertation nicht in gleicher oder ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 16.07.2021

.....

Ignazio Piseddu

Bestätigung der Ko-Autoren

Hiermit bestätige ich, dass alle beteiligten Ko-Autoren mit der Nutzung der im Folgenden aufgeführten Publikationen für meine kumulative Dissertation einverstanden sind. Darüber hinaus erkläre ich, dass alle Ko-Autoren darüber informiert wurden, dass kein weiterer Ko-Autor die hier verwendeten Publikationen für seine oder ihre kumulative Dissertation verwenden darf. Kopien der unterschriebenen Einverständniserklärungen sind dieser Dissertation separat beigefügt.

“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now is the time to understand more, so that we may fear less.”

Marie Sklodowska Curie

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Versicherung	v
Bestätigung der Ko-Autoren	vii
1 Einleitung: Das Immunsystem.....	1
1.1 Das angeborene Immunsystem.....	3
1.2 Dendritische Zellen	3
1.3 Das adaptive Immunsystem	4
1.3.1 T-Zellen	5
1.3.2 T-Zell-Aktivierung	5
1.3.3 Subtypen von CD4 ⁺ T-Zellen	6
1.3.4 Regulatorische T-Zellen	7
1.4 Zytokine	9
1.4.1 Zytokinfamilien.....	9
1.4.2 Das Zytokin GM-CSF	10
1.5 Chemokine	12
1.5.1 Chemokinfamilien	12
1.5.2 Das Chemokin CCL1	13
1.5.3 Das Chemokin CCL22.....	14
1.6 Tumorimmunologie und Tumorimmuntherapie.....	17
2 Fragestellung	20
3 Ergebnisse.....	22
4 Zusammenfassung	24
4.1 Deutschsprachige Zusammenfassung	24
4.2 Englischsprachige Zusammenfassung.....	26
5 Veröffentlichungen	28
5.1 Constitutive expression of CCL22 is mediated by T cell-derived GM-CSF ...	28
5.1.1 Eigener Beitrag zum Originalartikel	28
5.1.2 Originalartikel.....	29
5.2 CCL1 is a major regulatory T cell attracting factor in human breast cancer..	30
5.2.1 Eigener Beitrag zum Originalartikel	30
5.2.2 Originalartikel.....	31
Literaturverzeichnis	32
Abkürzungsverzeichnis	50
Publikationsliste.....	52
Danksagung.....	53

1 Einleitung: Das Immunsystem

Das Immunsystem ist ein komplexes Netzwerk aus Organen, immunologisch aktiven Zellen und löslichen Molekülen, deren Zusammenspiel der Erkennung und Abwehr körperfremder Strukturen dient, den Organismus somit schützt und dessen Integrität gewährleistet (Murphy et al., 2016).

Nahezu alle Organismen sind dauerhaft unterschiedlichsten Umwelteinflüssen ausgesetzt, die eine potentielle Bedrohung für deren Unversehrtheit darstellen (Medzhitov et al., 1997). Wenn es pathogenen Mikroorganismen gelingt, in den Wirtsorganismus einzudringen, kann dies zu Organ- bzw. Gewebeschädigungen führen (Murphy et al., 2016). Doch nicht nur extrinsische Gefahren können den Körper nachhaltig schädigen. Auch im Körperinneren entstehen täglich Zellen, die durch genetische Mutationen ihre physiologische Funktion verloren und einen fehlerhaften Zustand erhalten haben, der zur Entstehung von Krebs führen kann (Hahn et al., 2002).

Um die Invasion und Expansion von Pathogenen zu verhindern und fehlerhafte körpereigene Zellen abzutöten, besitzen beinahe alle Lebewesen umfassende Abwehrmechanismen (Sherr, 2004; Travis, 2009). Die Grundlage dieses effizienten Abwehrnetzwerks wird von zwei eigenständigen, jedoch gleichzeitig miteinander kooperierenden Bereichen gebildet, die als angeborenes und adaptives Immunsystem bezeichnet werden (Jain et al., 2017). Das angeborene oder unspezifische Immunsystem, welches auch in niederen Lebewesen existiert, phylogenetisch bereits sehr früh entstand und seitdem weitgehend konserviert blieb, stellt hierbei die erste und schnellere Verteidigungslinie dar (Travis, 2009). Im Gegensatz dazu entwickelte sich das adaptive Immunsystem, welches auch als erworbenes oder spezifisches Immunsystem bezeichnet wird, erst in Wirbeltieren und repräsentiert eine verzögernd einsetzende, anpassungsfähige und individuell antigenspezifische Abwehr mit der Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses (Marshall et al., 2018). Demzufolge nutzen das angeborene und das adaptive Immunsystem zwar fundamental verschiedene Abwehrstrategien, benötigen aber den wechselseitigen Synergismus sowohl zum Aufbau als auch zur Termination einer vollumfänglichen und effektiven Immunantwort (Chaplin, 2010).

Neben der Vermittlung dieser lebensnotwendigen Schutzfunktionen sind das Immunsystem bzw. dessen funktionelle Störungen jedoch auch in der Pathophysiologie

diverser Erkrankungen beteiligt. Eine fehlregulierte Immunantwort, bei der die Unterscheidung zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen versagt, kann die Entstehung von chronisch-inflammatorischen Prozessen sowie Autoimmunerkrankungen bedingen (Theofilopoulos et al., 2017). Ein defizientes oder medikamentös supprimiertes Immunsystem hingegen führt hauptsächlich zu wiederkehrenden und lebensbedrohlichen Infektionskrankheiten (Fischer, 2007; Chinen et al., 2010). Des Weiteren spielt das Immunsystem auch bei der Entstehung und Progression maligner Tumorerkrankungen eine tragende Rolle (Gonzalez et al., 2018). Hierbei ist das Immunsystem einerseits essenziell für die Elimination transformierter Zellen, kann jedoch andererseits durch Selbige auch zur verstärkten Tumorprogression ausgenutzt werden (Schreiber et al., 2011).

Das Verständnis grundlegender immunsuppressiver Mechanismen ist dementsprechend elementar, um die Entstehung und Entwicklung von Autoimmunprozessen und Tumorerkrankungen nachvollziehen und daraus therapeutische Strategien für die klinische Anwendung ableiten zu können. Der Einsatz von Immunsuppressiva wird bereits seit Mitte des 20. Jahrhunderts praktiziert und stets werden neue immunmodulierende Therapeutika zugelassen, die aktuelle pathophysiologische Konzepte berücksichtigen und die therapeutische Effektivität verbessern (Allison, 2000; Durrbach et al., 2010). Die Anwendung immunstimulierender Agenzien bei Tumorerkrankungen hingegen feierte mit den Erfolgen der Immuncheckpoint-Inhibition erst vor wenigen Jahren ihren revolutionären Durchbruch (Hodi et al., 2010).

Die hier vorliegende Arbeit untersucht die immunmodulatorischen Mechanismen der Chemokine CCL1 und CCL22 während immunologischer Homöostase und Krebs und soll somit zu einem umfassenderen Verständnis immunregulativer Prozesse beitragen. Die Befunde sollen neue Ansätze in der Immuntherapie von Tumoren und in der immunsuppressiven Therapie von Autoimmunpathologien ermöglichen.

1.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem besteht aus epithelialen Barrieren an Körperoberflächen, löslichen Faktoren wie dem Komplementsystem und antimikrobiellen Peptiden sowie verschiedenen Immunzellpopulationen, die in der direkten Verteidigung sowie der Kommunikation mit dem adaptiven Immunsystem jeweils unterschiedliche Funktionen ausüben (Riera Romo et al., 2016).

Die Abwehrstrategien des angeborenen Immunsystems basieren auf der Expression sogenannter *pattern recognition receptors* (PRR) durch zahlreiche Immunzellsubtypen (Akira et al., 2006). Mit ihrer Hilfe können konservierte mikrobielle Bestandteile, die sogenannten *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP), detektiert und von körpereigenen Strukturen diskriminiert werden (Janeway et al., 2002). Darüber hinaus erkennen PRR auch endogene Moleküle, die bei nekrotischen Gewebe- und Zellschädigungen wie Trauma, Ischämie und Krebs aus dem Zellinneren in den Extrazellulärraum freigesetzt werden. Diese werden als *danger-associated molecular patterns* (DAMP) bezeichnet (Tang et al., 2012). Die prominentesten Vertreter der PRR sind die Toll-*like*-Rezeptoren (TLR), welche als membranständige Moleküle auf der Zelloberfläche oder der endosomalen Membran extrazelluläre bzw. phagozytierte Erregerbestandteile detektieren (Beutler, 2009).

Die Aktivierung der PRR durch PAMP oder DAMP vermittelt letztendlich die beiden distinkten Aufgaben des angeborenen Immunsystems: Neben der Repräsentation der ersten immunologischen Barriere und damit der Bekämpfung und Beseitigung schädigender Prozesse bewirkt die Aktivierung der angeborenen Immunität zudem die Rekrutierung adaptiver Immunzellen und die Initiation einer spezifischen Immunantwort (Iwasaki et al., 2015).

1.2 Dendritische Zellen

Die dendritischen Zellen (DC) leisten an der Schnittstelle zwischen angeborener und adaptiver Immunität einen essenziellen Beitrag zur Initiierung einer zielgerichteten spezifischen Immunantwort (Banchereau et al., 1998). Nach ihrer Entstehung im Knochenmark positionieren sie sich strategisch an Körpergrenzen und Eintrittspforten von lymphatischen Geweben, wo sie Antigene phagozytotisch aufnehmen und daraufhin in die sekundär lymphatischen Organe migrieren (Banchereau et al., 1998). Hier prozessieren sie das phagozytierte Antigen in kleine Peptidfragmente, welche

schließlich auf den MHC-Komplex geladen und an T-Zellen präsentiert werden (Steinman et al., 1978; Steinman et al., 1979; Nussenzweig et al., 1980).

DC sind durch die diversen Mechanismen der Antigenaufnahme, -prozessierung und -präsentation sowie ihrer immensen Plastizität bezüglich Entwicklung, Lokalisation, Zytokinprofil und immunologischer Funktion in der Lage, unter gewissen Voraussetzungen die Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen zu vermitteln und somit eine adaptive Immunreaktion zu initiieren und zu dirigieren (Mildner and Jung, 2014). Dies soll zu einem späteren Zeitpunkt noch Gegenstand genauerer Betrachtung sein.

1.3 Das adaptive Immunsystem

Die adaptive Immunität stellt ein sich über die gesamte Lebenszeit anpassbares und verbesserndes Abwehrsystem dar, das parallel zu seiner direkten Abwehrfunktion auch der Etablierung eines immunologischen Gedächtnisses dient. Dieses gewährleistet bei erneuter Exposition gegenüber bekannten Pathogenen eine schnelle und effektive Erregereradikation (Chaplin, 2010).

Die B- und T-Lymphozyten sind die Effektorzellen des adaptiven Immunsystems. Beide Zellarten besitzen auf ihrer Oberfläche hochspezifische Antigenrezeptoren eines jeweils einzigartigen Bauplans zur Erkennung und Eliminierung eines spezifischen Antigens (Agrawal et al., 1998). Die Vielfalt dieser Rezeptoren wird im Zuge der Lymphozytenentwicklung besonders durch somatische Rekombination ermöglicht, welche hauptsächlich durch die Lymphozyten-spezifischen Proteine *recombination-activating gene* (RAG)-1 und RAG-2 vermittelt wird (Oettinger et al., 1990). Während B-Lymphozyten mit ihrem B-Zell-Rezeptor Antigene in löslicher Form binden und sogar endozytieren sowie präsentieren können, benötigen T-Zellen die Präsentation ihres zu erkennenden Peptidfragments durch eine Antigen-präsentierende Zelle (APC) über einen MHC-Komplex (Smith-Garvin et al., 2009; Cyster et al., 2019).

Die Antigenerkennung und Aktivierung von B-Zellen führt zur klonalen Proliferation sowie letztlich zur Differenzierung in Plasmazellen, die auf die Sekretion von Antikörpern spezialisiert sind. Diese sind unter anderem für die Neutralisation von Toxinen, die Aktivierung des Komplementsystems sowie die Opsonierung von Antigenen verantwortlich (Schroeder et al., 2010). Auch T-Zellen durchlaufen nach Aktivierung ihres T-Zell-Rezeptors (TCR) diverse Proliferations- und

Differenzierungsschritte, die sie je nach Subtyp zu verschiedenen Aufgaben befähigen (Bonilla et al., 2010).

1.3.1 T-Zellen

T-Zellen entwickeln sich im Knochenmark aus lymphoiden Progenitorzellen und begeben sich daraufhin zur weiteren Reifung in den Thymus (Kumar et al., 2018). Hier durchlaufen die nun als Thymozyten bezeichneten T-Zell-Vorläufer sequenzielle Selektionsschritte, die als positive und negative Selektion bezeichnet werden. In der positiven Selektion überleben nur diejenigen Thymozyten, die prinzipiell dazu in der Lage sind, mit ihrem TCR mit einer bestimmten Avidität mit einem MHC-Komplex zu interagieren. In der negativen Selektion werden alle T-Zell-Vorläufer eliminiert, die auch mit körpereigenen Peptidfragmenten interagieren (Starr et al., 2003). Diese intrathymischen Selektionsprozesse werden auch als zentrale Toleranz bezeichnet (Griesemer et al., 2010). Die verbliebenen reifen, aber antigenunerfahrenen, also naiven T-Zellen, wandern schließlich aus dem Thymus aus und migrieren vorwiegend in die sekundär lymphatischen Organe, um dort auf eine potentielle Aktivierung durch ihr korrespondierendes Antigen zu warten (Miller, 1961; Takahama, 2006).

T-Zellen übernehmen zentrale Rollen für die Intaktheit des Immunsystems und lassen sich anhand dessen grundsätzlich in zwei verschiedene Subpopulationen einteilen: CD8⁺ T-Zellen, die auch als zytotoxische T-Zellen bezeichnet werden, sind direkt mit der Abtötung von Zielzellen wie virusbefallenen oder maligne transformierten Zellen beauftragt (Zhang et al., 2011). Sie erkennen ausschließlich Antigene, die ihnen über den MHC-I-Komplex präsentiert wurden (Zinkernagel et al., 1974). Dahingegen verfügen CD4⁺ T-Zellen – die T-Helferzellen – weitestgehend über vielfältige administrative sowie regulative Aufgaben sowohl innerhalb des adaptiven als auch des angeborenen Immunsystems (Zhu et al., 2008; Zhu et al., 2010). Ihre Antigenbindung und -erkennung ist auf MHC-II-gebundene Antigene beschränkt (Bjorkman, 1997).

1.3.2 T-Zell-Aktivierung

Hauptverantwortlich für die Erkennung und Bindung von MHC-assoziierten Antigenen und damit für die Aktivierung von T-Zellen ist der TCR. Die Antigenbindung erfolgt durch eine α - und eine β -Kette, die intrazellulär mit dem signaltransduzierenden Protein CD3 assoziiert sind (Punt et al., 1994). Für die Bindung der Peptid-MHC-

Komplexe sind neben dem TCR auch die Korezeptoren CD4 und CD8 entscheidend, wobei CD4 als Korezeptor für die Bindung an MHC-II und CD8 als Korezeptor für die Bindung an MHC-I fungiert (Malissen et al., 2014).

Für eine vollumfassende T-Zell-Aktivierung werden neben der Interaktion von TCR und Antigen-MHC-Komplex jedoch zusätzliche Signale benötigt. Diese umfassen weitere kostimulatorische Moleküle wie die Interaktion der DC-ständigen Proteine CD80 oder CD86 mit dem von T-Zellen exprimierten Rezeptor CD28 (Chen et al., 2013) sowie die Expression unterschiedlicher Zytokine wie beispielsweise IL-2 (June et al., 1987; Thompson et al., 1989; Jenkins et al., 1991), die das Überleben, die Proliferation sowie die Differenzierung der naiven T-Zellen beeinflussen (Acuto et al., 2003). All diese Interaktionen zwischen APC (meist DC) und T-Zelle sind in Form einer sogenannten immunologischen Synapse organisiert (Huppa et al., 2003). Neben kostimulatorischen Rezeptoren für DC-exprimierte Liganden befinden sich auf T-Zellen jedoch auch koinhibitorische Moleküle, deren Aktivierung überschießende T-Zell-Antworten verhindern soll. Aus diesem Grund werden diese als Immun-Checkpoints bezeichnet. Prominente Vertreter sind die Proteine CTLA-4 und PD-1, deren Inhibition derzeit in der Therapie einiger maligner Tumoren, allen voran dem malignen Melanom, bahnbrechende Erfolge feiern konnte (Larkin et al., 2015).

Die TCR-MHC-Interaktion, kostimulatorische und koinhibitorische Moleküle sowie die Sekretion von Zytokinen liefern T-Zellen folglich komplexe Signale, die zu einer Reihe von transkriptionellen sowie funktionellen Veränderungen der T-Zellen führen und diese zur weiteren Differenzierung in unterschiedliche Subtypen anregen können (Murphy et al., 2002).

1.3.3 Subtypen von CD4⁺ T-Zellen

CD4⁺ T-Helferzellen sind eine heterogene Gruppe verschiedener Subpopulationen, die sich durch unterschiedliche Funktionen, diverse Zytokinsekretionsmuster und die Expression multipler funktionsvermittelnder Transkriptionsfaktoren unterscheiden (Zhu, 2010). Die erste Erkenntnis über die Präsenz unterschiedlicher T-Helferzell-Subpopulationen lieferten Mosmann und Coffman in den 1980er Jahren, indem sie zwei unterschiedliche Formen von T-Helferzellen, nämlich Th1- und Th2-Zellen, anhand der Sekretion unterschiedlicher Zytokine identifizierten (Mosmann et al., 1986).

Mittlerweile wurden viele weitere T-Helferzell-Subpopulationen beschrieben und es herrscht Konsens, dass CD4⁺ T-Zellen keine stabilen Zelltypen darstellen, sondern sich

an sich verändernde Umstände anpassen und je nach Situation verschiedene Funktionen übernehmen können (Zhu, 2010). Diese T-Zell-Plastizität wird auf unterschiedlichen Ebenen reguliert: Neben extrazellulären Signalen wie dem Zytokinmilieu spielen auch nachfolgende Signaltransduktionskaskaden und letztlich auch die Expression bestimmter nukleärer Transkriptionsfaktoren für die T-Zell-Polarisierung und damit für die Ausübung verschiedener Funktionen eine entscheidende Rolle (DuPage et al., 2016). **Tabelle 1** gibt einen Überblick über einige wichtige T-Helferzell-Subpopulationen (Zhu et al., 2008; Zhu, 2010).

Tabelle 1 Wichtige Subtypen von CD4⁺ T-Zellen

Subtyp	Hauptfunktion	Zytokinsekretion	Zytokine für Polarisation	Wichtigster Transkriptionsfaktor
Th1	Abwehr intrazellulärer Pathogene	IFN- γ	IL-2, -12, IFN- γ	T-bet
Th2	Parasitenabwehr, Allergie	IL-4, IL-5, IL-13	IL-2, -4	GATA3
Th17	Abwehr extrazellulärer Pathogene, Autoimmunität	IL-17, IL-22	IL-6, -21, -23, TGF- β	ROR γ t
Treg	Periphere Toleranz	TGF- β , IL-10	IL-2, TGF- β	FOXP3
Tfh	B-Zell-Aktivierung	IL-21	IL-6, IL-21	BCL-6

1.3.4 Regulatorische T-Zellen

Die Mechanismen des Immunsystems in der Abwehr von potentiell schädlichen Einflüssen auf den Organismus sind vielfältig und potent. Damit sich diese umfassende Immunreaktion jedoch nicht gegen körpereigene Strukturen oder kommensale Bakterien richtet und nicht unverhältnismäßig bzw. überschießend abläuft, hat der Organismus Mechanismen entwickelt, um sowohl physiologische Immunreaktionen zu regulieren als auch autoimmune und chronisch-inflammatorische Erkrankungen zu

verhindern (O'Garra et al., 2004). Eine zentrale Rolle nehmen hierbei die regulatorischen T-Zellen (Treg) ein, die entscheidend für die periphere Toleranz und damit die Verhinderung von Autoimmun- (Sakaguchi et al., 2001; Shevach et al., 2006) und chronisch-entzündlichen Erkrankungen (Coombes et al., 2005) sind.

Treg sind eine Subpopulation von CD4⁺ T-Zellen, die durch eine starke Expression von CD25, der hochaffinen α -Kette des IL-2-Rezeptors (Sakaguchi et al., 1995), sowie des Transkriptionsfaktors FOXP3 gekennzeichnet sind (Fontenot et al., 2003; Hori et al., 2003). Abhängig vom Ort ihrer Entwicklung können unterschiedliche Treg-Subtypen unterschieden werden: Solche, die im Thymus durch (zu) starke TCR-MHC-Interaktion entstehen, werden natürliche regulatorische T-Zellen, kurz nTreg, genannt (Jordan et al., 2001). Des Weiteren gibt es Treg, die unter bestimmten Voraussetzungen in der Peripherie aus konventionellen CD4⁺ T-Zellen hervorgehen können. Diese extrathymisch induzierten Zellen nennt man iTreg (Chen et al., 2003).

Treg nutzen diverse Mechanismen, um ihre regulative und immunsuppressive Funktion auszuüben. Durch die Sekretion immunsuppressiver Zytokine wie IL-10 (Asseman et al., 1999), TGF- β (Nakamura et al., 2001) und IL-35 (Collison et al., 2007) wird die Immunantwort durch Effektor-T-Zellen inhibiert. Daneben erzeugt auch die Zelltod-Induktion von Effektorzellen durch Granzyme und Perforine immunsuppressive Effekte (Cao et al., 2007). Darüber hinaus kann die Treg-abhängige Immunsuppression durch die metabolische Beeinträchtigung anderer Effektorzellen erklärt werden. Besonders die verstärkte Bindung und damit Absorption von IL-2 durch das auf Treg in besonderem Ausmaß exprimierte Protein CD25 ermöglicht es ihnen, die Bindung und Wirkung dieses Proliferations- und Überlebenszytokins an Effektor-T-Zellen zu verhindern (Pandiyani et al., 2007) und damit eine Immunsuppression zu erzeugen. Die Modulation von DC-Reifung und -funktion (Vignali et al., 2008) durch CTLA-4-CD80/86-abhängige Treg-DC-Interaktionen (Read et al., 2000; Tadokoro et al., 2006) sowie die Induktion des immunsuppressiven Metaboliten Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) in DC (Fallarino et al., 2003) sind weitere potente Mechanismen, die zur immunsuppressiven Wirkung von Treg beitragen.

Neben ihrer physiologisch entscheidenden Rolle zur Prävention von chronisch-entzündlichen Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen tragen die immunsuppressiven Mechanismen von Treg jedoch auch entscheidend zu Entrinnungsstrategien von malignen Tumorzellen vor der antitumoralen Immunantwort bei (Vinay et al., 2015). Während tumorantigenspezifische Effektor-T-Zellen eigentlich dazu in der Lage wären, Tumorzellen effektiv zu bekämpfen, werden diese unter anderem von rekrutierten oder im Tumorgewebe induzierten Treg an der Vernichtung

von Tumorzellen gehindert. Dies stellt einen potenten und fundamentalen Mechanismus der Tumor-induzierten Immunsuppression und damit ein großes Hindernis in der antitumoralen Immuntherapie dar (Zou, 2006; Togashi et al., 2019).

1.4 Zytokine

Zytokine sind eine Gruppe von Proteinen, die die Proliferation und Differenzierung von Zielzellen regulieren und das Zusammenspiel von angeborener und adaptiver Immunreaktion dirigieren (Dinarello, 2007). Ihre bedeutende Rolle in der Organisation von intakten Immunantworten wird ebenfalls in ihrem Beitrag zur Entwicklung von autoimmunen und inflammatorischen Krankheiten deutlich. In vielen immunvermittelten Erkrankungen, wie beispielsweise der rheumatoiden Arthritis oder chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, spielt eine Dysbalance von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen eine entscheidende Rolle für die Pathogenese, den weiteren Krankheitsverlauf oder die Krankheitsaktivität (O'Shea et al., 2002; McInnes et al., 2011; Neurath, 2014). Die Blockade proinflammatorischer Zytokine oder deren Rezeptoren zeigt dementsprechend eindrucksvolle klinische Effekte und wird bei einer Vielzahl von inflammatorischen und autoimmunen Erkrankungen erfolgreich angewandt (O'Dell, 2004; Abraham et al., 2009; Sandborg et al., 2012).

1.4.1 Zytokinfamilien

Zytokine können vereinfacht in fünf Hauptgruppen unterteilt werden, die allesamt verschiedene biologische Funktionen übernehmen (Dinarello, 2007).

Interferone sind Proteine, die vor allem in der antiviralen Immunantwort eine entscheidende Rolle spielen und Zielzellen dazu veranlassen, Proteine zu synthetisieren, die für die Eradikation des Virus bzw. der virusbefallenen Zelle notwendig sind (Yan et al., 2012).

Interleukine sind Botenstoffe, mit denen die verschiedenen Komponenten von angeborener und erworbener Immunität miteinander kommunizieren. Sie haben vielfältige Funktionen in der Aktivierung, Differenzierung und Regulation von Immunzellen und den von ihnen vermittelten Immunreaktionen (Akdis et al., 2011).

Chemokine sind Proteine, die als Lockstoffe fungieren und die Chemotaxis von Immunzellen vermitteln. So werden beispielsweise Entzündungsreaktionen dirigiert, indem am Inflammationsort lokalisierte Immunzellen durch die Sekretion von Chemokinen weitere Immunzellpopulationen zur effektiven Erregereradikation rekrutieren (Griffith et al., 2014).

Koloniestimulierende Faktoren sind Wachstumsfaktoren, die im Rahmen der Hämatopoese und Myelopoese eine entscheidende Rolle in der Entwicklung von ausdifferenzierten Zellpopulationen aus Stammzellen einnehmen. Darüber hinaus fungieren sie auch als Regulatoren von differenzierten Immunzellen und leisten dementsprechend einen Beitrag zu einer intakten Immunantwort (Hamilton, 2008).

Auch Tumornekrosefaktoren sind immunmodulierende Proteine, die vor allem proinflammatorische Funktionen ausüben und für Inflammation, Zelltod und Zelldifferenzierung wichtige Funktionen innerhalb des Immunsystems einnehmen (Kalliolas et al., 2015).

1.4.2 Das Zytokin GM-CSF

Das in dieser Arbeit näher untersuchte Zytokin GM-CSF ist neben M-CSF und G-CSF ein Hauptmitglied aus der Familie der koloniestimulierenden Faktoren. Während die Funktion von GM-CSF in der Ausreifung von granulozytären und makrophagozytären Populationen *in vitro* bereits vor einiger Zeit ausgiebig beschrieben wurde (Burgess et al., 1980; Inaba et al., 1992), scheinen bei GM-CSF-Defizienz *in vivo* andere Zytokine kompensatorische Funktionen zu übernehmen. GM-CSF-defiziente Mäuse weisen demnach bis auf die Abwesenheit von Alveolarmakrophagen und CD103⁺ und CD11b⁺ DC in nicht-lymphatischen Geweben keine wesentlichen Veränderungen im myeloiden Kompartiment auf (Stanley et al., 1994; Varol et al., 2009; Greter et al., 2012; Williams et al., 2013).

Der GM-CSF-Rezeptor ist ein Heterodimer, bestehend aus einer GM-CSF-spezifischen α -Kette und einer signalübertragenden β -Untereinheit, die auch Teil des IL-3- und des IL-5-Rezeptors ist (Kitamura et al., 1991; Tavernier et al., 1991). Die Bindung von GM-CSF an den Rezeptor aktiviert unterschiedliche Signalkaskaden. Differenzierungs- und Inflammationseffekte werden vor allem durch die Aktivierung von JAK2 und STAT5 getriggert, während Proliferation und Zellüberleben hauptsächlich durch die Aktivierung der PI3K und MAPK vermittelt werden (Guthridge et al., 1998). Der GM-CSF-Rezeptor

wird hauptsächlich von Zellen der myeloiden Reihe wie DC, Monozyten, Makrophagen sowie eosinophilen und neutrophilen Granulozyten exprimiert (Hamilton et al., 2004).

Mittlerweile konnten multiple zelluläre Sekretionsquellen von GM-CSF identifiziert werden. Neben Epithelzellen, Endothelzellen, Fibroblasten und Stromazellen sind auch hämatopoetische Zellen dazu in der Lage, GM-CSF zu sezernieren (Griffin et al., 1990). Besonders T-Zellen scheinen unter inflammatorischen Bedingungen eine prominente GM-CSF-Quelle darzustellen. Neben autoreaktiven T-Zellen, Th17-Zellen (Codarri et al., 2011) und Th1-Zellen werden in der Literatur auch ThGM-CSF-Zellen beschrieben, die sich durch die STAT5-abhängige Produktion von GM-CSF charakterisieren lassen (Herndler-Brandstetter et al., 2014).

Einige Autoren schreiben GM-CSF proinflammatorische und autoimmunitätstreibende Eigenschaften zu. So wurde gezeigt, dass GM-CSF die Krankheitsentwicklung in präklinischen Multiple Sklerose (MS)- (McQualter et al., 2001; El-Behi et al., 2011) und Arthritis-Modellen (Campbell et al., 1998) fördert und GM-CSF-Blockade einen therapeutischen Effekt in einer Reihe von Erkrankungen aus dem autoimmunen, entzündlichen und allergischen Formenkreis erzielt (Vlahos et al., 2006; Willart et al., 2012; Griseri et al., 2015; Stock et al., 2016; Burmester et al., 2017). Diese proinflammatorischen Effekte wurden hauptsächlich durch die vermehrte GM-CSF-abhängige Aktivierung und proinflammatorische Polarisation von APC erklärt (Aloisi et al., 2000; Ponomarev et al., 2007).

Im Gegensatz dazu gibt es jedoch auch einige Studien, die GM-CSF eine antiinflammatorische Rolle attribuieren. In Mausmodellen von Typ-I-Diabetes, experimenteller autoimmuner Thyreoiditis, experimenteller autoimmuner Myasthenia gravis sowie DSS-induzierter Kolitis konnte die GM-CSF-Applikation die Krankheitsentwicklung verzögern oder gar verhindern, was vor allem auf die Induktion tolerogener DC und der damit einhergehenden Expansion von Treg zurückgeführt wurde (Vasu et al., 2003; Sheng et al., 2006; Gaudreau et al., 2007; Xu et al., 2008; Bhattacharya et al., 2015). Dementsprechend zeigte die therapeutische Anwendung von GM-CSF bei Patienten mit Morbus Crohn eine Verringerung der Krankheitsaktivität sowie des Steroidbedarfs, wobei diese Beobachtungen bislang noch keinen Weg in die klinische Anwendung finden konnten (Dieckgraefe et al., 2002; Korzenik et al., 2005; Valentine et al., 2009).

Die ambivalente Rolle von GM-CSF in der Regulation von Immunantworten ist folglich noch nicht vollständig geklärt. Jedoch scheinen das lokale Mikromilieu, die lokal wirksame GM-CSF-Konzentration sowie die Anwesenheit anderer Zytokine eine

entscheidende Rolle in der GM-CSF-vermittelten Immunregulation zu spielen (Lutz et al., 2000; Nemunaitis et al., 2004).

1.5 Chemokine

Für die Effizienz des Immunsystems sind komplexe und vielfältige zelluläre Interaktionen sowie deren Lokalisation in unterschiedliche lymphoide Kompartimente unabdingbar. Chemokine sind kleine chemotaktische Proteine, die die Migration und Distribution aller Immunzellen während immunologischer Homöostase sowie akuter Inflammation kontrollieren. Des Weiteren spielen sie auch eine entscheidende Rolle in der Aktivierung naiver T-Zellen sowie der Funktion von Treg (Griffith, 2014).

1.5.1 Chemokinfamilien

Das Chemokin-System kann sowohl strukturell als auch funktionell in unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden (Zlotnik et al., 2012).

Strukturell besitzen alle Chemokine vier konservierte Cystein-Reste, die zwei Disulfidbrücken ausbilden. Basierend auf der Anordnung der N-terminalen Cysteinreste lassen sich vier verschiedene Chemokingruppen differenzieren. In der CXC-Familie werden die beiden Cysteinreste durch eine Aminosäure voneinander getrennt, während sie in der CC-Familie direkt aneinandergrenzen. In der CX3C-Familie liegen drei Aminosäuren zwischen den Cysteinen, während bei der XC-Familie das erste und dritte Cystein fehlen (Zlotnik et al., 2000).

Funktionell können Chemokine anhand ihres Expressionsmusters unterschieden werden. Einige Chemokine werden unter inflammatorischen Bedingungen induziert und sorgen für die Migration von Immunzellen während Inflammation, Infektion oder im Rahmen von Gewebeerneuerung und Tumoren. Andere Chemokine hingegen werden konstitutiv in lymphatischen Geweben und anderen Organen exprimiert. Diese sorgen für die homöostatische Migration von Immunzellen während deren Entwicklung im Knochenmark und Thymus, der Initiation adaptiver Immunantworten in sekundär lymphatischen Organen sowie der Überwachung gesunder Organe und Gewebe (Griffith, 2014). Manche Chemokine verbinden beide Eigenschaften und können sowohl unter homöostatischen als auch inflammatorischen Bedingungen exprimiert werden (Moser et al., 2004; Schulz et al., 2016).

Auch die zugehörigen Chemokinrezeptoren werden entsprechend der Nomenklatur ihrer Liganden in vier Untergruppen (CXCR, CCR, CX3CR, XCR) unterteilt. Diese sogenannten typischen Chemokinrezeptoren sind ausnahmslos G α_i -gekoppelte Rezeptoren, die nach Ligandenbindung zur Migration der Zelle in Richtung des Chemokingradienten führen (Bachelier et al., 2013). Neben den 18 typischen Chemokinrezeptoren gibt es jedoch auch atypische Chemokinrezeptoren, die als „stille“, also nicht-signaltransduzierende Rezeptoren fungieren. Sie binden jeweils eine große Anzahl unterschiedlicher Chemokinliganden, vermitteln jedoch keine Chemotaxis, sondern regulieren als *Decoy*-Rezeptoren die Immunzelldistribution durch Feinregulation der Formierung von Chemokingradienten (Mantovani et al., 2006).

1.5.2 Das Chemokin CCL1

Das Chemokin CCL1 wurde 1987 von Burd *et al.* entdeckt und aufgrund seiner Expression durch aktivierte T-Zellen als *T cell activating gene 3* (TCA3) bezeichnet (Burd et al., 1987). Mittlerweile konnten neben T-Zellen auch DC, Mastzellen und dermale Endothelzellen als weitere CCL1-Quellen identifiziert werden (Gombert et al., 2005). Die Funktionen von CCL1 wurden im weiteren Verlauf auf die Bindung an den Rezeptor CCR8 zurückgeführt (Roos et al., 1997). Dieser wird hauptsächlich von Th2-Zellen (Zingoni et al., 1998), Treg (Iellem et al., 2001), interstitiellen DC (Gombert, 2005) und NK-Zellen (Inngjerdigen et al., 2000) exprimiert.

Die Bindung von CCL1 an CCR8 löst neben Chemotaxis eine Reihe weiterer zellulärer Effekte aus. Initial konnte gezeigt werden, dass CCL1 als inflammatorisches Chemokin Monozyten sowie neutrophile Granulozyten attrahiert (Miller et al., 1992; Luo et al., 1994) und neben deren Migration auch deren Aktivierung vermittelt (Devi et al., 1995). Einige Studien schreiben der CCL1-CCR8-Achse durch die Rekrutierung von Langerhans-DC und aktivierten T-Zellen demnach eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der atopischen Dermatitis zu (Gombert, 2005). Im Gegensatz dazu konnten Barsheshet *et al.* erst kürzlich zeigen, dass die CCL1-abhängige Induktion von CCR8 die suppressive Potenz sowie die FOXP3-Expression von Treg verstärken und dadurch den Verlauf der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) verlangsamen konnte (Barsheshet et al., 2017). Darüber hinaus wurde in einigen Publikationen der negative Einfluss von CCL1 auf das Wachstum und die Prognose maligner Tumorerkrankungen gezeigt. Die Blockade von CCL1 verminderte die Konversion, Rekrutierung und suppressive Potenz von Treg in einem murinen Brustkrebsmodell und war somit in der Lage, die antitumorale Immunantwort

wiederherzustellen (Hoelzinger et al., 2010). Analog dazu führte die CCL1-Expression in murinen Brustkrebsmodellen zu einer stärkeren Treg-Infiltration und -Akkumulation (Xu et al., 2017). Ferner konnten Plitas *et al.* zeigen, dass die CCR8-Expression von Treg in humanen Mammakarzinomgeweben für deren Infiltration, suppressiver Potenz und für das Patientenüberleben eine entscheidende Rolle einnehmen (Plitas et al., 2016).

Neben der Inhibition der antitumoralen Immunantwort konnte ebenfalls ein Einfluss der CCL1-CCR8-Achse auf das Metastasierungsverhalten maligner Tumoren beobachtet werden (Das et al., 2013). Die CCL1-Expression von lymphoiden Endothelzellen korrelierte demnach mit einer verstärkten lymphogenen Metastasierung von CCR8⁺ Melanomzellen. Der genetische *knockdown* von CCR8 in murinen Melanomzelllinien konnte folglich die Anzahl an Lymphknotenmetastasen signifikant verringern.

Der Einfluss auf die Funktion von Treg bei immunregulativen Prozessen sowie dem Wachstumsverhalten und der Prognose vieler Tumorerkrankungen machen CCL1 und dessen Rezeptor CCR8 somit zu einem vielversprechenden Angriffspunkt für weitere immuntherapeutische Konzepte in der Therapie allergischer und autoimmuner sowie maligner Erkrankungen.

1.5.3 Das Chemokin CCL22

Das Chemokin CCL22 wurde zuerst von Godiska *et al.* im Jahre 1997 beschrieben und aufgrund der initial identifizierten Sekretion durch Makrophagen als *macrophage-derived chemokine* (MDC) bezeichnet (Godiska et al., 1997). Es ist neben CCL17 einer von zwei Liganden des Chemokinrezeptors CCR4 (Imai et al., 1998) und repräsentiert ein sowohl homöostatisch exprimiertes als auch inflammatorisch induzierbares Chemokin (Zlotnik et al., 2012). Der bislang einzige identifizierte CCL22-Rezeptor CCR4 wird hauptsächlich von bestimmten T-Zell-Subtypen exprimiert. So wurden im Laufe der Jahre Th2-Zellen (Imai et al., 1999), hautständige CLA⁺ T-Zellen (Soler et al., 2003) und in besonders spezifischem Ausmaß Treg (Iellem, 2001) als Träger von CCR4 identifiziert. Auch eine Reihe anderer Zelltypen wie NK-Zellen, eosinophile Granulozyten, Th17- und Th22-Zellen scheinen unter bestimmten Bedingungen in der Lage zu sein, CCR4 zu exprimieren (Yoshie et al., 2015).

Die Regulationsmechanismen der inflammatorischen CCL22-Expression sind in der Literatur mittlerweile umfassend beschrieben. Unterschiedliche Immunzellpopulationen sind nach Aktivierung in der Lage, CCL22 zu sezernieren. Hierzu gehören besonders

Zellen myeloiden Ursprungs wie M2-Makrophagen (Martinez et al., 2009) und DC (Vulcano et al., 2001; Wu et al., 2001), jedoch auch B-Zellen und T-Zellen (Mantovani et al., 2000). CCL22 wird unter anderem durch LPS, IL-4, IL-13, Prostaglandin E₂ und durch TCR-Aktivierung induziert, während IL-12, IFN- α und IFN- γ als potente CCL22-Suppressoren beschrieben wurden (Iellem et al., 2000; Yamashita et al., 2002; McIlroy et al., 2006)

Unter homöostatischen Bedingungen hingegen konnten besonders DC als führende CCL22-Quelle in lymphatischen Organen identifiziert werden, wobei die regulativen Mechanismen der konstitutiven CCL22-Sekretion bislang weitgehend unbekannt sind (Kanazawa et al., 1999; Tang et al., 1999). Lediglich apoptotische Zellfragmente konnten bislang als potente CCL22-induzierende Faktoren zur Aufrechterhaltung immunologischer Homöostase identifiziert werden (Hao et al., 2016). Außerdem wurde gezeigt, dass CCL22 während immunologischer Homöostase stark im Thymus exprimiert wird, wodurch ihm eine potentielle Rolle bei der negativen Selektion der T-Zell-Linie attribuiert wird (Godiska, 1997; Annunziato et al., 2000). Erst kürzlich konnten Rapp *et al.* die immense Bedeutung von CCL22 für die Regulation von T-Zell-vermittelten Immunantworten darstellen. Sie beschrieben, dass die konstitutive CCL22-Expression im Lymphknoten den Kontakt zwischen DC und Treg vermittelt und somit einen zentralen Regulator und neuartigen Immun-Checkpoint der T-Zell-Immunität repräsentiert (Rapp et al., 2019).

Besonders die Rolle von CCL22 als potentes Chemoattraktant von Treg wurde genutzt, um neue pathophysiologische Konzepte zu generieren und die mögliche therapeutische Nutzbarkeit der CCL22-CCR4-Achse zu untersuchen. Hierbei scheinen vor allem Erkrankungen aus dem allergischen und autoimmunen Formenkreis durch CCL22-CCR4-Interaktionen vermittelt zu sein. Die CCL22-CCR4-Achse spielt beispielweise eine entscheidende Rolle bei Erkrankungen atopischer Genese wie Asthma bronchiale, atopischer Dermatitis und allergischer Rhinitis (Gonzalo et al., 1999; Vestergaard et al., 1999; Lloyd et al., 2000; Yanai et al., 2007). Des Weiteren konnte die CCL22-vermittelte Treg-Rekrutierung in einem murinen Typ-I-Diabetes-Modell den autoimmunen Angriff und die Zerstörung der pankreatischen Inselzellen verzögern oder gar verhindern (Montane et al., 2011; Bischoff et al., 2015). Auch in Tiermodellen vieler weiterer Autoimmunerkrankungen wie Vitiligo (Eby et al., 2015) und EAE (Dogan et al., 2011) sowie der Prävention von Pankreasinsel-Transplantatabstoßung (Montane et al., 2015) spielt die CCL22-abhängige Rekrutierung von CCR4⁺ Treg eine wichtige Rolle in der Verhinderung bzw. der Abschwächung der Krankheitsverläufe.

Darüber hinaus ist auch der Einfluss der CCL22-CCR4-Achse auf das Wachstum maligner Tumoren und die Patientenprognose beschrieben. Einige Studien in unterschiedlichen Tumorentitäten konnten zeigen, dass Tumorzellen oder tumorinfiltrierende myeloide Zellen CCL22 sezernieren, was zur Rekrutierung und Akkumulation von Treg im Tumormikromilieu führt, die antitumorale Immunantwort supprimiert, die Tumorprogression begünstigt sowie die Patientenprognose verschlechtert (Curiel et al., 2004; Gobert et al., 2009; Li et al., 2013; Cao et al., 2014; Anz et al., 2015; Klarquist et al., 2016; Wiedemann et al., 2016; Maolake et al., 2017; Röhrle et al., 2020). Das Wissen um die hohe intratumorale CCL22-Expression wurde ebenfalls für die Entwicklung neuartiger immuntherapeutischer Konzepte genutzt. Die Überexpression von CCR4 in zytotoxischen T-Lymphozyten und adoptiver Transfer dieser T-Zellen in tumortragende Mäuse führte demnach zu einer verbesserten T-Zell-Migration in das Tumorgewebe und folglich zu einer gesteigerten antitumoralen Immunantwort, was die potentielle therapeutische Nutzbarkeit von CCR4 und CCL22 im Tumormikromilieu verdeutlicht (Rapp et al., 2016).

Zusammengefasst spielt die CCL22-CCR4-Achse in einer Vielzahl von Erkrankungen unterschiedlicher Genese eine wichtige Rolle und stellt dementsprechend ein vielversprechendes Ziel weiterer grundlagenimmunologischer sowie immuntherapeutischer Forschungsprojekte dar. **Abbildung 1** soll einen Überblick über die Regulationsmechanismen der CCL22-Sekretion während immunologischer Homöostase, Inflammation und Tumor-vermittelter Immunsuppression geben.

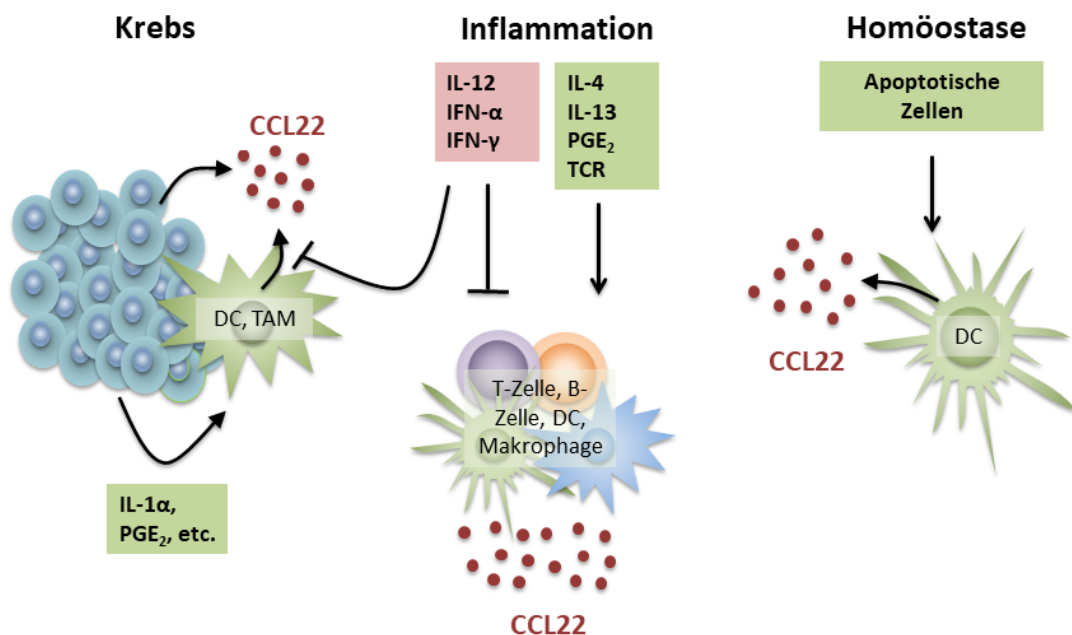


Abbildung 1. Regulation des Chemokins CCL22 während immunologischer Homöostase, Inflammation und Tumor-vermittelter Immunsuppression. In malignen Tumoren (links) wird CCL22 entweder durch die Tumorzellen selbst oder durch infiltrierende myeloide Zellen wie DC oder Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM) sezerniert. Diese werden durch Tumorzell-sezernierte Moleküle wie IL-1 α oder PGE₂ zur CCL22-Sekretion stimuliert. Unter inflammatorischen Bedingungen (Mitte) sind besonders die Th2-assoziierten Zytokine IL-4 und IL-13 sowie PGE₂ und TCR-Aktivierung potente CCL22-Induktoren in CCL22-produzierenden Zellen wie DC, Makrophagen, T- und B-Zellen. IL-12, IFN- α sowie IFN- γ wurden als potente CCL22-Suppressoren beschrieben. Ferner konnte gezeigt werden, dass eine Immunstimulation mittels TLR-Liganden und die konsekutive Expression von IFN- α die intratumorale CCL22-Sekretion durch myeloide Zellen inhibiert und damit die Treg-Rekrutierung hemmt. Die Regulationsmechanismen der konstitutiven CCL22-Sekretion (rechts) durch DC sind bislang kaum beschrieben. Lediglich apoptotische Zellfragmente konnten bislang als CCL22-Induktoren während immunologischer Homöostase identifiziert werden.

1.6 Tumorimmunologie und Tumorimmuntherapie

Während die Tumorthherapie im letzten Jahrhundert hauptsächlich die drei Säulen operative Therapie, Chemotherapie und Radiotherapie umfasste, haben mittlerweile zielgerichtete Therapien und die Immuntherapie Eintritt in den klinischen Alltag erhalten und die Krebstherapie revolutioniert. Aus diesem Grunde neigt man dazu, die Konzepte der Tumorimmunologie und Tumorimmuntherapie als erst kürzlich entdeckten medizinischen Fortschritt anzusehen. Jedoch gehen Berichte zu den Einflüssen des Immunsystems auf die Ausbildung und die Progression maligner Tumoren bis weit in die Vergangenheit zurück. Bereits in den Jahrhunderten zwischen antikem Ägypten und dem 18. Jahrhundert häuften sich Berichte, dass sich tumoröse Läsionen in Folge eines infektiösen oder febrilen Ereignisses verkleinerten oder ganz verschwanden (Oiseth et al., 2017). Die gezielte Nutzung des Immunsystems zur Bekämpfung von Krebszellen wurde in der zweiten Hälfte des 18. Jahrhunderts erstmalig praktiziert. Die beiden deutschen Ärzte Wilhelm Busch 1868 und Friedrich Fehleisen 1882 waren die Ersten, die absichtlich Tumorpatienten mit einem Erysipel infizierten und darunter eine Tumorverkleinerung beobachteten (Busch, 1868; Fehleisen, 1882). 1891 begann der amerikanische Chirurg William Coley mit der Injektion von abgetöteten Erysipel-Erregern („Coley's Toxin“) in Patienten mit inoperablen Tumoren und beobachtete eine Tumorregression in einer signifikanten Anzahl dieser Patienten (Coley, 1893; Coley, 1910). Aufgrund seiner Erfolge wird er noch heute von vielen als der „Vater der Tumorimmuntherapie“ bezeichnet (Oiseth et al., 2017).

Zur etwa selben Zeit veröffentlichte Paul Ehrlich die Idee, dass das Immunsystem dazu in der Lage ist, maligne transformierte Zellen zu erkennen und zu eliminieren (Ehrlich, 1908). Diese Theorie wurde Jahrzehnte später durch Burnet und Thomas in ihrer *cancer immunosurveillance*-Hypothese aufgegriffen und weiterentwickelt (Burnet, 1957; Thomas et al., 1959; Burnet, 1970). Jedoch wurde das Konzept der Dynamik zwischen Immunsystem und malignen Tumoren aufgrund widersprüchlicher humaner Studien sowie fehlgedeuteter Experimente mit athymischen Mäusen jahrzehntelang verlassen (Rygaard et al., 1974; Stutman, 1974; Manjili, 2011). Erst Mitte der 1990er Jahre häufte sich durch verbesserte immundefiziente Mausmodelle und das mittlerweile exponentiell gestiegene immunologische Grundlagenwissen Evidenz, dass das Immunsystem tatsächlich in vielfältiger Form mit Tumorzellen interagiert (Engel et al., 1996; Engel et al., 1997; Kaplan et al., 1998; Smyth et al., 2000; Shankaran et al., 2001).

Dies stellte die Grundlage für das *cancer immunoediting*-Konzept dar, in dem Robert Schreiber und Kollegen die ambivalente Wirkung des Immunsystems auf die Entstehung und das Wachstum maligner Tumoren beschrieben (Dunn et al., 2002). Dieses Konzept besagte, dass das Immunsystem einerseits dazu in der Lage ist, transformierte Zellen zu zerstören und den Wirt damit vor der Krebsentstehung zu schützen. Andererseits werden durch die ständige Tumor-Immun-Interaktion niedrig immunogene und damit überlebensfähige Tumorzellen selektiert, immunsuppressive Programme aktiviert und ein immunsuppressives Mikromilieu generiert (Schreiber, 2011). Somit kann das Immunsystem neben der Tumorbekämpfung auch die Tumorpromotion fördern, was durch die drei Phasen des *cancer immunoediting* verdeutlicht wird: In der *elimination*-Phase werden Tumorzellen durch die Effektoren des Immunsystems abgetötet. Kann dies nicht vollständig geschehen, da sich bestimmte „immunresistente“ Tumorzellen selektiert haben, folgt die *equilibrium*-Phase, in der das Immunsystem die Tumorzellen zwar nicht vollständig zerstören, aber deren Auswuchs verhindern kann. Durch den konstanten immunologischen Selektionsdruck können Tumorzellen im Laufe der Zeit weitere Mutationen anhäufen, die sie vollständig vor den Effektorfunktionen des Immunsystems entfliehen und praktisch ungehindert wachsen lassen. Dieser Abschnitt wird *escape*-Phase genannt (Schreiber, 2011). Mechanistisch sind hierbei die intratumorale Rekrutierung immunsuppressiver Immunzellpopulationen (Togashi, 2019), die Expression immunsupprimierender Liganden wie PD-L1 (Cha et al., 2019) und die Reduktion der MHC-Expression (Leone et al., 2013) von großer Relevanz für die Etablierung der immunsuppressiven Umgebung.

Die gezielte Stimulation des Immunsystems wie beispielsweise die Therapie mit Bacille Calmette-Guérin (BCG) bei superfizielltem Blasenkarzinom (Morales et al., 1976) sowie die Verabreichung von IL-2 oder IFN- α beim metastasierten Nierenzellkarzinom (Negrier et al., 1998) und metastasierten Melanom (Grob et al., 1998; Atkins et al., 1999) wurde in der klinischen Anwendung im Verlauf immer interessanter und fand schließlich Anfang der 2010er Jahre mit der Zulassung der Immun-Checkpoint-Inhibitoren ihren revolutionären Durchbruch (Hodi, 2010; Robert et al., 2011). Dementsprechend wurden deren Entdecker James Allison und Tasuku Honjo im Jahr 2018 mit dem Nobelpreis für Physiologie oder Medizin ausgezeichnet. Mittlerweile sind Inhibitoren unterschiedlicher Checkpoint-Moleküle auf dem Markt und zeigen in der Behandlung einer Reihe fortgeschrittener Tumorerkrankungen wie unter anderem dem malignen Melanom (Larkin et al., 2019), dem nicht-kleinzelligen (Reck et al., 2016) und dem kleinzelligen Bronchialkarzinom (Horn et al., 2018), dem Nierenzellkarzinom (Motzer et al., 2015), dem Hepatozellulären Karzinom (HCC) (Finn et al., 2020) sowie mikrosatelliteninstabilen Tumoren unterschiedlicher Entität (Le et al., 2015) herausragende Wirkung. Neben der Checkpoint-Inhibition konnte besonders der adoptive Transfer synthetisch hergestellter CAR-T-Zellen in therapierefraktären hämatologischen Neoplasien großartige immuntherapeutische Effekte erzielen (Neelapu et al., 2017; Park et al., 2018).

Der ständige Wissenszuwachs bezüglich der vielfältigen Interaktionen von Immunsystem und Tumorzellen und die dadurch angestoßene konsequente Neuentwicklung immuntherapeutischer Methoden und Modifikation bestehender Konzepte veranschaulichen die Wichtigkeit der Translation grundlagenwissenschaftlicher Prinzipien in die klinische Anwendung und lassen die Tumorimmunologie und Tumorimmuntherapie als aktuell eines der prosperierendsten Felder der Krebstherapie erscheinen (Waldman et al., 2020).

2 Fragestellung

Treg-attrahierende Chemokine spielen als immunregulative Botenstoffe während Homöostase, Inflammation sowie intratumoraler Immunsuppression eine entscheidende Rolle und sind dementsprechend elementar einerseits für die Erhaltung der physiologischen Immunbalance und andererseits für die Entstehung und Progression von inflammatorischen und malignen Erkrankungen.

Das Chemokin CCL22 repräsentiert ein zentrales Regulationselement der T-Zell-Immunität sowohl in immunologischer Homöostase, als auch in Inflammation sowie Tumor-vermittelter Immunsuppression. Die Mechanismen der CCL22-Induktion im Kontext entzündlicher oder maligner Prozesse wurden bereits ausführlich in der Literatur beschrieben, wohingegen die Regulation der konstitutiven CCL22-Expression bislang weitgehend unbekannt blieb. In der ersten Publikation, die der vorliegenden Dissertation zu Grunde liegt, sollten die regulativen Prinzipien der homöostatischen CCL22-Expression tiefgründiger beleuchtet werden. Hierbei waren wir besonders an folgenden Fragestellungen interessiert:

- (1) Welche Immunzellpopulation ist für die konstitutive CCL22-Sekretion sowohl murin als auch human verantwortlich?
- (2) Durch welchen Zelltyp wird die konstitutive CCL22-Sekretion vermittelt?
- (3) Welche Faktoren sind in dieser Kaskade entscheidend?

Die Expression Treg-attrahierender Chemokine im Mikromilieu maligner Tumoren stellt einen potenten Mechanismus der Tumor-vermittelten Immunsuppression dar. Während die klinische Auswirkung der intratumoralen Expression der Chemokine CCL1 und CCL22 in einigen Tumorentitäten bereits gezeigt werden konnte, blieb deren Beitrag zum immunsuppressiven Milieu im humanen Mammakarzinom bislang weitgehend unbekannt. Unser Interesse galt deshalb in der zweiten zu Grunde liegenden Publikation dieser Dissertation folgenden Fragestellungen:

- (1) Sind die Chemokine CCL1 und CCL22 im Tumorgewebe im Vergleich zu gesundem Brustgewebe überexprimiert?
- (2) Ist die intratumorale Chemokinexpression mit der Treg-Infiltration sowie weiteren histopathologischen Merkmalen assoziiert?

(3) Wird die Patientenprognose durch die intratumorale Chemokinexpression beeinflusst?

3 Ergebnisse

Während die Mechanismen der CCL22-Induktion bei entzündlichen oder malignen Prozessen bereits ausführlich in der Literatur beschrieben wurden, sollte in der Originalarbeit „Constitutive CCL22 expression is mediated by T cell-derived GM-CSF“ die Regulation der konstitutiven CCL22-Expression eingehend analysiert werden.

Die Publikation beschreibt den Einfluss des von T-Zellen sezernierten Zytokins GM-CSF auf die Expression des immunregulativen Chemokins CCL22 im Kontext immunologischer Homöostase. Die Arbeit demonstriert eindrücklich, dass DC zwar die exklusiven CCL22-Produzenten sind, hierfür jedoch *in vitro* sowohl im murinen als auch im humanen System die Anwesenheit von T-Zellen bzw. eines von T-Zellen sezernierten Faktors benötigen (Figure 1, Figure 2 und Supplementary Figure 1). Durch Verwendung neutralisierender Antikörper konnten wir GM-CSF als entscheidenden Faktor für die DC-abhängige CCL22-Sekretion identifizieren und diesen durch Versuche mit GM-CSF-defizienten T-Zellen validieren (Figure 3 und Supplementary Figure 2). Andere, ebenfalls klinisch eingesetzte koloniestimulierende Faktoren konnten als potente CCL22-Induktoren ausgeschlossen werden (Figure 4 und Supplementary Figure 3). *Rag1^{-/-}*-Mäuse, die keine funktionellen T-Zellen ausbilden können, zeigten auch *in vivo* verringerte CCL22-Level in lymphatischen Organen. Die intravenöse Injektion von T-Zellen sowie die subkutane Injektion von GM-CSF konnten die CCL22-Expression in diesen Organen wieder anheben (Figure 5 und Supplementary Figure 4).

Zusammengefasst konnte in der beschriebenen Originalarbeit ein bislang unbekannter Regulationsmechanismus des Chemokins CCL22 aufgedeckt und damit ein neuer immunregulatorischen Aspekt des Zytokins GM-CSF präsentiert werden, der in der Entwicklung neuartiger (immun-)therapeutischer Strategien für autoimmune und maligne Erkrankungen eine große Rolle spielen kann.

In der Publikation „CCL1 is a major regulatory T cell attracting factor in human breast cancer“ gingen wir der Frage nach, inwieweit die Treg-attrahierenden Chemokine CCL1 und CCL22 das immunsuppressive Mikromilieu im humanen Mammakarzinom beeinflussen. Hierfür wurden aus Tumormaterial von 199 Patientinnen *tissue microarrays* (TMA) angefertigt und FOXP3, CCL1 und CCL22 immunhistochemisch

angefärbt. Die gefärbten Schnitte wurden schließlich von zwei unabhängigen Betrachtern ausgewertet.

CCL1 und FOXP3, aber nicht CCL22, waren im Tumormaterial im Vergleich zu gesundem Brustgewebe signifikant überexprimiert (Figure 1). Darüber hinaus korrelierte die Expression von CCL1 und FOXP3 als Parameter für die CCL1-abhängige Treg-Infiltration signifikant miteinander (Table 1). Eine hohe CCL1-Expression zeigte sich besonders in *high-grade* Tumoren, die eine schlechtere Überlebensprognose aufweisen, sowie in Tumoren mit negativem Östrogenrezeptor-(ER-) Status. Im Gegensatz dazu konnte eine hohe CCL22-Expression eher in *low-grade* Tumoren nachgewiesen werden (Table 2 und Table 3). Das mediane Überleben zeigte trendweise eine prognostisch negative Assoziation zur intratumoralen CCL1-Expression. Bei Patientinnen mit hoher intratumoraler CCL1-Expression war das mediane Überleben mit 37 Monaten geringer als bei Patientinnen mit niedriger CCL1-Expression, die ein medianes Überleben von 50 Monaten aufwiesen (Figure 2). Dieser Trend war jedoch statistisch nicht signifikant.

Zusammenfassend konnte in dieser Publikation CCL1 als essenzielles Treg-attrahierendes Chemokin in humanem Brustkrebs evaluiert und als neues potentielles Target für Immuntherapien im Mammakarzinom identifiziert werden.

4 Zusammenfassung

4.1 Deutschsprachige Zusammenfassung

Regulatorische T-Zellen (Treg) sind für die Aufrechterhaltung immunologischer Homöostase und die Prävention überschießender und selbstgerichteter Immunantworten unentbehrlich. Andererseits wird eine effiziente antitumorale Immunantwort durch Treg-vermittelte Suppressionsmechanismen inhibiert. Die Chemokine CCL1 und CCL22 spielen für die Migration und Distribution von Treg eine entscheidende Rolle und tragen daher direkt zur Immunsuppression bei. Es ist demnach essenziell, die Regulation dieser Chemokine zu verstehen und deren Beitrag zur Treg-vermittelten Immunsuppression in Homöostase und Malignität nachzuvollziehen.

In der ersten Publikation dieser kumulativen Arbeit wurden dementsprechend die Mechanismen der konstitutiven CCL22-Expression, welche über die Vermittlung von Zellkontakten zwischen Treg und dendritischen Zellen (DC) im Lymphknoten einen entscheidenden Regulator der T-Zell-Immunität repräsentiert, untersucht. Unsere Experimente konnten von T-Zellen sezerniertes GM-CSF als potentes CCL22-induzierendes Zytokin in DC während immunologischer Homöostase sowohl im murinen als auch im humanen System identifizieren. In der zweiten Originalarbeit konnten wir zeigen, dass die intratumorale CCL1-Expression im humanen Mammakarzinom eine essenzielle Komponente der Rekrutierung von Treg darstellt, besonders mit *high-grade* Tumoren assoziiert ist und trendweise das mediane Patientenüberleben verringert (**Abbildung 2**).

Zusammenfassend werden in der vorliegenden kumulativen Arbeit grundlagenimmunologische und klinisch-translationale Konzepte gebündelt und die Regulation des Chemokins CCL22 während immunologischer Homöostase sowie der Einfluss des Chemokins CCL1 auf die Treg-Infiltration und die Prognose im humanen Mammakarzinom beleuchtet. Die hier gewonnenen Erkenntnisse leisten einen Beitrag zum besseren Verständnis pathophysiologischer Vorgänge sowie zur Konzeption neuartiger Therapiestrategien gegen Autoimmunität und Krebs.

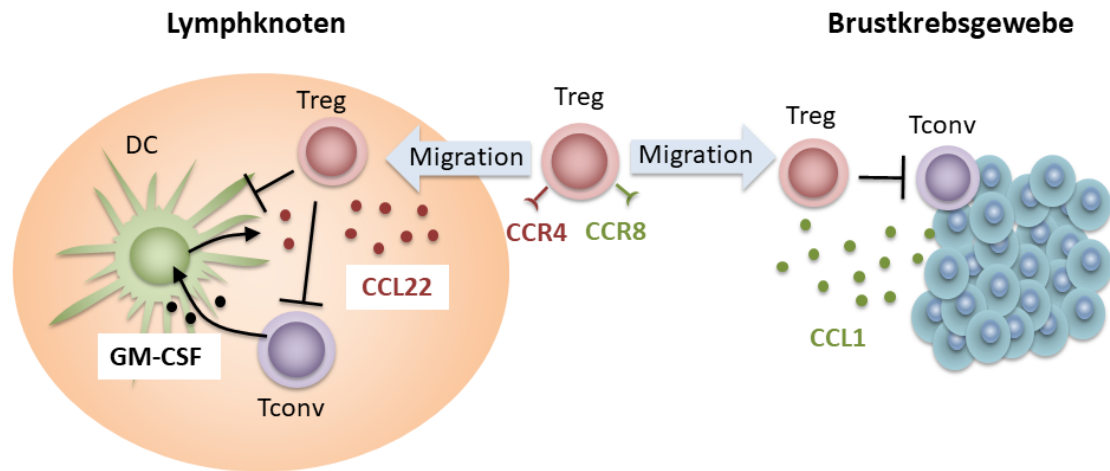


Abbildung 2. Expression und Funktion der immunregulatorischen Chemokine CCL1 und CCL22 im Kontext immunologischer Homöostase und Tumor-vermittelter Immunsuppression. Während immunologischer Homöostase (links) werden im Lymphknoten dendritische Zellen (DC) durch T-Zell-sezerniertes GM-CSF zur Produktion von CCL22 angeregt, wodurch CCR4⁺ regulatorische T-Zellen (Treg) rekrutiert und die Immunreaktion durch Inhibition von Effektorzellen wie konventionellen T-Zellen (Tconv) oder DC supprimiert bzw. feinmoduliert wird. Im Brustkrebsgewebe (rechts) werden CCR8⁺ Treg durch die intratumoral hohe CCL1-Expression rekrutiert und aktiviert und tragen somit zum immunsuppressiven Tumormikromilieu bei.

4.2 Englischsprachige Zusammenfassung

Regulatory T cells (Treg) are indispensable for the maintenance of immunological homeostasis and the prevention of overwhelming and self-directed immune responses. On the other hand, efficient anti-tumor immunity is inhibited by Treg-mediated suppressive mechanisms. The Treg-attracting chemokines CCL1 and CCL22 play an essential role for Treg migration and distribution and thus directly contribute to Treg-dependent immune suppression. Therefore, it is crucial to understand the homeostatic regulation of these chemokines and to trace their contribution to Treg-mediated immune suppression in homeostasis and malignancy.

The first publication of this cumulative thesis revealed the mechanisms leading to constitutive CCL22 expression, which represents a crucial regulator of T cell immunity by mediating the formation of Treg-DC contacts in the lymph node. Our experiments identified T cell-derived GM-CSF to be a potent CCL22-inducing cytokine in DC during immunological homeostasis in the murine as well as the human system. In the second publication, we could demonstrate that intratumoral CCL1 expression in human breast cancer represents an essential component of Treg recruitment and that high CCL1 expression is associated with high-grade tumors and trendwise reduces the median patient survival (**Figure 2**).

Taken together, this thesis combines basic immunological and clinical-translational concepts and reveals the regulation of the chemokine CCL22 during immunological homeostasis as well as the impact of the chemokine CCL1 on Treg infiltration and prognosis in human breast cancer. Thus, the findings are expected to contribute to a better understanding of pathophysiological processes as well as the conception of novel therapies for autoimmunity and cancer.

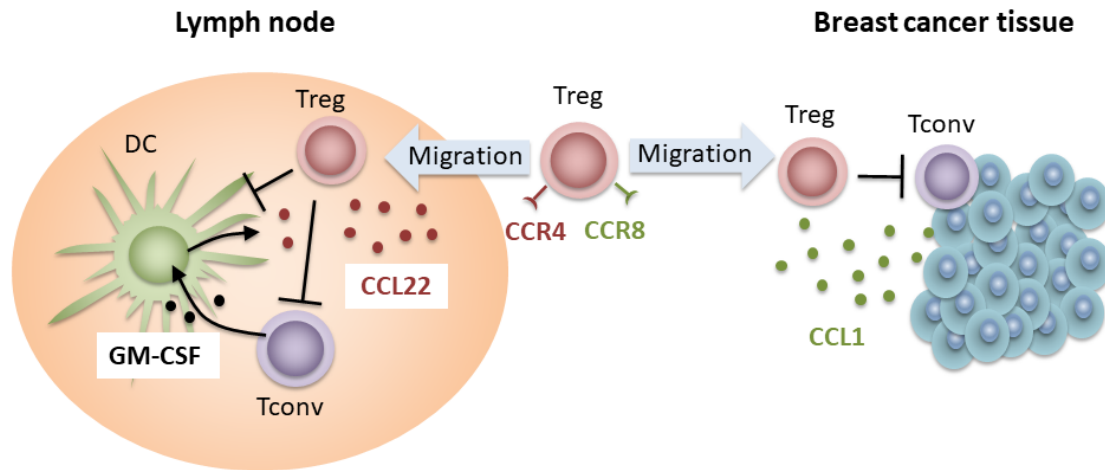


Figure 2. Expression and function of the immunoregulatory chemokines CCL1 and CCL22 in the context of immunological homeostasis and tumor-mediated immune suppression. During immunological homeostasis (left) in the lymph node, dendritic cells (DC) are stimulated to produce CCL22 by T cell-derived GM-CSF, leading to recruitment of CCR4⁺ regulatory T cells (Treg) and suppression or fine-tuning of the immune response by inhibition of effector cells such as conventional T cells (Tconv) or DC. In breast cancer tissue (right), high intratumoral CCL1 expression leads to CCR8⁺ Treg recruitment and activation and thereby contributes to the immunosuppressive microenvironment.

5 Veröffentlichungen

5.1 Constitutive expression of CCL22 is mediated by T cell-derived GM-CSF

5.1.1 Eigener Beitrag zum Originalartikel

Die von mir durchgeführten Experimente konnten zeigen, dass unstimulierte murine Wildtyp (WT-)Splenozyten *in vitro* spontan CCL22 sezernieren (Figure 1A, links) und Splenozyten aus T-Zell-depletierten *Rag1*^{-/-}-Mäusen eine stark verringerte CCL22-Sekretion aufweisen (Figure 1E). Ferner konnte ich in meinen Experimenten verdeutlichen, dass die Zugabe von WT T-Zellen (Figure 1F) bzw. deren Überständen (Figure 2B und Supplementary Figure 1) zu *Rag1*^{-/-}-Splenozyten zu einem signifikanten Anstieg der CCL22-Sekretion führt. Darüber hinaus konnte ich durch die Verwendung neutralisierender Antikörper herausarbeiten, dass GM-CSF einen entscheidenden Faktor für die konstitutive CCL22-Expression repräsentiert und von unstimulierten murinen T-Zellen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene exprimiert wird (Figure 3B links, Figure 3C links, Figure 3D und Supplementary Figure 2A). Murine DC sowie humane DC und Monozyten konnte ich als weitere GM-CSF-Quellen ausschließen (Supplementary Figure 2B und C). Die Relevanz von T-Zell-sezerniertem GM-CSF für die konstitutive CCL22-Expression konnten die von mir durchgeführten Versuche mit GM-CSF-defizienten Splenozyten (Figure 3E) sowie GM-CSF-defizienten T-Zellen bzw. deren Überständen bestätigen (Figure 3F). Die Relevanz von T-Zellen für die konstitutive CCL22-Sekretion in lymphatischen Organen konnte ich außerdem *in vivo* unterstreichen. Meine Experimente konnten zeigen, dass *Rag1*^{-/-}-Mäuse niedrigere CCL22-Level in einigen lymphatischen Organen aufweisen (Figure 5A) und dass der adoptive Transfer von WT-T-Zellen in *Rag1*^{-/-}-Mäuse die CCL22-Level in diesen Organen relevant erhöhen kann (Figure 5B und Supplementary Figure 4B).

Zusammengefasst konnten die von mir erhobenen Daten einen bislang unbekanntem Regulationsmechanismus des Chemokins CCL22 während immunologischer Homöostase aufdecken und eine neue immunregulatorische Rolle des Zytokins GM-CSF identifizieren. Mein Beitrag zu dieser Publikation wurde mit einer Erstautorenschaft honoriert.

5.1.2 Originalartikel

Die Publikation „Constitutive expression of CCL22 is mediated by T cell-derived GM-CSF“ kann unter dem Link

<https://www.jimmunol.org/content/early/2020/09/08/jimmunol.2000004> aufgerufen

werden und wird wie folgt zitiert:

Piseddu I, Röhrle N, Knott MML, Moder S, Eiber S, Schnell K, Vetter V, Meyer B, Layritz P, Kühnemuth B, Wiedemann GM, Gruen J, Perleberg C, Rapp M, Endres S, Anz D.

Constitutive expression of CCL22 is mediated by T cell-derived GM-CSF.

J Immunol 2020 Oct 15;205(8):2056-2065.; DOI:10.4049/jimmunol.2000004

5.2 CCL1 is a major regulatory T cell attracting factor in human breast cancer

5.2.1 Eigener Beitrag zum Originalartikel

Für die Auswertung der TMA wurden die Objektträger zunächst durch mich mit Hilfe eines hochauflösenden MIRAX MIDI (Zeiss, Deutschland) Scanner digital aufgenommen. CCL1-positive, CCL22-positive sowie FOXP3-positive Zellen aller Schnitte wurden dann durch mich und einen weiteren Betrachter unabhängig voneinander ausgezählt und auf positive Zellen pro mm² normiert. Diese Auszählung ist die Grundlage jeder Abbildung und Tabelle des Artikels (Figure 1 und 2, Table 1 bis 3). Figure 1 A-C zeigt repräsentative Ausschnitte aller drei Färbungen. In Figure 1 D konnten unsere Auszählungen zeigen, dass die Expression von CCL1 und FOXP3 im Tumorgewebe im Vergleich zu gesundem Kontrollgewebe signifikant erhöht war. Auf Grundlage der Auszählungen konnten wir ebenfalls zeigen, dass die Expression von CCL1 und FOXP3 signifikant miteinander korrelierte (Table 1). Weiterhin war ich bei den Entscheidungen mitbeteiligt, welche histopathologischen Parameter bzgl. deren Assoziation zur intratumoralen Chemokin- bzw. FOXP3-Expression analysiert werden sollen. Wir entschieden uns letztlich dafür, den Östrogen-, Progesteron und HER2-Rezeptorstatus sowie das Grading zu analysieren, da diese für Therapie und Prognose beim Mammakarzinom entscheidend sein können (Table 2 und 3). Auf Grundlage unserer Daten konnten wir auch zeigen, dass das mediane Überleben von Patientinnen mit CCL1-hochexprimierenden Tumoren niedriger ist das jenes von Patientinnen mit CCL1-niedrigexprimierenden Tumoren, auch wenn dieser Effekt nicht statistisch signifikant war (Figure 2).

Zusammenfassend konnten die von mir erhobenen und in Zusammenarbeit mit dem Institut für Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie der Universität München analysierten Daten zeigen, dass das Chemokin CCL1 in humanem Mammakarzinomgewebe im Vergleich zu gesundem Brustgewebe überexprimiert wird und mit der Akkumulation von Treg und einem hohen Grading assoziiert ist, welche als negativ prognostische Faktoren in der Literatur beschrieben sind. Mein Beitrag zu dieser Publikation wurde mit einer Zweitautorenschaft anerkannt.

5.2.2 Originalartikel

Die Publikation „CCL1 is a major regulatory T cell attracting factor in human breast cancer“ kann unter dem Link

<https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-018-5117-8> aufgerufen

werden und wird wie folgt zitiert:

Kühnemuth B, **Piseddu I**, Wiedemann GM, Lauseker M, Kuhn C, Hofmann S, Schmoeckel E, Endres S, Mayr D, Jeschke U, Anz D.

CCL1 is a major regulatory T cell attracting factor in human breast cancer.

BMC Cancer 2018 Dec 20;18(1):1278. DOI: 10.1186/s12885-018-5117-8

Literaturverzeichnis

- Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2009; 361:2066-78.
- Acuto O, Michel F. CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:939-51.
- Agrawal A, Eastman QM, Schatz DG. Transposition mediated by RAG1 and RAG2 and its implications for the evolution of the immune system. *Nature* 1998; 394:744-51.
- Akdis M, Burgler S, Cramer R, Eiwegger T, Fujita H, Gomez E, Klunker S, Meyer N, O'Mahony L, Palomares O, Rhyner C, Ouaked N, Schaffartzik A, Van De Veen W, Zeller S, Zimmermann M, Akdis CA. Interleukins, from 1 to 37, and interferon-gamma: receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127:701-21.e1-70.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; 124:783-801.
- Allison AC. Immunosuppressive drugs: the first 50 years and a glance forward. *Immunopharmacology* 2000; 47:63-83.
- Aloisi F, De Simone R, Columba-Cabezas S, Penna G, Adorini L. Functional maturation of adult mouse resting microglia into an APC is promoted by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interaction with Th1 cells. *J Immunol* 2000;164:1705-12.
- Annunziato F, Romagnani P, Cosmi L, Beltrame C, Steiner BH, Lazzeri E, Raport CJ, Galli G, Manetti R, Mavilia C, Vanini V, Chantry D, Maggi E, Romagnani S. Macrophage-derived chemokine and EBI1-ligand chemokine attract human thymocytes in different stage of development and are produced by distinct subsets of medullary epithelial cells: possible implications for negative selection. *J Immunol* 2000; 165:238-46.
- 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. Suppression of intratumoral CCL22 by type I interferon inhibits migration of regulatory T cells and blocks cancer progression. *Cancer Res* 2015; 75:4483-93.
- Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL, Powrie F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med* 1999; 190:995-1004.

- Atkins MB, Lotze MT, Dutcher JP, Fisher RI, Weiss G, Margolin K, Abrams J, Sznol M, Parkinson D, Hawkins M. High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. *J Clin Oncol* 1999; 17:2105-.
- Bachelier F, Ben-Baruch A, Burkhardt AM, Combadiere C, Farber JM, Graham GJ, Horuk R, Sparre-Ulrich AH, Locati M, Luster AD, Mantovani A, Matsushima K, Murphy PM, Nibbs R, Nomiyama H, Power CA, Proudfoot AEI, Rosenkilde MM, Rot A, Sozzani S, Thelen M, Yoshie O, Zlotnik A. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. [corrected]. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors. *Pharmacol Rev* 2013; 66:1-79.
- Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392:245-52.
- Barsheshet Y, Wildbaum G, Levy E, Vitenshtein A, Akinseye C, Griggs J, Lira SA, Karin N. CCR8(+)/FOXP3(+) Treg cells as master drivers of immune regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017; 114:6086-91.
- Beutler BA. TLRs and innate immunity. *Blood* 2009; 113:1399-407.
- Bhattacharya P, Thiruppathi M, Elshabrawy HA, Alharshawi K, Kumar P, Prabhakar BS. GM-CSF: An immune modulatory cytokine that can suppress autoimmunity. *Cytokine* 2015; 75:261-71.
- Bischoff L, Alvarez S, Dai DL, Soukhatcheva G, Orban PC, Verchere CB. Cellular mechanisms of CCL22-mediated attenuation of autoimmune diabetes. *J Immunol* 2015; 194:3054-64.
- Bjorkman PJ. MHC Restriction in Three Dimensions: A view of T cell receptor/ligand interactions. *Cell* 1997; 89:167-70.
- Bonilla FA, Oettgen HC. Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125:S33-40.
- Burd PR, Freeman GJ, Wilson SD, Berman M, DeKruyff R, Billings PR, Dorf ME. Cloning and characterization of a novel T cell activation gene. *J Immunol* 1987; 139:3126-31.
- Burgess AW, Metcalf D. The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors. *Blood* 1980; 56:947-58.
- Burmester GR, McInnes IB, Kremer J, Miranda P, Korkosz M, Vencovsky J, Rubbert-Roth A, Mysler E, Sleeman MA, Godwood A, Sinibaldi D, Guo X, White WI, Wang B, Wu CY, Ryan PC, Close D, Weinblatt ME, investigators EE. A randomised phase IIb study of mavrilimumab, a novel GM-CSF receptor alpha monoclonal antibody, in the treatment of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2017; 76:1020-30.

- Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 1970; 13:1-27.
- Burnet M. Cancer: a biological approach. III. Viruses associated with neoplastic conditions. IV. Practical applications. *Br Med J* 1957; 1:841-7.
- Busch W. Aus der Sitzung der medicinischen Section vom 13 November 1867. *Berl Klin Wochenschr* 1868; 5:137.
- Campbell IK, Rich MJ, Bischof RJ, Dunn AR, Grail D, Hamilton JA. Protection from collagen-induced arthritis in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-deficient mice. *J Immunol* 1998; 161:3639-44.
- Cao L, Hu X, Zhang J, Huang G, Zhang Y. The role of the CCL22-CCR4 axis in the metastasis of gastric cancer cells into omental milky spots. *J Transl Med* 2014; 12:267.
- Cao X, Cai SF, Fehniger TA, Song J, Collins LI, Piwnica-Worms DR, Ley TJ. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity* 2007; 27:635-46.
- Cha J-H, Chan L-C, Li C-W, Hsu JL, Hung M-C. Mechanisms Controlling PD-L1 Expression in Cancer. *Mol Cell* 2019; 76:359-70.
- Chaplin DD. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125:S3-23.
- Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol* 2013; 13:227-42.
- Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM. 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* 2003; 198:1875-86.
- Chinen J, Shearer WT. Secondary immunodeficiencies, including HIV infection. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125:S195-203.
- Codarri L, Gyulveszi G, Tosevski V, Hesske L, Fontana A, Magnenat L, Suter T, Becher B. RORgammat drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nat Immunol* 2011; 12:560-7.
- Coley WB. The treatment of inoperable sarcoma by bacterial toxins (the mixed toxins of the streptococcus erysipelas and the bacillus prodigiosus). *Proc R Soc Med* 1910; 3:1-48.
- Coley WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: With a report of ten original cases. 1. *Am J Med Sci (1827-1924)* 1893; 105:487.

- Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, Cross R, Sehy D, Blumberg RS, Vignali DA. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 2007; 450:566-9.
- Coombes JL, Robinson NJ, Maloy KJ, Uhlig HH, Powrie F. Regulatory T cells and intestinal homeostasis. *Immunol Rev* 2005; 204:184-94.
- 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. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 2004; 10:942-9.
- Cyster JG, Allen CDC. B cell responses: cell interaction dynamics and decisions. *Cell* 2019; 177:524-40.
- Das S, Sarrou E, Podgrabinska S, Cassella M, Mungamuri SK, Feirt N, Gordon R, Nagi CS, Wang Y, Entenberg D, Condeelis J, Skobe M. Tumor cell entry into the lymph node is controlled by CCL1 chemokine expressed by lymph node lymphatic sinuses. *J Exp Med* 2013; 210:1509-28.
- Devi S, Laning J, Luo Y, Dorf ME. Biologic activities of the beta-chemokine TCA3 on neutrophils and macrophages. *J Immunol* 1995; 154:5376-83.
- Dieckgraefe BK, Korzenik JR. Treatment of active Crohn's disease with recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Lancet* 2002; 360:1478-80.
- Dinarello CA. Historical insights into cytokines. *Eur J Immunol* 2007; 37 Suppl 1:S34-45.
- Dogan RN, Long N, Forde E, Dennis K, Kohm AP, Miller SD, Karpus WJ. CCL22 regulates experimental autoimmune encephalomyelitis by controlling inflammatory macrophage accumulation and effector function. *J Leukoc Biol* 2011; 89:93-104.
- Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002; 3:991-8.
- DuPage M, Bluestone JA. Harnessing the plasticity of CD4+ T cells to treat immune-mediated disease. *Nat Rev Immunol* 2016; 16:149.
- Durrbach A, Francois H, Beaudreuil S, Jacquet A, Charpentier B. Advances in immunosuppression for renal transplantation. *Nat Rev Nephrol* 2010; 6:160-7.
- Eby JM, Kang HK, Tully ST, Bindeman WE, Peiffer DS, Chatterjee S, Mehrotra S, Le Poole IC. CCL22 to activate Treg migration and suppress depigmentation in vitiligo. *J Invest Dermatol* 2015; 135:1574-80.
- Ehrlich P. Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung 1908.

- El-Behi M, Ciric B, Dai H, Yan Y, Cullimore M, Safavi F, Zhang GX, Dittel BN, Rostami A. The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nat Immunol* 2011; 12:568-75.
- Engel AM, Svane IM, Mouritsen S, Rygaard J, Clausen J, Werdelin O. Methylcholanthrene-induced sarcomas in nude mice have short induction times and relatively low levels of surface MHC class I expression. *APMIS* 1996; 104:629-39.
- Engel AM, Svane IM, Rygaard J, Werdelin O. MCA sarcomas induced in scid mice are more immunogenic than MCA sarcomas induced in congenic, immunocompetent mice. *Scand J Immunol* 1997; 45:463-70.
- Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, Orabona C, Vacca C, Bianchi R, Belladonna ML, Fioretti MC, Alegre ML, Puccetti P. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4:1206-12.
- Fehleisen F. Ueber die Züchtung der Erysipelkokken auf künstlichem Nährboden und ihre Übertragbarkeit auf den Menschen. *Dtsch Med Wochenschr* 1882; 8:553-4.
- Finn RS, Qin S, Ikeda M, Galle PR, Ducreux M, Kim T-Y, Kudo M, Breder V, Merle P, Kaseb AO, Li D, Verret W, Xu D-Z, Hernandez S, Liu J, Huang C, Mulla S, Wang Y, Lim HY, Zhu AX, Cheng A-L. Atezolizumab plus Bevacizumab in unresectable hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2020; 382:1894-905.
- Fischer A. Human Primary Immunodeficiency Diseases. *Immunity* 2007;27:835-45.
- Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4:330-6.
- Gaudreau S, Guindi C, Menard M, Besin G, Dupuis G, Amrani A. 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* 2007; 179:3638-47.
- 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, Menetrier-Caux C. Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer Res* 2009; 69:2000-9.
- Godiska R, Chantry D, Raport CJ, Sozzani S, Allavena P, Leviten D, Mantovani A, Gray PW. Human macrophage-derived chemokine (MDC), a novel chemoattractant for monocytes, monocyte-derived dendritic cells, and natural killer cells. *J Exp Med* 1997; 185:1595-604.

- Gombert M, Dieu-Nosjean M-C, Winterberg F, Bünemann E, Kubitza RC, Da Cunha L, Haahtela A, Lehtimäki S, Müller A, Rieker J, Meller S, Pivarcsi A, Koreck A, Fridman W-H, Zentgraf H-W, Pavenstädt H, Amara A, Caux C, Kemeny L, Alenius H, Lauerma A, Ruzicka T, Zlotnik A, Homey B. CCL1-CCR8 interactions: an axis mediating the recruitment of T cells and Langerhans-type dendritic cells to sites of atopic skin inflammation. *J Immunol* 2005; 174:5082-91.
- Gonzalez H, Hagerling C, Werb Z. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. *Genes Dev* 2018; 32:1267-84.
- Gonzalo JA, Pan Y, Lloyd CM, Jia GQ, Yu G, Dussault B, Powers CA, Proudfoot AE, Coyle AJ, Gearing D, Gutierrez-Ramos JC. Mouse monocyte-derived chemokine is involved in airway hyperreactivity and lung inflammation. *J Immunol* 1999; 163:403-11.
- Greter M, Helft J, Chow A, Hashimoto D, Mortha A, Agudo-Cantero J, Bogunovic M, Gautier EL, Miller J, Leboeuf M, Lu G, Aloman C, Brown BD, Pollard JW, Xiong H, Randolph GJ, Chipuk JE, Frenette PS, Merad M. GM-CSF controls nonlymphoid tissue dendritic cell homeostasis but is dispensable for the differentiation of inflammatory dendritic cells. *Immunity* 2012; 36:1031-46.
- Griesemer AD, Sorenson EC, Hardy MA. The role of the thymus in tolerance. *Transplantation* 2010; 90:465-74.
- Griffin JD, Cannistra SA, Sullivan R, Demetri GD, Ernst TJ, Kanakura Y. The biology of GM-CSF: regulation of production and interaction with its receptor. *Int J Cell Cloning* 1990; 8 Suppl 1:35-44; discussion -5.
- Griffith JW, Sokol CL, Luster AD. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annu Rev Immunol* 2014; 32:659-702.
- Griseri T, Arnold IC, Pearson C, Krausgruber T, Schiering C, Franchini F, Schulthess J, McKenzie BS, Crocker PR, Powrie F. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor-activated eosinophils promote interleukin-23 driven chronic colitis. *Immunity* 2015; 43:187-99.
- Grob JJ, Dreno B, de la Salmoniere P, Delaunay M, Cupissol D, Guillot B, Souteyrand P, Sassolas B, Cesarini J-P, Lionnet S, Lok C, Chastang C, Bonerandi JJ. Randomised trial of interferon alpha-2a as adjuvant therapy in resected primary melanoma thicker than 1.5 mm without clinically detectable node metastases. *Lancet* 1998; 351:1905-10.
- Guilliams M, De Kleer I, Henri S, Post S, Vanhoutte L, De Prijck S, Deswarte K, Malissen B, Hammad H, Lambrecht BN. Alveolar macrophages develop from

- fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *J Exp Med* 2013; 210:1977-92.
- Guthridge MA, Stomski FC, Thomas D, Woodcock JM, Bagley CJ, Berndt MC, Lopez AF. Mechanism of activation of the GM-CSF, IL-3, and IL-5 family of receptors. *Stem Cells* 1998; 16:301-13.
- Hahn WC, Weinberg RA. Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med* 2002; 347:1593-603.
- Hamilton JA. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:533-44.
- Hamilton JA, Anderson GP. GM-CSF Biology. *Growth Factors* 2004; 22:225-31.
- Hao S, Han X, Wang D, Yang Y, Li Q, Li X, Qiu C-H. Critical role of CCL22/CCR4 axis in the maintenance of immune homeostasis during apoptotic cell clearance by splenic CD8 α (+) CD103(+) dendritic cells. *Immunology* 2016; 148:174-86.
- Herndler-Brandstetter D, Flavell RA. Producing GM-CSF: a unique T helper subset? *Cell Res* 2014; 24:1379-80.
- Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, Akerley W, van den Eertwegh AJ, Lutzky J, Lorigan P, Vaubel JM, Linette GP, Hogg D, Ottensmeier CH, Lebba C, Peschel C, Quirt I, Clark JI, Wolchok JD, Weber JS, Tian J, Yellin MJ, Nichol GM, Hoos A, Urba WJ. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010; 363:711-23.
- Hoelzinger DB, Smith SE, Mirza N, Dominguez AL, Manrique SZ, Lustgarten J. Blockade of CCL1 inhibits T regulatory cell suppressive function enhancing tumor immunity without affecting T effector responses. *J Immunol* 2010; 184:6833-42.
- Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; 299:1057-61.
- Horn L, Mansfield AS, Szczęśna A, Havel L, Krzakowski M, Hochmair MJ, Huemer F, Losonczy G, Johnson ML, Nishio M, Reck M, Mok T, Lam S, Shames DS, Liu J, Ding B, Lopez-Chavez A, Kabbinar F, Lin W, Sandler A, Liu SV. First-line Atezolizumab plus chemotherapy in extensive-stage small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2018; 379:2220-9.
- Huppa JB, Davis MM. T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:973-83.
- Iellem A, Colantonio L, Bhakta S, Sozzani S, Mantovani A, Sinigaglia F, D'Ambrosio D. 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* 2000; 30:1030-9.
- Iellem A, Mariani M, Lang R, Recalde H, Panina-Bordignon P, Sinigaglia F, D'Ambrosio D. Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med* 2001; 194:847-53.
- Imai T, Chantry D, Raport CJ, Wood CL, Nishimura M, Godiska R, Yoshie O, Gray PW. Macrophage-derived Chemokine Is a Functional Ligand for the CC Chemokine Receptor 4. *J Biol Chem* 1998; 273:1764-8.
- Imai T, Nagira M, Takagi S, Kakizaki M, Nishimura M, Wang J, Gray PW, Matsushima K, Yoshie O. 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* 1999; 11:81-8.
- Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, Muramatsu S, Steinman RM. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 1992; 176:1693-702.
- Inngjerdigen M, Damaj B, Maghazachi AA. Human NK Cells Express CC Chemokine Receptors 4 and 8 and Respond to Thymus and Activation-Regulated Chemokine, Macrophage-Derived Chemokine, and I-309. *J Immunol* 2000; 164:4048-54.
- Jain A, Pasare C. Innate control of adaptive immunity: beyond the three-signal paradigm. *J Immunol* 2017; 198:3791-800.
- Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20:197-216.
- Jenkins MK, Taylor PS, Norton SD, Urdahl KB. CD28 delivers a costimulatory signal involved in antigen-specific IL-2 production by human T cells. *J Immunol* 1991; 147:2461-6.
- Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, Petrone AL, Hohenbeck AE, Lerman MA, Naji A, Caton AJ. Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol* 2001; 2:301-6.
- June CH, Ledbetter JA, Gillespie MM, Lindsten T, Thompson CB. T-cell proliferation involving the CD28 pathway is associated with cyclosporine-resistant interleukin 2 gene expression. *Mol Cell Biol* 1987; 7:4472-81.
- Kalliolias GD, Ivashkiv LB. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat Rev Rheumatol* 2015; 12:49.

- Kanazawa N, Nakamura T, Tashiro K, Muramatsu M, Morita K, Yoneda K, Inaba K, Imamura S, Honjo T. Fractalkine and macrophage-derived chemokine: T cell-attracting chemokines expressed in T cell area dendritic cells. *Eur J Immunol* 1999; 29:1925-32.
- Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ, Schreiber RD. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:7556-61.
- Kitamura T, Sato N, Arai K, Miyajima A. Expression cloning of the human IL-3 receptor cDNA reveals a shared beta subunit for the human IL-3 and GM-CSF receptors. *Cell* 1991; 66:1165-74.
- Klarquist J, Tobin K, Farhangi Oskuei P, Henning SW, Fernandez MF, Dellacecca ER, Navarro FC, Eby JM, Chatterjee S, Mehrotra S, Clark JI, Le Poole IC. Ccl22 diverts T regulatory cells and controls the growth of melanoma. *Cancer Res* 2016; 76:6230-40.
- Korzenik JR, Dieckgraefe BK, Valentine JF, Hausman DF, Gilbert MJ, Sargramostim in Crohn's Disease Study G. Sargramostim for active Crohn's disease. *N Engl J Med* 2005; 352:2193-201.
- Kumar BV, Connors TJ, Farber DL. Human T cell development, localization, and function throughout life. *Immunity* 2018; 48:202-13.
- Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob J-J, Rutkowski P, Lao CD, Cowey CL, Schadendorf D, Wagstaff J, Dummer R, Ferrucci PF, Smylie M, Hogg D, Hill A, Márquez-Rodas I, Haanen J, Guidoboni M, Maio M, Schöffski P, Carlino MS, Lebbé C, McArthur G, Ascierto PA, Daniels GA, Long GV, Bastholt L, Rizzo JI, Balogh A, Moshyk A, Hodi FS, Wolchok JD. Five-year survival with combined nivolumab and ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med* 2019; 381:1535-46.
- Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, Schadendorf D, Dummer R, Smylie M, Rutkowski P, Ferrucci PF, Hill A, Wagstaff J, Carlino MS, Haanen JB, Maio M, Marquez-Rodas I, McArthur GA, Ascierto PA, Long GV, Callahan MK, Postow MA, Grossmann K, Sznol M, Dreno B, Bastholt L, Yang A, Rollin LM, Horak C, Hodi FS, Wolchok JD. Combined nivolumab and ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma. *N Engl J Med* 2015; 373:23-34.
- Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, Skora AD, Luber BS, Azad NS, Laheru D, Biedrzycki B, Donehower RC, Zaheer A, Fisher GA, Crocenzi TS, Lee JJ, Duffy SM, Goldberg RM, de la Chapelle A, Koshiji M, Bhaijee F, Hiebner T, Hruban RH, Wood LD, Cuka N, Pardoll DM,

- Papadopoulos N, Kinzler KW, Zhou S, Cornish TC, Taube JM, Anders RA, Eshleman JR, Vogelstein B, Diaz LA. PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *N Engl J Med* 2015; 372:2509-20.
- Leone P, Shin EC, Perosa F, Vacca A, Dammacco F, Racanelli V. MHC class I antigen processing and presenting machinery: organization, function, and defects in tumor cells. *J Natl Cancer Inst* 2013; 105:1172-87.
- Li YQ, Liu FF, Zhang XM, Guo XJ, Ren MJ, Fu L. Tumor secretion of CCL22 activates intratumoral Treg infiltration and is independent prognostic predictor of breast cancer. *PloS One* 2013; 8:e76379.
- Lloyd CM, Delaney T, Nguyen T, Tian J, Martinez AC, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC. CC chemokine receptor (CCR)3/eotaxin is followed by CCR4/monocyte-derived chemokine in mediating pulmonary T helper lymphocyte type 2 recruitment after serial antigen challenge in vivo. *J Exp Med* 2000; 191:265-74.
- Luo Y, Laning J, Devi S, Mak J, Schall TJ, Dorf ME. Biologic activities of the murine beta-chemokine TCA3. *J Immunol* 1994; 153:4616-24.
- Lutz MB, Suri RM, Niimi M, Ogilvie AL, Kukutsch NA, Rossner S, Schuler G, Austyn JM. Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival in vivo. *Eur J Immunol* 2000; 30:1813-22.
- Malissen B, Grégoire C, Malissen M, Roncagalli R. Integrative biology of T cell activation. *Nat Immunol* 2014; 15:790.
- Manjili MH. Revisiting cancer immunoediting by understanding cancer immune complexity. *J Pathol* 2011; 224:5-9.
- Mantovani A, Bonecchi R, Locati M. Tuning inflammation and immunity by chemokine sequestration: decoys and more. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:907-18.
- Mantovani A, Gray PA, Van Damme J, Sozzani S. Macrophage-derived chemokine (MDC). *J Leukoc Biol* 2000; 68:400-4.
- Maolake A, Izumi K, Shigehara K, Natsagdorj A, Iwamoto H, Kadomoto S, Takezawa Y, Machioka K, Narimoto K, Namiki M, Lin WJ, Wufuer G, Mizokami A. Tumor-associated macrophages promote prostate cancer migration through activation of the CCL22-CCR4 axis. *Oncotarget* 2017; 8:9739-51.
- Marshall JS, Warrington R, Watson W, Kim HL. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2018; 14:49-.
- Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol* 2009; 27:451-83.
- McIlroy A, Caron G, Blanchard S, Frémaux I, Duluc D, Delneste Y, Chevailler A, Jeannin P. Histamine and prostaglandin E up-regulate the production of Th2-

- attracting chemokines (CCL17 and CCL22) and down-regulate IFN-gamma-induced CXCL10 production by immature human dendritic cells. *Immunology* 2006; 117:507-16.
- McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2011; 365:2205-19.
- McQualter JL, Darwiche R, Ewing C, Onuki M, Kay TW, Hamilton JA, Reid HH, Bernard CC. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor: a new putative therapeutic target in multiple sclerosis. *J Exp Med* 2001; 194:873-82.
- Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 1997; 91:295-8.
- Mildner A, Jung S. Development and function of dendritic cell subsets. *Immunity* 2014; 40:642-56.
- Miller JF. Immunological function of the thymus. *Lancet* 1961; 2:748-9.
- Miller MD, Krangel MS. The human cytokine I-309 is a monocyte chemoattractant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89:2950-4.
- Montane J, Bischoff L, Soukhatcheva G, Dai DL, Hardenberg G, Levings MK, Orban PC, Kieffer TJ, Tan R, Verchere CB. Prevention of murine autoimmune diabetes by CCL22-mediated Treg recruitment to the pancreatic islets. *J Clin Invest* 2011; 121:3024-8.
- Montane J, Obach M, Alvarez S, Bischoff L, Dai DL, Soukhatcheva G, Priatel JJ, Hardenberg G, Levings MK, Tan R, Orban PC, Verchere CB. CCL22 prevents rejection of mouse islet allografts and induces donor-specific tolerance. *Cell Transplant* 2015; 24:2143-54.
- Morales A, Eidinger D, Bruce A. Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. *The Journal of urology* 1976;116:180-2.
- Moser B, Wolf M, Walz A, Loetscher P. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol* 2004; 25:75-84.
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; 136:2348-57.
- Motzer RJ, Escudier B, McDermott DF, George S, Hammers HJ, Srinivas S, Tykodi SS, Sosman JA, Procopio G, Plimack ER, Castellano D, Choueiri TK, Gurney H, Donskov F, Bono P, Wagstaff J, Gaurer TC, Ueda T, Tomita Y, Schutz FA, Kollmannsberger C, Larkin J, Ravaud A, Simon JS, Xu L-A, Waxman IM, Sharma P. Nivolumab versus everolimus in advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2015; 373:1803-13.
- Murphy K, Weaver C. Janeway's immunobiology: Garland Science; 2016.

- Murphy KM, Reiner SL. The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:933-44.
- Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med* 2001; 194:629-44.
- Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, Lekakis LJ, Miklos DB, Jacobson CA, Braunschweig I, Oluwole OO, Siddiqi T, Lin Y, Timmerman JM, Stiff PJ, Friedberg JW, Flinn IW, Goy A, Hill BT, Smith MR, Deol A, Farooq U, McSweeney P, Munoz J, Avivi I, Castro JE, Westin JR, Chavez JC, Ghobadi A, Komanduri KV, Levy R, Jacobsen ED, Witzig TE, Reagan P, Bot A, Rossi J, Navale L, Jiang Y, Aycock J, Elias M, Chang D, Wiezorek J, Go WY. Axicabtagene ciloleucel CAR T-cell therapy in refractory large B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2017; 377:2531-44.
- Negrier S, Escudier B, Lasset C, Douillard J-Y, Savary J, Chevreau C, Ravaud A, Mercatello A, Peny J, Mousseau M, Philip T, Tursz T. Recombinant human interleukin-2, recombinant human interferon alfa-2a, or both in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 1998; 338:1272-8.
- Nemunaitis J, Serman D, Jablons D, Smith JW, 2nd, Fox B, Maples P, Hamilton S, Borellini F, Lin A, Morali S, Hege K. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene-modified autologous tumor vaccines in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96:326-31.
- Neurath MF. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2014;14:329-42.
- Nussenzweig MC, Steinman RM, Gutchinov B, Cohn ZA. Dendritic cells are accessory cells for the development of anti-trinitrophenyl cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 1980; 152:1070-84.
- O'Dell JR. Therapeutic Strategies for Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med* 2004; 350:2591-602.
- O'Garra A, Vieira P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat Med* 2004; 10:801-5.
- O'Shea JJ, Ma A, Lipsky P. Cytokines and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:37-45.
- Oettinger MA, Schatz DG, Gorka C, Baltimore D. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* 1990; 248:1517-23.
- Oiseth SJ, Aziz MS. Cancer immunotherapy: a brief review of the history, possibilities, and challenges ahead. *J Cancer Metastasis Treat* 2017; 3:250-61.

- Pandiyani P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol* 2007; 8:1353-62.
- Park JH, Rivière I, Gonen M, Wang X, Sénéchal B, Curran KJ, Sauter C, Wang Y, Santomasso B, Mead E, Roshal M, Maslak P, Davila M, Brentjens RJ, Sadelain M. Long-term follow-up of CD19 CAR therapy in acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2018; 378:449-59.
- Plitas G, Konopacki C, Wu K, Bos PD, Morrow M, Putintseva EV, Chudakov DM, Rudensky AY. Regulatory T cells exhibit distinct features in human breast cancer. *Immunity* 2016; 45:1122-34.
- Ponomarev ED, Shriver LP, Maresz K, Pedras-Vasconcelos J, Verthelyi D, Dittel BN. GM-CSF production by autoreactive T cells is required for the activation of microglial cells and the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2007; 178:39-48.
- Punt JA, Roberts JL, Kearse KP, Singer A. Stoichiometry of the T cell antigen receptor (TCR) complex: each TCR/CD3 complex contains one TCR alpha, one TCR beta, and two CD3 epsilon chains. *J Exp Med* 1994; 180:587-93.
- Rapp M, Grassmann S, Chaloupka M, Layritz P, Kruger S, Ormanns S, Rataj F, Janssen KP, Endres S, Anz D, Kobold S. C-C chemokine receptor type-4 transduction of T cells enhances interaction with dendritic cells, tumor infiltration and therapeutic efficacy of adoptive T cell transfer. *Oncoimmunology* 2016; 5:e1105428.
- Rapp M, Wintergerst MWM, Kunz WG, Vetter VK, Knott MML, Lisowski D, Haubner S, Moder S, Thaler R, Eiber S, Meyer B, Rohle N, Piseddu I, Grassmann S, Layritz P, Kuhnemuth 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. *J Exp Med* 2019; 216:1170-81.
- Read S, Malmstrom V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* 2000; 192:295-302.
- Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csőszi T, Fülöp A, Gottfried M, Peled N, Tafreshi A, Cuffe S, O'Brien M, Rao S, Hotta K, Leiby MA, Lubiniecki GM, Shentu Y, Rangwala R, Brahmer JR. Pembrolizumab versus chemotherapy for PD-L1–positive non–small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2016; 375:1823-33.
- Riera Romo M, Pérez-Martínez D, Castillo Ferrer C. Innate immunity in vertebrates: an overview. *Immunology* 2016; 148:125-39.

- Robert C, Thomas L, Bondarenko I, O'Day S, Weber J, Garbe C, Lebbe C, Baurain J-F, Testori A, Grob J-J, Davidson N, Richards J, Maio M, Hauschild A, Miller WH, Gascon P, Lotem M, Harmankaya K, Ibrahim R, Francis S, Chen T-T, Humphrey R, Hoos A, Wolchok JD. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2011; 364:2517-26.
- Röhrle N, Knott MML, Anz D. CCL22 Signaling in the tumor environment. *Adv Exp Med Biol* 2020; 1231:79-96.
- Roos RS, Loetscher M, Legler DF, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B. Identification of CCR8, the receptor for the human CC chemokine I-309. *J Biol Chem* 1997; 272:17251-4.
- Rygaard J, Povlsen CO. The mouse mutant nude does not develop spontaneous tumours. An argument against immunological surveillance. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1974; 82:99-106.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155:1151-64.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, Yamazaki S, Sakihama T, Itoh M, Kuniyasu Y, Nomura T, Toda M, Takahashi T. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev* 2001; 182:18-32.
- Sandborg C, Mellins ED. A New Era in the Treatment of Systemic Juvenile Idiopathic Arthritis. *N Engl J Med* 2012; 367:2439-40.
- Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 2011; 331:1565-70.
- Schroeder HW, Jr., Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125:S41-S52.
- Schulz O, Hammerschmidt SI, Moschovakis GL, Forster R. Chemokines and chemokine receptors in lymphoid tissue dynamics. *Annu Rev Immunol* 2016; 34:203-42.
- Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 2001; 410:1107-11.
- Sheng JR, Li L, Ganesh BB, Vasu C, Prabhakar BS, Meriglioli MN. Suppression of experimental autoimmune myasthenia gravis by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is associated with an expansion of FoxP3+ regulatory T cells. *J Immunol* 2006; 177:5296-306.

- Sherr CJ. Principles of Tumor Suppression. *Cell* 2004; 116:235-46.
- Shevach EM, DiPaolo RA, Andersson J, Zhao DM, Stephens GL, Thornton AM. The lifestyle of naturally occurring CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells. *Immunol Rev* 2006; 212:60-73.
- Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T cell activation. *Annu Rev Immunol* 2009; 27:591-619.
- Smyth MJ, Thia KY, Street SE, MacGregor D, Godfrey DI, Trapani JA. Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *J Exp Med* 2000; 192:755-60.
- Soler D, Humphreys TL, Spinola SM, Campbell JJ. CCR4 versus CCR10 in human cutaneous T_H lymphocyte trafficking. *Blood* 2003; 101:1677-82.
- Stanley E, Lieschke GJ, Grail D, Metcalf D, Hodgson G, Gall JA, Maher DW, Cebon J, Sinickas V, Dunn AR. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-deficient mice show no major perturbation of hematopoiesis but develop a characteristic pulmonary pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:5592-6.
- Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA. Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* 2003; 21:139-76.
- Steinman RM, Kaplan G, Witmer MD, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. V. Purification of spleen dendritic cells, new surface markers, and maintenance in vitro. *J Exp Med* 1979; 149:1-16.
- Steinman RM, Witmer MD. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978; 75:5132-6.
- Stock AT, Hansen JA, Sleeman MA, McKenzie BS, Wicks IP. GM-CSF primes cardiac inflammation in a mouse model of Kawasaki disease. *J Exp Med* 2016; 213:1983-98.
- Stutman O. Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. *Science* 1974; 183:534-6.
- Tadokoro CE, Shakhar G, Shen S, Ding Y, Lino AC, Maraver A, Lafaille JJ, Dustin ML. Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4⁺ T cells and dendritic cells in vivo. *J Exp Med* 2006; 203:505-11.
- Takahama Y. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:127-35.
- Tang D, Kang R, Coyne CB, Zeh HJ, Lotze MT. PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunol Rev* 2012; 249:158-75.
- Tang HL, Cyster JG. Chemokine up-regulation and activated T cell attraction by maturing dendritic cells. *Science* 1999; 284:819-22.

- Tavernier J, Devos R, Cornelis S, Tuypens T, Van der Heyden J, Fiers W, Plaetinck G. A human high affinity interleukin-5 receptor (IL5R) is composed of an IL5-specific α chain and a β chain shared with the receptor for GM-CSF. *Cell* 1991; 66:1175-84.
- Theofilopoulos AN, Kono DH, Baccala R. The multiple pathways to autoimmunity. *Nat Immunol* 2017; 18:716-24.
- Thomas L, Lawrence H. Cellular and humoral aspects of the hypersensitive states. *New York: Hoeber-Harper* 1959:529-32.
- Thompson CB, Lindsten T, Ledbetter JA, Kunkel SL, Young HA, Emerson SG, Leiden JM, June CH. CD28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell-derived lymphokines/cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86:1333-7.
- Togashi Y, Shitara K, Nishikawa H. Regulatory T cells in cancer immunosuppression - implications for anticancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2019; 16:356-71.
- Travis J. On the origin of the immune system. *Science* 2009;324:580-2.
- Valentine JF, Fedorak RN, Feagan B, Fredlund P, Schmitt R, Ni P, Humphries TJ. Steroid-sparing properties of sargramostim in patients with corticosteroid-dependent Crohn's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 study. *Gut* 2009; 58:1354-62.
- Varol C, Vallon-Eberhard A, Elinav E, Aychek T, Shapira Y, Luche H, Fehling HJ, Hardt WD, Shakhar G, Jung S. Intestinal lamina propria dendritic cell subsets have different origin and functions. *Immunity* 2009; 31:502-12.
- Vasu C, Dogan RN, Holterman MJ, Prabhakar BS. 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* 2003; 170:5511-22.
- Vestergaard C, Yoneyama H, Murai M, Nakamura K, Tamaki K, Terashima Y, Imai T, Yoshie O, Irimura T, Mizutani H, Matsushima K. Overproduction of Th2-specific chemokines in NC/Nga mice exhibiting atopic dermatitis-like lesions. *J Clin Invest* 1999; 104:1097-105.
- Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:523-32.
- Vinay DS, Ryan EP, Pawelec G, Talib WH, Stagg J, Elkord E, Lichtor T, Decker WK, Whelan RL, Kumara HMCS, Signori E, Honoki K, Georgakilas AG, Amin A, Helferich WG, Boosani CS, Guha G, Ciriolo MR, Chen S, Mohammed SI, Azmi AS, Keith WN, Bilsland A, Bhakta D, Halicka D, Fujii H, Aquilano K, Ashraf SS, Nowsheen S, Yang X, Choi BK, Kwon BS. Immune evasion in cancer:

- Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Semin Cancer Biol* 2015; 35:S185-S98.
- Vlahos R, Bozinovski S, Hamilton JA, Anderson GP. Therapeutic potential of treating chronic obstructive pulmonary disease (COPD) by neutralising granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF). *Pharmacol Ther* 2006; 112:106-15.
- Vulcano M, Albanesi C, Stoppacciaro A, Bagnati R, D'Amico G, Struyf S, Transidico P, Bonecchi R, Del Prete A, Allavena P, Ruco LP, Chiabrando C, Girolomoni G, Mantovani A, Sozzani S. Dendritic cells as a major source of macrophage-derived chemokine/CCL22 in vitro and in vivo. *Eur J Immunol* 2001; 31:812-22.
- Waldman AD, Fritz JM, Lenardo MJ. A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nat Rev Immunol* 2020.
- Wiedemann GM, Knott MM, Vetter VK, Rapp M, Haubner S, Fessler J, Kuhnemuth B, Layritz P, Thaler R, Kruger S, Ormanns S, Mayr D, Endres S, Anz D. Cancer cell-derived IL-1alpha induces CCL22 and the recruitment of regulatory T cells. *Oncoimmunology* 2016; 5:e1175794.
- Willart MA, Deswarte K, Pouliot P, Braun H, Beyaert R, Lambrecht BN, Hammad H. Interleukin-1alpha controls allergic sensitization to inhaled house dust mite via the epithelial release of GM-CSF and IL-33. *J Exp Med* 2012;209:1505-17.
- Wu M, Fang H, Hwang ST. Cutting edge: CCR4 mediates antigen-primed T cell binding to activated dendritic cells. *J Immunol* 2001; 167:4791-5.
- Xu Y, Dong X, Qi P, Ye Y, Shen W, Leng L, Wang L, Li X, Luo X, Chen Y, Sun P, Xiang R, Li N. Sox2 communicates with Tregs through CCL1 to promote the stemness property of breast cancer cells. *Stem Cells* 2017; 35:2351-65.
- Xu Y, Hunt NH, Bao S. The role of granulocyte macrophage-colony-stimulating factor in acute intestinal inflammation. *Cell Res* 2008; 18:1220-9.
- Yamashita U, Kuroda E. Regulation of macrophage-derived chemokine (MDC, CCL22) production. *Crit Rev Immunol* 2002; 22:105-14.
- Yan N, Chen ZJ. Intrinsic antiviral immunity. *Nat Immunol* 2012; 13:214-22.
- Yanai M, Sato K, Aoki N, Takiyama Y, Oikawa K, Kobayashi H, Kimura S, Harabuchi Y, Tateno M. The role of CCL22/macrophage-derived chemokine in allergic rhinitis. *Clin Immunol* 2007; 125:291-8.
- Yoshie O, Matsushima K. CCR4 and its ligands: from bench to bedside. *Int Immunol* 2015; 27:11-20.
- Zhang N, Bevan MJ. CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity* 2011; 35:161-8.
- Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 2008; 112:1557-69.

- Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu Rev Immunol* 2010; 28:445-89.
- Zingoni A, Soto H, Hedrick JA, Stoppacciaro A, Storlazzi CT, Sinigaglia F, D'Ambrosio D, O'Garra A, Robinson D, Rocchi M, Santoni A, Zlotnik A, Napolitano M. The chemokine receptor CCR8 is preferentially expressed in Th2 but not Th1 cells. *J Immunol* 1998; 161:547-51.
- Zinkernagel RM, Doherty PC. Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. *Nature* 1974; 251:547-8.
- Zlotnik A, Yoshie O. The chemokine superfamily revisited. *Immunity* 2012; 36:705-16.
- Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000; 12:121-7.
- Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:295-307.

Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigen-präsentierende Zelle
BCG	<i>Bacille Calmette-Guérin</i>
BCL6	<i>B cell lymphoma 6</i>
CAR	<i>Chimeric antigen receptor</i>
CCL	<i>CC-chemokine ligand</i>
CCR	<i>CC-chemokine receptor</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CLA	<i>Cutaneous lymphocyte-associated antigen</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4</i>
DAMP	<i>Danger-associated molecular pattern</i>
DC	Dendritische Zelle
DSS	<i>Dextran sodium sulfate</i>
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
ER	<i>Estrogen receptor</i>
FOXP3	<i>Forkhead box protein P3</i>
GATA3	<i>GATA binding protein 3</i>
G-CSF	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HER2	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN	Interferon
IL	Interleukin
iTreg	Induzierte regulatorische T-Zelle
JAK	<i>Janus kinase</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
MDC	<i>Macrophage-derived chemokine</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
mRNA	<i>Messenger-RNA</i>
MS	Multiple Sklerose
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
nTreg	Natürliche regulatorische T-Zelle

Abkürzungsverzeichnis

PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PD-1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
PD-L1	<i>Programmed cell-death ligand 1</i>
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PRR	<i>Pattern recognition receptors</i>
RAG	<i>Recombination-activating gene</i>
ROR γ t	<i>Retinoic-acid-receptor-related orphan receptor γt</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TAM	Tumor-assoziiertes Makrophage
T-bet	<i>T-box expressed in T cells</i>
TCA3	<i>T cell activating gene 3</i>
Tconv	Konventionelle T-Zelle
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF- β	<i>Transforming growth factor β</i>
Th	T-Helferzelle
TLR	Toll-like-Rezeptor
TMA	<i>Tissue microarray</i>
WT	Wildtyp

Publikationsliste

Originalarbeiten (chronologisch)

1. Kühnemuth B, **Piseddu I**, Wiedemann GM, Lauseker M, Kuhn C, Hofmann S, Schmoeckel E, Endres S, Mayr D, Jeschke U, Anz D. CCL1 is a major regulatory T cell attracting factor in human breast cancer. *BMC Cancer* 2018; 18:1278.
2. Rapp M, Wintergerst MWM, Kunz WG, Vetter VK, Knott MML, 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. *J Exp Med* 2019; 216(5):1170-1181.
3. **Piseddu I**, Röhrle N, Knott MML, Moder S, Eiber S, Schnell K, Vetter V, Meyer B, Layritz P, Kühnemuth B, Wiedemann GM, Gruen J, Perleberg C, Rapp M, Endres S, Anz D. Constitutive expression of CCL22 is mediated by T cell-derived GM-CSF. *J Immunol* 2020; 205(8):2056-2065..

Kongressbeiträge (chronologisch)

1. **Piseddu I**, Kühnemuth B, Knott MML, Vetter V, Layritz P, Endres S, Anz D. CD4⁺ T cells induce homeostatic expression of the Treg-attracting chemokine CCL22 in dendritic cells. Immunology 2017, Washington D.C., USA
2. Kühnemuth B, **Piseddu I**, Knott MML, Vetter V, Layritz P, Endres S, Anz D. CCL22 impedes T cell activation capacities of dendritic cells by reducing membrane expression of MHC molecules and CD80. Immunology 2017, Washington D.C., USA
3. Roehrle N, **Piseddu I**, Knott MML, Layritz P, Endres S, Perleberg C, Anz D. GM-CSF is a potent inducer of the Treg-attracting chemokine CCL22. World Immune Regulation Meeting (WIRM), Annual Meeting 2019, Davos, Schweiz

Danksagung

Meine tiefste Dankbarkeit gilt meinem Doktorvater und Mentor Prof. David Anz, der mir während meiner gesamten Promotionszeit gleichermaßen exzellente konzeptionelle Betreuung sowie wissenschaftliche Freiheit gewährleistet und mich darüber hinaus auch in meiner klinischen Ausbildung umfassend gefördert hat. Mit seiner klinischen und wissenschaftlichen Kompetenz, seiner Begeisterung für Patientenversorgung, Forschung und Lehre und seiner stets freundschaftlichen Art war und ist er für mich Inspiration und Vorbild zugleich.

Einen großen Dank möchte ich an dieser Stelle auch an Prof. Stefan Endres für die Möglichkeit aussprechen, im von ihm geleiteten Institut zu promovieren. Durch seine professionelle Art der Abteilungsführung sowie die ständige Unterstützung in allen Belangen schuf er eine Atmosphäre, in der ein kollegialer wissenschaftlicher Diskurs erwünscht war und gelebt wurde. Dies imponierte mir während meiner gesamten Laborzeit.

Darüber hinaus danke ich allen in der Abteilung für Klinische Pharmakologie für die konzeptionelle, technische und soziale Unterstützung während der gesamten Laborzeit. Besonders hervorheben möchte ich hier Dr. Benjamin Kühnemuth für seine herausragende Betreuung, Patrick Layritz für sein praktisches und soziales Engagement, Dr. Maximilian Knott für seine exzellente Einarbeitung sowie Dr. Carolin Perleberg für ihren außergewöhnlichen Einsatz für die gesamte Arbeitsgruppe.

Ein besonderer Dank gilt auch meiner Familie für die finanzielle und private Unterstützung während meines gesamten Studiums, ohne die die Durchführung dieser Promotion nicht möglich gewesen wäre. Darüber hinaus danke ich meiner Partnerin und meinen Freunden für deren Verständnis und bedingungslosen Rückhalt in dieser arbeitsintensiven Zeit.