

Aus der Eigenständigen Forschungseinheit Translationale Molekulare Immunologie

Helmholtz-Zentrum München

Leitung: Prof. Dr. Ralph Mocikat

*Immunevasion in einem endogenen B-Zell-Lymphommodell:
Die Rolle regulatorischer T-Zellen und Möglichkeiten der
therapeutischen Modulation*

Dissertation

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

vorgelegt von

Vera Maria Bauer

aus

Mönchengladbach

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Ralph Mocikat Prof. Dr. med. Andreas Humpe
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. Tobias Feuchtinger PD Dr. rer. nat. Reinhard Obst
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. Bernhard Frankenberger
Dekan:	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung:	29.03.2022

Eidesstattliche Versicherung

Vera Maria Bauer

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Immunevasion in einem endogenen B-Zell-Lymphommodell: Die Rolle regulatorischer T-Zellen und Möglichkeiten der therapeutischen Modulation

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

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

München, den 29.03.2022

Ort, Datum

Vera Maria Bauer

Unterschrift Doktorandin

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis	VII
1. Zusammenfassung.....	1
2. Einleitung.....	3
2.1 Grundlagen der Immunologie	3
2.1.1 Das angeborene Immunsystem.....	3
2.1.2 Das adaptive Immunsystem	3
2.1.3 Immunregulatorische Mechanismen und Selbsttoleranz	5
2.1.3.1 Regulatorische T-Zellen	5
2.1.3.2 Koinhibitorische Rezeptoren	7
2.2 Tumorimmunologie.....	8
2.2.1 Tumorentstehung und Immunevasion.....	8
2.2.2 Immunkontrollpunkt-Inhibition	9
2.3 Vom Burkitt-Lymphom zu <i>c-MYC</i> -transgenen Tumormodellen.....	9
2.4 Aufgabenstellung.....	10
3. Material und Methoden	12
3.1 Material	12
3.1.1 Mäuse	12
3.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	13
3.1.3 Chemikalien und Reagenzien	14
3.1.4 Medien und Puffer	16
3.1.5 Kits	17
3.1.6 Antikörper	17
3.1.6.1 Therapeutische Antikörper.....	17
3.1.6.2 Antikörper für <i>In-vitro</i> -Versuche	17
3.1.6.3 Antikörper für durchflusszytometrische Bestimmungen	18
3.1.7 Murine rekombinante Zytokine	19
3.1.8 Peptide zur spezifischen T-Zell-Stimulation <i>in vitro</i>	19
3.1.9 Primer	20
3.1.10 Software	20
3.2 Methoden.....	21
3.2.1 Genotypisierung der Mäuse.....	21
3.2.2 Zellkultur und Zelllinien.....	22

3.2.3	Blut-Aufbereitung und Herstellung einer Einzelzellsuspension aus lymphoiden Organen	22
3.2.4	Durchflusszytometrie	23
3.2.5	<i>In-vitro</i> -T-Zell-Stimulation mit α CD3/ α CD28-Antikörpern	24
3.2.6	Proliferationsbestimmung mittels <i>Cell Proliferation Dye</i>	24
3.2.7	Zellanreicherung	25
3.2.7.1	EasySep Magnetseparation	25
3.2.7.2	MACS Separation	25
3.2.8	<i>In-vitro</i> -Ansätze	26
3.2.8.1	Suppressionsassay mit CD3/CD28-Stimulation	26
3.2.8.2	Suppressionsassay mit Peptidstimulation	26
3.2.8.3	<i>In-vitro</i> -Inkubation tumoröser B-Zellen mit rIL-10	27
3.2.9	Zytokinbestimmungen	27
3.2.9.1	Zytokinbestimmung mittels ELISA	27
3.2.10	<i>In-vivo</i> -Versuche	28
3.2.10.1	Krankheitsstadien von λ -MYC-Mäusen	28
3.2.10.2	Therapie mit α PD-1/ α CTLA-4-Antikörpern	28
3.2.10.3	Therapieversuch mit α IL-10-Antikörpern	28
3.2.10.4	Spezifische Treg-Depletion	29
3.2.10.5	Spezifische Treg-Depletion in Kombination mit IL-10-Neutralisierung	29
3.2.11	Statistische Auswertung	30
4.	Ergebnisse	32
4.1	Tregs im murinen λ -MYC-Lymphommodell	32
4.1.1	Phänotypisierung intratumoraler Tregs	32
4.1.1.1	Verstärkte Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3	32
4.1.1.2	Hochregulation Suppressions-assoziiierter Moleküle	33
4.1.1.3	Stabilität intratumoraler Tregs	34
4.1.2	Funktionelle Analyse <i>in vitro</i>	36
4.1.2.1	Verstärkte Immunsuppression infolge des zunehmenden relativen Treg-Anteils und eines erhöhten suppressiven Potenzials der λ -MYC-Tregs auf Einzelzellebene	36
4.1.2.2	Analyse immunsuppressiver Mechanismen <i>in vitro</i>	37
4.1.3	Spezifische Treg-Depletion <i>in vivo</i>	39

4.1.3.1	Verstärkte Proliferation von T- und NK-Zellen	39
4.1.3.2	Gesteigerte IFN- γ -Expression von T- und NK-Zellen	41
4.2	Tregs und Immun-Kontrollpunkt-Inhibition	43
4.2.1	Phänotypische Veränderungen von Tregs nach kombinierter α PD-1/ α CTLA-4-Therapie <i>in vivo</i>	43
4.2.1.1	Verminderte Foxp3-Expression	43
4.2.1.2	Reduzierte CD25- und IL-10 Expression	44
4.2.2	Der Einfluss der α PD-1/ α CTLA-4-Therapie auf die Treg-Funktionalität <i>in vitro</i>	45
4.2.2.1	Leicht verminderte suppressive Kapazität nach α PD-1/ α CTLA-4-Therapie <i>in vivo</i> ...	45
4.2.2.2	Suppressive Kapazität unter Peptid-spezifischer Stimulation	46
4.3	Die Rolle von IL-10 im λ -MYC-Modell	48
4.3.1	Überlebensvorteil nach IL-10-Neutralisierung <i>in vivo</i>	48
4.3.2	Von IL-10-Neutralisierung profitierende Zellpopulationen	49
4.3.3	Effekte von IL-10 auf maligne λ -MYC-B-Zellen	50
5.	Diskussion	52
5.1	Relevanz der verstärkten Treg-abhängigen Immunsuppression für die tumorale Immunevasion	52
5.2	Suppressive Mechanismen von λ -MYC-Tregs	53
5.3	PD-1-Blockade und Tregs – ein zu berücksichtigender Einflussfaktor	54
5.4	Beeinträchtigung des suppressiven Phänotyps und der Funktionalität von λ -MYC-Tregs durch die kombinierte Immun-Kontrollpunkt-Blockade	56
5.5	Die IL-10-Neutralisierung als therapeutische Option beim B-Zell-Lymphom	56
5.6	Ausblick	58
6.	Literaturverzeichnis	59
7.	Anhang	70
7.1	Zusätzliche Abbildungen	70
7.2	Veröffentlichungen	71
7.2.1	Fachpublikationen	71
7.2.2	Poster und Vorträge	71
7.3	Danksagung	73

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α	Anti- (bei Antikörpern)
APCs	Antigen-präsentierende Zellen
BCR	B-Zell-Rezeptor
BL	Burkitt-Lymphom
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CLL	Chronisch Lymphatische Leukämie
CPD	<i>Cell Proliferation Dye</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Protein 4</i>
DC	Dendritische Zelle
DEREG	<i>Depletion of Regulatory T Cells</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DT	Diphtherietoxin
DTR	Diphtherietoxin-Rezeptor
eBL	Endemisches Burkitt-Lymphom
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FKS	Fetales Kälberserum
FMO	<i>Fluorescence Minus One</i>
Foxp3	<i>Forkhead Box Protein 3</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
het	Heterozygot
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
IC	Intrazellulärfärbung
IFN- γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-2R	Interleukin-2-Rezeptor
IL-10R	Interleukin-10-Rezeptor
i.p.	Intraperitoneal

iTreg	Induzierte Regulatorische T-Zelle
LAG-3	<i>Lymphocyte-Activation Gene 3</i>
LK	Lymphknoten
mAK	Monoklonaler Antikörper
MDSC	<i>Myeloid-Derived Suppressor Cell</i>
MFI	Mediane Fluoreszenzintensität
MHC-I/II	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NK	Natürliche Killerzelle
Nrp-1	Neuropilin-1
nTreg	Natürliche Regulatorische T-Zelle
OF	Oberflächenfärbung
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD-1	<i>Programmed Cell Death Protein 1</i>
PD-L1/PD-L2	<i>Programmed Cell Death Ligand 1/2</i>
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
rIL-10	Rekombinantes Interleukin-10
rIL-2	Rekombinantes Interleukin-2
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i>
SEMA4A	Semaphorin-4a
SSC	<i>Side Scatter</i>
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
TCR	T-Zell-Rezeptor
Teff	CD4 ⁺ Foxp3 ⁻ T-Effektorzelle
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor beta</i>
Th	T-Helferzelle
TIGIT	<i>T Cell Immunoreceptor with Ig and ITIM Domains</i>
TIM-3	<i>T-Cell Immunoglobulin and Mucin Domain-3</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
Tr1	<i>T Regulatory Type 1 Cell</i>
Treg	Regulatorische T-Zelle
WT	Wildtyp

1. ZUSAMMENFASSUNG

Maligne Zellen bedienen sich einer Reihe immunmodulatorischer Mechanismen, um der Eliminierung durch das Immunsystem zu entgehen. So können CD4⁺Foxp3⁺ regulatorische T-Zellen (Tregs), deren physiologische Aufgabe in der Aufrechterhaltung der Immunhomöostase besteht, durch Inhibition anti-tumoraler Immunantworten deren Immunevasion fördern, was sie wiederum zu einem vielversprechenden Ziel für immuntherapeutische Ansätze macht. Um Tregs in einem murinen Modell unter möglichst kliniknahen Bedingungen zu erforschen, wurden in der vorliegenden Arbeit transgene λ -MYC-Mäuse eingesetzt, welche infolge einer B-Zell-spezifischen Überexpression des Proto-Onkogens *c-MYC* im Alter von 10 bis 20 Wochen autochthone Lymphome entwickeln. Aus früheren Arbeiten war bekannt, dass λ -MYC-Tregs infolge der Erkennung Lymphom-assoziiierter Selbstepitope zur Proliferation stimuliert werden und im Tumor einen größeren Anteil am CD4⁺ Zellkompartiment ausmachen als bei Wildtyp (WT)-Mäusen. Es konnte nun gezeigt werden, dass λ -MYC-Tregs im Laufe der Tumorprogression die Suppressions-assoziierten Moleküle Foxp3, CD25, CTLA-4 und IL-10 zunehmend hochregulierten. Die gleichzeitig bestehende hohe PD-1-Expression intratumoraler Tregs war nicht mit einem Stabilitätsverlust im Sinne einer Foxp3-Reduktion und der Aufnahme einer IFN- γ -Produktion verbunden. Somit zeigten die intratumoralen λ -MYC-Tregs trotz chronischer Stimulation im Tumormilieu einen funktionalen Phänotyp. Im Rahmen von *In-vitro*-Analysen war ein steigender Treg-Anteil mit einer stärkeren Suppression der Responderzellen verbunden, zusätzlich konnte λ -MYC-Tregs gegenüber WT-Tregs ein erhöhtes suppressives Potenzial auf Einzelzellebene bestätigt werden. Die Suppression war abhängig von Zellkontakten und IL-10. Infolge der quantitativen Verschiebungen und der phänotypischen Veränderungen ist daher in λ -MYC-Tumoren mit einer verstärkten Immunsuppression durch die Tregs zu rechnen. Effektoren der anti-tumoralen Immunantwort – CD4⁺Foxp3⁻ und CD8⁺ T-Zellen sowie Natürliche Killerzellen (NKs) – zeigten nach spezifischer Treg-Depletion *in vivo* eine erhöhte Proliferation und verstärkte IFN- γ -Expression.

Im λ -MYC-Modell hatte sich die kombinierte Immunkontrollpunkt-Inhibition aus α PD-1- und α CTLA-4-Antikörpern – im Gegensatz zur jeweiligen Monotherapie – als hocheffektiv erwiesen. Angesichts der Rolle von Tregs bei der Förderung der Immunevasion von λ -MYC-Tumoren, wurde untersucht, ob die α PD-1/ α CTLA-4-Therapie auch das Treg-Zellkompartiment beeinflusst. Tregs aus behandelten λ -MYC-Mäusen zeigten nach zweimaliger Antikörperinjektion eine signifikante Herunterregulation von Foxp3 und CD25, im Tumormilieu war ein Trend zu einer weniger ausgeprägten Hochregulation von Foxp3, CD25 und IL-10 zu verzeichnen. Das Suppressionspotenzial *in vitro* war nach der Kombinationstherapie tendenziell reduziert. *In vitro* konnte zudem eine durch α PD-1-Monotherapie verstärkte Treg-vermittelte Immunsuppression durch Kombination mit dem α CTLA-4-Antikörper verhindert werden.

Somit beeinträchtigte der kombinatorische Ansatz der PD-1/CTLA-4-Blockade die Entwicklung des suppressiven Phänotyps und die Funktionalität der λ -MYC-Tregs, was einen weiteren Aspekt des therapeutischen Mechanismus darstellt.

Eine Reihe von IL-10-Produzenten – unter anderem die Tregs und die malignen Zellen selbst – tragen zu erhöhten IL-10-Konzentrationen im λ -MYC-Tumormilieu bei. Durch Neutralisierung von IL-10 konnte das Überleben der λ -MYC-Mäuse signifikant verlängert und somit der Beweis für einen weiteren tumoralen Immunevasionsmechanismus erbracht werden. Die α IL-10-Therapie hatte eine verbesserte Tumordinfiltration mit CD4⁺Foxp3⁻ und CD8⁺ T-Zellen sowie NK-Zellen zur Folge. Letztere zeigten unter Therapiebedingungen zudem eine signifikant gesteigerte IFN- γ -Expression. Interessanterweise war das B-Zellkompartiment nach zweimaliger α IL-10-Applikation nahezu vollständig eliminiert. Da die malignen Zellen an allen Tumormanifestationsorten den IL-10-Rezeptor exprimierten und eine reduzierte Überlebensfähigkeit in Abwesenheit von IL-10 zeigten, könnte neben den immunologisch vermittelten Effekten eine direkte Beeinflussung der Tumorzellen durch die α IL-10-Therapie eine Rolle spielen. Die Ergebnisse liefern somit eine Grundlage für den Einsatz von α IL-10-Antikörpern in der Lymphomtherapie.

2. EINLEITUNG

2.1 Grundlagen der Immunologie

Das menschliche Immunsystem ist ein hochkomplexes Netzwerk aus lymphatischen Organen, Zellen und humoralen Faktoren, dessen physiologische Aufgabe darin besteht, den Organismus vor Infektionen zu schützen. Man unterscheidet das angeborene und das adaptive Immunsystem, die eng miteinander interagieren (Parkin & Cohen 2001).

2.1.1 Das angeborene Immunsystem

Überwindet ein Pathogen die mechanische, chemische sowie mikrobielle Barriere der Epithelien und dringt in den Körper ein, dient die angeborene Immunantwort der ersten Abwehr. Mechanismen der Sofortreaktion gegen extrazelluläre Erreger sind Komplementaktivierung und Phagozytose (insbesondere durch Makrophagen und Granulozyten), wobei keine Spezifität für einen bestimmten Erreger besteht, sondern Pathogen-assoziierte Strukturen über Mustererkennungsmoleküle erkannt werden. Die mit Zytokin- und Chemokinsekretion einhergehende Aktivierung von Makrophagen führt zu einer Rekrutierung und Aktivierung weiterer Effektoren und es kommt zu einer Entzündungsreaktion, die mitunter der lokalen Eindämmung des Pathogens dient, bis die adaptive Immunantwort in Gang kommt. Bei der angeborenen Immunantwort gegen intrazelluläre Erreger oder entartete Zellen nehmen natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und auf der humoralen Ebene Interferone eine Schlüsselfunktion ein. Während intakte Körperzellen durch Expression von MHC-I-Molekülen (*Major Histocompatibility Complex*) vor der NK-Zellaktivität geschützt sind, regulieren Virus-befallene und maligne Zellen MHC-I herunter und werden – sofern gleichzeitig ein Stress-induziertes aktivierendes Signal vorliegt – durch zytotoxische, Perforin- und Granzym-enthaltende Granula der NK-Zellen lysiert. Das NK-Zell-Effektorzytokin Interferon- γ (IFN- γ) aktiviert Makrophagen und kann die adaptive Immunantwort anregen (Vollmar et al. 2013; Murphy & Weaver 2017; Mocikat et al. 2003).

2.1.2 Das adaptive Immunsystem

Den am Infektionsort befindlichen dendritischen Zellen (DCs) kommt eine duale Rolle zu. Zum einen können sie als Phagozyten Teil der angeborenen Immunantwort sein, ihre Hauptaufgabe besteht jedoch darin, die adaptive Immunantwort zu initiieren. Nach Antigenaufnahme in der Peripherie durchlaufen sie einen Reifeprozess mit Hochregulation kostimulatorischer Moleküle und migrieren als funktionelle Antigen-präsentierende Zellen (APCs) in sekundäre lymphatische Organe, wo sie naive

Lymphozyten aktivieren und deren Differenzierung zu Effektorzellen induzieren (Banchereau & Steinman 1998; Vollmar et al. 2013; Murphy & Weaver 2017).

Lymphozyten werden generell in B- und T-Zellen unterteilt. Jeder Lymphozyten-Klon exprimiert infolge somatischer Rekombination einen einzigartigen hochspezifischen Antigenrezeptor, wodurch die enorme Diversität des adaptiven Immunsystems entsteht. B- und T-Zellen unterscheiden sich erheblich in der Art der Antigenerkennung. B-Zellen können über ihren B-Zell-Rezeptor (BCR) Antigene direkt erkennen und zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen heranreifen, je nach Antigen kann jedoch eine T-Zellhilfe erforderlich sein. Die sezernierten Antikörper besitzen dieselbe Spezifität wie der BCR und stellen die humorale Komponente des adaptiven Immunsystems dar. Dagegen unterliegen T-Zellen der sogenannten MHC-Restriktion, d. h. der T-Zell-Rezeptor (TCR) kann nur Antigene detektieren, die über MHC-Moleküle präsentiert werden.

Es gibt zwei Klassen von MHC-Molekülen, die Antigene unterschiedlichen Ursprungs präsentieren. Von einer infizierten Zelle oder einer Tumorzelle synthetisierte endogene Antigene werden über MHC-I, und exogene Antigene nach Prozessierung durch APCs über MHC-II präsentiert. Die T-Zell-Reihe wird anhand ihres jeweiligen Korezeptors ebenfalls in zwei Hauptklassen eingeteilt: $CD8^+$ und $CD4^+$ T-Lymphozyten, wobei der TCR von $CD8^+$ T-Zellen an Peptid/MHC-I- und der von $CD4^+$ T-Zellen an Peptid/MHC-II-Komplexe bindet. Diese Interaktion stellt das erste für eine erfolgreiche T-Zellaktivierung und -differenzierung erforderliche Signal dar. Das zweite Signal wird meistens durch eine Interaktion von Molekülen der B7-Familie – B7-1/B7-2, auch CD80/86 genannt – auf reifen APCs mit ihrem Rezeptor CD28 auf der T-Zelle vermittelt und als Kostimulation bezeichnet. Durch TCR-Signal und Kostimulation wird eine erste Proliferation, die Synthese von Interleukin-2 (IL-2) und die Expression der α -Kette des IL-2-Rezeptors (CD25) induziert. Naive T-Zellen exprimieren nur den aus zwei Ketten bestehenden niedrig-affinen IL-2-Rezeptor (IL-2R), durch Zusammenlagerung mit CD25 entsteht die hochaffine Variante, die eine ausgeprägte autokrine Wirkung von IL-2 ermöglicht, was eine starke Proliferation (klonale Expansion) zur Folge hat (Bretscher & Cohn 1970; Meuer et al. 1982; June et al. 1987; Vollmar et al. 2013; Murphy & Weaver 2017).

Die $CD8^+$ T-Zellen differenzieren zu zytotoxischen T-Effektorzellen, diese können – wie die NK-Zellen – Zielzellen durch zytotoxische Granula lysieren sowie $IFN-\gamma$ sezernieren. Für die $CD4^+$ -Zelldifferenzierung zu T-Helferzellen (Th-Zellen) ist das Zytokinmilieu entscheidend. Man unterscheidet Th1, Th2, Th17, folliculäre Helferzellen und regulatorische T-Zellen (Tregs). Der wichtigste Subtyp bei der Abwehr intrazellulärer Erreger und bei der Eliminierung maligner Zellen ist der Th1-Subtyp, welcher unter Einfluss von IL-12 und $IFN-\gamma$ entsteht. Das Th1-Effektorzytokin $IFN-\gamma$ inhibiert die Differenzierung von Th2 und Th17-Zellen, sodass in dem Fall die benötigte Th1-Antwort dominiert (Murphy & Weaver 2017). Die Natur des Pathogens beeinflusst demnach entscheidend die induzierte T-Zellantwort, da sie

zum einen die Art der Antigenpräsentation über MHC-Moleküle bestimmt und zum anderen das bei der Differenzierung herrschende Zytokinmilieu.

Ausdifferenzierte Effektor-T-Zellen verlassen die sekundären lymphatischen Organe und migrieren gezielt zum Infektionsort, bei Antigen-spezifischer Aktivierung entfalten sie ihre Effektor-mechanismen, eine Kostimulation ist jedoch nicht mehr erforderlich. Während Effektor-T-Zellen nach Elimination des Pathogens absterben, persistieren langlebige Gedächtniszellen, sodass bei erneutem Kontakt die adaptive Immunantwort sofort initiiert wird (Vollmar et al. 2013; Murphy & Weaver 2017).

2.1.3 Immunregulatorische Mechanismen und Selbsttoleranz

Die Aufrechterhaltung der Integrität des Organismus erfordert Mechanismen, die es erlauben, Immunantworten zu regulieren und dadurch überschießende oder fehlgeleitete Reaktionen zu verhindern. Von entscheidender Bedeutung ist in diesem Kontext die Toleranz gegenüber körpereigenen Selbstantigenen. Zudem ist der Mensch permanent körperfremden Strukturen ausgesetzt, die unter normalen Umständen nicht pathogen sind – beispielsweise kommensalen Mikroorganismen der Darmflora – und deren Gegenwart keiner Immunantwort bedarf. Die Sicherstellung dieser Immunhomöostase ist die Hauptaufgabe der Tregs (Murphy & Weaver 2017).

2.1.3.1 Regulatorische T-Zellen

Erstmals definiert wurden Tregs 1995 als eine CD4⁺CD25⁺ Zellpopulation mit immunsuppressiven Eigenschaften (Sakaguchi et al. 1995). Wie bereits beschrieben, wird CD25 jedoch generell im Rahmen der T-Zellaktivierung hochreguliert. Im Jahr 2003 konnte den Tregs mit Foxp3 (*forkhead box protein 3*) ein zellpopulationsspezifischer Transkriptionsfaktor zugeordnet werden. Foxp3 trägt entscheidend zur Entwicklung und Funktionalität der Tregs bei, was eindrücklich dadurch gezeigt wird, dass konventionelle T-Zellen durch eine ektopische Expression von FoxP3 *in vivo* und *in vitro* eine Treg-ähnliche suppressive Aktivität erlangen (Hori et al. 2003; Fontenot et al. 2003). Umgekehrt zieht eine Reduktion der Foxp3-Expression einen nahezu vollständigen Verlust der suppressiven Kapazität nach sich (Wan & Flavell 2007). Inzwischen ist bekannt, dass Foxp3 mit weiteren Transkriptionsfaktoren und epigenetischen Desoxyribonukleinsäure (DNA)-(De)Methylierungsprozessen in einem hochkomplexen Netzwerk die Treg-spezifische Genexpression reguliert. Verschiedene Aktivierungs-assoziierte Moleküle wie CD25 aber auch CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4*) werden dadurch konstitutiv exprimiert, während die Expression von IL-2 und IFN- γ unter normalen Umständen reprimiert wird (Sakaguchi et al. 2020). Mutationen, die in einer defizienten Expression von Foxp3, CD25 oder CTLA-4 resultieren, führen zu autoimmunen Krankheitsbildern, welche sich in einer

eingeschränkten Funktionalität der Tregs begründen (Bennett et al. 2001; Wildin et al. 2001; Sharfe et al. 1997; Schubert et al. 2014; Kuehn et al. 2014).

Bezüglich ihrer Ontogenese werden Tregs in zwei Subpopulationen unterteilt. In der Literatur sind zwei Nomenklatorsysteme vertreten (z.B. de Lafaille & Lafaille 2009; Shevach & Thornton 2014). In dieser Arbeit wird nur das eine nachfolgend vorgestellte verwendet, die Bezeichnungen in den zitierten Originalpublikationen können daher abweichen. Natürliche Tregs (nTregs) differenzieren bereits im Thymus aus, sofern der TCR einer Vorläufer-T-Zelle die während der Thymusreifung präsentierten Selbstantigene mit einer mittleren Affinität erkennt. Zellen mit einer zu starken Eigenerkennung werden als potenziell autoreaktive Zellen deletiert (negative Selektion), während sich Zellen mit einer niedrigeren Affinität zu naiven T-Zellen entwickeln (positive Selektion). Dementsprechend ist das nTreg-TCR-Repertoire prädisponiert, Selbstepitope zu detektieren. Die nTregs werden in der Peripherie bereits durch deutlich niedrigere Konzentrationen ihres Antigens aktiviert als naive T-Zellen der gleichen Spezifität. Hierdurch wird sichergestellt, dass die Treg-vermittelte Selbsttoleranz dominiert (Sakaguchi et al. 2020; Hsieh et al. 2012). In der Peripherie können CD4⁺ T-Zellen bei Antigenkontakt unter Einfluss von IL-2 und TGF- β (*transforming growth factor*) ebenfalls Foxp3 exprimieren. Diese induzierten Tregs (iTregs) dienen vor allem der Eindämmung der Immunreaktion auf harmlose körperfremde Antigene, wie sie in Geweben mit Barrierefunktion, wie der Darmmukosa, vorkommen. Im Gegensatz zu den nTregs sind sie somit auf die Erkennung von Fremdantigenen ausgerichtet, und die Foxp3-Expression kann transient sein. Sie entfalten ihre Wirkung maßgeblich über Sekretion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 (Shevryev & Tereshchenko 2020; Sakaguchi et al. 2020). Zur Unterscheidung der beiden Subpopulationen kann die differenzielle Expression von Helios, einem Transkriptionsfaktor der Ikarus-Familie, herangezogen werden. Helios⁺ Tregs werden zu den nTregs gezählt, Helios⁻ Tregs zu den iTregs (Thornton et al. 2010), wobei anzumerken ist, dass diese Zuordnung von anderen Gruppen infrage gestellt wurde (Gottschalk et al. 2012; Akimova et al. 2011).

Während man ursprünglich davon ausging, dass es sich bei Tregs um eine terminal ausdifferenzierte T-Zellpopulation handelt, deuten neuere Daten daraufhin, dass Tregs – auch nTregs – unter bestimmten Umständen plastische Eigenschaften besitzen können. Man spricht auch von „Treg-Destabilisierung“, „Treg-Fragilität“ oder „Treg-Reprogrammierung“ (Munn et al. 2018; Piconese et al. 2020; Zhang & Zhou 2019). Gemeint ist – je nach Definition – ein Zustand mit reduzierter oder verlorengangener immunsuppressiver Aktivität, der den Verlust von Foxp3 einschließen kann und durch die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine gekennzeichnet ist (Moreno Ayala et al. 2019). Verschiedene auslösende Faktoren sind beschrieben. So können Tregs unter Einfluss von IFN- γ , IL-12 oder IL-6 zur IFN- γ -Produktion induziert werden (Overacre-Delgoffe et al. 2017; Munn et al. 2018; Moreno Ayala et al. 2019; Feng et al. 2011). Auch aktivierende Stimuli wie ein starkes/repetitives TCR- oder CD137-

Signal werden in diesem Zusammenhang genannt (Hoffmann et al. 2009; Akhmetzyanova et al. 2016; Bailey-Bucktrout et al. 2013; Zhang et al. 2017). Bei Autoimmunerkrankungen kann dieser „destabilisierte“ Zustand pathogen sein (Zhou et al. 2009).

2.1.3.2 Koinhibitorische Rezeptoren

Zur Prävention überschießender Immunantworten ist die T-Zellaktivierung ein fein kontrollierter Prozess. Inzwischen ist eine Vielzahl kostimulatorischer und koinhibitorischer Moleküle identifiziert, die in ihrer Gesamtheit das TCR-Signal – und somit Aktivierung, Differenzierung und Effektorfunktion – modulieren können. Zu den koinhibitorischen Molekülen gehören u. a. CTLA-4, PD-1 (*programmed cell death protein 1*), TIM-3 (*T-cell immunoglobulin and mucin domain-3*), LAG-3 (*lymphocyte-activation gene 3*) und TIGIT (*T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains*) (Chen & Flies 2013).

Der am längsten bekannte Vertreter der koinhibitorischen Moleküle ist CTLA-4. Die CTLA-4-Moleküle befinden sich überwiegend in intrazellulären Vesikeln der T-Zellen und werden nach Aktivierung an die Zelloberfläche transloziert. CTLA-4 interagiert hochaffin mit CD80/86 auf APCs und steht somit in Konkurrenz zu der CD28-abhängigen Kostimulation. Darüber hinaus ist CTLA-4 wichtiger Bestandteil des immunsuppressiven Mechanismus der Tregs. Diese können durch CTLA-4-vermittelte Transendozytose CD80/86-Moleküle von der Oberfläche der APCs entfernen. Die verminderte Verfügbarkeit von CD80/86 auf APCs hat letztlich ein Ausbleiben des kostimulatorischen Signals und damit eine unvollständige Aktivierung naiver T-Zellen zur Folge, welche in einen Zustand der Anergie fallen und nicht mehr auf einen Antigenstimulus reagieren. CTLA-4 greift damit in einen frühen Schritt der T-Zellaktivierung ein (Brunet et al. 1987; Krummel & Allison 1995; Linsley et al. 1996; Qureshi et al. 2011; Rowshanravan et al. 2018).

PD-1 wird im Sinne eines gegenregulatorischen Mechanismus bei der T-Zellaktivierung hochreguliert und bindet an seine Liganden PD-L1 und PD-L2 (B7-H1, B7-H2) auf APCs. Das PD-1-Signal inhibiert die TCR/CD28-vermittelte Signalkaskade und spielt eine wichtige Rolle bei Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz (Ishida et al. 1992; Freeman et al. 2000; Riella et al. 2012). Dieser Mechanismus ist für CD8⁺ und CD4⁺ T-Effektorzellen gut etabliert, die Rolle von PD-1 für Tregs ist im Vergleich weniger erforscht, und die Ergebnisse hängen stark vom Kontext ab. Das PD-1-vermittelte Signal inhibiert auch bei Tregs die TCR/CD28-abhängige Aktivierung (Kumagai et al. 2020; Tan et al. 2021; Sage et al. 2013), allerdings ist es für die Induktion von Tregs erforderlich (Stathopoulou et al. 2018) und es kann sich positiv auf die Stabilität des Treg-Phänotyps auswirken (Lucca & Dominguez-Villar 2020). Darüber hinaus ist die PD-1-Expression nicht auf T-Zellen beschränkt, auch Monozyten, bestimmte DC-Subpopulationen, NK- und B-Zellen können PD-1 exprimieren, woraus sich in der Gesamtheit vielfältige Wirkungsmöglichkeiten ergeben (Riella et al. 2012).

2.2 Tumorimmunologie

2.2.1 Tumorentstehung und Immunevasion

Maligne Neoplasien verzeichnen global eine steigende Inzidenz (Bray et al. 2018). Ursächlich für die Tumorentstehung ist eine deregulierte Teilung einzelner entarteter Zellen. Im Jahr 2000 definierten Hanahan und Weinberg die sogenannten „*Hallmarks of Cancer*“, dabei handelt es sich um sechs essenzielle Veränderungen der Zellphysiologie, aus denen die maligne Transformation einer Zelle resultiert: Unabhängigkeit von extrinsischen Wachstumssignalen (Autarkie), Nichtansprechen auf anti-proliferative Signale, Resistenz gegenüber Apoptose, unbegrenzt replikatives Potenzial, Induktion und Aufrechterhaltung von Angiogenese, Fähigkeit zur Gewebsinvasion und Metastasierung. Infolge des Fortschritts der Forschung diskutierten die Autoren 2011 eine Erweiterung um vier Charakteristika: Genominstabilität und Mutation, Umregulierung des zellulären Energiemetabolismus, Induktion einer Tumor-fördernden Entzündung und eben auch die Verhinderung der Zerstörung durch das Immunsystem (Hanahan & Weinberg 2000; Hanahan & Weinberg 2011).

Die Idee der Erkennung und Eliminierung entarteter körpereigener Zellen durch das Immunsystem geht letztlich bereits auf Paul Ehrlich zurück (Ehrlich 1909). Etwa 50 Jahre später griffen Burnet und Thomas unabhängig voneinander den Gedanken einer „Tumor-Immunüberwachung“ (*cancer immunosurveillance*) wieder auf. Obwohl Spontanheilungen von Tumoren und die erhöhte Inzidenz einiger maligner Neoplasien bei immunsupprimierten Patienten prinzipiell für die Hypothese sprachen, ließ sie sich erst in den 90er Jahren experimentell belegen (Finn 2018; Dunn et al. 2002; Dunn et al. 2004). Dunn et al. prägten schließlich das erweiterte dreiphasige Konzept der „Tumor-Immuneditierung“ (*cancer immunoediting*). Diesem zufolge werden maligne Zellen vom Immunsystem erkannt und im besten Fall eliminiert (1. *elimination*). Ist dies nicht möglich, folgt ein dynamischer Gleichgewichtszustand (2. *equilibrium*). Durch die fortbestehende antitumorale Immunantwort wird ein Selektionsdruck auf die Tumorzellen ausgeübt, und mutierte Tumorzellen von geringerer Immunogenität beginnen unkontrolliert zu expandieren, was die dritte Phase (3. *escape*) einleitet (Dunn et al. 2002; Dunn et al. 2004).

Zusätzlich zu Mechanismen wie der Herunterregulation von Tumor-assoziierten Antigenen (TAAs) oder MHC-I-Molekülen, die mit einer geringeren Erkennung der malignen Zellen durch das Immunsystem verbunden sind (Leone et al. 2013), generieren Tumoren ein hochkomplexes immunsuppressives Mikromilieu. Im Tumor herrschende metabolische Stressoren wie Azidose, Hypoxie und Nährstoffdefizit haben bereits für sich genommen suppressive Eigenschaften (Damgaci et al. 2018; Gupta et al. 2017). Zudem kommt es zu einer Akkumulation von Tregs, Tumor-assoziiertes

Makrophagen und MDSCs (*myeloid-derived suppressor cells*), die antitumorale Immunantworten inhibieren (Lorenzo-Sanz & Muñoz 2019). Tregs können CTLA-4-vermittelt das kostimulatorische Potenzial der DCs modulieren, die daher keine effektive adaptive Immunantwort mehr induzieren (Qureshi et al. 2011; Rowshanravan et al. 2018). Im Tumormilieu sind Effektor-T-Zellen zudem einer persistierenden TCR-Stimulation ausgesetzt, was zu einem progressiven Verlust ihrer Proliferationsfähigkeit und Effektorfunktionen führt. Dieser dysfunktionale Zustand – auch „T-Zellerschöpfung“ genannt – geht in der Regel mit einer hohen Expression verschiedener koinhibitorischer Moleküle einher. Der Tumor seinerseits kann PD-L1 hochregulieren oder immunsuppressive Zytokine wie IL-10 und TGF- β sezernieren, dadurch Effektor-T-Zellen direkt negativ regulieren und ihre Erschöpfung fördern (Wherry 2011; Wherry & Kurachi 2015; Murphy & Weaver 2017).

2.2.2 Immunkontrollpunkt-Inhibition

Die (Re-)Aktivierung intratumoraler Effektor-T-Zellen ist Ziel der sogenannten Immunkontrollpunkt-Inhibitoren, welche koinhibitorische Moleküle blockieren und so die durch sie vermittelte Immunsuppression unterbrechen. Antikörper gegen PD-1 (z.B. Nivolumab) oder CTLA-4 (Ipilimumab) bieten inzwischen eine etablierte Therapieoption. Trotz des unbestreitbaren Erfolgs spricht ein wesentlicher Teil der Patienten jedoch nicht auf die Monotherapie an (Hodi et al. 2010; Weber et al. 2015; Xu et al. 2017). Dass CTLA-4 in den Suppressionsmechanismus der Tregs eingreift und zu einem frühen Zeitpunkt der T-Zellaktivierung agiert, während PD-1 eher Effektor-T-Zellen in der Peripherie reguliert (Abschnitt 2.1.3.2), ist ein Argument für den kombinatorischen Einsatz von PD-1- und CTLA-4-blockierenden Antikörpern. Durch Kombination von Nivolumab und Ipilimumab konnte das progressionsfreie Überleben von Melanom-Patienten (niedrige PD-L1-Expression) verbessert werden (Larkin et al. 2015), was zur ersten Zulassung der Kombinationstherapie führte. Auch beim Nierenzellkarzinom und malignen Pleuramesotheliom wirkte sich die kombinierte Therapie positiv aus (Motzer et al. 2018; Baas et al. 2021) und ist inzwischen zugelassen. Weiterhin gilt es, die Patientengruppen zu identifizieren, die am meisten von der Therapie profitieren. Hierfür ist ein noch besseres Verständnis der jeweiligen Wirkweisen erforderlich, denn trotz ihres langjährigen Einsatzes in der Klinik sind nicht alle therapeutischen Mechanismen vollständig aufgeklärt.

2.3 Vom Burkitt-Lymphom zu *c-MYC*-transgenen Tumormodellen

Lymphome sind Tumoren des lymphatischen Systems, die gemäß WHO-Klassifikation in Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) unterteilt werden. Die heterogene Gruppe der NHL sind in etwa 85-90 % der Fälle auf eine Expansion maligner B-Lymphozyten zurückzuführen (Armitage et al. 2017). Bei

dem nach seinem Entdecker Denis Burkitt benannten erstmals 1958 beschriebenen Burkitt-Lymphom (BL) handelt es sich um ein sehr aggressives NHL der B-Zell-Reihe, das als Paradebeispiel für die *MYC*-assoziierte Lymphomgenese gilt. Es lässt sich in drei epidemiologisch unterschiedliche Subtypen einteilen: das endemische BL (eBL), das sporadische BL und das HIV (Humanes Immundefizienz-Virus)-assoziierte BL. Etwa 98% der eBL-Zellen tragen das Genom des Epstein-Barr-Virus (EBV), was für dessen Beteiligung an der Tumorgenese spricht. Das geteilte Charakteristikum aller drei Subtypen ist die deregulierte Expression des Transkriptionsfaktors *c-MYC*, der, da an Prozessen wie Wachstumskontrolle, Proliferation und Differenzierung beteiligt, ein onkogenes Potenzial besitzt. Durch die Translokation des *c-MYC*-Gens in einen Immunglobulin (Ig)-Locus, kommt es zu einer Überexpression von *c-MYC*, wobei die Tumorentwicklung kooperierende Mechanismen erfordert (Klapproth & Wirth 2010; Ott et al. 2013). Aufgrund seiner sehr hohen Teilungsrates ist das BL in der Regel chemosensitiv, mit Rituximab steht zudem ein gegen CD20 gerichteter monoklonaler Antikörper als ergänzende Therapieoption zur Verfügung. Die Heilungschancen stehen insbesondere bei pädiatrischen Patienten sehr gut. Bei trotz Standardtherapie progredienter oder rezidivierender Erkrankung bleiben die Überlebenschancen allerdings limitiert (Burkhardt & Wößmann 2017). Ebenso haben Erwachsene mit zunehmendem Alter eine schlechtere Prognose (Costa et al. 2013), was die Erforschung weiterer Therapieoptionen erforderlich macht.

Mit transgenen Mäusen, die das humane *c-MYC*-Gen unter der Kontrolle des B-Zell-spezifischen Verstärkerelements der Ig λ -Kette exprimieren (im Folgenden „ λ -*MYC*-Mäuse“ genannt), ist ein murines Modell des BLs verfügbar (Kovalchuk et al. 2000). Ein solches endogenes Tumormodell hat den Vorteil, dass – im Gegensatz zu transplantierten Tumoren – die einzelnen Phasen der tumoralen Immunevasion durchlaufen werden und die Etablierung eines immunsuppressiven Mikromilieus besser abgebildet wird.

2.4 Aufgabenstellung

CD4⁺Foxp3⁺ Tregs können durch Inhibition anti-tumoraler Immunantworten die Immunevasion maligner Zellen fördern, was sie wiederum zu einem vielversprechenden Ziel für immuntherapeutische Ansätze macht. Um Tregs in einem murinen Modell unter möglichst kliniknahen Bedingungen zu erforschen, wurde in der vorliegenden Arbeit das transgene λ -*MYC*-Lymphommodell eingesetzt (Kovalchuk et al. 2000). Aus früheren Arbeiten war bereits bekannt, dass (i) λ -*MYC*-Tregs die tumorale Immunevasion begünstigen (Ahmetlić et al. 2019), (ii) die Tumorentwicklung äußerst effektiv durch die Kombination aus PD-1- und CTLA-4-blockierenden Antikörpern verzögert oder sogar verhindert werden kann (Brenner et al. 2020; Ahmetlić et al. 2021) und (iii) im Tumormilieu erhöhte

Konzentrationen von IL-10 vorzufinden sind (Naujoks et al. 2014). Folgende sich daraus ergebende Fragestellungen wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht:

- Entwickeln die Tregs im Laufe der Tumorprogression phänotypische Veränderungen?
- Zeigen λ -MYC-Tregs eine veränderte immunsuppressive Kapazität?
- Welche Mechanismen liegen der Treg-vermittelten Suppression zugrunde?
- Welche Effektorzellen der anti-tumoralen Immunantwort unterliegen der Kontrolle der Tregs?
- Beeinflusst die kombinierte Immunkontrollpunkt-Blockade Phänotyp und/oder Funktionalität der Tregs?
- Welche Auswirkungen hat eine Neutralisierung des Treg-Effektorzytokins IL-10 auf die Tumorentwicklung?

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Mäuse

Alle Mäuse wurden unter den spezifiziert Pathogen-freien Bedingungen der Tierhaltung des Helmholtz-Zentrums München in Großhadern gehalten, die Zucht erfolgte in der Tierhaltung des Helmholtz-Zentrums München in Neuherberg.

Die Grundlage dieser Arbeit waren transgene λ -MYC-Mäuse mit C57BL/6-Hintergrund, die für die Zuchtaufrechterhaltung mit Wildtyp-C57BL/6-Mäusen (WT) verpaart wurden. λ -MYC-Mäuse exprimieren das humane Proto-Onkogen *c-MYC* unter der Kontrolle des B-Zell-spezifischen Verstärkerelements der Ig λ -Kette (Kovalchuk et al. 2000), was zu einer unkontrollierten Proliferation der B-Zellen im Alter von zehn bis 20 Wochen nach der Geburt führt. Die spontanen Tumoren werden in Lymphknoten (LK), Milz und/oder Thymus manifest. Zeigte eine Maus Krankheitssymptome, wurde sie bezüglich ihres Erscheinungsbildes (u.a. Fellzustand, Atmung, Bewegungsablauf), Verhaltens (u.a. Isolation von der Gruppe), weiterer klinischer Merkmale (z.B. apparente Raumforderungen der LK, Abdomenschwellung) beurteilt und bei Erreichen eines Abbruchscores umgehend abgetötet. Als Kontrollen dienten die nicht-transgenen C57BL/6-Mäuse aus gleicher Zucht.

Zur spezifischen Erforschung von Tregs, wurden DEREГ-Mäuse (*Depletion of Regulatory T Cells*) mit C57BL/6-Hintergrund, ursprünglich von Jackson Laboratory (Ben Harbor, USA) bezogen, mit λ -MYC-Mäusen aus eigener Zucht gekreuzt. DEREГ-Mäuse exprimieren ein Fusionsprotein aus dem Diphtherietoxin-Rezeptor (DTR) und dem GFP-Reporterprotein (grün-fluoreszierendes Protein). Dieses DTR-GFP-Fusionsprotein steht unter der Kontrolle des *foxp3*-Genlocus, dadurch können die Foxp3-exprimierenden Tregs über GFP detektiert, ohne intrazelluläre Färbung sortiert oder durch Gabe von Diphtherietoxin (DT) spezifisch depletiert werden (Lahl & Sparwasser 2011). Die unbehandelten λ -MYC/DEREГ-Nachkommen entwickeln mit derselben Kinetik Tumoren wie λ -MYC-Mäuse (Ahmetlić et al. 2019).

3.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1: Verwendete Geräte und Ausrüstungsgegenstände

Gerät	Hersteller
Absaugsystem <i>neoVAQ</i>	Neolab, Heidelberg
<i>BD LSR II Flow Cytometer</i>	Becton Dickinson, Heidelberg
<i>EasySep Magnet</i>	Stemcell Technologies, Vancouver, Kanada
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr, Ochsenhausen
Gefrierschrank (-86 °C)	Sanyo, Moriguchi, Japan
Heizschüttler <i>Eppendorf ThermoMixer C</i>	Eppendorf, Hamburg
Inkubator <i>Hera cell 240</i>	Heraeus, Hanau
Kühlschrank (4°C)	Liebherr, Ochsenhausen
Kühlzentrifuge <i>Hettich ROTANTA 460R</i>	Hettich, Tuttlingen
Gefrierbox <i>Corning CoolCell LX</i>	Corning, Corning, USA
Lichtmikroskop <i>Leica DM750</i>	Leica Microsystems, Wetzlar
Mehrkanalpipetten (200/300 µl)	Eppendorf, Hamburg
<i>OctoMACS Separator (+ MACS MultiStand)</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Thermocycler <i>Biometra T Gradient</i>	Analytik Jena, Jena
Pipetten (2/10/20/100/200/1000 µl)	Gilson, Middleton, USA
Plattenzentrifuge <i>Labofuge 400</i>	Heraeus, Hanau
Röntgenbestrahlungsanlage <i>XSTRAHL RS225</i>	Xstrahl, Ratingen
<i>SUNRISE Absorbance Reader</i>	Tecan Group, Männedorf, Schweiz
Sterilwerkbank	BDK, Sonnenbühl-Genkingen
Stickstofftank	Air Liquid, Düsseldorf
Tischzentrifuge <i>Centrifuge 5424R</i>	Eppendorf, Hamburg
Vortexer <i>Vortex Genie 2</i>	Bachofer, Reutlingen
Wasseraufbereitungssystem <i>Milli-Q Reference A+</i>	Merck Millipore/Merck, Darmstadt
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Zählkammer nach Neubauer	Neolab, Heidelberg

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Einmalkanülen (26G x ½ /23G x 1)	Henke Sass Wolf, Tuttlingen
Einmalpipetten (2 ml)	Corning, Corning, USA
Einmalpipetten (5/10/25 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
ELISA-Platten (96 Kavitäten) <i>Nunc MaxiSorp flat-bottom</i>	Thermo Scientific/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kryoröhrchen (1,8 ml) <i>Nunc CryoTube Vials</i>	Thermo Scientific/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
MACS-Säulen <i>MS Columns</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Petrischalen (94/16 mm)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen (D10/DL10)	Gilson, Middleton, USA
Pipettenspitzen (10-200/1000 µl)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Röhrchen (1,3 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Röhrchen mit Zellfilterkappe (5 ml, Porengröße: 35 µm)	Falcon/Corning, Corning, USA
Reaktionsgefäße (0,5/1,5/2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Spritzen (1/10 ml)	B. Braun, Melsungen
Spritzen (10/20 ml, Luer-Lock-Verschluss)	B. Braun, Melsungen
Sterilfilteraufsätze (Porengröße: 0,22 µm)	Merck Millipore/Merck, Darmstadt
Zellsiebe (Porengröße: 40 µm)	Falcon/Corning, Corning, USA
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturplatten (48 Kavitäten, Flachboden)	Falcon/Corning, Corning, USA
Zellkulturplatten (96 Kavitäten, Flachboden)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatten (96 Kavitäten, Doppelkammersystem)	Corning, Corning, USA
Zellkulturplatten (96 Kavitäten, Rundboden)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen, konisch (15/50 ml)	Falcon/Corning, Corning, USA

3.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie/Reagenz/Puffer	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Merck Millipore/Merck, Darmstadt
Brefeldin A	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>Cell Proliferation Dye eFluor 450</i>	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>CD11c MicroBeads UltraPure, mouse</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe
Diphtherietoxin	Merck Millipore/Merck, Darmstadt
DNA/RNA-Farbstoff <i>peqGREEN</i>	Peglab/VWR, Radnor, USA
dNTP	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)</i>	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz (EDTA)	Merck Millipore/Merck, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FKS)	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder</i>	Thermo Scientific/ Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ionomycin, Calcium-Salz	Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	Merck Millipore/Merck, Darmstadt
Ladepuffer 6x <i>DNA Loading Dye</i>	Thermo Scientific/ Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
L-Glutamin	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Lysereagenz <i>DirectPCR</i>	Viagen Biotech Inc., Los Angeles, USA
MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100X)	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>OneComp eBeads</i>	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>Penicillin-Streptomycin</i>	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt
Proteinase K	VWR, Radnor, USA
Reaktionspuffer 10x <i>PCR Rxn Buffer</i>	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Reaktionspuffer 10x <i>ThermoPol Reaction Buffer</i>	New England Biolabs, Ipswich, USA
<i>RPMI 1640 ohne L-Glutamin</i>	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Salzsäure (HCl)	Merck Millipore/Merck, Darmstadt
Taq DNA Polymerase	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Trypanblau	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Tween 20	Merck Millipore/Merck, Darmstadt

3.1.4 Medien und Puffer

Tabelle 4: Hergestellte Medien und Puffer

Medium/Puffer	Zusammensetzung
Basismedium	RPMI 1640 ohne L-Glutamin 5 oder 10 % FKS (hitzeinaktiviert) 100 U/ml Penicillin-G-Natrium 100 µg/ml Dihydrostreptomycinsulfat 2 mM L-Glutamin 1 mM Natriumpyruvat 0,1 mM Nicht-essenzielle Aminosäuren 50 µM 2-Mercaptoethanol
EasySep-Puffer	PBS 2 % FKS (hitzeinaktiviert)
Einfriermedium	90 % FKS (hitzeinaktiviert) 10 % DMSO
10x Erythrozyten-Lysepuffer (pH 7,4)	8,25 g Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl) 1,00 g Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃) 37,0 mg Natrium-EDTA ad 100 ml H ₂ O
FACS-Puffer	PBS 2 % FKS (hitzeinaktiviert) 1 % Natriumazid (NaN ₃) 2 mM EDTA
MACS-Puffer	PBS 0,5 % FKS (hitzeinaktiviert) 2 mM EDTA

3.1.5 Kits

Tabelle 5: Verwendete Kits

Kit	Hersteller
<i>ArC Amine Reactive Compensation Bead Kit</i>	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>EasySep Mouse CD4⁺ T Cell Isolation Kit</i>	Stemcell Technologies, Vancouver, Kanada
<i>EasySep Mouse CD25 Regulatory T Cell Positive Selection Kit</i>	Stemcell Technologies, Vancouver, Kanada
<i>Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set</i>	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>IFN gamma Mouse Uncoated ELISA Kit</i>	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>IL-10 Mouse Uncoated ELISA Kit</i>	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>LIVE/DEAD Fixable Blue Dead Cell Stain Kit</i>	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

3.1.6 Antikörper

3.1.6.1 Therapeutische Antikörper

Tabelle 6: *In vivo* verwendete Antikörper

Antigen	Klon	Spezies und Isotyp	Firma
PD-1	J43	Armenischer Hamster IgG	BioXCell, West Lebanon, USA
CTLA-4	UC10-4B9	Armenischer Hamster IgG	BioLegend, San Diego, USA
IL-10	JES5-16E3	Ratte IgG2b, κ	BioLegend, San Diego, USA

3.1.6.2 Antikörper für *In-vitro*-Versuche

Die bereits genannten *in vivo* eingesetzten Antikörper wurden auch für *In-vitro*-Versuche verwendet.

Tabelle 7: *In vitro* eingesetzte Antikörper

Antigen	Klon	Spezies und Isotyp	Firma
Neuropilin-1 (Nrp-1)	761704	Ratte IgG2a	Bio-Techne, Minneapolis, USA
FcRIII	4G8	Ratte IgG2b	Plattform Monoklonale Antikörper, Helmholtz-Zentrum, München

Tabelle 8: Antikörper für die T-Zell-Stimulation *in vitro*

Antigen	Klon	Spezies	Firma
CD3	145-2C11	Armenischer Hamster	Plattform Monoklonale Antikörper, Helmholtz-Zentrum München
CD28	37N	Syrischer Hamster	Plattform Monoklonale Antikörper, Helmholtz-Zentrum München

3.1.6.3 Antikörper für durchflusszytometrische Bestimmungen

Tabelle 9: Fluoreszenz-markierte Detektionsantikörper

Antigen	Klon	Spezies und Isotyp	Konjugat	Firma
CD4	RM4-5	Ratte IgG2a, κ	PerCP	BD Biosciences/Becton Dickinson, Heidelberg
CD8a	53-6.7	Ratte IgG2a, κ	eFluor 450	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
CD8b	H35-17.2	Ratte IgG2b, κ	Alexa Fluor 488	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
CD19	1D3	Ratte IgG2a, κ	eFluor 450	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
CD19	6D5	Ratte IgG2a, κ	PerCP	BioLegend, San Diego, USA
CD25	PC61	Ratte IgG1, λ	PE	BioLegend, San Diego, USA
CD152 (CTLA-4)	UC10-4B9	Armenischer Hamster IgG	Brilliant Violet 421	BioLegend, San Diego, USA
CD152 (CTLA-4)	1B8	Armenischer Hamster IgG	PE	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
CD210 (IL-10R)	1B1.3a	Ratte IgG1, κ	PE	BioLegend, San Diego, USA
CD279 (PD-1)	RMP1-30	Ratte IgG2b, κ	APC, PE	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Foxp3	FJK-16s	Ratte IgG2a, κ	Alexa Fluor 700, eFluor 450, eFluor 660	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Helios	22F6	Armenischer Hamster IgG	FITC	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
IFN-γ	XMG1.2	Ratte IgG1, κ	FITC	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
IFN-γ	XMG1.2	Ratte IgG1, κ	APC	BioLegend, San Diego, USA
IL-10	JES5-16E3	Ratte IgG2b, κ	PE	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Ki-67	SolA15	Ratte IgG2a, κ	Alexa Fluor 700	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
NK1.1	PK136	Maus IgG2a, κ	PE	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Nrp-1	3E12	Ratte IgG2a, κ	PE	BioLegend, San Diego, USA
Semaphorin-4a (SEMA4A)	5E3	Maus IgG1, λ	APC	BioLegend, San Diego, USA
TIGIT	GIGD7	Ratte IgG2a, κ	PE-Cy7	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Tabelle 10: Fluoreszenz-markierte Isotypkontrollen

Klon	Spezies und Isotyp	Konjugat	Firma
HTK888	Armenischer Hamster IgG	BrVio420	BioLegend, San Diego, USA
eBio299Arm	Armenischer Hamster IgG	FITC	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
R3-34	Ratte IgG1, κ	PE	BD Biosciences/Becton Dickinson, Heidelberg
eBR2a	Ratte IgG2a, κ	PE-Cy7	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
eBR2a	Ratte IgG2a, κ	AF700	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
eB149/10H5	Ratte IgG2b, κ	PE	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
A95-1	Ratte IgG2b, κ	APC	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

3.1.7 Murine rekombinante Zytokine

Tabelle 11: In *In-vitro*-Versuchen verwendete murine rekombinate Zytokine

Zytokin	Quelle	Firma
Rekombinantes IL-2 (rIL-2)	Escherichia coli	PeproTech, Hamburg
Rekombinantes IL-10 (rIL-10)	Escherichia coli	PeproTech, Hamburg

3.1.8 Peptide zur spezifischen T-Zell-Stimulation *in vitro*

Wie in [Ahmetlić et al. \(2019\)](#) beschrieben, konnten MHC-II-bindende Lymphom-assoziierte Selbstpeptide identifiziert werden, die sowohl von CD4⁺Foxp3⁺ Tregs, als auch von CD4⁺Foxp3⁻ T-

Effektorzellen (Teffs) über den T-Zell-Rezeptor detektiert werden. Die vier nachfolgend aufgeführten Peptide wurden zur spezifischen T-Zellstimulation für *In-vitro*-Assays verwendet (alle Metabion, Planegg).

Tabelle 12: Im Peptidmix zur spezifischen T-Zell-Stimulation enthaltene Peptide

Peptid	Gen	Codiertes Protein	Synthetisierte Peptid-Kernsequenz
Peptid 3	Trim28	Transcription intermediary factor 1-beta	LERLDLTLSDSQPPVF
Peptid 7	Mta2	Metastasis-associated protein MTA2	VRPPVPLPASSHPASTNEPIVLED
Peptid 8	Telo2	Telomere length regulation protein TEL2 homolog	EAVLTGLVEA
Peptid 10	Fxyd5	FXYP domain-containing ion transport regulator 5	RIEPLSPSKN

3.1.9 Primer

Alle Primer wurden von Metabion, Planegg, bezogen.

Tabelle 13: Für die Genotypisierung mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendete Primerpaare

Primerpaar	Zielgen	Fragmentgröße (Basenpaare)	Funktion	Sequenz
B29-18F B29-9R	<i>Cd79b</i>	≈ 300 bp	Mauspezifisches Haushaltsgen, interne Kontrolle	GTGGCACGGAAGCTTCTAGTC CTTGTCAAGTAGCAGGAAGA
E2 intfwd 12 rev	<i>c-MYC</i>	≈ 450 bp	Identifizierung der λ -MYC-Mäuse	GCTCGTCTCAGAGAAGCTGG ATCTCTCCAGATCTGCTATCTC
P442 P443	<i>DTReGFP</i>	≈ 500 bp	Identifizierung der DREG-Mäuse	CCCAGGTTACCATGGAGAGA GAACTTCAGGGTCAGCTTGC

3.1.10 Software

Tabelle 14: Verwendete Software

Methode	Software	Firma
Durchflusszytometrie	BD FACSDiva FlowJo v10.6.2	Becton Dickinson, Heidelberg

<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)</i>	Magellan 7.2	Tecan Group, Männedorf, Schweiz
Graphik	Adobe Illustrator CS5	Adobe Systems, San José, USA
Graphik und Statistik	GraphPad Prism 8	Graphpad Software Inc., La Jolla, USA
Multiplex	Bio-Plex Manager 6.1	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Text	MS Office, Word 2013	Microsoft, Redmond, USA

3.2 Methoden

3.2.1 Genotypisierung der Mäuse

Beim Absetzen erhielten die Mäuse Ohrlochmarkierungen, das dabei anfallende Gewebestückchen wurde für die Genotypisierung mittels PCR weiterverwendet. Dafür wurde es zunächst über Nacht bei 55 °C in Lyseagenz (200 µl) und Proteinase K (0,3 mg/ml) im Heizschüttler lysiert. Es folgte eine 45-minütige Inkubation bei 85 °C und die eigentliche PCR im Thermocycler.

Tabelle 15: Reagenzien und Temperaturverlauf der PCR zur Genotypisierung der λ-MYC-Mäuse

Mastermix		Temperaturverlauf im Thermocycler	
10x Reaction Buffer	5 µl	94 °C	4 min
50 mM MgCl ₂	2 µl	94 °C	45 s
10 mM dNTP Mix	1 µl	58 °C	30 s
Taq Polymerase	0,3 µl	72 °C	1 min 30 s
100 µM Primer E2 fwd	0,5 µl	72 °C	10 min
100 µM Primer 12 rev	0,5 µl	4 °C	Pause
100 µM Primer B29-18F	0,5 µl		
100 µM Primer B29-9R	0,5 µl		
H ₂ O, steril	38,2 µl		
DNA	1,5 µl		

} 35 Zyklen

Tabelle 16: Reagenzien und Temperaturverlauf der PCR zur Genotypisierung der DEREK-Mäuse

Mastermix		Temperaturverlauf im Thermocycler	
10x ThermoPol Reaction Buffer	2,5 µl	94 °C	5 min
10 mM dNTP Mix	0,5 µl	94 °C	1 min
Taq Polymerase	0,4 µl	60 °C	1 min
100 µM Primer P442	0,25 µl	72 °C	1 min
100 µM Primer P443	0,25 µl	72 °C	10 min
H ₂ O, steril	20,6 µl	4 °C	Pause
DNA	0,5 µl		

} 32 Zyklen

Im Anschluss wurden die PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese (λ -MYC: 2 %-iges Agarose-Gel, DEREK: 1,6 %-iges Agarose-Gel) aufgetrennt und die jeweiligen Genotypen ermittelt (Abbildung 1). Für die λ -MYC/DEREG-Nachkommen wurde sowohl eine MYC-PCR, als auch eine DEREK-PCR durchgeführt.

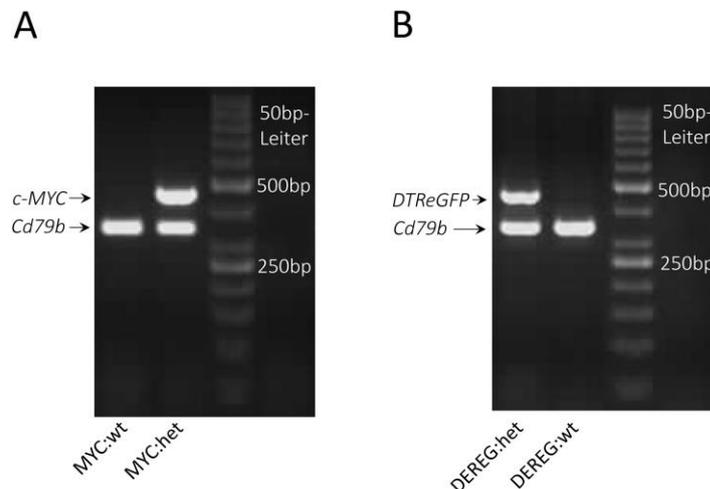


Abbildung 1: Genotypisierung von λ -MYC- und DEREK-Mäusen. (A) Exemplarisches Ergebnis einer Gelelektrophorese nach MYC-PCR. In der ersten Spur ist das Ergebnis einer WT-Maus, die nur das Amplikon des Maus-spezifischen Haushaltsgens *Cd79b* bei 300 bp zeigt. Die zweite Spur von einer heterozygoten λ -MYC-Maus weist daneben das Amplikon des humanen *c-MYC* bei 450 bp auf. (B) Exemplarisches Ergebnis einer Gelelektrophorese nach DEREK-PCR. In der ersten Spur ist das Ergebnis einer heterozygoten DEREK-Maus, die neben dem Amplikon von *Cd79b* bei 300 bp das Amplikon des DTReGFP-Fusionsproteins bei 500 bp zeigt. Die zweite Spur einer WT-Maus weist nur das Amplikon von *Cd79b* bei 300 bp auf. Es wurde jeweils eine 50 bp-Leiter verwendet. Die Genotypisierungen wurden von A. Geishauer durchgeführt.

3.2.2 Zellkultur und Zelllinien

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter Sterilwerkbänken durchgeführt. Die B-Zell-Lymphom-Zelllinie 291 ist ursprünglich von C. Brenner aus kranken λ -MYC-Mäusen generiert worden. Nach dem Auftauen wurden die Zellen in Basismedium mit 5 % FKS im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit in Kultur gehalten. Als Suspensionszelllinie wurde sie alle zwei Tage im Verhältnis 1 : 10 mit frischem Medium versetzt.

3.2.3 Blut-Aufbereitung und Herstellung einer Einzelzellsuspension aus lymphoiden Organen

Blut wurde *post mortem* aus der *Vena cava* entnommen. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Sollten auch die zellulären Bestandteile analysiert werden, wurde das Zellpellet weiter aufbereitet. Auf eine zweiminütige Inkubation mit Erythrozyten-Lysepuffer folgten zwei Waschschrte mit PBS und die Zellzahlbestimmung mithilfe der Neubauer-Zählkammer. Die Zellen wurden direkt verwendet.

Die Milz sowie gegebenenfalls mandibuläre, axilläre, inguinale LK und/oder Thymus wurden entnommen und durch ein Sieb (Porengröße: 40 µm) in RPMI-Medium gedrückt. Die erhaltenen Zellen wurden zwei Minuten mit Erythrozyten-Lysepuffer inkubiert, zweimal mit PBS gewaschen und residuale Gewebsfragmente durch Filtration (Porengröße: 35 µm) entfernt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte im Anschluss mithilfe der Neubauer-Zählkammer. Sofern nicht direkt weiterverwendet, wurden die Zellen bei -80 °C eingefroren ($2 - 10 \times 10^7 / 1,8$ ml Einfriermedium).

3.2.4 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie, auch als FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*, Markenname von Becton Dickinson) abgekürzt, dient als Messmethode zur Identifizierung und Quantifizierung zellulärer Oberflächenantigene und intrazellulärer Moleküle. Sie beruht auf der Markierung der Zielstrukturen mit spezifischen Fluorochrom-gekoppelten monoklonalen Antikörpern (mAk), welche dann am Gerät detektiert werden können. Alle Messungen wurden am *BD LSR II Flow Cytometer* durchgeführt. Die generierten Daten wurden mit der *FlowJo*-Software ausgewertet. Es wurden zunächst die Lymphozyten eingegrenzt und im Anschluss Dubletten sowie tote Zellen ausgeschlossen. Abbildung 2 zeigt exemplarisch die Gating-Strategie für CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen einer WT- (Abbildung 2A) sowie einer tumorösen λ-MYC-Milz (Abbildung 2B). B-Zellen wurden als CD19⁺- und NK-Zellen als NK1.1⁺CD19⁻ Zellpopulation eingegrenzt.

Für die Oberflächenfärbung (OF) wurden die zu untersuchenden Zellen (1×10^6 pro 50 µl PBS) mit den entsprechenden mAK sowie dem Lebend-Tot-Farbstoff (*LIVE/DEAD[®] Fixable Blue Dead Cell Stain Kit*) für 30 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Die optimale Antikörperkonzentration wurde für jeden neuen Antikörper zunächst austitriert. Zur Erfassung intrazellulärer Moleküle, wie der Transkriptionsfaktoren Foxp3 und Helios oder des nukleären Antigens Ki-67, wurden die Zellen im nächsten Schritt für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln fixiert und dann permeabilisiert (*Foxp3/Transkription Factor Staining Buffer Set*). Die Intrazellulärfärbung (IC) erfolgte mit den zugehörigen mAk in 50 µl Permeabilisierungspuffer für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Im Anschluss wurden die Zellen gewaschen, in 150 µl FACS-Puffer aufgenommen und vermessen. Als Kontrollen dienten passende Isotypen- oder FMO-Färbungen (*Fluorescence Minus One*).

Die Detektion intrazellulärer Zytokine (IL-10, IFN-γ) erfordert eine der FACS-Färbung vorangehende Stimulation. Dazu wurden die Zellen zunächst mit 1 µg/ml PMA, 1 µg/ml Ionomycin und 3 µg/ml Brefeldin A in Basismedium (10 % FKS) für 4 h im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit stimuliert. Die Negativkontrolle wurde gleichermaßen behandelt, jedoch lediglich mit Brefeldin A in Basismedium (10 % FKS) inkubiert. Die sich anschließende FACS-Färbung wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

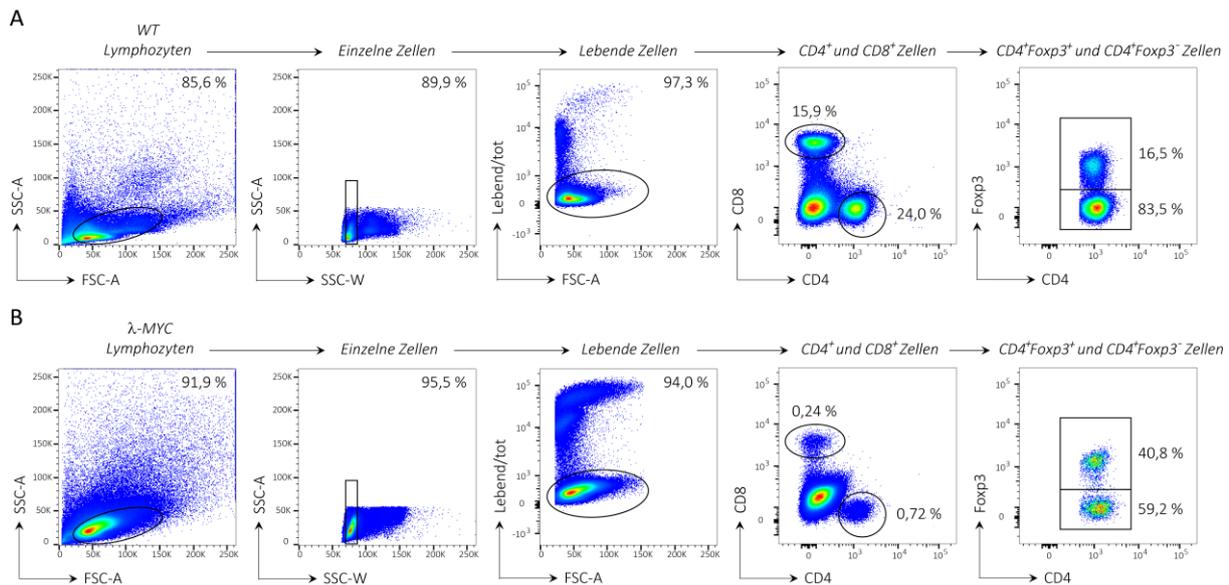


Abbildung 2: Gating-Strategie von T-Zellen bei der durchflusszytometrischen Analyse. Exemplarische Plots der Splenozyten einer WT-Maus (**A**) und einer tumortragenden λ -MYC-Maus (**B**). Nach Eingrenzung auf Lymphozyten wurden Dubletten und tote Zellen ausgeschlossen und zwischen CD8⁺ und CD4⁺ Zellen unterschieden. Die CD4⁺ Zellen wurden weiter unterteilt in CD4⁺Foxp3⁺ Tregs und CD4⁺Foxp3⁻ Teffs.

3.2.5 *In-vitro*-T-Zell-Stimulation mit α CD3/ α CD28-Antikörpern

Antikörper gegen CD3 und CD28 dienen der unspezifischen T-Zellstimulation. Hierzu wurden pro Kavität 50 μ l PBS mit α CD3/ α CD28-Antikörpern (jeweils 2 μ g/ml) in eine 96-Well-Rundbodenplatte pipettiert und diese über Nacht bei 4 °C inkubiert, dabei beschichten die Antikörper den Boden, die überstehende Lösung wurde am folgenden Tag abgesaugt. Es folgten zwei Waschschritte mit jeweils 200 μ l PBS und Basismedium (10 % FKS). In die für die unstimulierte Kontrolle vorgesehenen Wells wurden zu Beginn lediglich 50 μ l PBS gegeben, ansonsten wurden sie gleichbehandelt. Bei Platten mit einem Zweikammersystem, wurden zur Beschichtung jeweils 100 μ l der α CD3/ α CD28-Antikörperlösung pro Kammer eingesetzt. Die Waschschritte erfolgten ebenfalls mit 100 μ l pro Kammer.

3.2.6 Proliferationsbestimmung mittels *Cell Proliferation Dye*

Cell Proliferation Dye eFluor 450 (CPD) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der an alle zellulären Proteine mit primären Aminen bindet. Teilt sich die Zelle, so wird der Farbstoff gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt und die Fluoreszenzintensität halbiert sich. Dadurch können bis zu sieben Generationen mittels Durchflusszytometrie visualisiert werden. Für die Färbung wurden max. 20×10^6 Zellen in 1 ml vorgewärmten PBS aufgenommen und im Verhältnis 1 : 1 mit einer 20 μ M CPD-Lösung (ebenfalls in vorgewärmtem PBS) gemischt. Es folgte eine 20-minütige Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln mit Abstoppen der Reaktion durch Zugabe des vier- bis fünffachen Volumens an kaltem Basismedium

(10 % FKS) und anschließender fünfminütiger Inkubation auf Eis. Die gefärbten Zellen wurden dreimal mit Basismedium (10 % FKS) gewaschen und dem Versuch entsprechend eingestellt.

3.2.7 Zellanreicherung

3.2.7.1 EasySep Magnetseparation

Das Grundprinzip der EasySep Magnetseparation besteht in einer Kopplung einer/mehrerer Zielzellpopulation/en an magnetische Partikel z.B. über biotinylierte Antikörper. Die in dieser Weise markierten Zellen werden in einem Magnetfeld an den Rand des Röhrchens gezogen (= Positivfraktion), die unmarkierten Zellen können in ein neues Röhrchen überführt werden (= Negativfraktion). Die CD4⁺-Zellsortierung ist eine Negativselektion, daran lässt sich, zur Gewinnung der Tregs, eine CD25-Separation anschließen. Die CD4⁺CD25⁻ Teffs bilden dann die Negativfraktion, während die am Röhrchen verbleibenden CD4⁺CD25⁺ Tregs die Positivfraktion darstellen. Die EasySep-Sortierungen wurden gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt, die erzielten Reinheiten wurden bei Inkulturnahme stets per FACS ermittelt und sind in Abbildung 3 exemplarisch dargestellt.

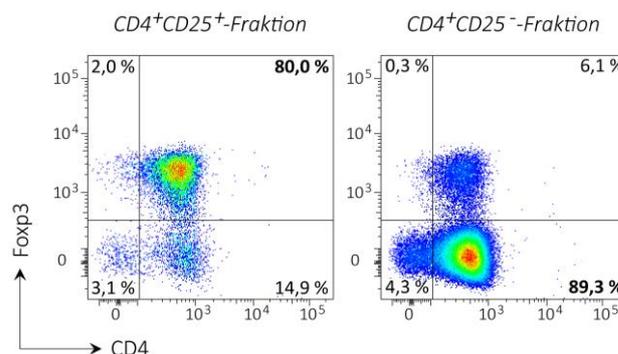


Abbildung 3: Mittels EasySep-Magnetseparation erzielte Reinheiten. Durchflusszytometrische Prüfung der CD4⁺CD25⁻- und der CD4⁺CD25⁺-Fraktion in Hinblick auf die CD4- und die Foxp3-Expression. Dargestellt sind exemplarische Plots nach Durchführung einer CD4- und einer CD25-Separation mit den Splenozyten einer WT-Maus.

3.2.7.2 MACS Separation

Das MACS-System (**M**agnetic **C**ell **S**eparation) bietet eine weitere Möglichkeit der magnetischen Zellseparation und wurde für die Positivselektion CD11c⁺ DCs verwendet. Die zu isolierenden CD11c⁺ Zellen werden spezifisch mit MicroBeads magnetisch markiert und über eine in einem magnetischen Feld platzierte Säule geschickt. Während sich die nicht markierten Zellen im Durchfluss befinden, werden die markierten Zellen zurückgehalten und können, nach Entfernen der Säule aus dem magnetischen Feld, eluiert werden. Die Sortierungen wurden den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt.

3.2.8 *In-vitro*-Ansätze

3.2.8.1 Suppressionsassay mit CD3/CD28-Stimulation

Die suppressive Kapazität der Tregs wurde mithilfe eines *In-vitro*-Suppressionsassays bestimmt. Hierzu wurden CD4⁺CD25⁺ Tregs aus WT- oder λ -MYC-Milzen und CD4⁺CD25⁻ Responderzellen aus WT-Milzen magnetisch isoliert (Abschnitt 3.2.7.1), die CD4⁺CD25⁻ Zellen CPD-markiert (Abschnitt 3.2.6) und schließlich mit den Tregs in unterschiedlichen Verhältnissen (1 : 10, 1 : 2, 1 : 1, 2 : 1, 10 : 1) unter CD3/CD28-Stimulation (Abschnitt 3.2.5) kokultiviert. Es wurde dabei pro Kavität einer 96-Well-Rundpodenplatte eine konstante Gesamtzahl von 1×10^5 Zellen in 200 μ l Basismedium (10 % FKS) eingesetzt. Nach 48 h Inkubation im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit wurde der Überstand abgenommen und für die spätere Zytokinanalyse bei -20 °C eingefroren. Die CPD-Markierung erlaubte eine Visualisierung sowie Quantifizierung der erfolgten Zellteilungen mittels Durchflusszytometrie, wobei in der Auswertung die CPD⁺CD4⁺Foxp3⁻ Teffs eingegrenzt wurden. Teffs mit einer gegenüber der unstimulierten Kontrolle verminderten CPD-Fluoreszenzintensität (CPD^{dil}) hatten mindestens eine Zellteilung durchlaufen. Durch Bezug auf die maximale Teff-Proliferation, d.h. die in Abwesenheit von Tregs (0:1), ließ sich daraus die prozentuale Suppression errechnen:

$$\% \text{ Suppression} = \frac{\% \text{ CPD}^{\text{dil}} \text{ Teffs (0:1)} - \% \text{ CPD}^{\text{dil}} \text{ Teffs (jeweiliges Verhältnis)}}{\% \text{ CPD}^{\text{dil}} \text{ Teffs (0:1)}} \times 100 \%$$

Zur Ermittlung des Einflusses von Zellkontakten wurde der Suppressionsassay in einem Doppelkammersystem durchgeführt. Ein solcher Ansatz erfolgte nach dem gleichen Vorgehen, allerdings verhinderte eine Membran direkte Zellkontakte zwischen den Tregs und den Teffs, der Austausch humoraler Faktoren blieb unbeeinflusst. Um eine gleiche Stimulation zu gewährleisten, wurden beide Kammern mit α CD3/ α CD28-Antikörpern beschichtet. Je nach Fragestellung war das Medium mit α IL-10 (0,1 μ g/ml) oder α Nrp-1 (1 μ g/ml) versetzt. Die Antikörper hatten in Ansätzen ohne Tregs keine Auswirkungen auf das Proliferationsverhalten der Teffs.

3.2.8.2 Suppressionsassay mit Peptidstimulation

Tregs und CPD-markierte Teffs wurden wie in Abschnitt 3.2.8.1 in den genannten Verhältnissen eingesetzt. Die Stimulation erfolgte jedoch Peptid-spezifisch mithilfe von APCs. Dazu wurden CD11c⁺ DCs magnetisch aus WT-Milzen isoliert (Abschnitt 3.2.7.2), bestrahlt (30 Gy) und durch eine dreistündige Inkubation mit einem Peptidmix beladen. Dieser bestand aus vier Lymphom-assoziierten Selbstpeptiden, die von Tregs, als auch von Teffs erkannt werden (Ahmetlić et al. 2019). Die Peptide LERLDLDTSDSQPPVF, VRPPVPLPASSHPASTNEPIVLED, EAVLTGLVEA und RIEPLSPSKN wurden zu je

1 µg/ml in Basismedium mit 10 % FKS eingesetzt, als Kontrolle wurden DCs unter gleichen Bedingungen, aber in Abwesenheit der Peptide inkubiert.

Insgesamt wurden pro Kavität einer 96-Well-Rundbodenplatte $1,5 \times 10^5$ T-Zellen mit 2×10^4 DCs in 200 µl Basismedium (10 % FKS) unter Zusatz von 50 U/ml rIL-2 kokultiviert. Nach sechs Tagen Inkubation im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit wurde die erfolgte Proliferation über die Ki-67-Expression der CPD-markierten CD4⁺Foxp3⁻ Teffs durchflusszytometrisch bestimmt. Die prozentuale Suppression wurde wie folgt berechnet:

$$\% \text{ Suppression} = \frac{\% \text{ Ki-67}^+ \text{ Teffs (0:1)} - \% \text{ Ki-67}^+ \text{ Teffs (jeweiliges Verhältnis)}}{\% \text{ Ki-67}^+ \text{ Teffs (0:1)}} \times 100 \%$$

Gegebenenfalls war das Medium mit Antikörpern gegen PD-1 (1 µg/ml) und CTLA-4 (10 µg/ml) versetzt.

3.2.8.3 *In-vitro*-Inkubation tumoröser B-Zellen mit rIL-10

Die Zellsuspensionen tumoröser Milzen wurden entweder mit rIL-10 (10 ng/ml) oder in Anwesenheit eines αIL-10-Antikörpers (1 µg/ml) inkubiert. In Ansätzen zur Bestimmung der Gesamtzellzahl wurden pro Kavität 1×10^5 Zellen in 200 µl Basismedium (10 % FKS) eingesetzt (96-Well-Rundbodenplatte), für FACS-Färbungen 1×10^6 Zellen in 1000 µl Basismedium (10 % FKS) (48-Well-Flachbodenplatte). Nach 24-stündiger Inkubation im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit wurde entweder die Gesamtzellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt oder die Zellen wurden durchflusszytometrisch analysiert.

3.2.9 Zytokinbestimmungen

3.2.9.1 Zytokinbestimmung mittels ELISA

Mittels ELISA lassen sich Zytokinkonzentrationen beispielsweise in Zellkulturüberständen bestimmen. Hierfür wird eine ELISA-Platte mit Fangantikörpern, die gegen das zu bestimmende Zytokin gerichtet sind, beschichtet. Unspezifische Bindungsstellen werden blockiert und die Standardverdünnungsreihe, die Proben sowie die Negativkontrollen aufgetragen. Der Fangantikörper bindet sein Ziel-Zytokin, ungebundene Antigene werden durch Waschen entfernt. Im nächsten Schritt werden für das Zytokin spezifische Detektionsantikörper hinzugefügt, über die ein Enzym (Streptavidin-HRP) gekoppelt wird. Durch Zugabe eines Substrates kommt es zu einer Farbreaktion, die nach Abstoppen der Reaktion (3 M HCl), photometrisch erfasst wird. Mithilfe der gemessenen Absorption und der Standardreihe kann die

sich in der Probe befindliche Zytokin-Konzentration berechnet werden. Die abgenommenen Zellkulturüberstände aus Abschnitt 3.2.8.1 wurden gemäß Herstellerprotokoll auf die enthaltenen IL-10- und IFN- γ -Konzentrationen untersucht.

3.2.10 *In-vivo*-Versuche

Alle Tierversuche waren von der Regierung von Oberbayern genehmigt und erfolgten im Einklang mit den tierschutzrechtlichen Bestimmungen.

3.2.10.1 Krankheitsstadien von λ -MYC-Mäusen

Bei unbehandelten Tieren wurden zwei Krankheitsstadien unterschieden. Als frühes Krankheitsstadium wurden phänotypisch unauffällige Mäuse im Alter von 65-75 Tagen definiert. In diesem Zeitintervall sind bereits vor dem Auftreten manifester Tumoren Veränderungen auf zellulärer Ebene zu verzeichnen (Naujoks et al. 2014; Ma et al. 2021). Sobald eine Maus auffällig war, wurde sie bezüglich ihres Erscheinungsbildes beurteilt und bei Erreichen eines Abbruchscores umgehend getötet (vgl. Abschnitt 3.1.1). Waren bei der Sektion Tumoren – unabhängig von Manifestationsort und Alter der Mäuse – visuell erfassbar, wurden sie dem späten Krankheitsstadium zugeordnet (Abbildung 4A).

3.2.10.2 Therapie mit α PD-1/ α CTLA-4-Antikörpern

Durch die Therapie mit α PD-1/ α CTLA-4-Antikörpern zeigen λ -MYC-Mäuse ein signifikant verlängertes Überleben (Brenner et al. 2020; Ahmetlić et al. 2021). Um den Einfluss der Immunkontrollpunkt-Inhibition auf die Tregs zu analysieren, wurde klinisch unauffälligen λ -MYC-Mäusen eine Kombination aus α PD-1- und α CTLA-4-Antikörpern (jeweils 100 μ g in 200 μ l PBS) intraperitoneal (i. p.) gespritzt. Beginnend mit dem 55. Lebenstag erfolgte die insgesamt viermalige Antikörpergabe alle zehn Tage. Aufgrund der Aggressivität des Tumormodells ist ein späterer Behandlungsbeginn (nach dem Auftreten von Symptomen) nicht möglich. Es wurden behandelte Mäuse mit apparenten Tumoren und unbehandelte tumortragende Kontrolltiere verglichen. Zur Beurteilung der Immunreaktion in der Frühphase der Therapie erfolgte die Analyse bereits nach zweimaliger Antikörpergabe im Vergleich zu unbehandelten λ -MYC-Mäusen vergleichbaren Alters (Abbildung 4B).

3.2.10.3 Therapieversuch mit α IL-10-Antikörpern

Für den Überlebensversuch wurde klinisch unauffälligen λ -MYC-Mäusen ein IL-10-neutralisierender Antikörper (100 μ g in 200 μ l PBS) i. p. gespritzt. Beginnend mit dem 55. Lebenstag erfolgte die insgesamt viermalige Antikörpergabe alle zehn Tage. Zur Analyse der Tumor-infiltrierenden Immunzellen wurden die im Überlebensversuch eingesetzten behandelten Mäuse mit unbehandelten

tumortragenden Kontrolltieren verglichen. Zur Beurteilung der Immunreaktion in der Frühphase der Therapie wurden die Tiere bereits nach zweimaliger Antikörpergabe im Vergleich zu unbehandelten λ -MYC-Mäusen vergleichbaren Alters analysiert (Abbildung 4C).

3.2.10.4 Spezifische Treg-Depletion

Die spezifische Treg-Depletion führt bei λ -MYC/DEREG-Mäusen zu einem signifikant verlängerten Überleben (Ahmetlić et al. 2019). Um zu analysieren, welche Zellpopulationen von der Abwesenheit der Tregs profitieren, wurden die Tregs durch i. p.-Injektionen von DT in λ -MYC/DEREG-Mäusen spezifisch depletiert. Die DT-Gabe (0,5 μ g in 100 μ l PBS) erfolgte in zwei Zyklen im Abstand von zwei Wochen an jeweils zwei aufeinanderfolgenden Tagen (Tag 50/51, Tag 64/65). Da ein weiterer DT-Zyklus die Tregs nicht mehr effizient deletiert (Lahl & Sparwasser 2011; Riedel 2013), wurden die Tiere am dritten Tag nach dem zweiten Zyklus abgetötet und die Milzen analysiert (Abbildung 4D).

3.2.10.5 Spezifische Treg-Depletion in Kombination mit IL-10-Neutralisierung

Für die spezifische Treg-Depletion in Kombination mit der IL-10-Neutralisierung wurden die Tregs von λ -MYC/DEREG-Mäusen wie in Abschnitt 3.2.10.4 mittels DT-Injektionen deletiert, zusätzlich wurde an den Tagen 51, 58 und 65 ein IL-10-neutralisierender Antikörper gespritzt (Abbildung 4E). Die an den Tagen 51 und 65 zusammenfallenden Injektionen wurden zeitlich getrennt. Als Vergleichsgruppe dienten λ -MYC/DEREG-Mäuse, die lediglich die zwei DT-Zyklen erhielten.

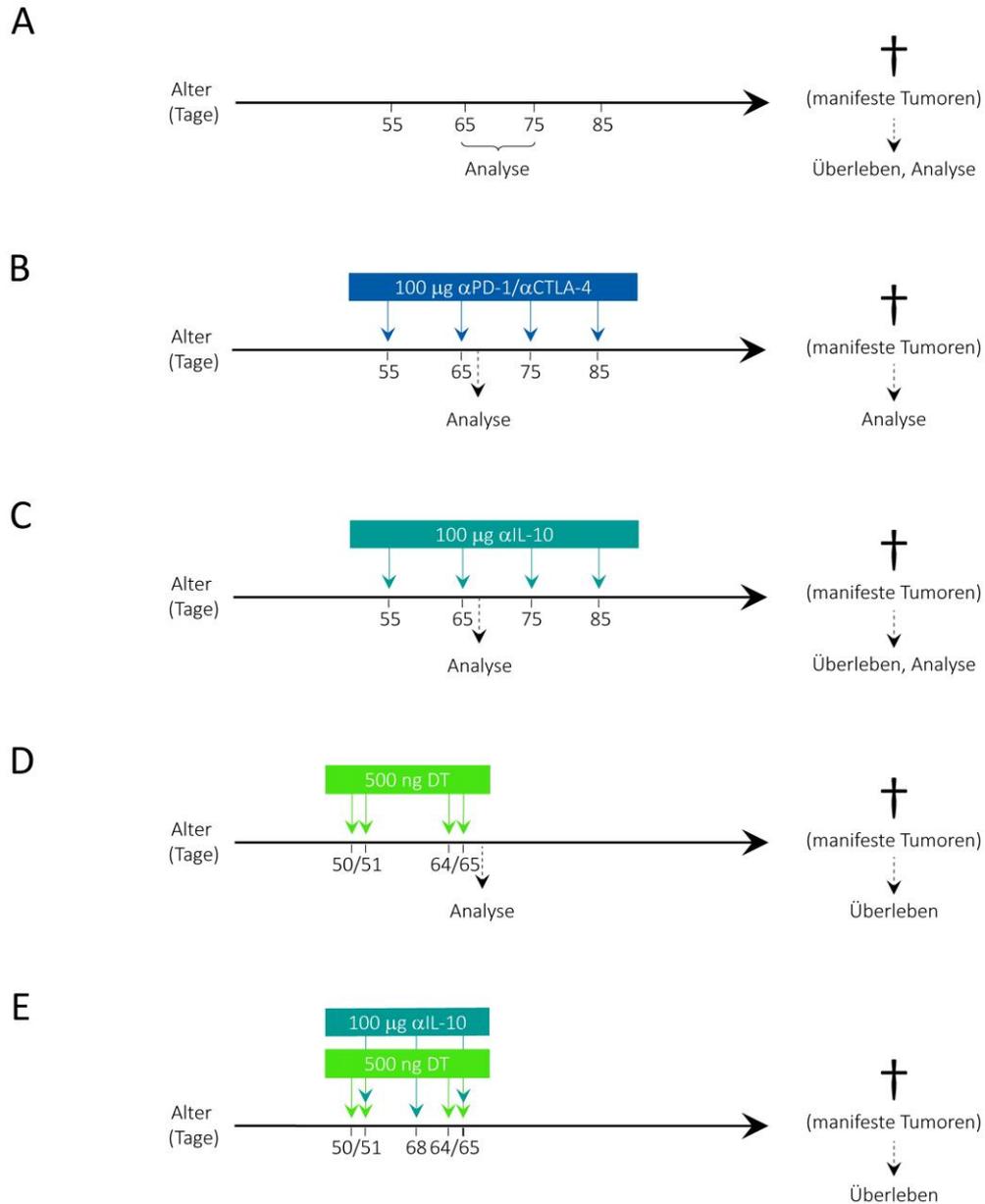


Abbildung 4: Therapieschemata der *In-vivo*-Versuche. (A) Analysezeitpunkte der unbehandelten Kontrollgruppen. Therapieschemata und Analysezeitpunkte bei Therapie von λ -MYC-Mäusen mit α PD-1/ α CTLA-4 (B) oder α IL-10 (C). (D) Therapieschema und Analysezeitpunkt für die spezifische Treg-Depletion bei λ -MYC/DEREG-Mäusen. (E) Therapieschema für die spezifische Treg-Depletion unter IL-10-Neutralisierung bei λ -MYC/DEREG-Mäusen.

3.2.11 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mithilfe der *GraphPad Prism 8*-Software vorgenommen. Der Test auf Normalverteilung erfolgte mittels *Shapiro-Wilk test* und *QQ plots*. Varianzunterschiede wurden mithilfe des *F test* ermittelt. Für den Vergleich zweier voneinander abhängiger Gruppen wurde der *Paired t test*, für zwei voneinander unabhängige Gruppen der *Unpaired t test* (gegebenenfalls mit *Welch's correction* bei signifikantem Varianzunterschied) herangezogen. Bei mehr als zwei Gruppen

wurde der *Ordinary One-way ANOVA* mit anschließendem *Bonferroni's multiple comparisons test* verwendet. Bei Therapiestudien mit α PD-1/ α CTLA-4 oder α IL-10 wurden ausgewählte Gruppen untereinander verglichen. Signifikanzen von Kaplan-Meier-Diagrammen wurden mithilfe des *Log-Rank (Mantel-Cox) test* ermittelt. Graphische Darstellungen der Signifikanzen erfolgten durch folgende Markierungen:

- * $p < 0,05$
- ** $p < 0,01$
- *** $p < 0,001$

Nicht-signifikante Unterschiede wurden mit „ns“ oder nicht gesondert gekennzeichnet. Fehlerbalken wurden als SEM (*Standard Error of the Mean*) dargestellt.

4. ERGEBNISSE

4.1 Tregs im murinen λ -MYC-Lymphommodell

In λ -MYC-Tumoren ist der Treg/Teff-Quotient zugunsten der Tregs verschoben. Durch spezifische Depletionsexperimente konnte direkt gezeigt werden, dass die Abwesenheit von Tregs mit einem signifikanten Überlebensvorteil der λ -MYC-Mäuse verbunden ist und die Tregs somit die Immunevasion der endogenen Lymphome begünstigen. Bei den Tumor-infiltrierenden Tregs handelt es sich überwiegend um nTregs thymischen Ursprungs, die infolge der Erkennung unmutierter, jedoch in Lymphomzellen prävalenter, MHC-II-bindender Selbstepitope aktiviert und zur Proliferation stimuliert werden, woraus wahrscheinlich der erhöhte relative Anteil der Tregs am CD4⁺-Zellkompartiment resultiert (Ahmetlić et al. 2019). Ungeklärt war, ob sich λ -MYC-Tregs hinsichtlich ihres Suppressionsvermögens von normalen WT-Tregs unterscheiden. Vor diesem Hintergrund wurden intratumorale Tregs zunächst auf phänotypische Merkmale untersucht, die mit einer immunsuppressiven Funktion assoziiert sind. Dies umfasste im Folgenden die Quantifizierung der Moleküle Foxp3, CD25, CTLA-4 und IL-10.

4.1.1 Phänotypisierung intratumoraler Tregs

4.1.1.1 Verstärkte Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3

Tregs definieren sich über den Transkriptionsfaktor Foxp3, der entscheidend für die Ausbildung ihrer suppressiven Eigenschaft ist (Hori et al. 2003; Fontenot et al. 2003). Für eine erste Einschätzung des zu erwartenden suppressiven Potenzials wurde anhand der durchflusszytometrisch erhobenen medianen Fluoreszenzintensitäten (MFI) das Ausmaß der Foxp3-Expression von λ -MYC-Tregs früher und später Krankheitsstadien im Vergleich zu WT-Tregs bestimmt. Dem frühen Krankheitsstadium wurden phänotypisch unauffällige Mäuse im Alter von 65 bis 75 Tagen zugeordnet. In diesem Zeitintervall sind bereits vor dem Auftreten manifester Tumoren Veränderungen auf zellulärer Ebene zu verzeichnen (Naujoks et al. 2014; Ma et al. 2021). Sobald Tumoren unabhängig von Manifestationsort und Alter visuell erfassbar waren, wurden die Mäuse zum späten Krankheitsstadium gezählt.

Im Laufe der Tumorentwicklung regulierten λ -MYC-Tregs Foxp3 zunehmend hoch. In frühen wie späten Krankheitsstadien war die Foxp3-Expression der λ -MYC-Tregs gegenüber der der WT-Tregs erhöht (Abbildung 5A, B). Zur Analyse der Subpopulationen wurde die Foxp3-Expression in Abhängigkeit von Helios bestimmt. Im λ -MYC-Tumormilieu zeigten die Helios⁺ nTregs im Vergleich zu den Helios⁻ iTregs eine höhere Foxp3-Expression (Abbildung 5C).

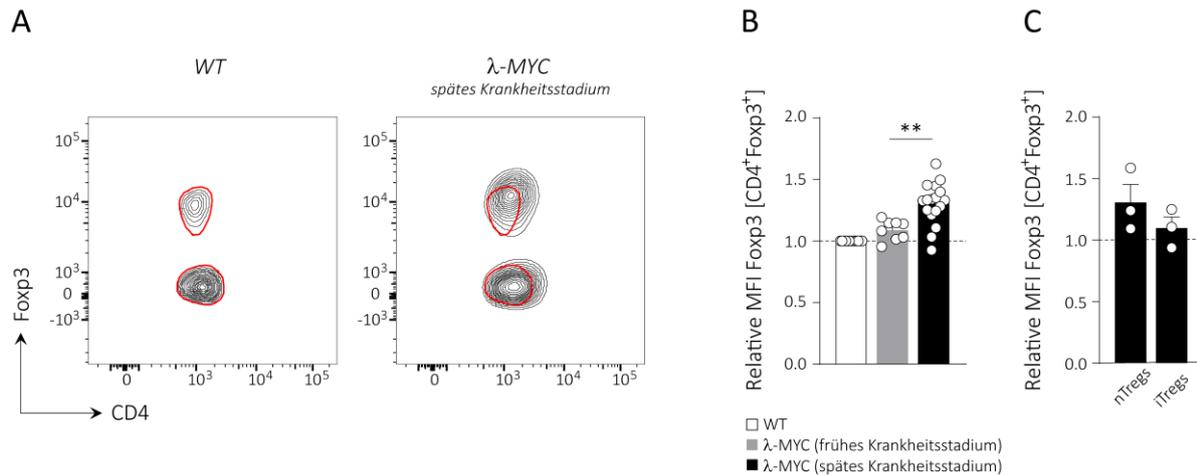


Abbildung 5: Graduelle Hochregulation der Foxp3-Expression mit dem Krankheitsverlauf. Durchflusszytometrische Analyse der Milzen von WT- und λ -MYC-Mäusen verschiedener Krankheitsstadien (Abschnitt 3.2.10.1). **(A)** Exemplarische Darstellung der Foxp3-Expression von CD4⁺ Splenozyten einer WT- und einer tumortragenden λ -MYC-Maus. **(B)** Quantitative Darstellung der relativen Foxp3-MFI von CD4⁺Foxp3⁺ Tregs, Normierung auf Foxp3-MFI von CD4⁺Foxp3⁺ WT-Tregs. **(C)** Relative Foxp3-MFI von CD4⁺Foxp3⁺ Tregs in Abhängigkeit der Subpopulationen (Helios⁺ nTregs vs. Helios⁻ iTregs), Normierung auf Foxp3-MFI von CD4⁺Foxp3⁺ WT-Tregs. Die Signifikanz wurde mithilfe des *Unpaired t test* berechnet. Darstellung der Mittelwerte einer Gruppe \pm SEM. Ein Punkt bildet den Mittelwert einer Maus ab.

4.1.1.2 Hochregulation Suppressions-assoziiierter Moleküle

Die erhöhten Foxp3-Mengen intratumoraler Tregs implizierten ein verstärktes immunsuppressives Potenzial. Zwei essenzielle Treg-assoziierte Moleküle, welche unter der transkriptionellen Kontrolle von Foxp3 stehen (Zheng et al. 2007) und mit einer immunsuppressiven Funktion in Verbindung gebracht werden, sind CD25 und CTLA-4. Ein CD25-Signal ist für das Überleben und die Aufrechterhaltung der Suppressorfunktion ausgereifter Tregs erforderlich, zudem können Tregs dem Milieu CD25-vermittelt IL-2 entziehen, das im Rahmen der T-Zellaktivierung benötigt wird (Fan et al. 2018; Chinen et al. 2016; Murphy & Weaver 2017). CTLA-4 moduliert die CD28-abhängige Kostimulation (Rowshanravan et al. 2018). Da die Treg-abhängige Suppression auch über die Sekretion anti-inflammatorischer Zytokine erfolgen kann und in Tumorüberständen und Seren tumortragender λ -MYC-Mäuse erhöhte Konzentrationen von IL-10 detektierbar sind (Naujoks et al. 2014; Brenner 2009), sollte getestet werden, ob Tregs als IL-10-Produzenten infrage kämen. Entsprechend wurde die CD25-, CTLA-4- und IL-10-Expression von WT- und λ -MYC-Tregs der verschiedenen Krankheitsstadien durchflusszytometrisch bestimmt. CTLA-4 kommt überwiegend in intrazellulären Reservoirs vor und wird nach Aktivierung an die Oberfläche transloziert (Linsley et al. 1996), weshalb für CTLA-4 sowohl die oberflächlich als auch die intrazellulär exprimierten Mengen bestimmt wurden.

Wie repräsentativ in Abbildung 6A bis C dargestellt ist, war die CD25-, die CTLA-4- und die IL-10-Expression intratumoraler λ -MYC-Tregs erhöht. Die Quantifizierung zeigte für CD25 und CTLA-4, wie

bereits für Foxp3, eine graduelle Hochregulation mit dem Krankheitsverlauf (Abbildung 6D, E), während die IL-10-Expression erst in späten Krankheitsstadien anstieg (Abbildung 6F). Wie sich IL-10 auf die Lymphomgenese auswirkt und welche Rolle dabei von den Treg sezerniertes IL-10 spielt, wird in Abschnitt 4.3 erörtert.

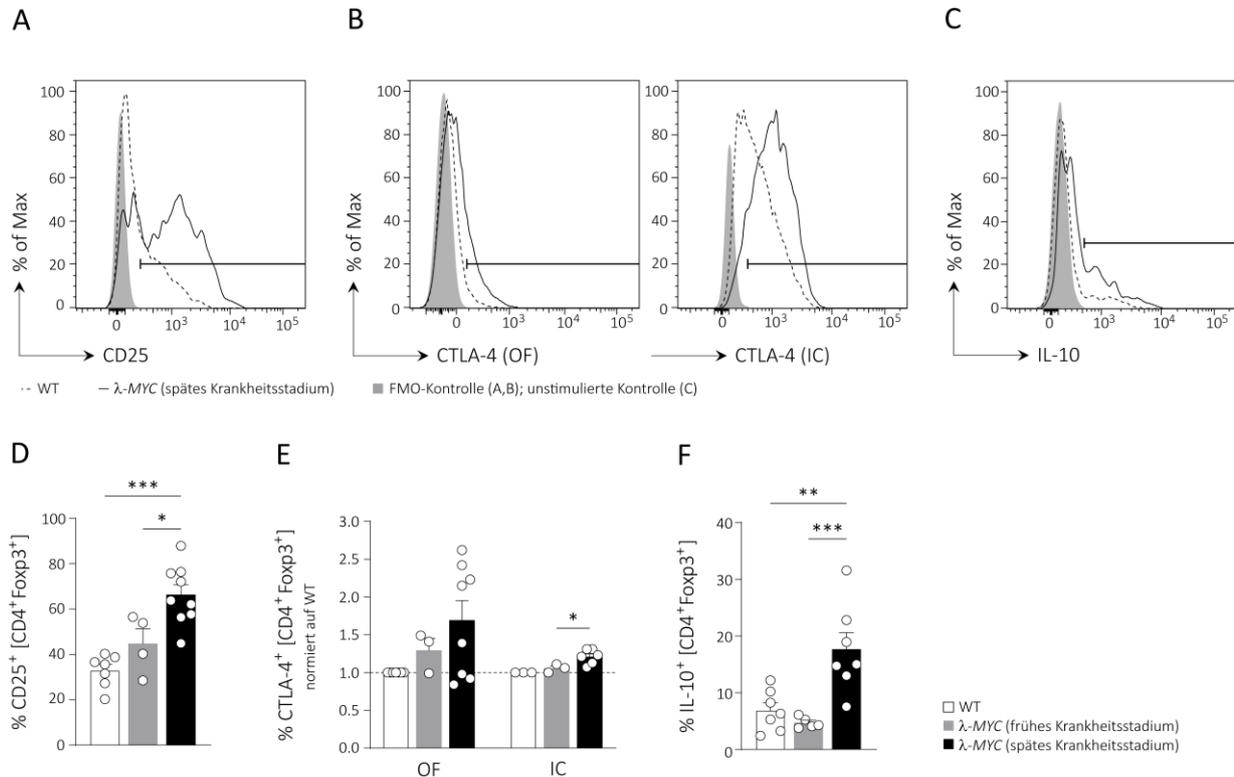


Abbildung 6: Hochregulation der CD25-, CTLA-4- und IL-10-Expression intratumoraler Tregs. Durchflusszytometrische Analyse der Milzen von WT- und λ -MYC-Mäusen verschiedener Krankheitsstadien (Abschnitt 3.2.10.1). Exemplarisches Histogramm (A) und Quantifizierung (D) der CD25-Expression auf $CD4^+Foxp3^+$ Tregs. Exemplarische Histogramme (B) sowie Quantifizierung (E) des oberflächlich und intrazellulär exprimierten CTLA-4 auf/in $CD4^+Foxp3^+$ Tregs, dargestellt nach Normierung auf die jeweilige CTLA-4-Expression von $CD4^+Foxp3^+$ WT-Tregs. Exemplarisches Histogramm (C) und Quantifizierung (F) der IL-10-Expression von $CD4^+Foxp3^+$ Tregs. Der FACS-Färbung ging eine vierstündige *Ex-vivo*-Stimulation mit PMA und Ionomycin bei 37°C voran. (D,F) Die Signifikanzen wurden mithilfe des *Ordinary One-way ANOVA (Bonferroni)* ermittelt. (E) Die Signifikanz wurde mithilfe des *Unpaired t test* ermittelt. Darstellung der Mittelwerte einer Gruppe \pm SEM. Ein Punkt bildet den Mittelwert einer Maus ab.

4.1.1.3 Stabilität intratumoraler Tregs

Tregs regulierten im Laufe der Tumorgenese verschiedene Marker hoch, die Funktionalität implizieren, gleichzeitig unterliegen sie im λ -MYC-Tumormilieu einer persistierenden Stimulation durch Lymphom-assoziierte Selbstpeptide und weisen eine hohe PD-1-Expression auf, was mit einer Destabilisierung im Sinne einer Foxp3-Reduktion oder $IFN-\gamma$ -Produktion assoziiert sein kann (Ahmetlić 2018; Riedel 2013; Ahmetlić et al. 2019; Lowther et al. 2016; Bailey-Bucktrout et al. 2013; Hoffmann et al. 2009). Da die Ergebnisse zur Rolle von PD-1 bei Tregs kontrovers diskutiert werden und vom jeweils gegebenen Milieu abhängen, wurden die PD-1-exprimierenden Tregs in λ -MYC-Lymphomen genauer charakterisiert.

Aufgrund der Intensität der PD-1-Expression konnten drei Populationen unterschieden werden, PD-1 negative ($PD-1^-$), PD-1 niedrig- ($PD-1^{low}$) und hochexprimierende ($PD-1^{high}$) Tregs (Abbildung 7A), wobei insbesondere der Anteil der $PD-1^{high}$ Tregs in λ -MYC-Tumoren erhöht war (Abbildung 7B, vgl. auch [Riedel 2013](#)). Im Gegensatz zu WT-Tregs zeigten intratumorale λ -MYC-Tregs eine Korrelation der PD-1- und Foxp3-Expression (Abbildung 7C). Trotz der ausgeprägten PD-1-Expression war bei λ -MYC-Tregs keine gegenüber den WT-Tregs erhöhte IFN- γ -Expression detektierbar (Abbildung 7D, E), somit konnten mittels Durchflusszytometrie keine Anzeichen einer Destabilisierung der $PD-1^+$ Tregs im λ -MYC-Tumormilieu festgestellt werden. Neben PD-1 und CTLA-4 wurden weitere koinhibitorische Moleküle, wie Nrp-1 und TIGIT, von intratumoralen Tregs exprimiert (Abbildung 7F), welche im Zusammenhang mit einer Stabilisierung des Treg-Phänotyps beschrieben sind ([Delgoffe et al. 2013](#); [Lucca et al. 2019](#); [Lucca & Dominguez-Villar 2020](#)).

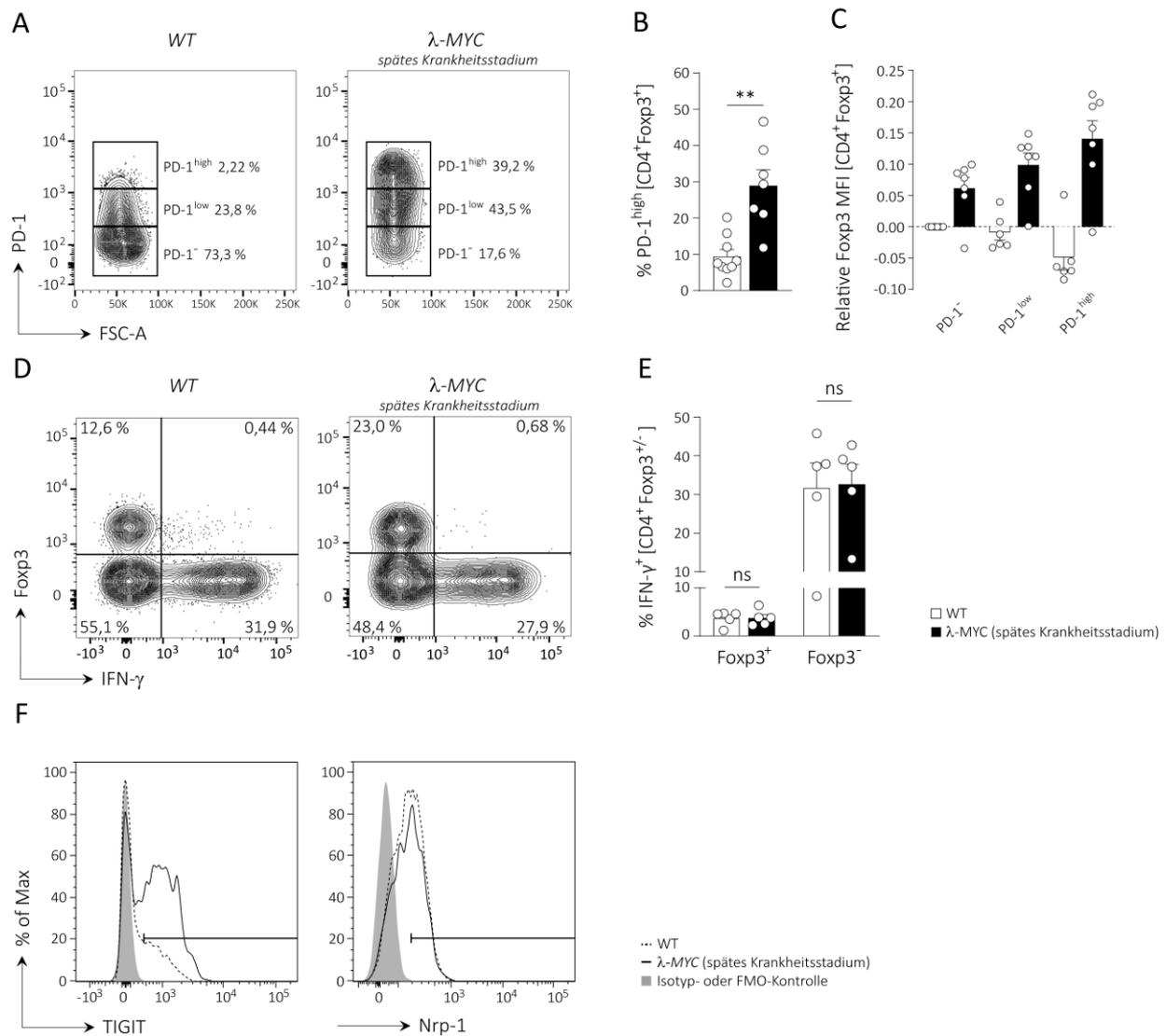


Abbildung 7: Stabilität intratumoraler λ -MYC-Tregs. Durchflusszytometrische Analyse der Milzen von WT- und tumortragenden λ -MYC-Mäusen. **(A)** Exemplarische Darstellung der Gates PD-1⁺, PD-1^{low} und PD-1^{high} der CD4⁺Foxp3⁺ Tregs einer WT- und einer λ -MYC-Maus. **(B)** Quantifizierung des Anteils PD-1-hochexprimierender CD4⁺Foxp3⁺ Tregs. Die Signifikanz wurde mithilfe des *Unpaired t test* ermittelt. **(C)** Logarithmische Darstellung der

relativen Foxp3-MFI von PD-1^{low/high}CD4⁺Foxp3⁺ Tregs, Normierung auf Foxp3-MFI von PD-1⁻CD4⁺Foxp3⁺ WT-Tregs. Exemplarische Darstellung **(D)** und Quantifizierung **(E)** der IFN- γ -Expression der CD4⁺ Splenozyten. Der FACS-Färbung ging eine vierstündige *Ex-vivo*-Stimulation mit PMA und Ionomycin bei 37°C voran. Auf Signifikanz wurde mithilfe des *Unpaired t test* getestet. **(F)** TIGIT-bzw. Nrp-1-Expression von CD4⁺Foxp3⁺ Tregs, exemplarische Histogramme aus drei Färbungen. **(B,C,E)** Darstellung der Mittelwerte einer Gruppe \pm SEM. Ein Punkt bildet den Mittelwert einer Maus ab.

4.1.2 Funktionelle Analyse *in vitro*

4.1.2.1 Verstärkte Immunsuppression infolge des zunehmenden relativen Treg-Anteils und eines erhöhten suppressiven Potenzials der λ -MYC-Tregs auf Einzelzellebene

Um die Relevanz der im λ -MYC-Tumormilieu auftretenden quantitativen und phänotypischen Veränderungen der Tregs für die Beeinträchtigung der Teff-Aktivität zu untersuchen, wurde ein standardisierter *In-vitro*-Suppressionsassay verwendet, der auf der Treg-vermittelten Hemmung der CD3/CD28-induzierten Proliferation von Teffs basiert (vgl. [Ahmetlić 2018](#)). Um näherungsweise den während der Tumorprogression zunehmenden Anteil an Tregs am CD4⁺-Zellkompartiment abzubilden, wurden CD4⁺CD25⁺ Tregs aus WT- oder λ -MYC-Milzen und CD4⁺CD25⁻ Responderzellen aus WT-Milzen mittels immunmagnetischer Zellseparation isoliert, die Responderzellen CPD-markiert und mit den Tregs (Suppressor) in unterschiedlichen Verhältnissen (Suppressor : Responder, 1:10, 1:2, 1:1, 2:1, 10:1) unter CD3/CD28-Stimulation kokultiviert (Abbildung 8A). Die CPD-Färbung erlaubte eine Visualisierung sowie Quantifizierung der erfolgten Zellteilungen mittels Durchflusszytometrie.

Ein steigender Treg-Anteil führte bereits bei Einsatz von WT-Tregs zu einem zunehmend eingeschränkten Proliferationsvermögen der Teffs (Abbildung 8B, C). Indem sich in λ -MYC-Tumoren der Treg/Teff-Quotient zugunsten der Tregs verschiebt, kann es somit auch bei unveränderter suppressiver Kapazität zu einer verstärkten Suppression durch die Tregs kommen. Da im vorherigen Kapitel die phänotypischen Veränderungen eine verstärkte immunsuppressive Funktion der λ -MYC-Tregs anzeigten, wurden im nächsten Schritt WT- und λ -MYC-Tregs hinsichtlich ihres Suppressionsvermögens miteinander verglichen. In beiden Fällen dienten CD4⁺CD25⁻ Zellen aus Wildtypen als Responderzellen, sodass die Tregs die einzige Variable darstellten. Die λ -MYC-Tregs repräsentierten ein frühes Krankheitsstadium, zeigten sich aber bei hohem Anteil signifikant suppressiver als WT-Tregs (Abbildung 8C). Zudem waren in den Überständen der Kokulturen mit λ -MYC-Tregs gegenüber denjenigen mit WT-Tregs geringere Konzentrationen von IFN- γ detektierbar (Abbildung 8D). Darauf basierend, dass WT- sowie λ -MYC-Tregs praktisch kein IFN- γ exprimierten (Abbildung 7D, E), waren die von den Responderzellen sezernierten IFN- γ -Mengen reduziert. Somit ist im λ -MYC-Tumormilieu neben dem verstärkt suppressiven Effekt durch den erhöhten relativen Anteil der Tregs auch eine stärkere Suppression auf Einzelzellebene zu erwarten.

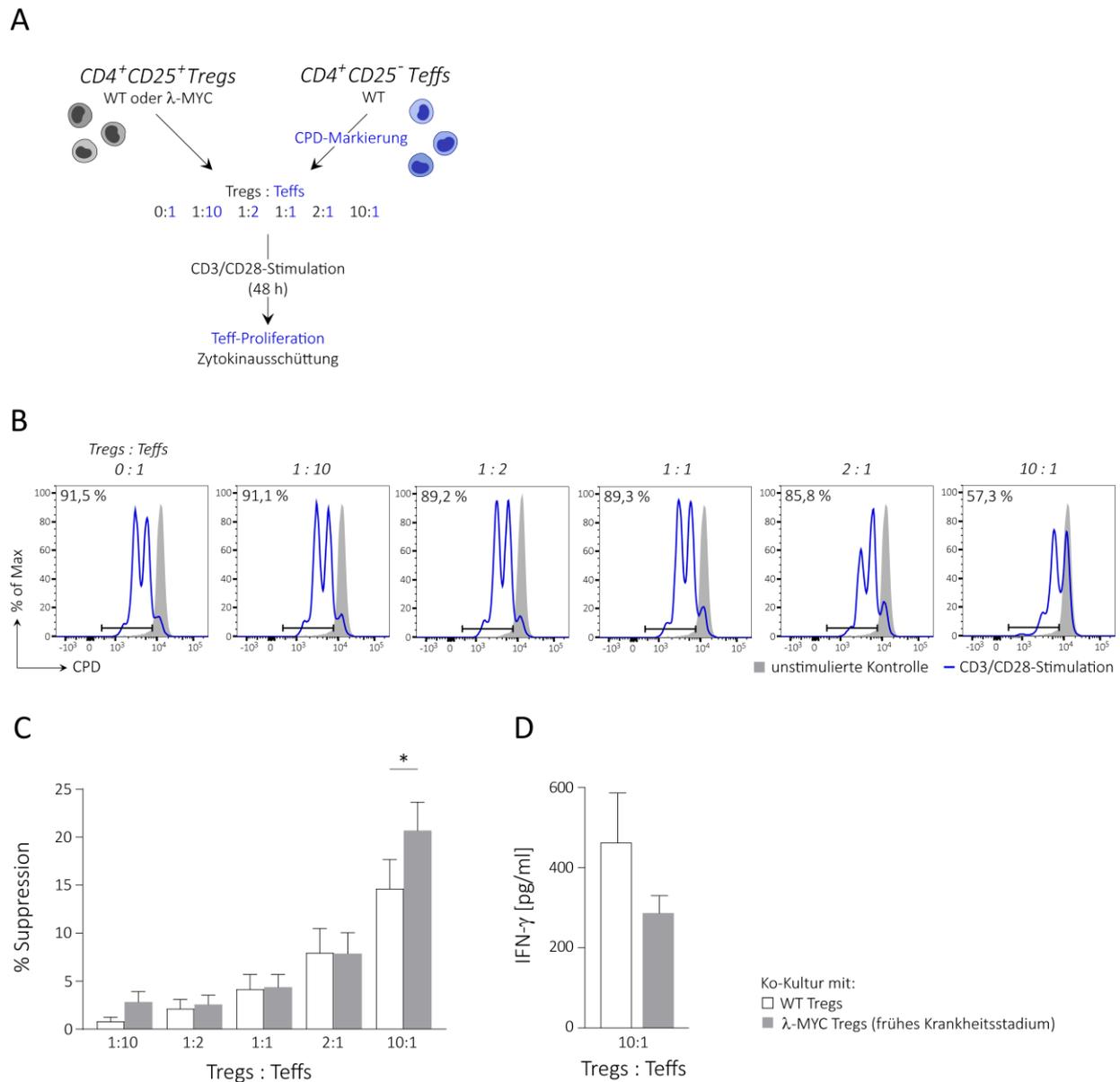


Abbildung 8: Verstärkte Immunsuppression infolge des zunehmenden relativen Treg-Anteils und eines erhöhten suppressiven Potenzials der λ-MYC-Tregs auf Einzelzebene. Funktionelle Analysen *in vitro*. **(A)** Schematische Darstellung des *In-vitro*-Suppressionsassays. **(B)** Exemplarische durchflusszytometrische Analyse eines Suppressionsassays mit WT-Zellen. Gezeigt sind die Histogramme der CPD-markierten $CD4^+Foxp3^-$ Teffs in den unterschiedlichen Kokulturen. Eingegrenzt wurden die Teffs mit einer gegenüber der unstimulierten Kontrolle verminderten CPD-Intensität. **(C)** Darstellung der prozentualen Suppression (vgl. Abschnitt 3.2.8.1) durch Tregs aus WT- und λ-MYC-Mäusen in den unterschiedlichen Kokulturen. Zusammengefasste Daten aus sieben Versuchen. Die Signifikanz wurde mithilfe des *Paired t test* berechnet. **(D)** Mittels ELISA gemessene IFN-γ-Konzentrationen der Zellkulturüberstände von Kokulturen mit WT- und λ-MYC-Tregs bei einem Treg/Teff-Verhältnis von 10:1. Zusammengefasste Daten aus drei Versuchen. Darstellung der Mittelwerte einer Gruppe \pm SEM.

4.1.2.2 Analyse immunsuppressiver Mechanismen *in vitro*

Um der Frage nachzugehen, welche Mechanismen der Treg-vermittelten Suppression zugrundeliegen, wurde zunächst getestet, ob die *in vitro* beobachtete Suppression über Zellkontakte vermittelt wurde. Hierfür wurde der Suppressionsassay nach dem bisherigen Schema, jedoch in einem

Doppelkammersystem durchgeführt. Eine Membran verhinderte dabei direkte Zell-Zell-Interaktionen zwischen den beiden Populationen, während der Austausch löslicher Faktoren möglich blieb.

In dem Doppelkammersystem war eine im Vergleich zur Einzelkammer verminderte Suppression zu verzeichnen (Abbildung 9A). Da der Suppressionsassay auf der Messung der CD3/CD28-induzierten Proliferation in Abwesenheit von APCs beruht, deutete es darauf hin, dass ein Teil der Suppression von direkten Treg-Teff-Interaktionen abhängig ist. Für die weitere Analyse wurde das Interaktionspaar Nrp-1/SEMA4A in Betracht gezogen, da intratumorale Tregs Nrp-1 (Abbildung 7F) exprimierten und Teffs SEMA4A im Tumormilieu signifikant hochregulierten (Anhang). Entsprechend wurde der Suppressionsassay in Gegenwart eines Nrp-1-neutralisierenden Antikörpers durchgeführt, was in einer verringerten Suppression resultierte, wobei jedoch kein solcher Rückgang wie in der Doppelkammer erreicht werden konnte (Abbildung 9B).

Die verbleibende Suppression in der Doppelkammer zeigte, dass neben Zellkontakten humorale Faktoren an der Treg-abhängigen Suppression beteiligt sind. Aufgrund der in Abschnitt 4.1.1.2 beschriebenen erhöhten IL-10-Expression intratumoraler Tregs wurden die Zellkulturüberstände der Suppressionsassays auf sezerniertes IL-10 untersucht. Die detektierten IL-10-Konzentrationen korrelierten mit der beobachteten Suppression (Abbildung 9C), und die Durchführung des Suppressionsassays in Gegenwart eines IL-10-neutralisierenden Antikörpers kompensierte einen Teil der Suppression (Abbildung 9D), wodurch sich die Beteiligung von IL-10 am immunsuppressiven Mechanismus der Tregs bestätigt.

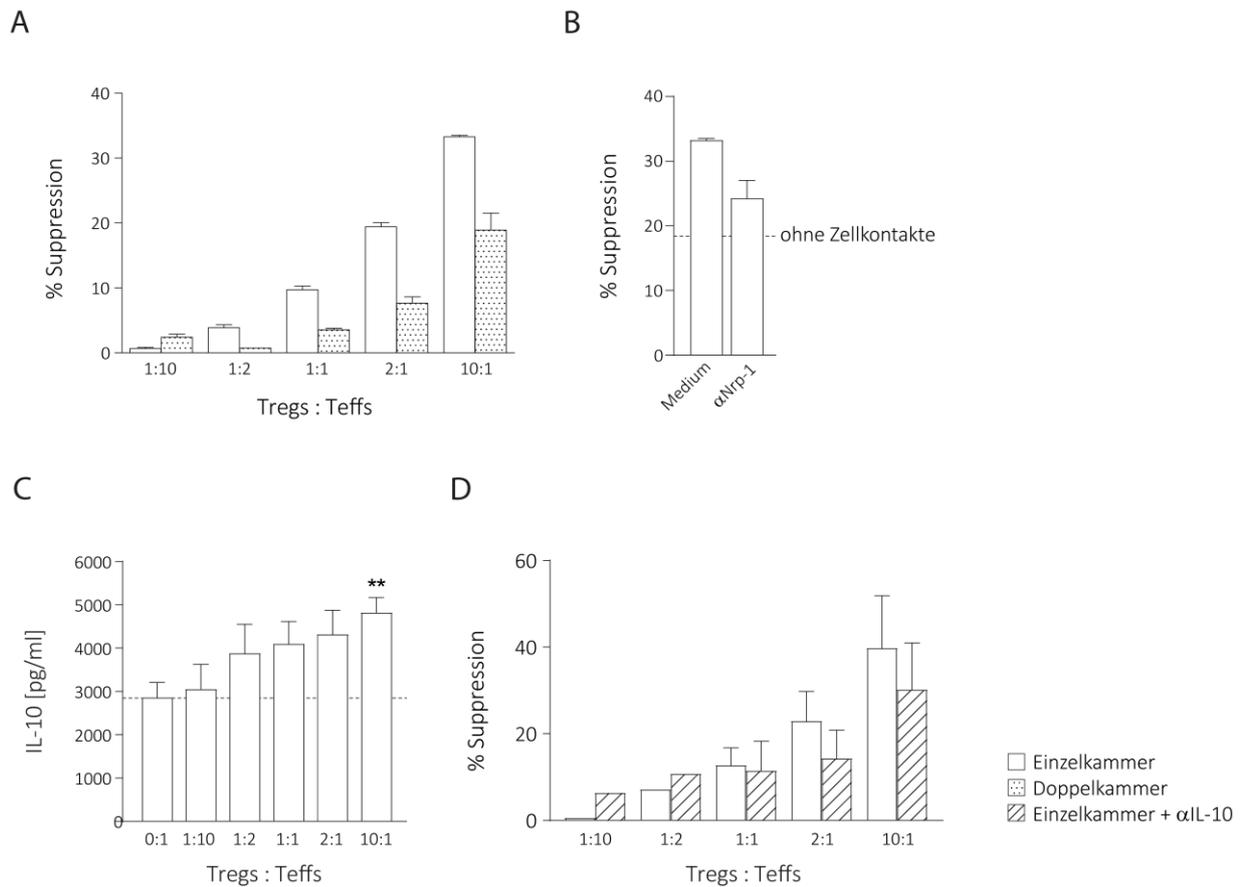


Abbildung 9: Abhängigkeit der Treg-vermittelten Suppression von Zellkontakten und IL-10. Funktionelle *In-vitro*-Suppressionsassays mit λ -MYC-Tregs gemäß Abbildung 8. **(A)** Prozentuale Suppression im Einzel-, bzw. Doppelkammersystem. Repräsentatives Ergebnis aus zwei Versuchen. **(B)** Prozentuale Suppression in Gegenwart eines α Nrp-1-Antikörpers. Zusammengefasste Daten aus drei Versuchen. **(C)** Mittels ELISA gemessene IL-10-Konzentrationen der Zellkulturüberstände. Zusammengefasste Daten aus vier Versuchen. Die Signifikanz wurde mithilfe des *RM One-way ANOVA (Bonferroni)* im Vergleich zum 0:1-Verhältnis (gestrichelte Linie) geprüft. **(D)** Prozentuale Suppression in Gegenwart eines α IL-10-Antikörpers. Zusammengefasste Daten aus drei Versuchen. Darstellung der Mittelwerte einer Gruppe \pm SEM.

4.1.3 Spezifische Treg-Depletion *in vivo*

4.1.3.1 Verstärkte Proliferation von T- und NK-Zellen

Die funktionellen *In-vitro*-Analysen zeigten in Anwesenheit von Tregs eine deutliche Suppression der Proliferation der CD4⁺Foxp3⁻ Responderzellen. Um dieses Ergebnis *in vivo* zu validieren und darüber hinaus zu klären, welche weiteren Immunzellpopulationen von den Tregs reguliert werden, wurde die DEREK-Mauslinie, welche eine spezifische Treg-Depletion erlaubt, in die λ -MYC-Linie eingekreuzt. DEREK-Mäuse exprimieren ein DTR-GFP-Fusionsprotein unter der Kontrolle des *foxp3*-Genlocus, was eine Fluoreszenz-basierte Detektion oder DT-induzierte Ablation der Foxp3⁺ Tregs ermöglicht (Lahl & Sparwasser 2011). Die unbehandelten λ -MYC/DEREK-Nachkommen entwickeln mit derselben Kinetik Tumoren wie λ -MYC-Mäuse, während DT-Injektionen zu einem signifikanten Überlebensvorteil führen

(Ahmetlić et al. 2019). Da lediglich zwei DT-Zyklen die Tregs effizient zu depletieren vermögen (Lahl & Sparwasser 2011; Riedel 2013), wurde die Milz zwei Tage nach dem zweiten Zyklus in Hinblick auf das Proliferationsverhalten verschiedener Immunzellpopulationen analysiert (Abbildung 10A). Hierfür wurde die Expression des nukleären Proliferationsmarkers Ki-67 von $CD4^+Foxp3^-$ und $CD8^+$ T-Zellen, NK- und B-Zellen von DT-behandelten λ -MYC/DEREG-Mäusen durchflusszytometrisch erfasst. Als Kontrolle dienten unbehandelte λ -MYC-Mäuse vergleichbaren Alters sowie Wildtypen.

In Übereinstimmung mit den *In-vitro*-Tests führte die Abwesenheit von Tregs auch *in vivo* zu einer verstärkten Proliferation der $CD4^+Foxp3^-$ T-Zellen. Daneben proliferierten $CD8^+$ T-Zellen und NK-Zellen vermehrt, während sich für die $CD19^+$ B-Zellen keine signifikant veränderten Ki-67-Level abzeichneten (Abbildung 10B-F).

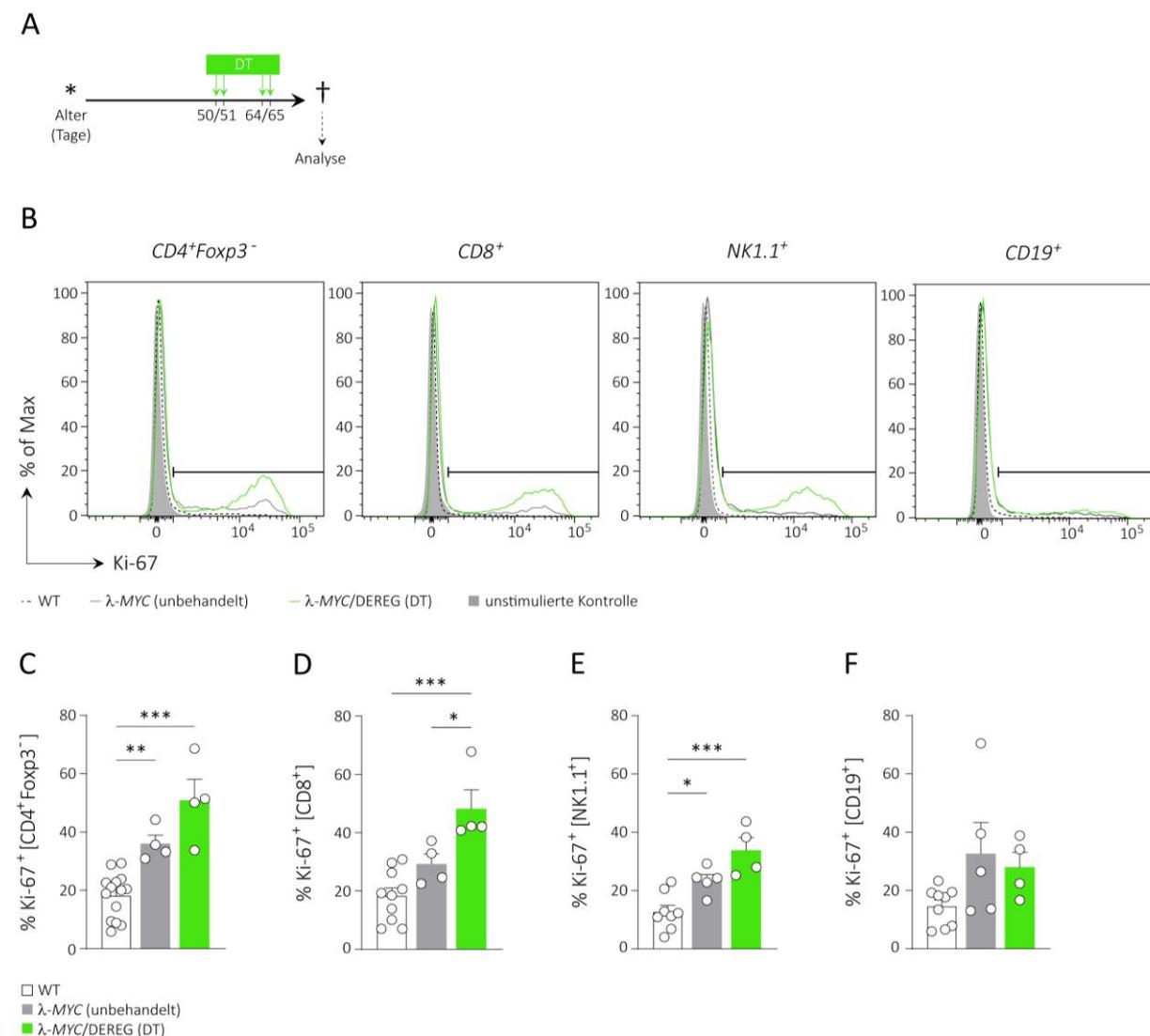


Abbildung 10: Erhöhte Proliferation von $CD4^+Foxp3^-$ Teffs, $CD8^+$ T-Zellen und NK-Zellen, jedoch nicht der B-Zellen, nach spezifischer Treg-Depletion *in vivo*. Durchflusszytometrische Analyse der Milzen von WT-, λ -MYC- und DT-behandelten λ -MYC/DEREG-Mäusen. **(A)** Therapieschema. **(B)** Exemplarische Histogramme der Ki-67-Expression von $CD4^+Foxp3^-$, $CD8^+$, $NK1.1^+$ und $CD19^+$ Zellen. Quantifizierung der Ki-67-Expression von $CD4^+Foxp3^-$

(C), CD8⁺ (D), NK1.1⁺ (E) und CD19⁺ Zellen (F). Die Signifikanzen wurden mithilfe des *Ordinary One-way ANOVA (Bonferroni)* errechnet. Darstellung der Mittelwerte einer Gruppe \pm SEM. Ein Punkt bildet den Mittelwert einer Maus ab.

4.1.3.2 Gesteigerte IFN- γ -Expression von T- und NK-Zellen

Da CD4⁺Foxp3⁻ sowie CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen in der Abwesenheit von Tregs eine verstärkte Proliferation zeigten, sollten diese Zellpopulationen auch in Hinblick auf ihre Funktionalität untersucht werden. Hierfür wurde die jeweilige IFN- γ -Expression bestimmt.

Alle drei Zellpopulationen zeigten nach Treg-Depletion einen erhöhten Anteil IFN- γ ⁺ Zellen (Abbildung 11). Somit profitierten CD4⁺Foxp3⁻ und CD8⁺ T-Zellen sowie NK-Zellen nicht nur im Sinne einer Proliferationssteigerung von der Abwesenheit der Tregs, sondern wiesen auch eine höhere IFN- γ -Expression auf.

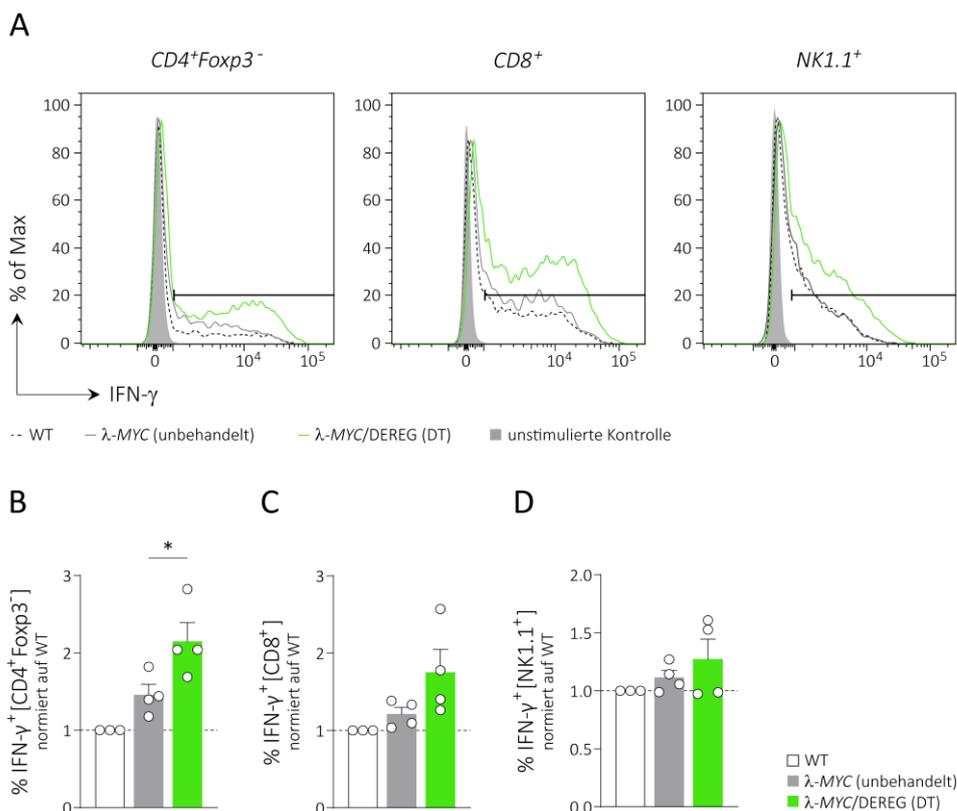


Abbildung 11: Erhöhte IFN- γ -Expression von CD4⁺Foxp3⁻ Teffs, CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen nach spezifischer Treg-Depletion *in vivo*. Durchflusszytometrische Analyse der Milzen von WT-, λ -MYC- und DT-behandelten λ -MYC/DEREG-Mäusen (Therapieschema vgl. Abbildung 10). Der FACS-Färbung ging eine vierstündige *Ex-vivo*-Stimulation mit PMA und Ionomycin bei 37°C voran. **(A)** Exemplarische Histogramme der IFN- γ -Expression von CD4⁺Foxp3⁻, CD8⁺ und NK1.1⁺ Zellen. Quantifizierung der relativen IFN- γ -Expression von CD4⁺Foxp3⁻ **(B)**, CD8⁺ **(C)** und NK1.1⁺ **(D)** Zellen aus den Milzen von WT-, λ -MYC- und DT-behandelten λ -MYC/DEREG-Mäusen. Normierung auf IFN- γ -Expression der jeweiligen Zellpopulation aus WT-Milzen. Die Signifikanzen wurden mithilfe des *Unpaired t test* geprüft. Darstellung der Mittelwerte einer Gruppe \pm SEM. Ein Punkt bildet den Mittelwert einer Maus ab.

Zusammenfassend konnte bisher gezeigt werden, dass λ -MYC-Tregs im Laufe der Tumorgenese Marker hochregulierten, die mit einer immunsuppressiven Funktion assoziiert sind. Die gleichzeitig bestehende hohe PD-1-Expression intratumoraler Tregs war nicht mit einem Stabilitätsverlust im Sinne einer Foxp3-Reduktion und der Aufnahme einer IFN- γ -Produktion verbunden. Entsprechende funktionelle *In-vitro*-Analysen bestätigten λ -MYC-Tregs gegenüber WT-Tregs eine signifikant erhöhte immunsuppressive Kapazität, und *In-vivo*-Untersuchungen ergaben, dass neben CD4⁺Foxp3⁻ Zellen auch CD8⁺ T-Zellen sowie NK-Zellen, in der Abwesenheit von Tregs verstärkt proliferierten und mehr IFN- γ exprimierten. Diese regulierten Populationen sind essenzieller Bestandteil der Immunantwort gegen maligne Zellen. Der durch die Treg-Depletion erzielte Überlebensvorteil ([Ahmetlić et al. 2019](#)) verdeutlicht das Potenzial einer auf die Modulation der Tregs abzielenden anti-tumoralen Therapie.

4.2 Tregs und Immun-Kontrollpunkt-Inhibition

Mit Antikörpern gegen u.a. CTLA-4 und PD-1 stehen in der Klinik zugelassene Immunkontrollpunkt-Inhibitoren als Therapieoption zur Verfügung. Im λ -MYC-Modell vermittelte die jeweilige Monotherapie von PD-1- und CTLA-4-blockierenden Antikörpern jedoch keinen Überlebensvorteil, wohingegen sich die Kombinationstherapie aus beiden als hocheffektiv erwiesen hat (Brenner et al. 2020; Ahmetlić et al. 2021). Angesichts der im Laufe der Tumorentwicklung auftretenden phänotypischen und funktionellen Veränderungen von Tregs, der Rolle von Tregs bei der Förderung der Immunevasion von λ -MYC-Tumoren (Ahmetlić et al. 2019) und des Vermögens der kombinierten Immunkontrollpunkt-Blockade, das Wachstum von λ -MYC-Tumoren zu verzögern (Brenner et al. 2020; Ahmetlić et al. 2021), stellte sich die Frage, ob die Immunkontrollpunkt-inhibierende Therapie auch das Treg-Zellkompartiment beeinflusst. Da λ -MYC-Tregs im Tumormilieu CTLA-4 (Abschnitt 4.1.1.2) und PD-1 (Abschnitt 4.1.1.3) hochregulierten, könnten therapeutische Antikörper gegen die beiden Moleküle direkt auf die Tregs abzielen und deren Funktion und Stabilität beeinflussen (Lucca & Dominguez-Villar 2020). Daher wurde untersucht, wie sich die in den Abschnitten 4.1.1.1 und 4.1.1.2 identifizierten, im Tumormilieu hochregulierten Marker Foxp3, CD25 und IL-10 unter der Therapie verhielten.

4.2.1 Phänotypische Veränderungen von Tregs nach kombinierter α PD-1/ α CTLA-4-Therapie *in vivo*

4.2.1.1 Verminderte Foxp3-Expression

Um den Einfluss der *In-vivo*-Immunkontrollpunkt-Inhibition auf die Tregs zu analysieren, wurde λ -MYC-Mäusen beginnend mit dem 55. Lebensstag insgesamt viermalig im Abstand von zehn Tagen eine Kombination aus α PD-1- und α CTLA-4-Antikörpern appliziert. Beim Auftreten von Tumoren wurden die Milzen behandelter λ -MYC-Mäuse mit denen unbehandelter tumortragender Kontrolltiere verglichen. Zur Beurteilung der Immunreaktion in der Frühphase der Therapie erfolgte die Analyse bereits nach zweimaliger Antikörpergabe im Vergleich zu unbehandelten λ -MYC-Mäusen vergleichbaren Alters (Abbildung 12A).

Bereits eine zweimalige Antikörperinjektion führte zu einer im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren signifikant verminderten Foxp3-Expression. Die in Abschnitt 4.1.1.1 beschriebene erhöhte Foxp3-Expression intratumoraler Tregs erschien unter Behandlung tendenziell weniger ausgeprägt (Abbildung 12B). Bei Betrachtung der Subpopulationen war die Foxp3-Expression intratumoraler nTregs und iTregs unter der α PD-1/ α CTLA-4-Therapie reduziert (Abbildung 12C, D).

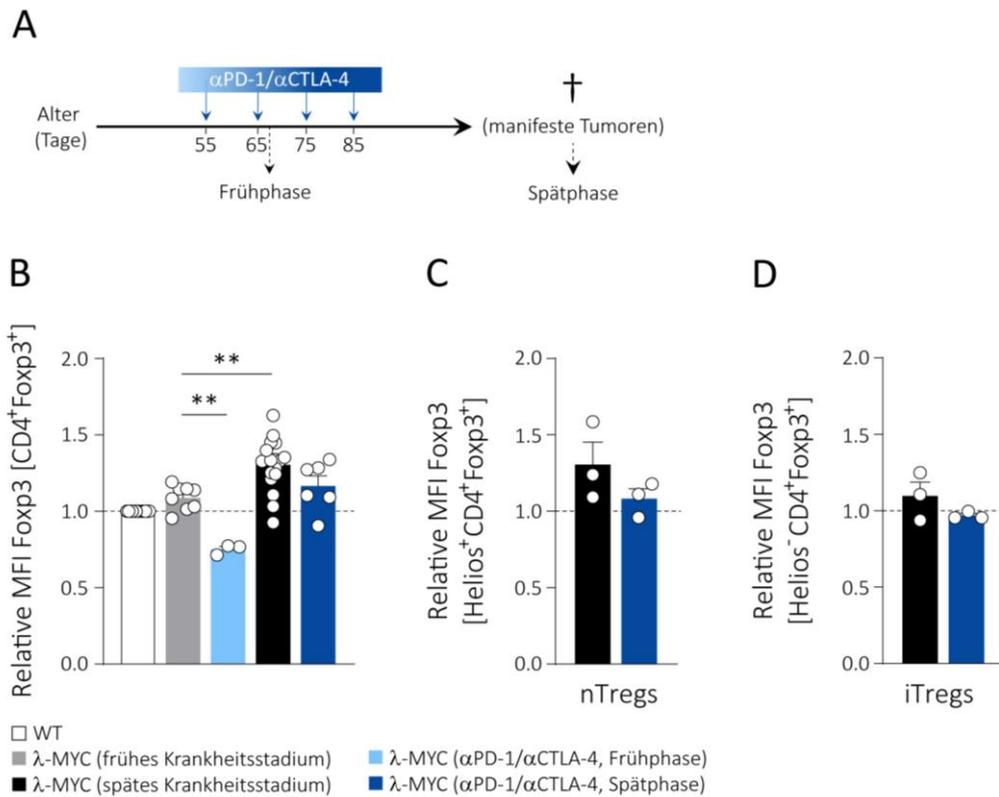


Abbildung 12: Reduzierte Foxp3-Expression nach αPD-1/αCTLA-4-Therapie *in vivo*. Durchflusszytometrische Analyse der Milzen von WT-, unbehandelten und αPD-1/αCTLA-4-therapierten λ-MYC-Mäusen. **(A)** Therapie-schemata. Quantitative Darstellung der relativen Foxp3-MFI von CD4⁺Foxp3⁺ Tregs **(B)**, CD4⁺Foxp3⁺Helios⁺ nTregs **(C)** und CD4⁺Foxp3⁺Helios⁻ iTregs **(D)**, Normierung auf Foxp3-MFI von CD4⁺Foxp3⁺ WT-Tregs. Die Signifikanzen wurden mithilfe des *Ordinary One-way ANOVA (Bonferroni)* berechnet. Darstellung der Mittelwerte einer Gruppe ± SEM. Ein Punkt bildet den Mittelwert einer Maus ab.

4.2.1.2 Reduzierte CD25- und IL-10 Expression

Ein der Foxp3-Expression entsprechendes Bild zeigte sich bei der durchflusszytometrischen Quantifizierung von CD25. In frühen Krankheitsstadien führte die Kombinationstherapie zu einer signifikanten Herunterregulation von CD25, in späten Tumorstadien war ein Trend zu einer geringeren Hochregulation zu beobachten (Abbildung 13A). Für IL-10 konnte, wie bereits für Foxp3 und CD25, in späten Tumorstadien eine tendenziell geringer ausfallende Hochregulation beobachtet werden (Abbildung 13B).

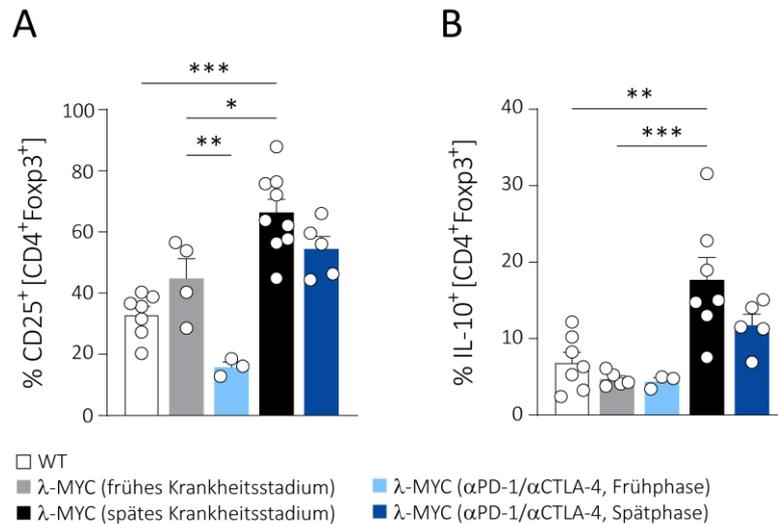


Abbildung 13: Reduzierte CD25- und IL-10-Expression nach α PD-1/ α CTLA-4-Therapie *in vivo*. Durchflusszytometrische Analyse der Milzen von WT-, unbehandelten und α PD-1/ α CTLA-4-therapierten λ -MYC-Mäusen (Therapieschema vgl. Abbildung 12). **(A)** Quantifizierung der CD25-Expression der jeweiligen CD4⁺Foxp3⁺ Tregs. **(B)** Quantifizierung der IL-10-Expression der jeweiligen CD4⁺Foxp3⁺ Tregs. Der FACS-Färbung ging eine vierstündige *Ex-vivo*-Stimulation mit PMA und Ionomycin bei 37°C voran. Die Signifikanzen wurden mithilfe des *Ordinary One-way ANOVA (Bonferroni)* ermittelt. Darstellung der Mittelwerte einer Gruppe \pm SEM. Ein Punkt bildet den Mittelwert einer Maus ab.

4.2.2 Der Einfluss der α PD-1/ α CTLA-4-Therapie auf die Treg-Funktionalität *in vitro*

4.2.2.1 Leicht verminderte suppressive Kapazität nach α PD-1/ α CTLA-4-Therapie *in vivo*

Um zu testen, ob sich die infolge der α PD-1/ α CTLA-4-Therapie beobachteten phänotypischen Veränderungen auf die Funktionalität auswirkten, wurden die Tregs zweimalig behandelter λ -MYC-Mäuse mit denen unbehandelter Kontrolltiere gleichen Alters hinsichtlich ihres Suppressionsvermögens *in vitro* (vgl. Abschnitt 4.1.2) verglichen. Da sich die suppressive Kapazität von λ -MYC-Tregs nur bei einem hohen Treg-Anteil gegenüber WT-Tregs signifikant erhöht gezeigt hat, wurde das Treg/Teff-Verhältnis von 10:1 betrachtet.

Aus behandelten λ -MYC-Mäusen isolierte Tregs wiesen gegenüber Tregs unbehandelter Kontrolltiere ein leicht reduziertes suppressives Potenzial auf. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die CTLA-4-vermittelte Suppression, welche auf einer Verminderung des kostimulatorischen CD28-Signals durch Reduktion der Verfügbarkeit von CD80/86 auf APCs beruht, durch die Antikörper-vermittelte CD28-Stimulation umgangen wird.

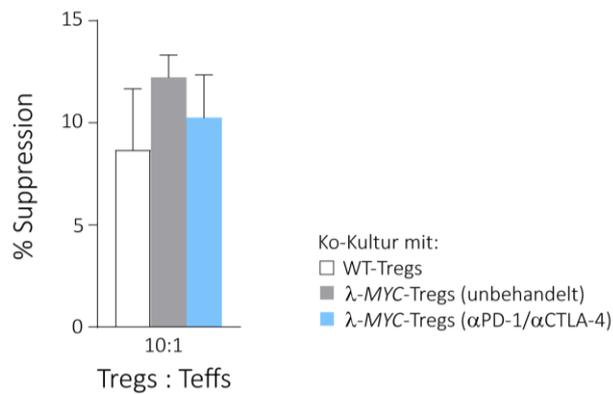


Abbildung 14: Leicht reduzierte suppressive Kapazität *in vitro* nach αPD-1/αCTLA-4-Therapie *in vivo*. Funktioneller *In-vitro*-Suppressionsassay gemäß Abbildung 8. Prozentuale Suppression durch Tregs aus WT-, unbehandelten λ-MYC- und zweifach αPD-1/αCTLA-4-behandelten λ-MYC-Mäusen (Therapieschema vgl. Abbildung 12) bei einem Treg/Teff-Verhältnis von 10:1. Zusammengefasste Daten aus zwei Versuchen. Darstellung der Mittelwerte einer Gruppe ± SEM.

4.2.2.2 Suppressive Kapazität unter Peptid-spezifischer Stimulation

Die PD-1-Blockade in Monotherapie reaktiviert nicht nur intratumorale Teffs, sondern steigert auch das Suppressionsvermögen der Tregs, was sich nachteilig auf den therapeutischen Erfolg auswirken kann (Kamada et al. 2019; Kumagai et al. 2020). Vor diesem Hintergrund sollte getestet werden, ob der Effekt der gesteigerten suppressiven Kapazität der Tregs nach alleiniger PD-1-Blockade *in vitro* nachgestellt und im gegebenen Fall durch die etablierte Kombination mit dem αCTLA-4-Antikörper verhindert werden kann. Um auch die indirekten über die Modulation der APCs vermittelten Suppressionsmechanismen von CTLA-4 abzubilden, wurde zu einem physiologischeren *In-vitro*-System mit Stimulation durch DCs übergegangen (Abbildung 15A). Tregs und Teffs wurden wieder immunmagnetisch angereichert, die Teffs CPD-markiert und die beiden Populationen in den bisherigen Verhältnissen eingesetzt (vgl. Abschnitt 4.1.2). Die Stimulation erfolgte mithilfe magnetisch sortierter CD11c⁺ DCs. Diese wurden nach Bestrahlung mit Lymphom-assoziierten, MHC-II-bindenden Selbstpeptiden beladen, die sowohl von Tregs als auch von Teffs erkannt werden (Ahmetlić et al. 2019). Die Analyse erfolgte an Tag 6 durch die Messung der stattgefundenen Proliferation über die Ki-67-Expression der CPD-markierten CD4⁺Foxp3⁻ Teffs.

Mit dem Peptidmix beladene DCs induzierten eine im Vergleich zu unbeladenen DCs signifikant gesteigerte Proliferation der Responderzellen (Abbildung 15B). Das *In-vitro*-System zeigte sich geeignet, da ein erhöhter Treg-Anteil - wie bei dem Ansatz mit CD3/CD28-Stimulation - eine geringere Proliferation der Responderzellen zur Folge hatte, lediglich das 10:1-Verhältnis war aufgrund der geringen Anzahl lebender Teffs nach sechstägiger Stimulation nicht auswertbar. Die Gegenwart des αPD-1-Antikörpers in der Kokultur führte zu einer verstärkten Suppression. Dieses Ergebnis konnte durch Wiederholung des Versuchs mit aus PD-1-defizienten Mäusen isolierten Tregs sowie den Einsatz

von mit α PD-1 vorinkubierten Tregs in dem Suppressionsassay mit CD3/CD28-Stimulation bestätigt werden (nicht gezeigt). Durch Kombination mit dem CTLA-4-blockierenden Antikörper ließ sich der Effekt verhindern (Abbildung 15C).

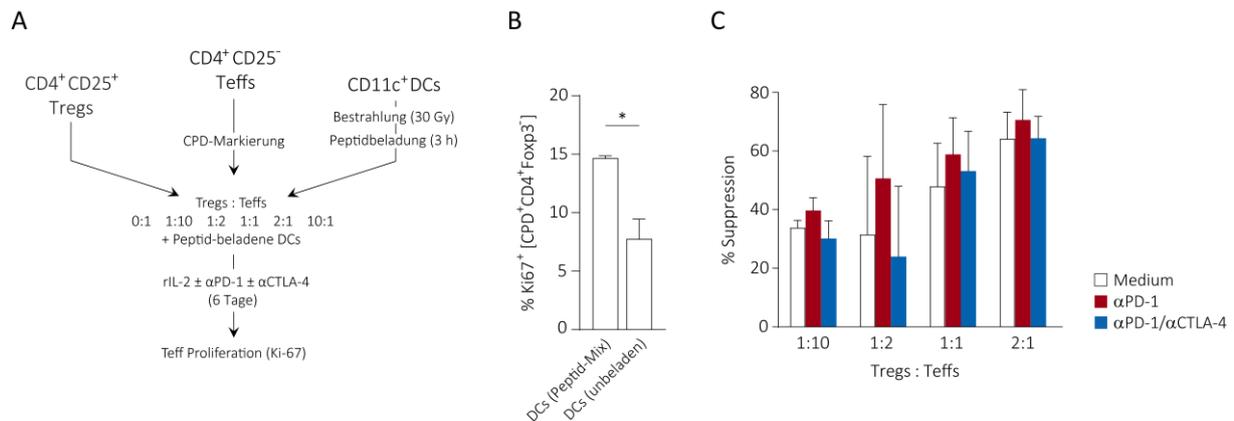


Abbildung 15: Verhinderung der durch PD-1-Blockade gesteigerten Treg-vermittelten Suppression durch Kombination mit dem α CTLA-4-Antikörper. (A) Schematische Darstellung des *In-vitro*-Suppressionstests mit Peptid-spezifischer Stimulation. (B) Anteil der Ki-67⁺ Zellen von den CPD-markierten CD4⁺Foxp3⁻ Teffs in Gegenwart von mit dem Peptidmix beladenen oder unbeladenen CD11c⁺ Stimulatorzellen. (C) Darstellung der prozentualen Suppression (vgl. Abschnitt 3.2.8.2) in den jeweiligen Verhältnissen, ggf. in Gegenwart von α PD-1 ± α CTLA-4-Antikörpern. Zusammengefasste Daten aus drei Versuchen mit WT-Zellen. Darstellung der Mittelwerte einer Gruppe ± SEM.

Zusammenfassend war die Hochregulation der mit einer immunsuppressiven Funktion assoziierten Moleküle Foxp3, CD25 und IL-10 unter der α PD-1/ α CTLA-4-Kombinationstherapie geringer ausgeprägt. Der weniger suppressive Phänotyp der Tregs behandelter Mäuse spiegelte sich in einer leicht verringerten Suppression der CD3/CD28-induzierten Teff-Proliferation *in vitro* wider. In einem physiologischeren *In-vitro*-System mit Peptid-spezifischer Stimulation durch Tumor-assoziierte Selbstantigene konnte die durch eine α PD-1-Monotherapie vermittelte Steigerung der suppressiven Kapazität der Tregs durch Kombination mit dem α CTLA-4-Antikörper verhindert werden.

4.3 Die Rolle von IL-10 im λ -MYC-Modell

Neben koinhibitorischen Rezeptoren können anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10 die Immunantwort modulieren. In Tumorüberständen sowie Serum tumortragender λ -MYC-Mäuse sind erhöhte IL-10-Konzentrationen detektierbar (Naujoks et al. 2014; Brenner 2009). In Abschnitt 4.1.1.2 konnte eine erhöhte IL-10-Expression intratumoraler λ -MYC-Tregs nachgewiesen werden, das in funktionellen *In-vitro*-Tests Teil ihres suppressiven Mechanismus war (Abschnitt 4.1.2.2). Daher sollte untersucht werden, inwiefern IL-10 die Lymphomgenese der λ -MYC-Mäuse beeinflusst.

4.3.1 Überlebensvorteil nach IL-10-Neutralisierung *in vivo*

Um zu testen, wie sich eine Abwesenheit von IL-10 auf das Überleben auswirkt, wurde λ -MYC-Mäusen beginnend mit dem 55. Lebenstag ein IL-10-neutralisierender Antikörper gespritzt. Die Injektionen erfolgten insgesamt viermalig jeweils im Abstand von zehn Tagen (Abbildung 16A).

Im Vergleich zu den unbehandelten λ -MYC-Kontrolltieren zeigten die therapierten λ -MYC-Mäuse ein signifikant verlängertes Überleben (Abbildung 16B). Zwei der behandelten Tiere hatten sogar ein anhaltendes Ansprechen bis Tag 200. Zudem konnte der durch eine Treg-Depletion erzielte Überlebensvorteil mittels additiver IL-10-Neutralisierung tendenziell weiter verbessert werden (Abbildung 16D), was verdeutlicht, dass neben Tregs weitere IL-10-Produzenten an der Bildung des immunsuppressiven Tumormilieus beteiligt sind. Die IL-10-Neutralisierung bietet somit eine effektive Möglichkeit, dieses Netzwerk zu inhibieren. Um IL-10 nur in dem Zeitraum zu neutralisieren, in dem auch die Treg-Depletion erfolgreich ist, wurde der α IL-10-Antikörper in diesem Versuch lediglich dreimal verabreicht (Abbildung 16C).

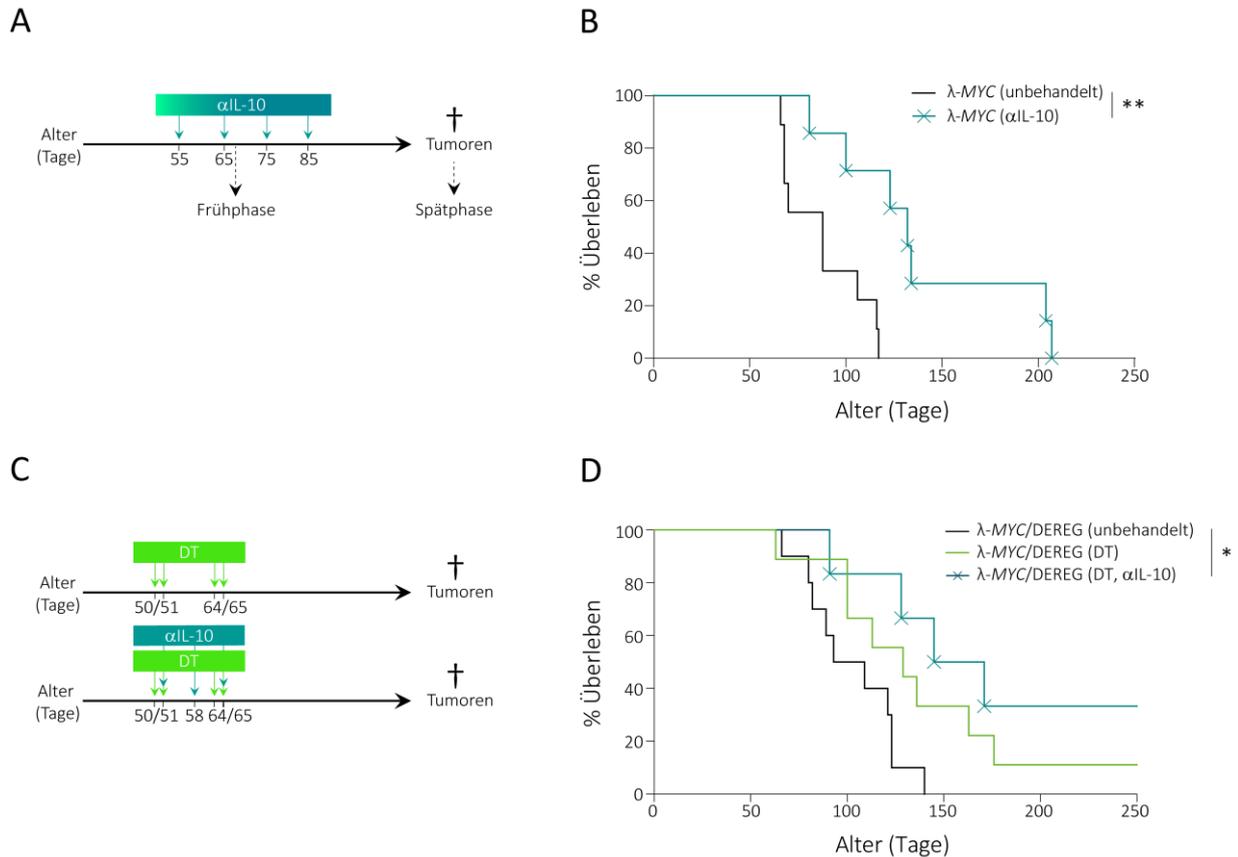


Abbildung 16: Signifikant verlängertes Überleben der λ -MYC-Mäuse nach IL-10-Neutralisierung *in vivo*. (A) Therapieschema IL-10-Neutralisierung, als Kontrolle dienten unbehandelte λ -MYC-Mäuse. (C) Therapieschemata Treg-Depletion und Treg-Depletion unter IL-10-Neutralisierung. (B,D) Überlebenskurven in Form von Kaplan-Meier-Diagrammen. Die Signifikanzen wurden anhand des *Log-rank (Mantel-Cox) test* geprüft.

4.3.2 Von IL-10-Neutralisierung profitierende Zellpopulationen

Um herauszufinden, welche Zellpopulationen an der Vermittlung des Überlebensvorteils beteiligt waren, wurden als nächstes die relativen Zellanteile von Tumor-infiltrierenden Immunzellen der im Überlebensversuch eingesetzten λ -MYC-Mäuse mit denen tumortragender un behandelter λ -MYC-Kontrolltiere verglichen. Zusätzlich wurde die IFN- γ -Expression bestimmt. Zur Evaluation der Effekte in der Frühphase der Therapie wurden λ -MYC-Mäuse nach zweimaliger α IL-10-Applikation im Vergleich zu un behandelten λ -MYC-Mäusen gleichen Alters analysiert.

Nach zwei- sowie viermaliger α IL-10-Injektion zeigte sich eine Expansion des CD8⁺- und des CD4⁺Foxp3⁺-T-Zellkompartiments (Abbildung 17A, B), wobei die IFN- γ -Expression unverändert war (nicht gezeigt). Der Anteil der NK-Zellen war ebenfalls zu beiden Zeitpunkten erhöht, sie wiesen zudem im Tumormilieu eine signifikant gesteigerte IFN- γ -Expression auf (Abbildung 17C). Dagegen war das B-Zellkompartiment nach zweimaliger Antikörperapplikation nahezu eliminiert (Abbildung 17D).

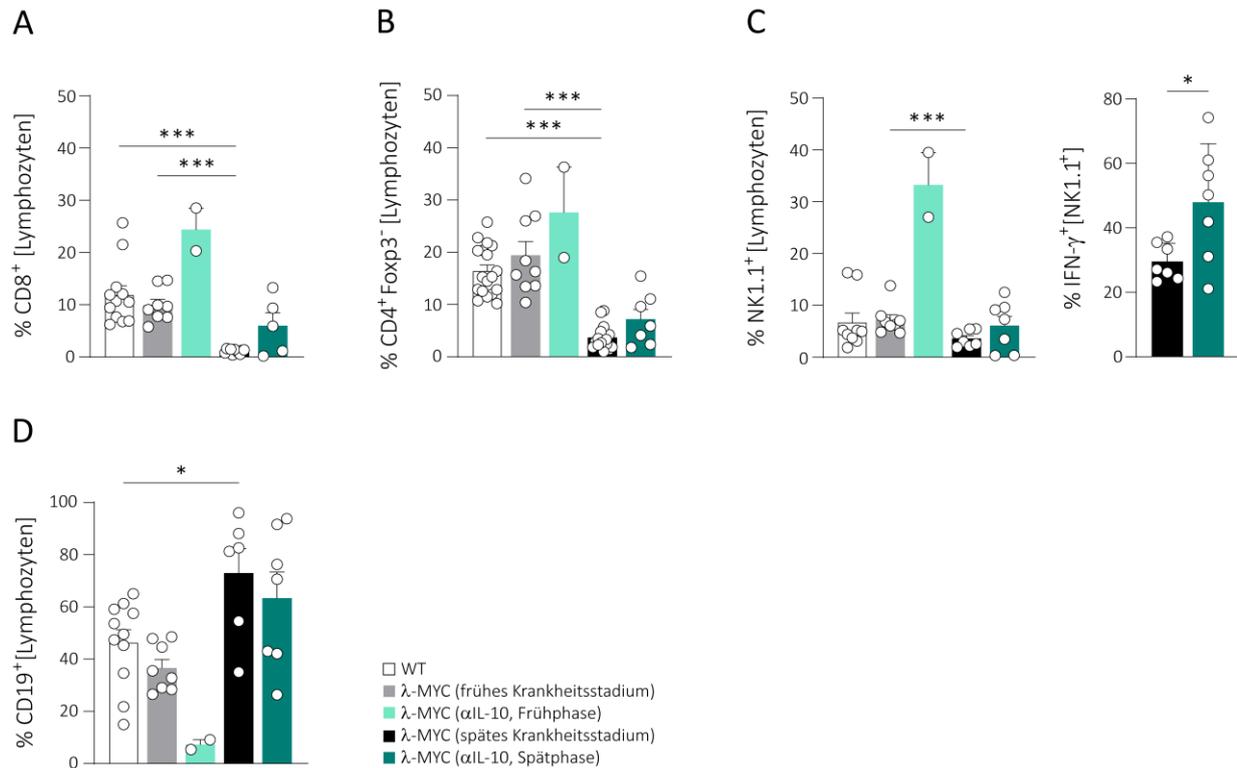


Abbildung 17: Infolge der IL-10-Neutralisierung erhöhtes Immunzell-Infiltrat bei Reduktion des B-Zellkompartiments. Durchflusszytometrische Analyse der Milzen von WT-, unbehandelten und α IL-10-therapierten λ -MYC-Mäusen (Therapieschema vgl. Abbildung 16). Quantifizierung des relativen Anteils CD8⁺ (A), CD4⁺Foxp3⁻ (B) T-Zellen. Quantifizierung des relativen Anteils und der IFN- γ -Expression von NK1.1⁺ Zellen. Für die Zytokinbestimmung ging der FACS-Färbung eine vierstündige *Ex-vivo*-Stimulation mit PMA und Ionomycin bei 37°C voran. (D) Quantifizierung des relativen Anteils der CD19⁺ B-Zellen. Die Signifikanzen der Zellanteile wurden mithilfe des *Ordinary One-way ANOVA (Bonferroni)* berechnet. Die der IFN- γ -Expression mithilfe des *Unpaired t test*. Darstellung der Mittelwerte einer Gruppe \pm SEM. Ein Punkt bildet den Mittelwert einer Maus ab.

4.3.3 Effekte von IL-10 auf maligne λ -MYC-B-Zellen

Es ist beschrieben, dass IL-10 das Überleben und die Proliferation von B-Lymphozyten verbessert (Go et al. 1990; Rousset et al. 1992). Daher stellte sich die Frage, ob IL-10 auch eine direkte Wirkung auf die malignen λ -MYC-B-Zellen ausübt. Um zu testen, ob die B-Zellen die Voraussetzung für ein direktes Ansprechen auf IL-10 haben, wurde geprüft, ob der IL-10-Rezeptor (IL-10R) auf der Zelloberfläche tumoröser B-Zellen detektierbar war.

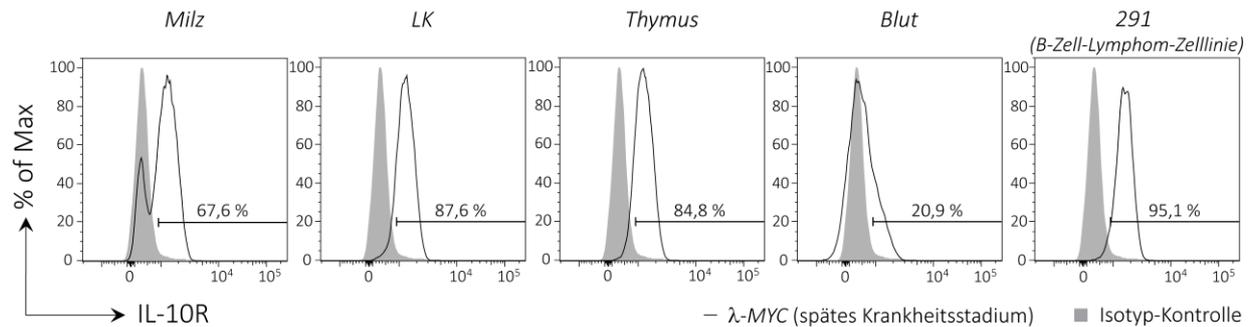
Die B-Zellen wiesen an allen drei Tumor-Manifestationsorten (Milz, LK und Thymus), weniger im peripheren Blut, eine hohe IL-10R-Expression auf. Auch die λ -MYC-B-Zell-Lymphom-Zelllinie 291 exprimierte den IL-10R (Abbildung 18A).

Zur Klärung der Frage, welchen Effekt die Anwesenheit von IL-10 auf das Überleben tumoraler λ -MYC-B-Zellen hat, wurden die Zellsuspensionen von tumorösen Milzen entweder mit rIL-10 oder dem neutralisierenden α IL-10-Antikörper inkubiert. Ohne zusätzliche Stimulation sterben die Zellen binnen

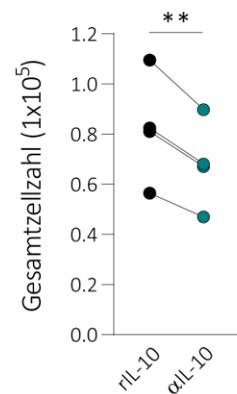
kurzer Zeit ab. Nach 24 Stunden wurde die Gesamtzellzahl lebender Zellen nach Trypanblau-Färbung bestimmt oder der relative Anteil lebender CD19⁺ Zellen durchflusszytometrisch gemessen.

In Abwesenheit von IL-10 war die Gesamtzellzahl signifikant reduziert (Abbildung 18B). Durch FACS-basierte Identifizierung der CD19⁺ Zellen konnte festgestellt werden, dass in jedem Ansatz der Anteil lebender B-Zellen in Abwesenheit von IL-10 geringer war (Abbildung 18C).

A



B



C

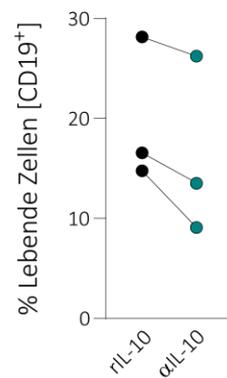


Abbildung 18: Expression des IL-10R auf B-Zellen aller Tumormanifestationsorte und der B-Zell-Lymphom-Zelllinie 291 und reduziertes Überleben maligner λ -MYC-B-Zellen in Abwesenheit von IL-10. (A) Durchflusszytometrische Analyse der Zellen aus Milz, LK, Thymus und peripherem Blut einer tumortragenden λ -MYC-Maus und der B-Zell-Lymphom-Zelllinie 291. Histogramme der IL-10R-Expression von CD19⁺ B-Zellen. Repräsentatives Ergebnis aus zwei Versuchen. **(B,C)** In-vitro-Inkubation von Zellsuspensionen tumoröser λ -MYC-Milzen mit rIL-10 oder dem α IL-10-Antikörper. Gesamtzahl lebender Zellen nach Trypanblau-Färbung **(B)** und durchflusszytometrisch ermittelter relativer Anteil lebender CD19⁺ B-Zellen **(C)** nach 24-stündiger Inkubation. Die Signifikanz wurde mithilfe des *Paired t test* berechnet. Die verbundenen Punkte bilden die jeweiligen Mittelwerte derselben Maus ab.

5. DISKUSSION

Um die klinische Situation bestmöglich widerzuspiegeln, wurde in der vorliegenden Arbeit das autochthone λ -MYC-Lymphommodell verwendet. Bei transplantierten Tumoren induziert die hohe initiale Tumorzelllast eine sofortige NK-Zell-Antwort, welche über IFN- γ DCs zur IL-12-Sekretion stimuliert, was eine Aktivierung des adaptiven Immunsystems mit einer zytotoxischen T-Zell-Antwort zur Folge hat. Dieser Verlauf weist Parallelen zu den Mechanismen einer Virusinfektion auf ([Mocikat et al. 2003](#)). Im Gegensatz dazu werden bei der λ -MYC-Lymphomgenese die einzelnen Phasen der tumoralen Immunevasion durchlaufen und die Etablierung eines immunsuppressiven Mikromilieus besser abgebildet. Folgen sind progressive Einschränkung der NK-Zell-Effektorfunktionen ([Brenner et al. 2010](#); [Przewoznik et al. 2012](#)), Erschöpfung intratumoraler T-Zellen ([Riedel, 2013](#)) sowie Umprogrammierung von Th1-Zellen und DCs ([Ma et al. 2021](#); [Naujoks et al. 2014](#)). Als mitunter ursächlich wurden die drei nachfolgenden gegenregulatorischen Mechanismen identifiziert ([Riedel 2013](#)):

- (i) Akkumulation von Tregs
- (ii) Hochregulation koinhibitorischer Rezeptoren
- (iii) Gegenwart von IL-10

Der durch spezifische Treg-Depletion ([Ahmetlić et al. 2019](#)), kombinierte Immunkontrollpunkt-Blockade ([Brenner et al. 2020](#); [Ahmetlić et al. 2021](#)) oder IL-10-Neutralisierung (Abschnitt 4.3.1) erzielte Überlebensvorteil der λ -MYC-Mäuse verdeutlicht das Potenzial einer therapeutischen Modulation der genannten Mechanismen, welche im Folgenden mit speziellem Fokus auf die Tregs diskutiert werden.

5.1 Relevanz der verstärkten Treg-abhängigen Immunsuppression für die tumorale Immunevasion

Der im λ -MYC-Tumormilieu vorhandene TCR-Stimulus durch die Lymphom-assoziierten Selbstepitope bedingt ein differenzielles Proliferationsverhalten in Tregs und Teffs, das in einem zugunsten der Tregs verschobenen Treg/Teff-Quotienten resultiert ([Ahmetlić et al. 2019](#)). *In vitro* hat ein solcher bereits für sich genommen eine verstärkte Suppression der Teffs zur Folge (Abbildung 8B), und auch beim Menschen korreliert in der Mehrzahl von Tumorentitäten eine hohe Treg-Infiltration mit einer schlechten Prognose (Metaanalyse von [Shang et al. 2015](#)). Daneben ist ein TCR-vermitteltes Signal für die Entfaltung des vollen suppressiven Potenzials der Tregs erforderlich ([Levine et al. 2014](#); [Vahl et al. 2014](#)). Foxp3 beeinflusst das TCR-abhängige Transkriptionsprogramm und kontrolliert die Expression

maßgeblicher Suppressions-assoziiierter Moleküle (Levine et al. 2014; Zheng et al. 2007). In verschiedenen Studien ist das Ausmaß der Foxp3-Expression entscheidend für das suppressive Verhalten der Tregs (Wan & Flavell 2007; Saito et al. 2016). λ -MYC-Tregs zeigten eine mit der Tumorprogression zunehmende Foxp3-Expression (Abbildung 5A, B). Die erhöhte Foxp3-Expression war überwiegend auf die Helios⁺ nTregs zurückzuführen (Abbildung 5C), was im Einklang mit den Daten aus Ahmetlić et al. (2019) steht, die den nTregs gegenüber den iTregs eine dominierende Rolle in λ -MYC-Tumoren zusprechen. Die Expression von durch Foxp3 beeinflussten Markern – CD25, CTLA-4 und IL-10 (Zheng et al. 2007; Md Sakib Hossain et al. 2013) – war auf/in intratumoralen Tregs ebenfalls signifikant gesteigert (Abbildung 6). Die gleichzeitig bestehende hohe PD-1-Expression intratumoraler Tregs war nicht mit einem Stabilitätsverlust im Sinne einer Foxp3-Reduktion und der Aufnahme einer IFN- γ -Produktion verbunden (Abbildung 7). Trotz chronischer Stimulation zeigten die intratumoralen λ -MYC-Tregs im Tumormilieu demnach insgesamt einen funktionalen Phänotyp. *In-vitro*-Analysen bestätigten λ -MYC-Tregs gegenüber WT-Tregs ein signifikant erhöhtes Suppressionspotenzial auf Einzelzellebene. Somit kommt es in λ -MYC-Tumoren infolge der quantitativen Verschiebungen und phänotypischen Veränderungen zu einer verstärkten Immunsuppression durch die Tregs. Die Relevanz der Treg-vermittelten Suppression für die λ -MYC-Tumorprogression wird durch das verzögerte Tumorwachstum nach spezifischer Treg-Depletion *in vivo* verdeutlicht (Ahmetlić et al. 2019). In der Abwesenheit von Tregs zeigten CD4⁺Foxp3⁻ und CD8⁺ T-Zellen sowie NK-Zellen jeweils eine verstärkte Proliferation und eine erhöhte IFN- γ -Expression (Abbildung 10, Abbildung 11). Diese regulierten Zellpopulationen sind wichtige Effektoren der anti-tumoralen Immunantwort. Tregs tragen somit zur tumoralen Immunevasion bei.

5.2 Suppressive Mechanismen von λ -MYC-Tregs

Basierend auf Phänotyp und/oder funktionellen Untersuchungen spielen beim λ -MYC-Modell verschiedene suppressive Mechanismen zusammen, wobei die Beteiligung weiterer Mechanismen nicht ausgeschlossen wird. Ein Mechanismus der Treg-vermittelten Suppression besteht in ihrem Vermögen, die effektive Antigenpräsentation der DCs einzuschränken. Dies kann über mehrere Wege erfolgen. Da Tregs und Teffs im λ -MYC-Tumormilieu dieselben MHC-II-bindenden Selbstpeptide erkennen (Ahmetlić et al. 2019), erscheint eine Konkurrenz um den TCR-Stimulus als wahrscheinlich. Infolge des mit der Tumorprogression zunehmenden Treg-Teff-Quotienten können die Teffs vermehrt durch das Treg-Zellkompartiment verdrängt werden, dabei mag die bei der Thymusreifung selektierte höhere Affinität zu Selbstantigenen (Sakaguchi et al. 2020) den Tregs einen zusätzlichen Vorteil verschaffen. Zudem können Tregs spezifisch Peptid-MHC-II-Komplexe von der Zelloberfläche der DCs entfernen und dadurch deren Fähigkeit einer effektiven Antigenpräsentation reduzieren (Akkaya et al. 2019), was in diesem Kontext ebenfalls denkbar wäre. Ein weiterer die Funktionalität der APCs

modulierender Mechanismus betrifft die CD80/86-vermittelte Kostimulation. Intratumorale λ -MYC-Tregs exprimieren – sowohl oberflächlich, als auch intrazellulär – vermehrt CTLA-4 (Abbildung 6B, E), welches durch Transendozytose die CD80/86-Moleküle von den DCs entfernen kann und so das für die T-Zellaktivierung erforderliche kostimulatorische Signal verringert (Qureshi et al. 2011).

Da sich das suppressive Potenzial der λ -MYC-Tregs nach unspezifischer CD3/CD28-Stimulation in Abwesenheit von DCs verstärkt zeigte (Abbildung 8C, D), sind auch von APCs unabhängige Suppressionsmechanismen relevant. Ein Teil der Suppression war von direkten Treg-Teff-Zellinteraktionen abhängig (Abbildung 9A), möglicherweise unter Beteiligung des auf λ -MYC-Tregs exprimierten Moleküls Nrp-1 (Abbildung 7F, Abbildung 9B), welches an SEMA4A bindet (Delgoffe et al. 2013), das wiederum von intratumoralen Teffs hochreguliert wird (Anhang). Durch Neutralisierung von Nrp-1 konnte eine tendenziell verminderte Suppression erreicht werden, jedoch kein Rückgang auf das Niveau der Doppelkammer. Neben Zellkontakt-abhängigen Mechanismen sind lösliche Faktoren an der λ -MYC-Treg-vermittelten Suppression beteiligt (Abbildung 9A). Intratumorale λ -MYC-Tregs zeigen eine signifikant erhöhte Expression von IL-10 (Abbildung 6), welches *in vitro* am suppressiven Mechanismus der Tregs beteiligt war (Abbildung 9C, D). Da in λ -MYC-Tumorüberständen und Seren tumortragender λ -MYC-Mäuse keine nennenswerten TGF- β -Konzentrationen nachgewiesen werden konnten (Riedel 2013) und es sich bei den intratumoralen Tregs überwiegend um nTregs und weniger um peripher induzierte iTregs handelt (Ahmetlić et al. 2019), scheint TGF- β in diesem Modell eine untergeordnete Rolle zu spielen. Die starke Hochregulation von CD25 auf intratumoralen λ -MYC-Tregs könnte einen gesteigerten IL-2-Entzug nach sich ziehen, wie er bei der Regulierung der CD8⁺- (Chinen et al. 2016) und NK-Immunantwort (Sitrin et al. 2013) beschrieben ist.

5.3 PD-1-Blockade und Tregs – ein zu berücksichtigender Einflussfaktor

Neben Tregs stellen koinhibitorische Rezeptoren einen weiteren – häufig von malignen Zellen zur Immunevasion ausgenutzten – gegenregulatorischen Mechanismus dar. So können Tumoren in Reaktion auf die IFN- γ -Antwort der Effektor-T-Zellen den Liganden PD-L1 hochexprimieren, welcher mit PD-1 auf den T-Zellen interagiert und diese inhibiert (Iwai et al. 2002; Blank et al. 2004; Blank et al. 2005). Antikörper gegen PD-1 oder PD-L1 unterbrechen den Mechanismus und bieten inzwischen eine etablierte Therapieoption. Dennoch spricht ein großer Teil der Patienten nicht auf eine PD-1/PD-L1-Blockade an. Daher ist es wichtig, die zugrundeliegenden Mechanismen zu identifizieren und die Wirksamkeit durch einen noch gezielteren Einsatz und geeignete Kombinationsstrategien zu verbessern. Während die PD-L1-Expression und Mutationslast der Tumoren als anerkannte prognostische Faktoren gewertet werden (Doroshov et al. 2021; Samstein et al. 2019; Gibney et al.

2016; Jiang et al. 2020), legen verschiedene Publikationen nahe, dass auch Tregs einen Einfluss auf die Prognose haben.

Kumagai et al. (2020) zeigten, dass die Balance der PD-1-Expression von CD8⁺ T-Zellen und Tregs entscheidend den therapeutischen Erfolg der PD-1-Blockade beeinflusst, wobei sich eine zu Therapiebeginn bestehende hohe PD-1-Expression auf Tregs nachteilig und eine hohe PD-1-Expression auf CD8⁺ vorteilhaft auswirkt. Dem liegt zugrunde, dass das PD-1-Signal – obwohl die genauen Mechanismen noch nicht abschließend geklärt sind – auch bei Tregs das TCR-Signal reguliert (Kumagai et al. 2020). Dieses ist für die Differenzierung zu Effektor-Tregs und eine intakte suppressive Funktion erforderlich (Levine et al. 2014; Vahl et al. 2014). Entsprechend ist die Treg-spezifische PD-1-Defizienz mit einem proliferativen Vorteil und einem verstärkten immunsuppressiven Potenzial verbunden (Tan et al. 2021; Kumagai et al. 2020; Kamada et al. 2019; Sage et al. 2013). Bei Magenkarzinom-Patienten wurde zudem das seltene Phänomen einer hyperprogressiven Erkrankung nach PD-1-Blockade mit aktivierten, immunsuppressiven Tregs in Verbindung gebracht (Kamada et al. 2019). Interessanterweise gibt es im Gegensatz dazu auch Berichte, wonach das Ansprechen auf eine PD-1-Blockade durch destabilisierte Tregs begünstigt wird (Overacre-Delgoffe et al. 2017; Di Pilato et al. 2019; Lowther et al. 2016). Beispielsweise zeigten die PD-1^{high} Tregs von Glioblastom-Patienten auf transkriptioneller Ebene Anzeichen einer IFN- γ -Exposition und sezernierten selbst IFN- γ – ein Effekt, der durch die PD-1-Blockade verstärkt wurde (Lowther et al. 2016).

Im λ -MYC-Modell war die alleinige PD-1-Blockade nicht effektiv (Riedel 2013). Mit Sicherheit spielen verschiedene Faktoren zusammen. Tregs wiesen in Hinblick auf die diskutierten Aspekte jedoch schlechte Voraussetzungen für ein Ansprechen auf die PD-1-Blockade auf. So war im λ -MYC-Tumormilieu die PD-1-Expression der Tregs deutlich stärker ausgeprägt als die der CD8⁺ T-Zellen (Ahmetlić 2018) und intratumorale λ -MYC-Tregs zeigten keine Anzeichen eines Stabilitätsverlustes (Abbildung 7). Möglicherweise ist der stabile Treg-Phänotyp auf das verhältnismäßig IFN- γ -arme λ -MYC-Tumormilieu zurückzuführen, intratumorale T-Zellen halten zwar eine gewisse IFN- γ -Produktion aufrecht (Ma et al. 2021; Riedel 2013; Ahmetlić 2018), die Effektorfunktionen der NK-Zellen, welche die Hauptproduzenten für IFN- γ sind, sind jedoch stark eingeschränkt (Brenner et al. 2010; Przewoznik et al. 2012). Gleichzeitig exprimierten intratumorale λ -MYC-Tregs hohe Mengen PD-1, TIGIT, Nrp-1 und CD25 (Abbildung 7A, B, F; Abbildung 6A, D), welche alle den Treg-Phänotyp stabilisieren (Lucca & Dominguez-Villar 2020; Munn et al. 2018; Overacre-Delgoffe et al. 2017; Moreno Ayala et al. 2019; Lucca et al. 2019). Auch in anderen Modellen herrschen im Tumormilieu die Treg-stabilisierenden Signale vor (Munn et al. 2018), in solchen Fällen könnte anstelle der alleinigen PD-1-Blockade eine Kombinationsstrategie mit Treg-inhibierenden Therapeutika von Vorteil sein.

5.4 Beeinträchtigung des suppressiven Phänotyps und der Funktionalität von λ -MYC-Tregs durch die kombinierte Immun-Kontrollpunkt-Blockade

Im Gegensatz zur jeweiligen Monotherapie erwies sich die Kombination von PD-1- und CTLA-4-blockierenden Antikörpern im λ -MYC-Modell als hocheffektiv, wobei der therapeutische Erfolg maßgeblich von der gesteigerten IFN- γ -Produktion intratumoraler T- und NK-Zellen abhängt (Brenner et al. 2020; Ahmetlić et al. 2021). Dieses vermag den IL-10/IL-12-Quotienten intratumoraler DCs günstig zu beeinflussen (Scheuerpflug et al. 2021) und hat durch Seneszenzinduktion (Zellzyklusarretierung) auch einen direkten inhibierenden Effekt auf die malignen B-Zellen (Ahmetlić et al. 2021). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die kombinierte Immunkontrollpunkt-Blockade zudem das Treg-Zellkompartiment beeinflusst, das beide Marker stark exprimiert (Abbildung 6B, E; Abbildung 7A, B). Die Foxp3-Expression war infolge der Therapie reduziert (Abbildung 12). Dies betraf die iTregs (Abbildung 12D), für deren Induktion ein PD-1-Signal benötigt wird (Stathopoulou et al. 2018; Sasidharan Nair et al. 2020), aber auch die nTregs (Abbildung 12C), die im λ -MYC-Modell von größerer Bedeutung sind. Es ist denkbar, dass die reduzierte Foxp3-Expression Tregs durch die Therapie-induzierte Verschiebung hin zu einem pro-inflammatorischen Milieu bei gleichzeitigem Wegfall des zellintrinsic stabilisierenden Effektes von PD-1 bedingt ist (Lucca & Dominguez-Villar 2020). Daneben fiel die Hochregulation von CD25 und IL-10 im Tumormilieu unter Therapie geringer aus (Abbildung 13), wobei es sich um sekundäre Effekte der reduzierten Foxp3-Expression handeln könnte (Zheng et al. 2007; Md Sakib Hossain et al. 2013). Das suppressive Potenzial von Tregs α PD-1/ α CTLA-4-behandelter Mäuse war *in vitro* tendenziell reduziert (Abbildung 14), jedoch bildet die CD3/CD28-Stimulation die CTLA-4-vermittelte Suppression nicht ab. Dafür ließ sich in Suppressionstests mit einer Stimulation durch Peptid-beladene DCs die α PD-1-vermittelte Steigerung der suppressiven Kapazität durch Kombination mit dem α CTLA-4-Antikörper verhindern (Abbildung 15). Bei der kombinierten Immunkontrollpunkt-Blockade können also erschöpfte intratumorale Effektor-T-Zellen reaktiviert werden, ohne dass der Effekt mit einer gleichzeitig gesteigerten Treg-abhängigen Suppression kompetiert.

5.5 Die IL-10-Neutralisierung als therapeutische Option beim B-Zell-Lymphom

IL-10 wird infolge seiner Fähigkeit, proinflammatorische Th1-Antworten zu inhibieren (Fiorentino et al. 1989), klassischerweise eine Tumor-fördernde Rolle zugeschrieben. Dagegen stehen Berichte einer immunstimulierenden, tumorprotektiven Wirkung von IL-10, die auf eine verbesserte CD8-Zellinfiltration und IFN- γ -Antwort zurückgeführt wurde. Die kontroversen Effekte könnten von der Tumorentität und den jeweils beteiligten zellulären Netzwerken abhängen (Emmerich et al. 2012; Mumm et al. 2011; Naing et al. 2018; Saraiva et al. 2020). Die IL-10-Konzentrationen in den

Überständen von λ -MYC-Tumoren sowie Seren tumortragender λ -MYC-Mäuse waren erhöht (Naujoks et al. 2014; Brenner 2009), der IL-12/IL-10-Quotient intratumoraler DCs zugunsten von IL-10 verschoben (Naujoks et al. 2014), intratumorale Tregs exprimierten vermehrt IL-10 (Abbildung 6), und auch die malignen Zellen zeigten sich zur IL-10-Produktion befähigt (Naujoks et al. 2014). Zudem wurden potenziell Tumor-reaktive IFN- γ ⁺ Th1-Zellen im λ -MYC-Tumormilieu zu immunsuppressiven IFN- γ /IL-10-koexprimierenden Tr1-Zellen (*T regulatory type 1 cells*) umprogrammiert – eine Konversion, die präexistentes IL-10 erforderte. Auch trug das IL-10 zur Erschöpfung intratumoraler T-Zellen bei (Ma et al. 2021). Somit implizierte die Gesamtheit der beobachteten Mechanismen für IL-10 eine Tumor-fördernde Funktion in λ -MYC-Lymphomen. Durch die Neutralisierung von IL-10 konnte nun der definitive Beweis für eine Beteiligung von IL-10 an der tumoralen Immunevasion maligner λ -MYC-B-Zellen erbracht werden: Die λ -MYC-Mäuse zeigten nach IL-10-Neutralisierung ein signifikant verlängertes Überleben (Abbildung 16B). Dass dieser Effekt bereits durch eine zeitlich begrenzte Monotherapie erzielt werden konnte, ist – angesichts der Aggressivität des Tumormodells – beachtlich und verdeutlicht eine grundlegende Beteiligung von IL-10 an der Immunevasion in λ -MYC-Lymphomen. In Ovarialkarzinom- und CLL-Modellen (Chronisch Lymphatische Leukämie) war beispielsweise erst die Kombination aus PD-1/PD-L1- und IL-10-Blockade effektiv (Lamichhane et al. 2017; Rivas et al. 2021), und PBMCs (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) von Melanompatienten sezernierten ebenfalls erst nach der kombinierten *In-vitro*-Behandlung mit α PD-1- und α IL-10R-Antikörpern deutlich erhöhte Konzentrationen IFN- γ und TNF- α (Sun et al. 2015). Im λ -MYC-Modell hatte die IL-10-neutralisierende Therapie eine verbesserte tumorale Immunzellinfiltration zur Folge. So war der relative Anteil Tumorf infiltrierender CD4⁺Foxp3⁻ und CD8⁺ T-Zellen, sowie der der NK-Zellen, therapierter Mäusen erhöht (Abbildung 17A, B, C). Die IFN- γ -Expression intratumoraler NK-Zellen, deren Immunantwort essenziell für die Tumorkontrolle erforderlich ist (Brenner et al. 2010), war unter Therapiebedingungen signifikant gesteigert (Abbildung 17C). Es wäre interessant, ob dies – wie bei der kombinierten Immunkontrollpunkt-Blockade – eine Zytokin-induzierte Seneszenz der Tumorzellen bedingt (Ahmetlić et al. 2021; Brenner et al. 2020). Dagegen war das B-Zellkompartiment nach zweimaliger α IL-10-Injektion nahezu vollständig reduziert (Abbildung 17D). Auf den malignen B-Zellen konnte an allen Tumormanifestationsorten eine hohe IL-10R-Expression detektiert werden und ihre Überlebensfähigkeit war in Abwesenheit von IL-10 reduziert (Abbildung 18). Da IL-10 das Überleben, die Proliferation und Antikörperproduktion von B-Zellen verbessern kann (Go et al. 1990; Rousset et al. 1992), erscheint somit ein zusätzlicher direkter Effekt von IL-10 auf die malignen Zellen selbst als wahrscheinlich. Es wäre demnach denkbar, dass IL-10 bei Lymphomen zum einen das Tumorwachstum fördert und gleichzeitig die Bildung des immunsuppressiven Tumormilieus unterstützt. Eine IL-10-Neutralisierung unterbräche beide Mechanismen, was die hohe Effektivität erklärte. Das λ -MYC-Modell spiegelt in vielerlei Hinsicht die klinische Situation des humanen Burkitt-Lymphoms wider (Kovalchuk

et al. 2000). Ein Subtyp – das endemische Burkitt Lymphom – ist EBV-assoziiert (Klapproth & Wirth 2010). Interessanterweise kann EBV in infizierten B-Zellen eine IL-10-Produktion induzieren (Sairenji et al. 1998; Burdin et al. 1993). Daneben wurde IL-10 eine Rolle am autonomen Wachstum EBV-transformierter B-Zelllinien zugeschrieben (Beatty et al. 1997). Eine IL-10-Neutralisierung könnte sich bei malignen EBV-abhängigen B-Zell-Lymphomen entsprechend positiv auswirken.

5.6 Ausblick

Gegenstand dieser Arbeit waren grundlegende tumorale Immunevasionsmechanismen und ihre therapeutische Modulation. Tregs entwickelten während der Lymphomgenese einen zunehmend suppressiven Phänotyp, korrelierend mit einer verstärkten suppressiven Funktion, was die kombinierte Immunkontrollpunkt-Blockade aus PD-1- und CTLA-4-blockierenden Antikörpern teilweise verhinderte. Desweiteren konnte eine Grundlage für den Einsatz von α IL-10-Antikörpern in der Lymphomtherapie geliefert werden. Es bleiben allerdings noch einige Fragen zu klären:

- Um die Rolle von PD-1 bei intratumoralen Tregs besser zu verstehen, können die drei identifizierten Treg-Populationen PD-1⁻, PD-1^{low} und PD-1^{high} von tumortragenden λ -MYC/DEREG-Mäusen FACS-sortiert und hinsichtlich ihres Suppressionspotenzials untersucht werden.
- Um festzustellen, ob aktivierte Tregs für das Therapieversagen der PD-1-Monotherapie mitverantwortlich sind, sollte der Einfluss der PD-1-Blockade auf die Tregs ermittelt werden. Ebenso könnte untersucht werden, ob λ -MYC/DEREG-Mäuse nach Treg-Depletion von einer Therapie mit dem PD-1-blockierenden Antikörper profitieren.
- Ist die durch die PD-1/CTLA-4-Blockade induzierte Verschiebung zu einem pro-inflammatorischen Milieu ursächlich für die beobachteten phänotypischen Veränderungen der Tregs? Hierzu können Tregs nach PD-1/CTLA-4-Blockade bei gleichzeitiger IFN- γ -Neutralisierung untersucht werden (vgl. Ahmetlić et al. 2021).
- Wie verhält sich die 291-Lymphomzelllinie nach einem IL-10R-Knockout oder unter IL-10-Neutralisierung?
- Bedingt die IL-10-neutralisierende Therapie wie die kombinierte Immunkontrollpunkt-Blockade eine Zytokin-vermittelte Seneszenzinduktion in den malignen Zellen?
- Um zu klären, ob das von Tumorzellen oder das von anderen Zellpopulationen sezernierte IL-10 ausschlaggebend für die tumorale Immunevasion ist, könnte man λ -MYC-Mäuse mit einer B-Zell-spezifischen IL-10-Defizienz züchten und erforschen, wie sich diese auf die Lymphomgenese auswirkt.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Ahmetlić, F. (2018). Mechanismen der Tumorthherapie mit Immunkontrollpunkt-Inhibitoren: Rolle von T-Zell-Aktivierung und zellulärer Seneszenz. *Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München*.
- Ahmetlić, F., Fauser, J., Riedel, T., Bauer, V., Flessner, C., Hömberg, N., Hennel, R., Brenner, E., Lauber, K., Röcken, M., & Mocikat, R. (2021). Therapy of lymphoma by immune checkpoint inhibitors: the role of T cells, NK cells and cytokine-induced tumor senescence. *Journal for Immunotherapy of Cancer, 9*(1).
- Ahmetlić, F., Riedel, T., Hömberg, N., Bauer, V., Trautwein, N., Geishauser, A., Sparwasser, T., Stevanović, S., Röcken, M., & Mocikat, R. (2019). Regulatory T cells in an endogenous mouse lymphoma recognize specific antigen peptides and contribute to immune escape. *Cancer Immunology Research, 7*(4), 600-608.
- Akhmetzyanova, I., Zelinsky, G., Littwitz-Salomon, E., Malyshkina, A., Dietze, K. K., Streeck, H., Brandau, S., & Dittmer, U. (2016). CD137 agonist therapy can reprogram regulatory T cells into cytotoxic CD4+ T cells with antitumor activity. *The Journal of Immunology, 196*(1), 484-492.
- Akimova, T., Beier, U. H., Wang, L., Levine, M. H., & Hancock, W. W. (2011). Helios expression is a marker of T cell activation and proliferation. *PloS one, 6*(8), e24226.
- Akkaya, B., Oya, Y., Akkaya, M., Al Souz, J., Holstein, A. H., Kamenyeva, O., Kabat, J., Matsumura, R., Dorward, D. W., Glass, D. D., & Shevach, E. M. (2019). Regulatory T cells mediate specific suppression by depleting peptide–MHC class II from dendritic cells. *Nature Immunology, 20*(2), 218-231.
- Armitage, J. O., Gascoyne, R. D., Lunning, M. A., & Cavalli, F. (2017). Non-hodgkin lymphoma. *The Lancet, 390*(10091), 298-310.
- Baas, P., Scherpereel, A., Nowak, A. K., Fujimoto, N., Peters, S., Tsao, A. S., Mansfield, A. S., Popat, S., Jahan, T., Antonia, S., Oulkhour, Y., Bautista, Y., Cornelissen, R., Greillier, L., Grossi, F., Kowalski, D., Rodríguez-Cid, J., Aanur, P., Oukessou, A., Baudelet, C., & Zalcman, G. (2021). First-line nivolumab plus ipilimumab in unresectable malignant pleural mesothelioma (CheckMate 743): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet, 397*(10272), 375-386.
- Bailey-Bucktrout, S. L., Martinez-Llordella, M., Zhou, X., Anthony, B., Rosenthal, W., Luche, H., Fehling, H. J., & Bluestone, J. A. (2013). Self-antigen-driven activation induces instability of regulatory T cells during an inflammatory autoimmune response. *Immunity, 39*(5), 949-962.
- Banchereau, J., & Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature, 392*(6673) 245-252.
- Beatty, P. R., Krams, S. M., & Martinez, O. M. (1997). Involvement of IL-10 in the autonomous growth of EBV-transformed B cell lines. *The Journal of Immunology, 158*(9), 4045-4051.

- Bennett, C. L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M. E., Ferguson, P. J., Whitesell, L., Kelly, T. E., Saulsbury, F. T., Chance, P. F., & Ochs, H. D. (2001). The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nature Genetics*, 27(1), 20-21.
- Blank, C., Brown, I., Peterson, A. C., Spiotto, M., Iwai, Y., Honjo, T., & Gajewski, T. F. (2004). PD-L1/B7H-1 inhibits the effector phase of tumor rejection by T cell receptor (TCR) transgenic CD8+ T cells. *Cancer Research*, 64(3), 1140-1145.
- Blank, C., Gajewski, T. F., & Mackensen, A. (2005). Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion: implications for tumor immunotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 54(4), 307-314.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394-424.
- Brenner, C. (2009). Untersuchungen zur Bedeutung von Natürlichen Killerzellen und T-Zellen in einem murinen Spontan-Tumormodell. *Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München*.
- Brenner, C. D., King, S., Przewoznik, M., Wolters, I., Adam, C., Bornkamm, G. W., Busch, D. H., Röcken, M., & Mocikat, R. (2010). Requirements for control of B-cell lymphoma by NK cells. *European Journal of Immunology*, 40(2), 494-504.
- Brenner, E., Schörg, B. F., Ahmetlić, F., Wieder, T., Hilke, F. J., Simon, N., Schroeder, C., Demidov, G., Riedel, T., Fehrenbacher, B., Schaller, M., Forschner, A., Eigentler, T., Niessner, H., Sinnberg, T., Böhm, K. S., Hömberg, N., Braumüller, H., Dauch, D., Zwirner, S., Zender, L., Sonanini, D., Geishauser, A., Bauer, J., Eichner, M., Jarick, K. J., Beilhack, A., Biskup, S., Döcker, D., Schadendorf, D., Quintanilla-Martinez, L., Pichler, B. J., Kneilling, M., Mocikat, R., & Röcken, M. (2020). Cancer immune control needs senescence induction by interferon-dependent cell cycle regulator pathways in tumours. *Nature Communications*, 11(1), 1-19.
- Bretscher, P., & Cohn, M. (1970). A Theory of Self-Nonself Discrimination: Paralysis and induction involve the recognition of one and two determinants on an antigen, respectively. *Science*, 169(3950), 1042-1049.
- Brunet, J. F., Denizot, F., Luciani, M. F., Roux-Dosseto, M., Suzan, M., Mattei, M. G., & Golstein, P. (1987). A new member of the immunoglobulin superfamily—CTLA-4. *Nature*, 328(6127), 267-270.
- Burdin, N., Peronne, C., Banchereau, J., & Rousset, F. (1993). Epstein-Barr virus transformation induces B lymphocytes to produce human interleukin 10. *The Journal of Experimental Medicine*, 177(2), 295-304.
- Burkhardt, B., & Wößmann, W. (2017) S1-Leitlinie 025/013: Non-Hodgkin-Lymphome im Kindes- und Jugendalter, abgerufen am 22.06.2021, von https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/025-013l_S1_Non-Hodgkin-Lymphome_NHL_2017-05.pdf

- Chen, L., & Flies, D. B. (2013). Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nature Reviews Immunology*, *13*(4), 227-242.
- Chinen, T., Kannan, A. K., Levine, A. G., Fan, X., Klein, U., Zheng, Y., Gasteiger, G., Feng, Y., Fontenot, J. D., & Rudensky, A. Y. (2016). An essential role for the IL-2 receptor in T reg cell function. *Nature Immunology*, *17*(11), 1322-1333.
- Costa, L. J., Xavier, A. C., Wahlquist, A. E., & Hill, E. G. (2013). Trends in survival of patients with Burkitt lymphoma/leukemia in the USA: an analysis of 3691 cases. *Blood*, *121*(24), 4861-4866.
- Damgaci, S., Ibrahim-Hashim, A., Enriquez-Navas, P. M., Pilon-Thomas, S., Guvenis, A., & Gillies, R. J. (2018). Hypoxia and acidosis: immune suppressors and therapeutic targets. *Immunology*, *154*(3), 354-362.
- de Lafaille, M. A. C., & Lafaille, J. J. (2009). Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor?. *Immunity*, *30*(5), 626-635.
- Delgoffe, G. M., Woo, S. R., Turnis, M. E., Gravano, D. M., Guy, C., Overacre, A. E., Bettini, M. L., Vogel, P., Finkelstein, D., Bonnevier, J., Workman, C. J., & Vignali, D. A. (2013). Stability and function of regulatory T cells is maintained by a neuropilin-1–semaphorin-4a axis. *Nature*, *501*(7466), 252-256.
- Di Pilato, M., Kim, E. Y., Cadilha, B. L., Prüllmann, J. N., Nasrallah, M. N., Seruggia, D., Usmani, S. M., Misale, S., Zappulli, V., Carrizosa, E., Mani, V., Ligorio, M., Warner, R. D., Medoff, B. D., Marangoni, F., Villani, A. C., & Mempel, T. R. (2019). Targeting the CBM complex causes T_{reg} cells to prime tumours for immune checkpoint therapy. *Nature*, *570*(7759), 112–116.
- Doroshov, D. B., Bhalla, S., Beasley, M. B., Sholl, L. M., Kerr, K. M., Gnjatic, S., Wistuba, I. I., Rimm, D. L., Tsao, M. S., & Hirsch, F. R. (2021). PD-L1 as a biomarker of response to immune-checkpoint inhibitors. *Nature Reviews Clinical Oncology*, *18*(6), 345-362.
- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology*, *3*(11), 991-998.
- Dunn, G. P., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2004). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*, *21*(2), 137-148.
- Ehrlich, P. (1909) Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde*, *5*, 273-290.
- Emmerich, J., Mumm, J. B., Chan, I. H., LaFace, D., Truong, H., McClanahan, T., Gorman, D. M., & Oft, M. (2012). IL-10 directly activates and expands tumor-resident CD8+ T cells without de novo infiltration from secondary lymphoid organs. *Cancer Research*, *72*(14), 3570-3581.
- Fan, M. Y., Low, J. S., Tanimine, N., Finn, K. K., Priyadharshini, B., Germana, S. K., Kaeck, S. M., & Turka, L. A. (2018). Differential roles of IL-2 signaling in developing versus mature Tregs. *Cell Reports*, *25*(5), 1204-1213.

- Feng, T., Cao, A. T., Weaver, C. T., Elson, C. O., & Cong, Y. (2011). Interleukin-12 Converts Foxp3+ Regulatory T Cells to Interferon- γ -Producing Foxp3+ T Cells That Inhibit Colitis. *Gastroenterology*, *140*(7), 2031-2043
- Finn, O. J. (2018). A believer's overview of cancer immunosurveillance and immunotherapy. *The Journal of Immunology*, *200*(2), 385-391.
- Fiorentino, D. F., Bond, M. W., & Mosmann, T. R. (1989). Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *Journal of Experimental Medicine*, *170*(6), 2081-2095.
- Fontenot, J. D., Gavin, M. A., & Rudensky, A. Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Nature Immunology*, *4*(4), 330-336.
- Freeman, G. J., Long, A. J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L. J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M. C., Horton, H. F., Fouser, L., Carter, L., Ling, V., Bowman, M. R., Carreno, B. M., Collins, M., Wood, C. R., & Honjo, T. (2000). Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *The Journal of Experimental Medicine*, *192*(7), 1027-1034.
- Gibney, G. T., Weiner, L. M., & Atkins, M. B. (2016). Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *The Lancet Oncology*, *17*(12), e542-e551.
- Go, N. F., Castle, B. E., Barrett, R., Kastelein, R., Dang, W., Mosmann, T. R., Moore, K. W., & Howard, M. (1990). Interleukin 10, a novel B cell stimulatory factor: unresponsiveness of X chromosome-linked immunodeficiency B cells. *The Journal of Experimental Medicine*, *172*(6), 1625-1631.
- Gottschalk, R. A., Corse, E., & Allison, J. P. (2012). Expression of Helios in peripherally induced Foxp3+ regulatory T cells. *The Journal of Immunology*, *188*(3), 976-980.
- Gupta, S., Roy, A., & Dwarakanath, B. S. (2017). Metabolic cooperation and competition in the tumor microenvironment: implications for therapy. *Frontiers in Oncology*, *7*, 68.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, *100*(1), 57-70.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, *144*(5), 646-674.
- Hodi, F. S., O'Day, S. J., McDermott, D. F., Weber, R. W., Sosman, J. A., Haanen, J. B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J. C., Akerley, W., van den Eertwegh, A. J. M., Lutzky, J., Lorigan, P., Vaubel, J. M., Linette, G. P., Hogg, D., Ottensmeier, C. H., Lebbé, C., Peschel, C., Qirtz, I., Clark, J. I., Wolchok, J. D., Weber, J. S., Tian, J., Yellin, M. J., Nichol, G. M., Hoos, A., & Urba, W. J. (2010). Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *New England Journal of Medicine*, *363*(8), 711-723.
- Hoffmann, P., Boeld, T. J., Eder, R., Huehn, J., Floess, S., Wieczorek, G., Olek, S., Dietmaier, W., Andreesen, R., & Edinger, M. (2009). Loss of FOXP3 expression in natural human CD4+ CD25+ regulatory T cells upon repetitive in vitro stimulation. *European Journal of Immunology*, *39*(4), 1088-1097.

- Hori, S., Nomura, T., & Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, *299*(5609), 1057-1061.
- Hsieh, C. S., Lee, H. M., & Lio, C. W. J. (2012). Selection of regulatory T cells in the thymus. *Nature Reviews Immunology*, *12*(3), 157-167.
- Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K., & Honjo, T. (1992). Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *The EMBO Journal*, *11*(11), 3887-3895.
- Iwai, Y., Ishida, M., Tanaka, Y., Okazaki, T., Honjo, T., & Minato, N. (2002). Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(19), 12293-12297.
- Jiang, Y., Zhao, X., Fu, J., & Wang, H. (2020). Progress and challenges in precise treatment of tumors with PD-1/PD-L1 blockade. *Frontiers in Immunology*, *11*.
- June, C. H., Ledbetter, J. A., Gillespie, M. M., Lindsten, T., & Thompson, C. B. (1987). T-cell proliferation involving the CD28 pathway is associated with cyclosporine-resistant interleukin 2 gene expression. *Molecular and Cellular Biology*, *7*(12), 4472.
- Kamada, T., Togashi, Y., Tay, C., Ha, D., Sasaki, A., Nakamura, Y., Sato, E., Fukuoka, S., Tada, Y., Tanaka, A., Morikawa, H., Kawazoe, A., Kinoshita, T., Shitara, K., Sakaguchi, S., & Nishikawa, H. (2019). PD-1⁺ regulatory T cells amplified by PD-1 blockade promote hyperprogression of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *116*(20), 9999–10008.
- Klapproth, K., & Wirth, T. (2010). Advances in the understanding of MYC-induced lymphomagenesis. *British Journal of Haematology*, *149*(4), 484-497.
- Kovalchuk, A. L., Qi, C. F., Torrey, T. A., Taddesse-Heath, L., Feigenbaum, L., Park, S. S., Gerbitz, A., Klobeck, G., Hoertnagel, K., Polack, A., Bornkamm, G. W., Janz, S., & Morse III, H. C. (2000). Burkitt lymphoma in the mouse. *The Journal of Experimental Medicine*, *192*(8), 1183-1190.
- Krummel, M. F., & Allison, J. P. (1995). CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *The Journal of Experimental Medicine*, *182*(2), 459-465.
- Kuehn, H. S., Ouyang, W., Lo, B., Deenick, E. K., Niemela, J. E., Avery, D. T., Schickel, J. N., Tran, D. Q., Stoddard, J., Zhang, Y., Frucht, D. M., Dumitriu, B., Scheinberg, P., Folio, L. R., Frein, C. A., Price, S., Koh, C., Heller, T., Seroogy, C. M., Huttenlocher, A., Rao, V. K., Su, H. C., Kleiner, D., Notarangelo, L. D., Rampertaap, Y., Olivier, K. N., McElwee, J., Hughes, J., Pittaluga, S., Oliveira, J. B., Meffre, E., Fleisher, T. A., Holland, S. M., Lenardo, M. J., Tangye, S. G., & Uzel, G. (2014). Immune dysregulation in human subjects with heterozygous germline mutations in CTLA4. *Science (New York, N.Y.)*, *345*(6204), 1623–1627.
- Kumagai, S., Togashi, Y., Kamada, T., Sugiyama, E., Nishinakamura, H., Takeuchi, Y., Vitaly, K., Itahashi, K., Maeda, Y., Matsui, S., Shibahara, T., Yamashita, Y., Irie, T., Tsuge, A., Fukuoka, S., Kawazoe, A., Udagawa, H., Kirita, K., Aokage, K., Ishii, G., Kuwata, T., Nakama, K., Kawazu, M., Ueno, T.,

- Yamazaki, N., Goto, K., Tsuboi, M., Mano, H., Doi, T., Shitara, K., & Nishikawa, H. (2020). The PD-1 expression balance between effector and regulatory T cells predicts the clinical efficacy of PD-1 blockade therapies. *Nature Immunology*, *21*(11), 1346–1358.
- Lahl, K., & Sparwasser, T. (2011). In vivo depletion of FoxP3+ Tregs using the DEREK mouse model. In *Regulatory T Cells* (pp. 157-172). Humana Press, Totowa, NJ.
- Lamichhane, P., Karyampudi, L., Shreeder, B., Krempsi, J., Bahr, D., Daum, J., Kalli, K. R., Goode, E. L., Block, M. S., Cannon, M. J., & Knutson, K. L. (2017). IL10 Release upon PD-1 Blockade Sustains Immunosuppression in Ovarian Cancer. *Cancer Research*, *77*(23), 6667–6678.
- Larkin, J., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., Grob, J. J., Cowey, C. L., Lao, C. D., Schadendorf, D., Dummer, R., Smylie, M., Rutkowski, P., Ferrucci, P. F., Hill, A., Wagstaff, J., Carlino, M. S., Haanen, J. B., Maio, M., Marquez-Rodas, I., McArthur, G. A., Ascierto, P. A., Long, G. V., Callahan, M. K., Postow, M. A., Grossmann, K., Sznol, M., Dreno, B., Bastholt, L., Yang, A., Rollin, L. M., Horak, C., Hodi, F. S., & Wolchok, J. D. (2015). Combined nivolumab and ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma. *New England Journal of Medicine*, *373*(1), 23-34.
- Leone, P., Shin, E. C., Perosa, F., Vacca, A., Dammacco, F., & Racanelli, V. (2013). MHC class I antigen processing and presenting machinery: organization, function, and defects in tumor cells. *Journal of the National Cancer Institute*, *105*(16), 1172-1187.
- Levine, A. G., Arvey, A., Jin, W., & Rudensky, A. Y. (2014). Continuous requirement for the TCR in regulatory T cell function. *Nature Immunology*, *15*(11), 1070-1078.
- Linsley, P. S., Bradshaw, J., Greene, J., Peach, R., Bennett, K. L., & Mittler, R. S. (1996). Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement. *Immunity*, *4*(6), 535-543.
- Lorenzo-Sanz, L., & Muñoz, P. (2019). Tumor-infiltrating immunosuppressive cells in cancer-cell plasticity, tumor progression and therapy response. *Cancer Microenvironment*, *12*(2), 119-132.
- Lowther, D. E., Goods, B. A., Lucca, L. E., Lerner, B. A., Raddassi, K., van Dijk, D., Hernandez, A. L., Duan, X., Gunel, M., Coric, V., Krishnaswamy, S., Love, J. C., & Hafler, D. A. (2016). PD-1 marks dysfunctional regulatory T cells in malignant gliomas. *JCI Insight*, *1*(5).
- Lucca, L. E., Axisa, P. P., Singer, E. R., Nolan, N. M., Dominguez-Villar, M., & Hafler, D. A. (2019). TIGIT signaling restores suppressor function of Th1 Tregs. *JCI Insight*, *4*(3).
- Lucca, L. E., & Dominguez-Villar, M. (2020). Modulation of regulatory T cell function and stability by co-inhibitory receptors. *Nature Reviews Immunology*, *20*(11), 680-693.
- Ma, Y., Bauer, V., Riedel, T., Ahmetlić, F., Hömberg, N., Hofer, T. P., Röcken, M., & Mocikat, R. (2021). Interleukin-10 counteracts T-helper type 1 responses in B-cell lymphoma and is a target for tumor immunotherapy. *Cancer Letters*, *503*, 110-116.
- Md Sakib Hossain, D., Panda, A. K., Manna, A., Mohanty, S., Bhattacharjee, P., Bhattacharyya, S., Saha, T., Chakraborty, S., Kar, R. K., Das, T., Chatterjee, S., & Sa, G. (2013). FoxP3 acts as a

- cotranscription factor with STAT3 in tumor-induced regulatory T cells. *Immunity*, 39(6), 1057-1069.
- Meuer, S. C., Schlossman, S. F., & Reinherz, E. L. (1982). Clonal analysis of human cytotoxic T lymphocytes: T4+ and T8+ effector T cells recognize products of different major histocompatibility complex regions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(14), 4395-4399.
- Mocikat, R., Braumüller, H., Gumy, A., Egeter, O., Ziegler, H., Reusch, U., Bubeck, A., Louis, J., Mailhammer, R., Riethmüller, G., Koszinowski, U. & Röcken, M. (2003). Natural killer cells activated by MHC class II targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses. *Immunity*, 19(4), 561-569.
- Moreno Ayala, M. A., Li, Z., & DuPage, M. (2019). Treg programming and therapeutic reprogramming in cancer. *Immunology*, 157(3), 198-209.
- Motzer, R. J., Tannir, N. M., McDermott, D. F., Frontera, O. A., Melichar, B., Choueiri, T. K., Plimack, E. R., Barthélémy, P., Porta, C., George, S., Powles, T., Donskov, F., Neiman, V., Kollmannsberger, C. K., Salman, P., Gurney, H., Hawkins, R., Ravaud, A., Grimm, M. O., Bracarda, S., Barrios, C. H., Tomita, Y., Castellano, D., Rini, B. I., Chen, A. C., Mekan, S., McHenry, M. B., Wind-Rotolo, M., Doan, J., Sharma, P., Hammers, H. J., & Escudier, B. (2018). Nivolumab plus ipilimumab versus sunitinib in advanced renal-cell carcinoma. *New England Journal of Medicine*.
- Mumm, J. B., Emmerich, J., Zhang, X., Chan, I., Wu, L., Mauze, S., Blaisdell, S., Basham, B., Dai, J., Grein, J., Sheppard, C., Hong, K., Cutler, C., Turner, S., LaFace, D., Kleinschek, M., Judo, M., Ayanoglu, G., Langowski, J., Gu, D., Paporello, B., Murphy, E., Sriram, V., Naravula, S., Desai, B., Medicherla, S., Seghezzi, W., McClanahan, T., Cannon-Carlson, S., Beebe, A. M., & Oft, M. (2011). IL-10 elicits IFN γ -dependent tumor immune surveillance. *Cancer Cell*, 20(6), 781-796.
- Munn, D. H., Sharma, M. D., & Johnson, T. S. (2018). Treg destabilization and reprogramming: implications for cancer immunotherapy. *Cancer Research*, 78(18), 5191-5199.
- Murphy, K., Weaver, C., (2017). Janeway's Immunobiology. 9th ed. New York: *Garland Science/Taylor & Francis Group*
- Naing, A., Infante, J. R., Papadopoulos, K. P., Chan, I. H., Shen, C., Ratti, N. P., Rojo, B., Autio, K. A., Wong, D. J., Patel, M. R., Ott, P. A., Falchook, G. S., Pant, S., Hung, A., Pekarek, K. L., Wu, V., Adamow, M., McCauley, S., Mumm, J. B., Wong, P., Van Vlasselaer, P., Leveque, J., Tannir, N. M., & Oft, M. (2018). PEGylated IL-10 (Pegilodecakin) Induces Systemic Immune Activation, CD8⁺ T Cell Invigoration and Polyclonal T Cell Expansion in Cancer Patients. *Cancer Cell*, 34(5), 775–791.
- Naujoks, M., Weiß, J., Riedel, T., Hömberg, N., Przewoznik, M., Noessner, E., Röcken, M. & Mocikat, R. (2014). Alterations of costimulatory molecules and instructive cytokines expressed by dendritic cells in the microenvironment of an endogenous mouse lymphoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 63(5), 491-499.

- Ott, G., Rosenwald, A., & Campo, E. (2013). Understanding MYC-driven aggressive B-cell lymphomas: pathogenesis and classification. *Blood*, *122*(24), 3884-3891.
- Overacre-Delgoffe, A. E., Chikina, M., Dadey, R. E., Yano, H., Brunazzi, E. A., Shayan, G., Horne, W., Moskovitz, J. M., Kolls, J. K., Sander, C., Shuai, Y., Normolle, D. P., Kirkwood, J. M., Ferris, R. L., Delgoffe, G. M., Bruno, T. C., Workman, C. J., & Vignali, D. (2017). Interferon- γ Drives T_{reg} Fragility to Promote Anti-tumor Immunity. *Cell*, *169*(6), 1130–1141.
- Parkin, J., & Cohen, B. (2001). An overview of the immune system. *The Lancet*, *357*(9270), 1777-1789.
- Piconese, S., Walker, L. S., & Dominguez-Villar, M. (2020). Control of Regulatory T Cell Stability, Plasticity, and Function in Health and Disease. *Frontiers in Immunology*, *11*.
- Przewoznik, M., Hömberg, N., Naujoks, M., Pötzl, J., Münchmeier, N., Brenner, C. D., Anz, D., Bourquin, C., Nelson, P. J., Röcken, M. & Mocikat, R. (2012). Recruitment of natural killer cells in advanced stages of endogenously arising B-cell lymphoma: implications for therapeutic cell transfer. *Journal of Immunotherapy*, *35*(3), 217-222.
- Qureshi, O. S., Zheng, Y., Nakamura, K., Attridge, K., Manzotti, C., Schmidt, E. M., Baker, J., Jeffery, L. E., Kaur, S., Briggs, Z., Hou, T. Z., Fütter, C. E., Anderson, G., Walker, L. S., & Sansom, D. M. (2011). Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science (New York, N.Y.)*, *332*(6029), 600–603.
- Riedel, T. (2013). Intratumorale T-Zellen in einem Spontanlymphommodell der Maus: aktivierende und supprimierende Mechanismen. *Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München*.
- Riella, L. V., Paterson, A. M., Sharpe, A. H., & Chandraker, A. (2012). Role of the PD-1 pathway in the immune response. *American Journal of Transplantation*, *12*(10), 2575-2587.
- Rivas, J. R., Liu, Y., Alhakeem, S. S., Eckenrode, J. M., Marti, F., Collard, J. P., Zhang, Y., Shaaban, K. A., Muthusamy, N., Hildebrandt, G. C., Fleischman, R. A., Chen, L., Thorson, J. S., Leggas, M. & Bondada, S. (2021). Interleukin-10 suppression enhances T-cell antitumor immunity and responses to checkpoint blockade in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, <https://doi.org/10.1038/s41375-021-01217-1>
- Rousset, F., Garcia, E., Defrance, T., Péronne, C., Vezzio, N., Hsu, D. H., Kastelein, R., Moore, K. W., & Banchereau, J. (1992). Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *89*(5), 1890-1893.
- Rowshanravan, B., Halliday, N., & Sansom, D. M. (2018). CTLA-4: a moving target in immunotherapy. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, *131*(1), 58-67.
- Sage, P. T., Francisco, L. M., Carman, C. V., & Sharpe, A. H. (2013). The receptor PD-1 controls follicular regulatory T cells in the lymph nodes and blood. *Nature Immunology*, *14*(2), 152-161.
- Sairenji, T., Ohnishi, E., Inouye, S., & Kurata, T. (1998). Induction of interleukin-10 on activation of Epstein-Barr virus in EBV-infected B-cell lines. *Viral Immunology*, *11*(4), 221-231.

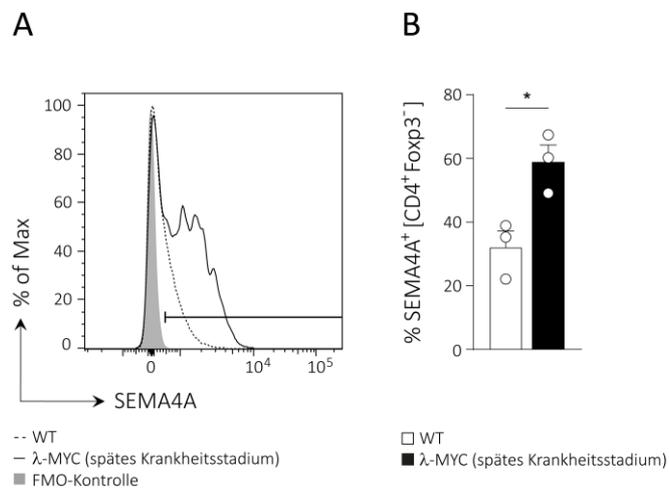
- Saito, T., Nishikawa, H., Wada, H., Nagano, Y., Sugiyama, D., Atarashi, K., Maeda, Y., Hamaguchi, M., Ohkura, N., Sato, E., Nagase, H., Nishimura, J., Yamamoto, H., Takiguchi, S., Tanoue, T., Suda, W., Morita, H., Hattori, M., Honda, K., Mori, M., Doki, Y., & Sakaguchi, S. (2016). Two FOXP3+ CD4+ T cell subpopulations distinctly control the prognosis of colorectal cancers. *Nature Medicine*, *22*(6), 679-684.
- Sakaguchi, S., Mikami, N., Wing, J. B., Tanaka, A., Ichiyama, K., & Ohkura, N. (2020). Regulatory T cells and human disease. *Annual Review of Immunology*, *38*, 541-566.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., & Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *The Journal of Immunology*, *155*(3), 1151-1164.
- Samstein, R. M., Lee, C. H., Shoushtari, A. N., Hellmann, M. D., Shen, R., Janjigian, Y. Y., Barron, D. A., Zehir, A., Jordan, E. J., Omuro, A., Kaley, T. J., Kendall, S. M., Motzer, R. J., Hakimi, A. A., Voss, M. H., Russo, P., Rosenberg, J., Iyer, G., Bochner, B. H., Bajorin, D. F., Al-Ahmadie, H. A., Chafft, J. E., Rudin, C. M., Riely, G. J., Baxi, S., Ho, A. L., Wong, R. J., Pfister, D. G., Wolchok, J. D., Barker, C. A., Gutin, P. H., Brennan, C. W., Tabar, V., Mellingerhoff, I. K., DeAngelis, L. M., Ariyan, C. E., Lee, N., Tap, W. D., Gounder, M. M., D'Angelo, S. P., Saltz, L., Stadler, Z. K., Scher, H. I., Baselga, J., Razavi, P., Klebanoff, C. A., Yaeger, R., Segal, N. H., Ku, G. Y., DeMatteo, R. P., Ladanyi, M., Rizvi, N. A., Berger, M. F., Riaz, N., Solit, D. B., Chan, T. A., & Morris, L. (2019). Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types. *Nature Genetics*, *51*(2), 202–206.
- Saraiva, M., Vieira, P., & O'garra, A. (2020). Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *The Journal of Experimental Medicine*, *217*(1).
- Sasidharan Nair, V. , Toor, S. M., Taouk, G., Pfister, G., Ouararhni, K., Alajez, N. M., & Elkord, E. (2020). Pembrolizumab Interferes with the Differentiation of Human FOXP3+–Induced T Regulatory Cells, but Not with FOXP3 Stability, through Activation of mTOR. *The Journal of Immunology*, *204*(1), 199-211.
- Scheuerpflug, A., Ahmetlić, F., Bauer, V., Riedel, T., Röcken, M., & Mocikat, R. (2021). The role of dendritic cells for therapy of B-cell lymphoma with immune checkpoint inhibitors. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, *70*(5), 1343-1350.
- Schubert, D., Bode, C., Kenefeck, R., Hou, T. Z., Wing, J. B., Kennedy, A., Bulashevskaya, A., Petersen, B. S., Schäffer, A. A., Grüning, B. A., Unger, S., Frede, N., Baumann, U., Witte, T., Schmidt, R. E., Dueckers, G., Niehues, T., Seneviratne, S., Kanariou, M., Speckmann, C., Ehl, S., Rensing-Ehl, A., Warnatz, K., Rakhmanov, M., Thimme, R., Hasselblatt, P., Emmerich, F., Cathomen, T., Backofen, R., Fisch, P., Seidl, M., May, A., Schmitt-Graeff, A., Ikemizu, S., Salzer, U., Franke, A., Sakaguchi, S., Walker, L. S. K., Sansom, D. M., & Grimbacher, B. (2014). Autosomal dominant immune dysregulation syndrome in humans with CTLA4 mutations. *Nature Medicine*, *20*(12), 1410–1416.

- Shang, B., Liu, Y., Jiang, S. J., & Liu, Y. (2015). Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3+ regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*, 5(1), 1-9.
- Sharfe, N., Dadi, H. K., Shahar, M., & Roifman, C. M. (1997). Human immune disorder arising from mutation of the α chain of the interleukin-2 receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(7), 3168-3171.
- Shevach, E. M., & Thornton, A. M. (2014). tTregs, pTregs, and iTregs: similarities and differences. *Immunological Reviews*, 259(1), 88-102.
- Shevryev, D., & Tereshchenko, V. (2020). Treg heterogeneity, function, and homeostasis. *Frontiers in Immunology*, 10, 3100.
- Sitrin, J., Ring, A., Garcia, K. C., Benoist, C., & Mathis, D. (2013). Regulatory T cells control NK cells in an insulinitic lesion by depriving them of IL-2. *Journal of Experimental Medicine*, 210(6), 1153-1165.
- Stathopoulou, C., Gangaplara, A., Mallett, G., Flomerfelt, F. A., Liniyany, L. P., Knight, D., Samsel, L. A., Berlinguer-Palmini, R., Yim, J. J., Felizardo, T. C., Eckhaus, M. A., Edgington-Mitchell, L., Martinez-Fabregas, J., Zhu, J., Fowler, D. H., van Kasteren, S. I., Laurence, A., Bogoyo, M., Watts, C., Shevach, E. M., & Amarnath, S. (2018). PD-1 Inhibitory Receptor Downregulates Asparaginyl Endopeptidase and Maintains Foxp3 Transcription Factor Stability in Induced Regulatory T Cells. *Immunity*, 49(2), 247–263.
- Sun, Z., Fourcade, J., Pagliano, O., Chauvin, J. M., Sander, C., Kirkwood, J. M., & Zarour, H. M. (2015). IL10 and PD-1 cooperate to limit the activity of tumor-specific CD8+ T cells. *Cancer Research*, 75(8), 1635-1644.
- Tan, C. L., Kuchroo, J. R., Sage, P. T., Liang, D., Francisco, L. M., Buck, J., Thaker, Y. R., Zhang, Q., McArdel, S. L., Juneja, V. R., Lee, S. J., Lovitch, S. B., Lian, C., Murphy, G. F., Blazar, B. R., Vignali, D., Freeman, G. J., & Sharpe, A. H. (2021). PD-1 restraint of regulatory T cell suppressive activity is critical for immune tolerance. *The Journal of Experimental Medicine*, 218(1).
- Thornton, A. M., Korty, P. E., Tran, D. Q., Wohlfert, E. A., Murray, P. E., Belkaid, Y., & Shevach, E. M. (2010). Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *The Journal of Immunology*, 184(7), 3433-3441.
- Vahl, J. C., Drees, C., Heger, K., Heink, S., Fischer, J. C., Nedjic, J., Ohkura, N., Morikawa, H., Poeck, H., Schallenberg, S., Rieß, D., Hein, M. Y., Buch, T., Polic, B., Schönle, A., Zeiser, R., Schmitt-Gräff, A., Kretschmer, K., Klein, L., Korn, T., Sakaguchi, S., & Schmidt-Supprian, M. (2014). Continuous T cell receptor signals maintain a functional regulatory T cell pool. *Immunity*, 41(5), 722-736.
- Vollmar, A., Zündorf, I., Dingermann, T., (2013). Immunologie – Grundlagen und Wirkstoffe. 2. Auflage. Stuttgart: *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart*
- Wan, Y. Y., & Flavell, R. A. (2007). Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. *Nature*, 445(7129), 766-770.

- Weber, J. S., D'Angelo, S. P., Minor, D., Hodi, F. S., Gutzmer, R., Neyns, B., Hoeller, C., Khushalani, N. I., Miller, W. H., Lao, C. D., Linette, G. P., Thomas, L., Lorigan, P., Grossmann, K. F., Hassel, J. C., Maio, M., Sznol, M., Ascierto, P. A., Mohr, P., Chmielowski, B., Bryce, A., Svane, I. M., Grob, J. J., Krackhardt, A. M., Horak, C., Lambert, A., Yang, A. S., & Larkin, J. (2015). Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, *16*(4), 375-384.
- Wherry, E. J. (2011). T cell exhaustion. *Nature Immunology*, *12*(6), 492-499.
- Wherry, E. J., & Kurachi, M. (2015). Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nature Reviews Immunology*, *15*(8), 486-499.
- Wildin, R. S., Ramsdell, F., Peake, J., Faravelli, F., Casanova, J. L., Buist, N., Levy-Lahad, E., Mazzella, M., Goulet, O., Perroni, L., Dagna Bricarelli, F., Byrne, G., McEuen, M., Proll, S., Appleby, M., & Brunkow, M. E. (2001). X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nature Genetics*, *27*(1), 18-20.
- Xu, J. X., Maher, V. E., Zhang, L., Tang, S., Sridhara, R., Ibrahim, A., Kim, G., & Pazdur, R. (2017). FDA approval summary: nivolumab in advanced renal cell carcinoma after anti-angiogenic therapy and exploratory predictive biomarker analysis. *The Oncologist*, *22*(3), 311.
- Zhang, Z., Zhang, W., Guo, J., Gu, Q., Zhu, X., & Zhou, X. (2017). Activation and functional specialization of regulatory T cells lead to the generation of Foxp3 instability. *The Journal of Immunology*, *198*(7), 2612-2625.
- Zhang, Z., & Zhou, X. (2019). Foxp3 instability helps tregs distinguish self and non-self. *Frontiers in Immunology*, *10*, 2226.
- Zheng, Y., Josefowicz, S. Z., Kas, A., Chu, T. T., Gavin, M. A., & Rudensky, A. Y. (2007). Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature*, *445*(7130), 936-940.
- Zhou, X., Bailey-Bucktrout, S. L., Jeker, L. T., Penaranda, C., Martínez-Llordella, M., Ashby, M., Nakayama, M., Rosenthal, W., & Bluestone, J. A. (2009). Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nature Immunology*, *10*(9), 1000-1007.

7. ANHANG

7.1 Zusätzliche Abbildungen



Hochregulation von SEMA4A auf intratumoralen CD4⁺Foxp3⁻ Teffs. Durchflusszytometrische Analyse der Milzen von WT- und tumortragenden λ -MYC-Mäusen. Exemplarisches Histogramm **(A)** und Quantifizierung **(B)** der SEMA4A-Expression auf CD4⁺Foxp3⁻ Teffs. Die Signifikanz wurde mithilfe des *Unpaired t test* berechnet. Darstellung der Mittelwerte einer Gruppe \pm SEM. Ein Punkt bildet den Mittelwert einer Maus ab.

7.2 Veröffentlichungen

Die vorliegende Arbeit ist in Teilen veröffentlicht.

7.2.1 Fachpublikationen

Bauer, V., Ahmetlić, F., Hömberg, N., Geishauser, A., Röcken, M., & Mocikat, R. (2021) Immune checkpoint blockade impairs immunosuppressive mechanisms of regulatory T cells in B-cell lymphoma. *Translational Oncology*, 14(9), 1011-1170.

Ma, Y.*, **Bauer, V.***, Riedel, T.*, Ahmetlić, F., Hömberg, N., Hofer, T. P., Röcken, M., & Mocikat, R. (2021). Interleukin-10 counteracts T-helper type 1 responses in B-cell lymphoma and is a target for tumor immunotherapy. *Cancer Letters*, 503, 110-116.

Ahmetlic, F., Fauser, J., Riedel, T., **Bauer, V.**, Flessner, C., Hömberg, N., Hennel, R., Brenner, E., Lauber, K., Röcken, M., & Mocikat, R. (2021). Therapy of lymphoma by immune checkpoint inhibitors: the role of T cells, NK cells and cytokine-induced tumor senescence. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 9(1).

Scheuerpflug, A., Ahmetlić, F., **Bauer, V.**, Riedel, T., Röcken, M., & Mocikat, R. (2021). The role of dendritic cells for therapy of B-cell lymphoma with immune checkpoint inhibitors. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 70(5), 1343-1350.

Ahmetlić, F., Riedel, T., Hömberg, N., **Bauer, V.**, Trautwein, N., Geishauser, A., Sparwasser, T., Stevanović, S., Röcken, M., & Mocikat, R. (2019). Regulatory T cells in an endogenous mouse lymphoma recognize specific antigen peptides and contribute to immune escape. *Cancer Immunology Research*, 7(4), 600-608.

*geteilte Erstautorenschaft

7.2.2 Poster und Vorträge

Bauer, V., Ahmetlić, F., Röcken, M., & Mocikat, R. Immune checkpoint blockade impacts the suppressive phenotype and function of regulatory T cells in an endogenous mouse lymphoma model. 35. SITC-Jahrestreffen (virtuell), 9.-14. November 2020. Abstrakt in *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 8(3), A467-A468 (2020).

Ma, Y., **Bauer, V.**, Riedel, T., Hofer, T., Röcken, M., & Mocikat, R. Interleukin-10 drives the development of T regulatory type 1 (Tr1) cells and is a target for immunotherapy. 35. SITC-Jahrestreffen (virtuell), 9.-14. November 2020. Abstrakt in *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 8(3), A500 (2020).

Bauer, V., Ahmetlić, F., Riedel, T., Trautwein, N., Sparwasser, T., Stevanović, S., Röcken, M., & Mocikat, R. Regulatory T cells in an endogenous lymphoma mouse model evolve an increasingly suppressive phenotype and are targeted by immune checkpoint inhibitors. 15. Symposium "Tumor immunology meets oncology (TIMO)", Halle/Saale, 25.-27. April 2019.

Bauer, V., Ahmetlić, F., Riedel, T., Trautwein, N., Sparwasser, T., Stevanović, S., Röcken, M., & Mocikat, R. Regulatory T cells in endogenous mouse lymphoma are antigen-specific nTregs and provide a target

for immune checkpoint-inhibiting therapies. 1. Symposium "Cancer-Immuno-Oncology", Lübeck, 17.-18. Oktober 2018. Abstrakt in *Proceedings on Cancer-Immuno-Oncology* (2018).

7.3 Danksagung

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Ralph Mocikat bedanken, der in den letzten drei Jahren stets ein offenes Ohr für Probleme und Fragen jeglicher Art hatte, bei all meinen Ideen den roten Faden im Auge behielt und sich so viel Zeit für mich nahm. Ich habe sehr viel von ihm lernen dürfen.

Herzlichsten Dank an Nadine, Albert und Yanchun, dass wir so eine schöne, fröhliche Zeit miteinander hatten und aus Arbeitskollegen Freunde wurden. Auch der gesamten AG Nößner möchte ich für die spaßigen Mittagspausen, die gegenseitige Unterstützung, das Teilen der Dongles und Tom für die FACS-Sortierungen danken. Großer Dank geht an die Tierpfleger – insbesondere Michael und Franzi – für die Hilfsbereitschaft und tolle Zusammenarbeit. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Zudem danke ich Prof. Dr. Martin Röcken und Dr. Bernhard Frankenberger für die fachliche Betreuung und der Deutschen Krebshilfe für die finanzielle Unterstützung der Arbeit. Desweiteren möchte ich mich bei der gesamten iTarget-Gruppe für den netten Austausch während der zahlreichen Seminare, Workshops und Freizeitveranstaltungen bedanken.

Zuletzt ein riesiges Dankeschön an meine Familie, meinen Freund und meine Freunde. Ihr seid mir in jeder Lebenslage eine solche Stütze – ich bin unheimlich froh, dass es euch gibt!