

Aus der Eigenständigen Forschungseinheit Translationale Molekulare Immunologie

Helmholtz-Zentrum München

Leitung: Prof. Dr. Ralph Mocikat

Bedeutung dendritischer Zellen

für die Tumorthherapie mit Immunkontrollpunkt-Inhibitoren

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Anne Catharina Scheuerpflug

aus

Würzburg

Jahr

2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Ralph Mocikat
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Barbara Schraml-Schotta Prof. Dr. Tobias Feuchtinger PD Dr. Markus Moser
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	-
Dekan:	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung:	09.02.2023

Die experimentelle Forschung der vorliegenden Arbeit wurde von April 2017 bis April 2018 in der Eigenständigen Forschungseinheit „Translationale Molekulare Immunologie (TMI)“ des Helmholtz-Zentrums München, Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt, durchgeführt.

Prof. Dr. med. Ralph Mocikat hatte die Fachvertretung für die Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München inne.

Teile der Arbeit wurden veröffentlicht:

Originalpublikation:

Scheuerpflug, A., Ahmetlić, F., Bauer, V. et al. The role of dendritic cells for therapy of B-cell lymphoma with immune checkpoint inhibitors. *Cancer Immunol Immunother* 70, 1343–1350 (2021). <https://doi.org/10.1007/s00262-020-02767-6>

Poster:

A. Scheuerpflug, M. Naujoks, R. Mocikat, Tumorimmunologie – Grundlagen und therapeutische Modulation des Immunsystems, Doktamed 2018

Für meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis	III
Zusammenfassung	V
1. Einleitung	1
1.1 Die Funktionsweise des Immunsystems	1
1.1.1. Reifung und Proliferation der T-Zellen	1
1.1.1.1. T-Helferzellen	2
1.1.1.2. Regulatorische T-Zellen	3
1.1.1.3. Zytotoxische T-Zellen	3
1.1.2. Aufgaben der Natürlichen Killerzellen	4
1.1.3. Die Rolle der dendritischen Zellen	5
1.2 Tumorimmunologie	6
1.2.1. Mechanismen der Immunevasion	6
1.2.2. Tumorimmuntherapien	8
1.3. B-Zell-Lymphom im Mausmodell	9
1.4. Fragestellung	11
2. Material und Methoden	13
2.1. Material	13
2.2.1. Geräte	13
2.2.2. Chemikalien und Reagenzien	14
2.2.3. Medien und Puffer	15
2.2.4. Mäuse	17
2.2.4.1. Nicht-transgene Wildtyp- und λ -MYC-Mäuse	17
2.2.4.2. BALB/c- und OT-Mäuse	17
2.2.5. Antikörper	17
2.2.5.1. Antikörper der In-vivo-Versuche	17
2.2.5.2. Detektionsantikörper	18
2.2.6. Kits	19
2.2.7. Peptide	19
2.2.8. Software	19
2.2. Methoden	20
2.2.1. Behandlung der Mäuse mit Immunkontrollpunkt-Inhibitoren	20
2.2.2. Steriles Arbeiten und Zellkultur	20

2.2.3.	Gewinnung einer Einzelzellsuspension	20
2.2.4.	Einfrieren und Auftauen von Zellen	22
2.2.5.	Oberflächenfärbung	22
2.2.6.	Intrazellulärfärbung	23
2.2.7.	Durchflusszytometrie	23
2.2.8.	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	24
2.2.9.	Magnetische Zellseparation	25
2.2.22.	Anlegen einer In-vitro-Kokultur	25
2.2.21.	In-vitro-Inkubation mit therapeutischen Antikörpern	25
2.2.22.	Allogene Stimulation	26
2.2.23.	Peptidbeladung der dendritischen Zellen	26
2.2.24.	Peptidspezifische Stimulation	26
3.	Ergebnisse	27
3.1.	Analyse der Oberflächenmarker dendritischer Zellen	27
3.1.1.	Verhältnis der DZ-Subpopulationen	27
3.1.2	Reife- und Aktivierungsmarker	28
3.1.3	PD-L1- und CTLA-4-Expression auf dendritischen Zellen	32
3.2.	Regulation der Immunantwort durch Zytokinexpression	34
3.2.1.	IL-12-/IL-10-Verhältnis der dendritischen Zellen aus In-vivo-Versuchen	34
3.2.2.	Zytokinexpression nach In-vitro-Inkubation mit therapeutischen Antikörpern	36
3.3	Funktionalität dendritischer Zellen	37
3.3.1	Allogene Stimulation	37
3.3.2	Peptidspezifische Stimulation	38
4.	Diskussion	40
4.1	Bedeutung der Therapie mit Immunkontrollpunkt-Inhibitoren	40
4.2	Die Effekte von IFN-γ	40
4.3	Stimulationskapazität der DZ	42
4.4	Fazit und Ausblick	43
5.	Literaturverzeichnis	45
6.	Anhang	56

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Ag	Antigen
AK	Antikörper
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
Arm.	Armenisch
CD	Cluster of differentiation; Differenzierungsgruppe
CTL	Cytotoxic T lymphocyte; zytotoxischer T-Lymphozyt
CTLA-4	Cytotoxic T lymphocyte antigen-4
DMSO	Dimethylsulfoxid
DZ	Dendritische Zelle
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescence activated cell sorting
Fc	Fragment crystallisable; C-Terminus eines Antikörpers
FKS	Fetales Kälberserum
FSC	Forward scatter; Vorwärtsstreuung
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
iT _{reg}	induzierte regulatorische T-Zellen
LK	Lymphknoten
MACS	Magnetic cell separation; magnetischer Zellsortierer
mAK	monoklonaler Antikörper
MHC	Major histocompatibility complex; Haupthistokompatibilitätskomplex
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NSCLC	Non-small cell lung cancer; Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
nT _{reg}	natürliche regulatorische T-Zellen
OVA	Ovalbumin

PBS	Phosphate buffered saline
PD-1	Programmed cell death 1
PD-L1/PD-L2	Programmed cell death ligand 1/2
PGE2	Prostaglandin E2
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
RPMI 1640	Rosewell Park Memorial Institute Medium 1640
RT	Raumtemperatur
SSC	Sideward scatter; Seitwärtsstreuung
TAA	Tumor-assoziierte Antigene
T _{eff}	T-Effektorzelle
TGF-β	Transforming growth factor β
T _H -Zelle	T-Helferzelle
TIDZ	Tumor-infiltrierende dendritische Zelle
TNF	Tumornekrosefaktor
T _{reg}	regulatorische T-Zelle
TZR	T-Zell-Rezeptor
Wt	Wildtyp

ZUSAMMENFASSUNG

Neben Operation, Chemotherapie oder Bestrahlung nimmt die Bedeutung der Immuntherapie in den letzten Jahren als neue Therapiesäule bei Tumorerkrankungen weiter zu. Einer der dabei zu Grunde liegenden Mechanismen zielt auf die Blockade der Immunkontrollpunkte CTLA-4 und PD-1 mittels monoklonaler Antikörper wie Ipilimumab bzw. Nivolumab oder Pembrolizumab ab. Gerade durch den kombinierten Einsatz dieser Kontrollpunktinhibitoren wurden nicht nur bei soliden Tumoren, wie dem malignen Melanom oder dem Mammakarzinom, sondern auch bei Tumoren, welche sich innerhalb des Immunsystems bilden, große klinische Erfolge verzeichnet. Lange Zeit wurde als Mechanismus der Therapie fast ausschließlich die Reaktivierung der im Tumormilieu supprimierten T-Zell-Funktionen vermutet. Mittlerweile hat man herausgefunden, dass der therapeutische Effekt der Immunkontrollpunkt-Inhibition zusätzlich von weiteren Immunzellen und deren Zytokin-sekretion abhängt.

Unter der Therapie mit anti-CTLA-4- und anti-PD-1-Antikörpern produzieren T-Zellen und vor allem NK-Zellen vermehrt Interferon- γ (Ahmetlic et al., 2021). Ausgangspunkt dieser Arbeit ist, dass dies wiederum Einfluss auf die Eigenschaften dendritischer Zellen (DZ) ausüben sollte. Diese spielen als Antigen-präsentierende Zellen (APZ) eine Schlüsselrolle in der Bekämpfung von Tumorzellen. Allerdings scheinen ihre phänotypischen und funktionellen Eigenschaften in der Tumorumgebung verändert bzw. unterdrückt zu werden (Naujoks et al., 2014). Es wurde daher untersucht, ob der Einsatz der therapeutischen Antikörper zu einem Wechsel der inhibitorischen Eigenschaften tumor-infiltrierender DZ (TIDZ) hin zu einer gewünschten inflammatorischen Reaktionskaskade führt. Als Untersuchungsmodell wurden transgene λ -MYC-Mäuse verwendet, welche nach 80 bis 120 Tagen endogene B-Zell-Lymphome entwickeln.

Zunächst wurde der Reifegrad der TIDZ aus mit Antikörpern behandelten λ -MYC-Mäusen anhand der Expression von Oberflächenmarkern charakterisiert. Dabei war das Verhältnis der CD11c^{niedrig} zur CD11c^{hoch} Population im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe signifikant verringert. Dies ist in funktioneller Hinsicht von Bedeutung, da die CD11c^{niedrig} Population als regulatorische und eher unreife Subgruppe bezeichnet wird, welche Anergie

und Tumorzelltoleranz in T-Zellen induziert (Perrot et al., 2007). Zudem kam es unter Therapie insbesondere in der CD11c^{niedrig} Gruppe zu einer Hochregulation der kostimulatorischen Marker CD80, CD86 und des Haupthistokompatibilitätskomplex-II (MHC-II), welche essentiell für eine erfolgreiche T-Zell-Stimulation sind.

Auch konnte gezeigt werden, dass es durch IFN- γ zu einer Umkehr des im Tumormilieu verringerten IL-12-/IL-10-Verhältnis in DZ kam, wodurch eine T_H1-gesteuerte Antitumor-Antwort begünstigt werden sollte. Die Steigerung des IL12-/IL-10-Verhältnisses konnte darüber hinaus auch durch die direkte Interaktion der therapeutischen Antikörper mit DZ erreicht werden. Von besonderer Bedeutung war schließlich die klar verbesserte Fähigkeit der TIDZ zur allogenen und auch peptidspezifischen T-Zell-Stimulation in vitro, welche aus Mäusen gewonnen wurden, die zuvor mit α -CTLA-4- und α -PD-1-Antikörpern behandelt worden waren.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass dendritische Zellen unter Therapie mit Immunkontrollpunktinhibitoren ihre im Tumormilieu unterdrückten Funktionen wieder erlangen können. Gemeinsam mit NK-Zellen unterstützen DZ die Antitumor-Aktivität der T-Zellen und tragen daher maßgeblich zum therapeutischen Erfolg von α -CTLA-4- und α -PD-1-Antikörpern im λ -MYC-Lymphommodell bei.

1. EINLEITUNG

1.1 Die Funktionsweise des Immunsystems

Über unsere Umwelt ist der Körper ständig Erregern ausgesetzt. Damit es dennoch nicht zu einer Infektion kommt, besitzen wir das Immunsystem, welches sich in einen angeborenen und einen erworbenen Arm unterteilen lässt. Zu den Bestandteilen des angeborenen Immunsystems gehören neben physiologischen Barrieren und löslichen Faktoren wie Zytokinen und Komplementfaktoren auch verschiedene Zelltypen wie Makrophagen, Natürliche Killerzellen und Antigen-präsentierende Zellen. Während Zellen des angeborenen Immunsystems innerhalb kürzester Zeit gegen Pathogene aktiv werden, aber unspezifisch reagieren, antwortet das erworbene Immunsystem, zu dem T- und B-Zellen gehören, auf Fremdkörper mit hoher Spezifität. Wichtig für die erfolgreiche Bekämpfung schädigender Organismen ist letztendlich auch das Zusammenspiel beider Seiten des Immunsystems. (Parkin & Cohen, 2001)

1.1.1. Reifung und Proliferation der T-Zellen

Die im Thymus gereiften $CD4^+$ bzw. $CD8^+$ T-Zellen sind zunächst Antigen-unerfahren und benötigen zur Aktivierung bestimmte Signale. Dazu wandern sie in sekundäre lymphatische Organe, wie Milz und Lymphknoten ein. Dort befinden sich Antigen-präsentierende Zellen, welche zuvor ein körperfremdes Molekül in der Peripherie aufgenommen haben und dieses nun als prozessiertes Peptid auf ihrer Oberfläche mittels des MHC präsentieren. Durch die Erkennung dieses spezifischen Antigens durch den T-Zell-Rezeptor (TZR) werden in der T-Zelle verschiedene Vorgänge in Gang gesetzt (Steinman & Inaba, 1989). Zur vollständigen Aktivierung wird außerdem ein zweites, kostimulatorisches Signal benötigt. Wurde lediglich der TZR stimuliert, werden die T-Zellen anerg und sind nicht in der Lage, adäquat auf ein fremdes Antigen zu reagieren (Mueller et al., 1989). Dieses zusätzliche für die Aktivierung obligatorische Signal wird über die Bindung des Oberflächenrezeptors CD28 auf der T-Zelle an CD80 bzw. CD86 (B7-1 bzw. B7-2) der APZ induziert (Greenwald et al., 2005). Die nun aktivierte T-Zelle proliferiert und bildet T-Effektorzellen (T_{eff}). Diese wandern in peripheres Gewebe, wo sie nun eigenständig spezifische Moleküle detektieren können. Wurde ein

Erreger erkannt und eliminiert, bilden manche T-Zellen Gedächtniszellen, welche in Zukunft bei Kontakt mit dem gleichen Antigen schneller und effektiver eingreifen können (Sallusto et al., 1999).

Neben kostimulatorischen Molekülen exprimieren T-Zellen auch koinhibitorische Rezeptoren, welche deren Aktivität herabregulieren. Zu diesen gehören die Immunkontrollpunkt-moleküle programmed cell death 1 (PD-1) und cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4). PD-1 wird von programmed cell death ligand 1 bzw. 2 (PD-L1/ PD-L2) gebunden, welche sich beispielsweise auf der Oberfläche dendritischer Zellen oder auch Tumorzellen befinden. Dagegen wird CTLA-4 aufgrund ähnlicher Struktur wie CD28 von CD80 (B7-1) bzw. CD86 (B7-2) gebunden.

Diese kontroversen Signalwege sorgen letztendlich für ein Gleichgewicht zwischen T-Zell-Aktivierung und -Toleranz. Dies dient unter physiologischen Bedingungen als Schutz vor Autoimmunität und wahrt die Selbsttoleranz. (Collins et al., 2002; Greenwald et al., 2005; Keir et al., 2008; Pardoll, 2012; Parry et al., 2005)

1.1.1.1. T-Helferzellen

T-Helferzellen sind $CD4^+$ T-Effektorzellen und binden mit ihrem TZR an den MHC der Klasse II, welcher sich nur auf bestimmten Zellen des Immunsystems befindet. Dazu gehören dendritische Zellen, Makrophagen oder B-Lymphozyten. Diese APZ nehmen Antigene aus dem Interzellularraum auf und präsentieren sie den $CD4^+$ T-Zellen, welche daraufhin aktiviert werden. Die anschließende Differenzierung der $CD4^+$ T-Zellen zu den verschiedenen Zellsubtypen wird durch das lokal vorhandene Zytokinmuster beeinflusst. Dabei induzieren Interleukin-12 (IL-12) sowie Interferon- γ die Entwicklung zu T-Helferzellen vom Typ 1 (T_H1 -Zellen), welche vor allem für die Bekämpfung intrazellulärer Pathogene wichtig sind. T_H1 -Zellen sezernieren Interleukin-2 (IL-2), wodurch sie die Bildung weiterer T-Effektorzellen hervorrufen. Das zudem gebildete Interferon- γ hemmt die Bildung von Typ-2-Helferzellen (T_H2 -Zellen) und aktiviert verschiedene APZ, welche wiederum zur Produktion von IL-12 und IFN- γ angeregt werden. (Adam et al., 2005; Kennedy & Celis, 2008)

Durch Interleukin-4 (IL-4) wird die Polarisierung zu T_H2 -Zellen gefördert, welche über zusätzliche IL-4/-10-Sekretion die Entstehung weiterer T_H2 -Zellen begünstigen und die Bildung von T_H1 -Zellen reduzieren (Pardoll & Topalian, 1998). T_H1 - und T_H2 -Zellen besitzen somit entgegengesetzte Funktionen: T_H1 -Zellen fördern proinflammatorische Prozesse,

welche wichtig für die Bekämpfung pathogener Erreger oder entarteter Zellen sind. T_H2 -Zellen dagegen bremsen überschießende Immunreaktionen und verhindern die Zerstörung körpereigenen Gewebes. Für die Homöostase des Organismus ist daher ein Gleichgewicht beider Seiten notwendig (Shurin et al., 1999).

1.1.1.2. Regulatorische T-Zellen

Eine weitere Untergruppe der $CD4^+$ T-Lymphozyten sind die regulatorischen T-Zellen (T_{reg}), von denen ein Teil bereits im Thymusgewebe als natürliche T_{reg} entsteht (nT_{reg}). Der andere Teil sind sogenannte induzierte T_{reg} (iT_{reg}), welche in der Peripherie unter dem Einfluss des transformierenden Wachstumsfaktor β (TGF- β) gebildet werden (Marie et al., 2005; Schmitt & Williams, 2013). T_{reg} dienen als Gegenspieler der T-Effektorzellen, indem sie deren Proliferation und Zytokinproduktion hemmen. So kann die Gewebshomöostase aufrechterhalten und beispielsweise der Gewebsschaden im Rahmen einer Entzündungsreaktion reduziert werden (Kondělková et al., 2010). Wird die T_{reg} -Bildung dagegen verhindert, kommt es zu einer Multi-Organ-Autoimmunität (Sakaguchi et al., 1995).

Auch T_{reg} exprimieren das Immunkontrollpunkt-Molekül CTLA-4. Im Gegensatz zur Unterdrückung der T-Effektorzell-Aktivität hat die Bindung auf den T_{reg} einen fördernden Einfluss. Wird CTLA-4 dagegen nur vermindert exprimiert oder beispielsweise durch Antikörper blockiert, bewirkt dies Lymphozytenproliferation und Tumormunität (Wing et al., 2008).

1.1.1.3. Zytotoxische T-Zellen

Zytotoxische T-Zellen (CTL) sind $CD8^+$ T-Effektorzellen, deren TZR im Gegensatz zu den T-Helferzellen an den MHC der Klasse I bindet. Der MHC-I befindet sich auf allen kernhaltigen Zellen des Körpers und präsentiert intrazelluläre Antigene der jeweiligen Zelle. Die durch dendritische Zellen und $CD4^+$ T-Helferzellen aktivierten CTL patrouillieren über die verschiedenen Lymph- und Blutbahnen durch den Körper und prüfen dabei den Zustand verschiedener Zellen (de Vries et al., 1989). Befindet sich darunter eine virusbefallene Zelle oder Tumorzelle, präsentiert deren MHC-I auch pathogene Antigenfragmente, welche die Entartung der Zelle anzeigen. Die CTL leitet nach der Bindung des TZR an den MHC-I die

Apoptose der Zielzelle ein. Dies geschieht entweder indirekt über die Sekretion zytotoxischer Substanzen, wie Granzyme und Perforine oder direkt über die Bindung des Fas-Rezeptors (Todesrezeptor) auf der entarteten Zelle durch den Fas-Ligand auf der CTL-Oberfläche. Zudem können CTL weitere Proteine wie Interferon- γ ausschütten und dadurch andere Immunzellen, wie dendritische Zellen aktivieren. (Gerosa et al., 1996; Mailliard et al., 2002; Parkin & Cohen, 2001)

1.1.2 Aufgaben der Natürlichen Killerzellen

Eine weitere wichtige Population der zellvermittelten Immunabwehr stellen Natürliche Killerzellen dar. Diese zum angeborenen Immunsystem gehörenden Zellen besitzen auf ihrer Oberfläche sowohl aktivierende als auch inhibitorische Rezeptoren. Entscheidend für die Effektorfunktion der NK-Zelle ist daher das Verhältnis der eingehenden Signale (Lanier, 2008). Damit NK-Zellen keine gesunden, körpereigenen Zellen zerstören, können Letztere über ihren MHC-I an inhibitorische Rezeptoren auf der NK-Zell-Oberfläche binden. Dadurch wird die Aktivierung der NK-Zellen unterdrückt und die Selbsttoleranz aufrechterhalten. Abnormale Zellen, wie Tumorzellen, weisen im Vergleich eine verminderte Anzahl an MHC-I auf ihrer Oberfläche auf, um der Zerstörung durch zytotoxische T-Zellen zu entgehen. Aufgrund dieser Eigenschaft überwiegen nun die aktivierenden Signale und die entarteten Zellen werden in den gerichteten Zelltod (Apoptose) getrieben. Neben der MHC-I-abhängigen Aktivierung kann die Zytotoxizität der NK-Zellen auch antikörpervermittelt stimuliert werden. Dazu bindet der Fc-Ligand der NK-Zelle den Fc-Teil des gegen Pathogene gerichteten Antikörpers. Auch Interaktionen mit anderen Immunzellen, wie T-Zellen, dendritischen Zellen oder Makrophagen sowie das Zytokinmilieu der Umgebung beeinflusst das Verhalten der Natürlichen Killerzellen (Vivier et al., 2008). Überwiegen die aktivierenden Signale, kann die entartete Zelle direkt über Zell-Zell-Interaktionen eliminiert werden. Dazu besitzt die NK-Zelle einen zur Tumornekrosefaktor-Familie gehörenden Fas-Liganden, welcher an den Fas-Rezeptor der Zielzelle bindet. Dadurch werden intrazelluläre Caspasen aktiviert und die Zelle apoptotisch (Zamai et al., 1998). Alternativ sezernieren NK-Zellen zytotoxische Moleküle, wie Perforine und Granzyme, welche die Zielzelle lysieren und die Apoptose einleiten. NK-Zellen sind außerdem die wichtigste Quelle von IFN- γ . Durch dieses proinflammatorische Molekül aktivieren sie Makrophagen und stimulieren die Expression von MHC-II-Molekülen auf APZ und somit deren Antigenpräsentation. Dadurch werden

wiederum verstärkt CD4⁺ T-Zellen aktiviert (Schroder et al., 2004). Auch im direkten Bezug auf T-Zellen übt das produzierte IFN- γ einen wichtigen Einfluss aus, indem es - wie oben beschrieben - die Polarisierung von T-Helferzellen zum Subtyp 1 fördert.

1.1.3 Die Rolle der dendritischen Zellen

Dendritische Zellen, die zu den APZ gehören, stellen ein wichtiges Bindeglied zwischen im Körper befindlichen Antigenen und der Reaktion des Organismus auf diese dar. Die dem Knochenmark entstammenden, zunächst unreifen DZ zeichnen sich durch eine geringe Expression von MHC-II sowie kostimulatorischen Molekülen, darunter CD80/ 86, CD40 und CD83, aus. Sobald sie in der Peripherie ein fremdes Antigen phagozytiert und prozessiert haben, werden diese Marker an der Oberfläche verstärkt exprimiert und die nun reife dendritische Zelle kann diese Peptidfragmente naiven T-Zellen präsentieren. Damit eine effektive Antigenpräsentation und folgende T-Zell-Antwort generiert werden kann, benötigen DZ zusätzlich proinflammatorische Signale in ihrer Umgebung. Diese werden über verschiedene Rezeptoren wie Toll-like-Rezeptoren wahrgenommen (Hasegawa & Matsumoto, 2018). Fehlen diese Stimuli, gelangen dendritische Zellen in einen tolerogenen Zustand, wodurch sie eine Anergie in T-Effektorzellen induzieren und weitere stimulatorische Vorgänge unterdrücken. Dies ist aus physiologischer Sicht wichtig, damit überschießende Immunreaktionen verhindert und die Gewebshomöostase gewahrt werden kann. (Banchereau & Steinman, 1998; Sato et al., 2017; Steinman, 1991)

Dendritische Zellen werden unter anderem anhand der exprimierten CD11c-Menge in CD11c^{niedrig}-DZ und CD11c^{hoch}-DZ eingeteilt. Diese Unterscheidung ist sinnvoll, da beiden Subgruppen unterschiedliche phänotypische und funktionelle Eigenschaften zugesprochen werden (Perrot et al., 2007). Über die Sekretion verschiedener Zytokine regulieren DZ die Polarisierung der T-Helferzellen zu verschiedenen Subtypen und damit auch die Richtung der Immunreaktion. Besonders das Verhältnis von IL-12 zu IL-10 stellt den entscheidenden Faktor für eine überwiegende T_H1- oder T_H2-gesteuerte Antwort dar. Während CD11c^{niedrig} DZ vor allem IL-10 sezernieren und daher immunsuppressiven Funktionen nachgehen, produzieren CD11c^{hoch} ein IL-12-gewichtetes Zytokinmuster. IL-12 ist nicht nur potenter Initiator einer T_H1-gewichteten Immunreaktion, sondern führt auch zur Aktivierung und gesteigerten IFN- γ -Produktion von T-Zellen und Natürlichen Killerzellen. (Fernandez et al.,

1999; Gerosa et al., 1996; Heufler et al., 1996; Ma et al., 2015; Orange & Biron, 1996; Wakkach et al., 2003)

1.2 Tumormunologie

Das Immunsystem besitzt eine Reihe effektiver Mechanismen, die es ermöglichen, den Körper vor entarteten Zellen zu schützen. NK-Zellen und CTL besitzen die Fähigkeit, Tumorzellen selbstständig zu erkennen und diese zu zerstören. Die dabei entstehenden Tumorzell-Antigene werden von dendritischen Zellen aufgenommen und naiven T-Zellen im lymphatischen Gewebe präsentiert. Aktivierte T-Zellen wandern daraufhin in das Tumorbett, in welchem sie die Krebszellen erkennen und lysieren könnten. Diese, von Chen & Mellman als Krebs-Immunitäts-Zyklus bezeichneten Schritte leiten eine inflammatorische Immunreaktion ein, welche sich gegen die vorhandenen Tumorzellen richtet. Bei vielen Krebserkrankungen finden diese Prozesse allerdings oft nur in geringem Maße oder mit wenig Erfolg statt. Der Tumor proliferiert, metastasiert und führt häufig zum Tod des Patienten (Topalian et al., 2015). Um geeignete Therapeutika zu entwickeln, die diese Verläufe aufhalten können, muss man zunächst verstehen, wie die Tumorzellen den Angriff des Immunsystems unterdrücken und diesem entkommen können.

1.2.1. Mechanismen der Immunevasion

Krebszellen haben bestimmte Eigenschaften entwickelt, um sich der Erkennung durch das Immunsystem zu entziehen. Dazu gehört beispielsweise die Reduktion der exprimierten MHC-I-Moleküle sowie das Herabregulieren von Genen, die für die Präsentation der intrazellulären Proteine auf der Zelloberfläche zuständig sind. Dazu kommt, dass tumorassoziierte Antigene (TAA) aus körpereigenen Zellen entstehen und daher eine Immunreaktion im Rahmen der Selbsttoleranz unterdrückt wird (Gabilovich, 2004).

Krebszellen beeinflussen außerdem das Milieu ihrer Umgebung durch die Sekretion verschiedener Zytokine, wie IL-10, TGF- β und viele weitere. Neben T-Zellen oder NK-Zellen wirkt sich das suppressive Milieu auch auf tumorinfiltrierende dendritische Zellen aus (Demoulin et al., 2013; Vicari, Caux, et al., 2002; Yang et al., 2015). In verschiedenen Untersuchungen präsentierten sich diese häufig in einem unreifen Status mit herabregulierter Expression kostimulatorischer Marker und waren zu keiner adäquaten Antigenpräsentation bzw. T-Zell-Aktivierung fähig (Chaux et al., 1997). Die Entstehung dieser regulatorischen DZ wird

zusätzlich über die Sekretion von TGF- β und Prostaglandin E2 (PGE2) von Tumorzellen gefördert (Liu et al., 2009). Auch das Zytokinmuster tumorinfiltrierender dendritischer Zellen wird durch das sie umgebende Milieu verändert. Ruffell et al. konnten zeigen, dass das im Tumormilieu sezernierte IL-10 die Produktion von Interleukin-12 in TIDZ unterdrückt und zur Hemmung der CD8⁺ T-Zell-Antwort führt. Außerdem wird das Verhältnis von T_H1- zu T_H2-Zellen vermindert, wodurch eine antiinflammatorisch wirkende Immunantwort und die Toleranz von Tumorzellen im Organismus gefördert werden. (García-Hernández et al., 2002; Mellman et al., 2011)

Bei der Analyse von tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs) hatte sich außerdem gezeigt, dass diese im Vergleich zu Lymphozyten in gesundem Gewebe eine größere Menge an PD-1 exprimieren. Gleichzeitig weisen Tumorzellen als adaptiven Schutzmechanismus auf das von T-Effektorzellen sezernierte IFN- γ verstärkt PD-L1/ PD-L2 auf ihrer Oberfläche auf. Über diese Bindung wird in den TILs eine Anergie oder Erschöpfung mit gestörter Proliferation und Zytokinausschüttung hervorgerufen. (Blank et al., 2005; Ilcus et al., 2017; Mellman et al., 2011; Topalian, Drake, et al., 2012)

Diese zahlreichen Mechanismen erschaffen eine Umgebung des Tumors mit einerseits anergischen und seneszenten Effektorzellen, andererseits auch mit einem vergrößerten Anteil regulatorischer Zellen, welche eine gegen den Tumor gerichtete Immunreaktion unterdrücken. So wird den Krebszellen ein Überleben und Ausbreiten im Körper ermöglicht. (Crespo et al., 2013; Dimri, 2005; Wherry, 2011; Zou, 2005)

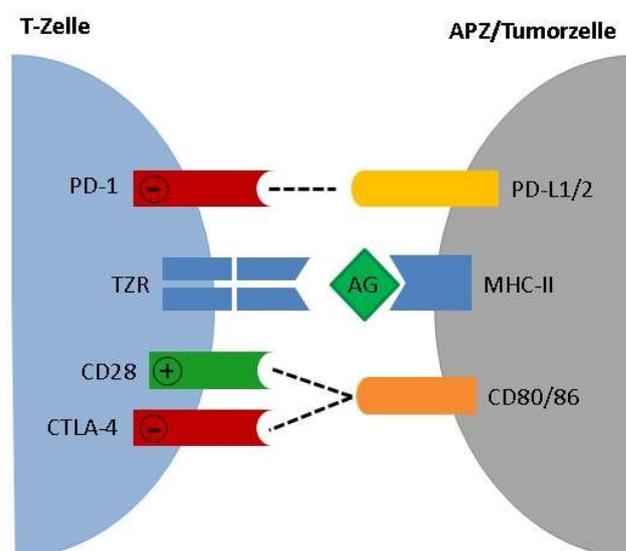


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Interaktion zwischen T-Zellen und APZ/ Tumorzellen über ihre jeweiligen Rezeptoren. Während PD-1 und CTLA-4 eine inhibitorische Signalkaskaden in der T-Zelle vermitteln, fördert die CD28/B7-Bindung die Zellaktivierung.

1.2.2. Tumorimmuntherapien

Chemotherapie, Operation oder Bestrahlung gehören heutzutage zum festen Behandlungsschema bei einem Krebsleiden. Inzwischen haben sich neben diesen herkömmlichen Verfahren weitere Therapeutika in der Tumorbehandlung etabliert, die auf die Modulation des Immunsystems abzielen. Neben dem adoptiven T-Zell-Transfer erweisen sich besonders Antikörper gegen verschiedene Oberflächenmoleküle von Tumor- oder Immunzellen als erfolgversprechend. Als erster Vertreter seiner Art wurde der monoklonale Antikörper Rituximab 1997 von der US Food and Drug Administration (FDA) zur Behandlung des Non-Hodgkin-Lymphoms (NHL) zugelassen. Heutzutage ist dieser gegen das CD20-Molekül auf entarteten B-Zellen gerichtete AK aus der Therapie maligner Lymphome nicht mehr wegzudenken (Batlevi et al., 2016).

Ein weiteres, vielversprechendes Ziel in der antikörperbasierten Immuntherapie ist die Blockade der Immunkontrollpunkt-Moleküle CTLA-4 und PD-1. Diese auf der Immunzelloberfläche befindlichen Rezeptoren dienen unter physiologischen Bedingungen dem Schutz körpereigenen Gewebes, da sie überschießende, inflammatorische Zellaktivitäten verhindern (Tivol et al., 1995). Sie werden deshalb auch von Tumorzellen stimuliert, um den Angriff des Immunsystems zu unterdrücken. Wie in Abbildung 1.2 dargestellt, verhindern die Antikörper die Bindung an CTLA-4 und PD-1 durch Rezeptorblockade. Dadurch werden keine hemmenden Signalkaskaden in der T-Zelle ausgelöst und somit deren Aktivität aufrecht erhalten (Pardoll, 2012).

Leach et al. entdeckten, dass es unter Blockade des inhibitorischen Rezeptors CTLA-4 zu einer Tumorabstoßung und Immunität gegenüber sekundärer Tumorexposition kommt. In später folgenden Phase-III-Studien führte die CTLA-4-Blockade mit Ipilimumab zu einem verlängerten Überleben bei Patienten mit fortgeschrittenem Melanom, woraufhin der α -CTLA-4-Antikörper als erstes Therapeutikum der Immunkontrollpunkt-Inhibition im Jahr 2011 von der US Food and Drug Administration (FDA) zugelassen wurde (Hodi et al., 2010; Pardoll, 2012). Im Jahr 2014 folgte schließlich die Zulassung der PD-1-Antikörper Nivolumab und Pembrolizumab zur Behandlung des metastasierten Melanoms (Li et al., 2020).

Aufgrund der unterschiedlichen Angriffspunkte und sich ergänzenden Effekte von Ipilimumab und Nivolumab, konnte das therapeutische Potential der Antikörpertherapie durch die kombinierte Immunkontrollpunkt-Blockade zusätzlich gesteigert werden (Larkin et al., 2015).

Inzwischen finden α -PD-1- und α -CTLA-4-Antikörper Anwendung bei vielen verschiedenen Tumorerkrankungen (Postow et al., 2015; Topalian et al., 2015): Neben der Behandlung des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms (NSCLC), sind sie auch für die Therapie des Nierenzellkarzinoms, des Mammakarzinoms und vielen weiteren zugelassen (Dyck & Mills, 2017; McArthur & Page, 2016; Pardoll, 2012; Topalian, Hodi, et al., 2012). Auch zur Bekämpfung von nicht-soliden Tumoren, darunter aggressive NHL wie das Burkitt-Lymphom, werden die Immunkontrollpunkt-Inhibitoren erfolgreich eingesetzt (Topalian et al., 2014; Witkowska & Smolewski, 2018).

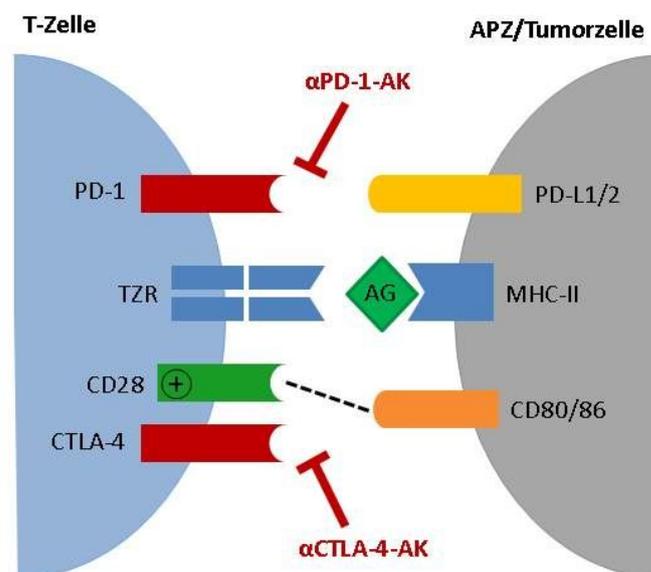


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der therapeutischen Intervention mit α -CTLA-4- bzw. α -PD-1-Antikörpern.

1.3. B-Zell-Lymphom im Mausmodell

Um die Funktionsweise und somit auch den Erfolg der Immunkontrollpunkt-Inhibition besser verstehen zu können, wird ein Untersuchungsmodell benötigt, welches in Entstehung und Verlauf einem menschlichen Tumor möglichst ähnlich ist. Dazu bietet sich das λ -MYC-

Mausmodell an, in welchem das MYC-Gen unter dem Einfluss des Verstärkers der Ig λ -Kette steht. Durch die Dysregulation mit Überexpression dieses Proto-Onkoproteins entwickeln die transgenen Tiere nach 80 bis 120 Tagen Lymphome, welche sich vor allem in Milz und LK manifestieren. Diese Tumoren sind vergleichbar mit dem humanen Burkitt-Lymphom, bei dem es durch eine Translokation des MYC-Gens ebenfalls zur gesteigerten Expression und dadurch zum endogenen Tumorwachstum kommt (Hecht & Aster, 2000; Kovalchuk et al., 2000).

1.4. Fragestellung

Bei Untersuchungen dendritischer Zellen aus tumorkranken λ -MYC-Mäusen stellte sich heraus, dass diese im Vergleich zum Wildtyp einen veränderten Phänotyp und funktionelle Einschränkungen aufweisen. Mit einem erhöhten Anteil an regulatorischen CD11c^{niedrig}-DZ und einer verstärkten Interleukin-10-Sekretion tragen tumorinfiltrierende dendritische Zellen zu einem immunsuppressiven Milieu bei, in welchem die Krebszellen proliferieren können und vom Immunsystem unentdeckt bleiben (Naujoks et al., 2014). Durch die Therapie mit Kontrollpunkt-Inhibitoren konnten allerdings bei verschiedenen Tumorerkrankungen bereits vielfältige, immunstimulierende Effekte nachgewiesen werden (Topalian et al., 2015). Auch beim λ -MYC-Tumormodell der Maus wurde unter anderem eine deutliche Steigerung der Überlebensrate im Vergleich zur nicht-therapierten Gruppe erreicht. Dafür konnte das von T-Zellen und besonders von NK-Zellen produzierte IFN- γ verantwortlich gemacht werden (Ahmetlic et al., 2021). Da IFN- γ einen direkten Einfluss auf dendritische Zellen hat, dürften auch deren Eigenschaften im Rahmen der Behandlung beeinflusst werden.

Zunächst sollte der Reifegrad der DZ aus behandelten Mäusen anhand der Expression kostimulatorischer Moleküle bestimmt werden, welche für eine erfolgreiche T-Zell-Aktivierung notwendig sind. Darüber hinaus wurde auch die Sekretion der instruktiven Zytokine IL-10 und IL-12 in dendritischen Zellen nach der Therapie gemessen. Insbesondere deren Verhältnis ist von großer Bedeutung, da es die Polarisierung der T-Helferzellen und somit die Richtung der Immunreaktion lenkt. Während das Immunkontrollpunkt-Molekül PD-1 auf der Oberfläche bereits nachgewiesen wurde (Scheuerpflug et al., 2020), war es noch unklar, ob auch CTLA-4 von dendritischen Zellen exprimiert wird. Sollte dies der Fall sein, stellt sich die Frage, ob und welchen direkten Einfluss die therapeutischen Antikörper α -CTLA-4 und α -PD-1 und auch deren kombinierter Einsatz auf die dendritischen Zellen haben. Anschließend sollte die Fähigkeit zur adäquaten T-Zell-Stimulation von TIDZ aus behandelten Mäusen getestet werden, da dies eine wichtige Voraussetzung für die Einleitung einer spezifischen Antitumor-Reaktion darstellt. Diese stimulatorischen Kapazitäten sollen sowohl in allogenen als auch peptidspezifischen In-vitro-Ansätzen gemessen werden.

Zusammengefasst ist das Ziel dieser Arbeit, den Einfluss von Immunkontrollpunkt-Inhibitoren auf die Eigenschaften der dendritischen Zellen in einem dem menschlichen

Burkitt-Lymphom ähnlichen Mausmodell zu untersuchen. Letztlich soll dadurch der Beitrag der DZ zum Therapieerfolg inmitten des immunologischen Netzwerkes dargestellt werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.2.1. Geräte

Gerät	Hersteller
BD LSR II Flow Cytometer	Becton Dickinson, Heidelberg
Brutschrank Hera cell 240	Heraeus Instruments, Hanau
EasySep® Magnet	Stemcell Technologies, Vancouver (Kanada)
Einmalpipetten 5/10/25ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
Eismaschine AF 200	Scotsman, Mailand (Italien)
ELISA Gerät Sunrise	Tecan, Crailsheim
ELISA Platten	Maxi-Sorp Nunc, Wiesbaden
FACS-Röhrchen, klein	Greiner bio-one, Frickenhausen
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr, Ochsenhausen
Gefrierschrank (-80°C)	Thermo Scientific, Braunschweig
Kühlschrank	Liebherr, Ochsenhausen
Kulturplatten, 96-Loch	Greiner, Frickenhausen
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Kühlzentrifuge Megafug 1.0R	Heraeus Instruments, Hanau
Mikroskop Aksioskop HE	Carl Zeiss Microscopy, Jena
Milli-Q® -Reinwasserherstellungssystem	Millipore, Schwabach
Petrischalen	Greiner, Frickinghausen
Pipetten Eppendorf/Gilson	Zentrallager Helmholtz-Zentrum, Neuherberg
Pipettenspitzen Gilson/Greiner	Zentrallager Helmholtz-Zentrum, Neuherberg

Plattenzentrifuge Labofuge 400	Heraeus Instruments, Hanau
Reaktionsgefäße 1,5/2 ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 15/50 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Schüttler IKA® -Schüttler MTS 4	Fröbel Laborgeräte, Lindau
Schüttler Vortex Genie 2	Bachofer, Reutlingen
Sieb, Cell strainer (40 µm)	Becton Dickinson, Heidelberg
Spritze Omnifix® Luer Lock Solo 20m	B.Braun, Melsungen
Sterilwerkbank	BDK, Sonnenbühl-Genkingen
Tischzentrifuge Centrifuge 5424R	Eppendorf, Hamburg
Wasserbad	Memmert, Schwabach

Tabelle 1: Geräte und Verbrauchsmaterialien

2.2.2. Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Life Technologies, Frankfurt
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Merck, Darmstadt
Brefeldin A	eBioscience, Frankfurt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Life Technologies, Frankfurt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Natrium-Salz	Merck, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FKS)	Life Technologies, Frankfurt
IC Fixation Buffer	eBioscience, Frankfurt
Ionomycin, Calcium-Salz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	Merck, Darmstadt

L-Glutamin	Life Technologies, Frankfurt
MEM Medium	Biochrom, Berlin
MEM Non-Essential Amino Acid Solution (100x)	Life Technologies, Frankfurt
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumpyruvat	Life Technologies, Frankfurt
OneComp eBeads	eBioscience, Frankfurt
Penicillin-Streptomycin	Life Technologies, Frankfurt
Permeabilization Buffer (10x)	eBioscience, Frankfurt
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
RPMI 1640 ohne L-Glutamin	Life Technologies, Frankfurt
Streptavidin-β-Galactosidase (500 U/ml)	Roche Diagnostics, Mannheim
Trypanblau	Life Technologies, Frankfurt
Tween 20	ICN, Eschwege

Tabelle 2: Chemikalien und Reagenzien

2.2.3. Medien und Puffer

Medium/ Puffer	Zusammensetzung
Basismedium	RPMI 1640 ohne L-Glutamin 5 bzw. 10 % FKS (hitzeinaktiviert) 100 U/ ml Penicillin-G-Natrium 100 µg/ ml Dihydrostreptomycinsulfat 5 ml L-Glutamin (200mM) 5 ml Natriumpyruvat (100mM)

	5 ml Nicht-essentielle Aminosäuren (100x) 500 µl 2-Mercaptoethanol (50mM)
Einfrüermedium	90 % FKS (hitzeinaktiviert) 10 % DMSO
ELISA Puffer	500 ml DPBS 250 µl Polysorbat 20
Erythrozyten-Lysepuffer (pH 7,4)	16,5 g Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl) 2,0 g Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃) 74,0 g Natrium-EDTA ad 200 ml H ₂ Odest
FACS Puffer	500 ml DPBS 10 ml FKS 5 ml Natriumazid 5 ml EDTA (0,5 M)
Waschpuffer für EasySep-Kits	500 ml DPBS 10 ml FKS
Waschpuffer für MACS-Kits	500 ml DPBS 2,5 ml FKS 2 ml Na-EDTA (0,5M)

Tabelle 3: Medien und Puffer

2.2.4. Mäuse

2.2.4.1. Nicht-transgene Wildtyp- und λ -MYC-Mäuse

Die verwendeten Wildtyp-Mäuse und λ -MYC-Mäuse haben den genetischen Hintergrund C57BL/6 und stammen aus der Zucht des Helmholtz-Zentrums im Campus Neuherberg. Die λ -MYC-Mäuse exprimieren das humane Proto-Onkogen MYC unter Kontrolle des Transkriptionsverstärkers der Ig- λ -Kette und entwickeln nach 80 bis 120 Tagen B-Zell-Lymphome. Diese ähneln dem menschlichen Burkitt-Lymphom.

2.2.4.2. BALB/c- und OT-Mäuse

Die Mäuse vom Stamm BALB/c mit dem MHC Haplotyp H2^d stammen von dem Unternehmen Charles River.

Die transgenen OT-I- und OT-II-Mäuse wurden von der AG Brocker des Instituts für Immunologie der LMU gezüchtet und uns großzügigerweise zur Verfügung gestellt. Die OT-I-Mäuse tragen das Gen für einen T-Zell-Rezeptor, welcher das Peptid OVA257-264 (SIINFEKL) im Zusammenhang mit dem MHC-I-Proteinkomplex erkennt, während der T-Zell-Rezeptor von OT-II-Mäusen das Peptid OVA323-339 über die Präsentation durch die MHC-Klasse II erkennt.

2.2.5. Antikörper

2.2.5.1. Antikörper der In-vivo-Versuche

Antigen	Klon	Spezies	Isotyp	Hersteller
CTLA-4	UC10-4B9	Arm. Hamster	IgG	BioLegend
PD-1	J43	Arm. Hamster	IgG	BioXCell
IFN- γ	XMG 1.2	Ratte	IgG1	Plattform Monoklonale Antikörper, Helmholtz-Zentrum München

Tabelle 4: Antikörper der In-vivo-Versuche

2.2.5.2. Detektionsantikörper

Antigen	Klon	Spezies	Isotyp	Hersteller
CD11c	N418	arm. Hamster	IgG	BioLegend
CD11b	M1/70	Ratte	Ig2b kappa	BioLegend
CD19	1D3	Ratte	IgG2a	BD
CD4	RM4-5	Ratte	IgG2a	BD
CD8a	53-6.7	Ratte	IgG2a	eBioscience
CD40	3/23	Ratte	Ig2a, kappa	BioLegend
CD80	16-10A1	Hamster	IgG2, kappa	BD Pharmingen
CD83	Michel-19	Ratte	IgG1 kappa	BioLegend
CD86	PO3	Ratte	IgG2b	Caltag
MHC II (I-A/I-E)	2G9	Ratte	IgG2a, kappa	BD
PD-L1(B7-H1,CD274)	MIH6	Ratte	IgG2a	AbD Serotec
IL-10	JES5-16E3	Ratte	IgG2b	BD Pharmingen
IL-12	C15.6	Ratte	IgG1	BD Pharmingen
Ki-67	SolA15	Ratte	IgG2a, kappa	eBioscience
FoxP3	FJK-16s	Ratte	IgG2a, kappa	eBioscience

Tabelle 5: Detektionsantikörper

2.2.6. Kits

Kit	Hersteller
LIVE/DEAD® Fixable Blue Dead Cell Stain Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
CD11c MicroBeads UltraPure, mouse	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD8a ⁺ T cell Isolation Kit, mouse	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
EasySep™ Mouse CD4 ⁺ T Cell Isolation Kit	Stemcell Technologies, Vancouver (Kanada)
Mouse IFN-γ ELISA Ready-SET-Go!®	eBioscience, Frankfurt
Th1/Th2/Th9/Th17/Th22/Treg Cytokine 17-Plex Mouse ProcartaPlex™ Panel	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

Tabelle 6: Kits

2.2.7. Peptide

Peptid	Sequenz	Hersteller
OT-1-Peptid	SIINFEKL (OVA 257-264)	GenWay Biotech, San Diego (USA)
OT-2-Peptid	ISQAVHAAHEINEAGR (OVA 323-339)	GenWay Biotech, San Diego (USA)

Tabelle 7: Peptide

2.2.8. Software

Methode	Software	Hersteller
Durchflusszytometrie	BD FACSDiva™	Becton Dickinson, Heidelberg
	FlowJo 8.8.6	Treestar Inc., Ashland (USA)
ELISA	Magellan™ 7.2	Tecan, Crailsheim
Auswertung und Statistik	GraphPad Prism 5	Graphpad Software Inc., La Jolla (USA)
Multiplex	Bio-Plex Manager™ 6.1	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Tabelle 8: Software

2.2. Methoden

2.2.1. Behandlung der Mäuse mit Immunkontrollpunkt-Inhibitoren

Die Therapie der λ -MYC-Mäuse erfolgte ab einem Alter von 55 Tagen mit je 100 μ g α -CTLA-4- und α -PD-1-Antikörpern, welche viermal in einem Abstand von etwa 10 Tagen i.p. gespritzt wurden. Um die Frühphase der Therapie zu untersuchen, erhielten manche Tiere nur eine zweimalige Antikörpergabe und wurden anschließend abgetötet, auch wenn sie zu diesem Zeitpunkt noch keine klinischen Krankheitszeichen entwickelt hatten.

Um das Zytokin IFN- γ zu depletieren, wurden manchen λ -MYC-Mäusen zusätzlich zu den Immunkontrollpunkt-Inhibitoren IFN- γ -neutralisierende Antikörper (150 μ g, 300 μ g oder 500 μ g XMG-1.2) gespritzt. Der Abstand und die jeweilige Menge dieser Antikörper-Behandlung erfolgten nach dem abgebildeten Schema (Abbildung 2.1).

Die Antikörper wurden jeweils in einem Volumen von 100 μ l PBS verabreicht.

2.2.2. Steriles Arbeiten und Zellkultur

Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden alle Arbeiten unter einer Sicherheitswerkbank mit sterilen Geräten und Materialien durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂-Gehalt, 95 % Luftfeuchtigkeit).

2.2.3. Gewinnung einer Einzelzellsuspension

Nach Einschläfern der Mäuse mittels CO₂ wurde die Milz steril entnommen und durch ein Zellsieb mit 40 μ m Maschenweite in MEM-Medium gedrückt. Nach Inkubation in Erythrozyten-Lysepuffer und mehrmaligem Waschen mit PBS, wurden die Zellen anschließend unter dem Mikroskop mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

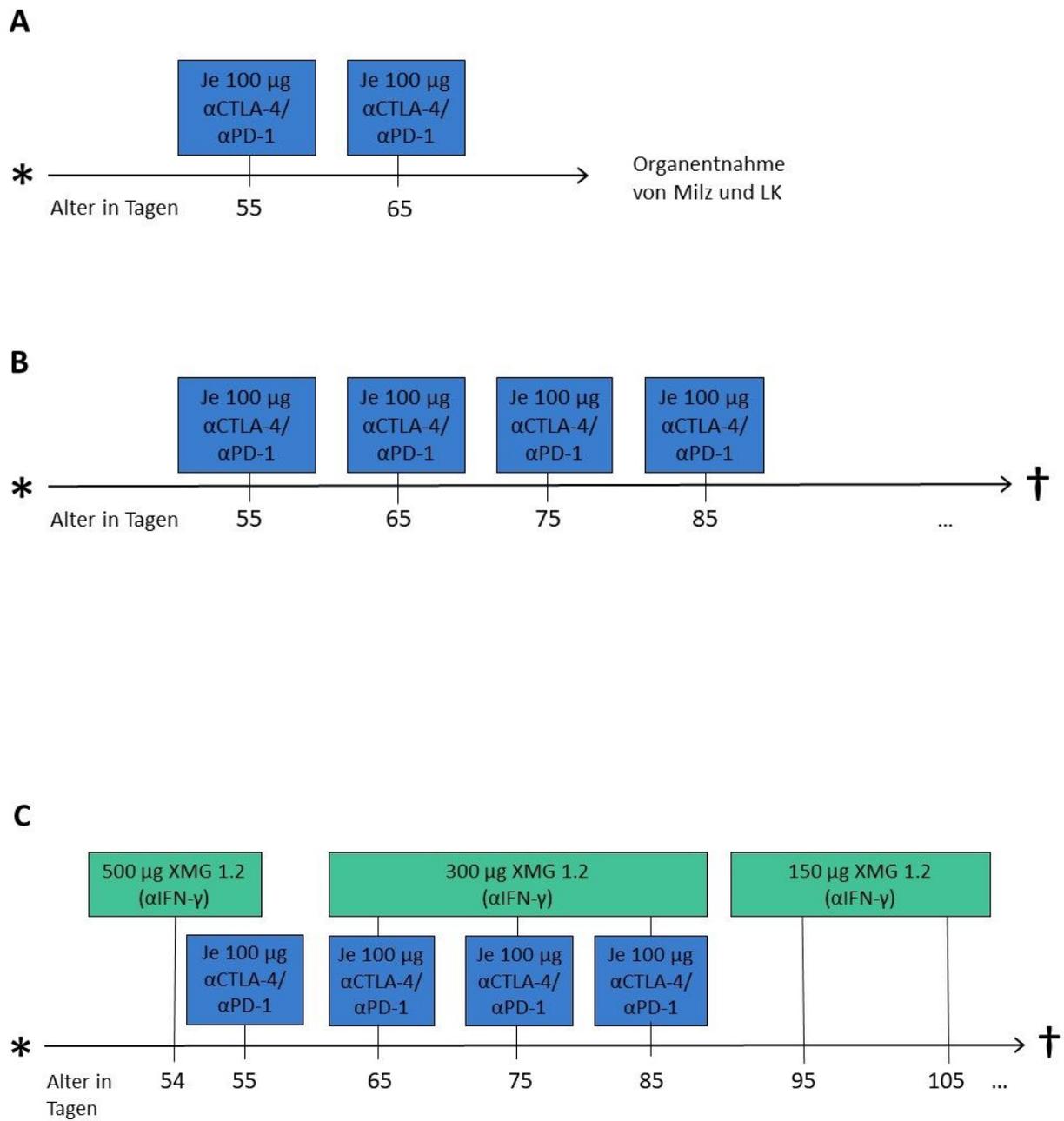


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Therapie mit zweimaliger (A) bzw. viermaliger (B) Antikörper-Gabe sowie die zusätzliche Verabreichung des IFN- γ -neutralisierende Antikörpers XMG-1.2 unter Therapie mit den Immunkontrollpunkt-Inhibitoren (C).

2.2.4. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Um Zellen zu einem späteren Zeitpunkt verwenden zu können, wurden diese in Einfrierlösung gegeben und in einem Kryoröhrchen bei -80 °C eingefroren.

Eingefrorene Zellen aus dem -80 °C Kühlschrank wurden zunächst mit 37 °C warmem PBS aufgetaut und die Einfrierlösung anschließend abgewaschen.

2.2.5. Oberflächenfärbung

Nach Zellisolierung aus der Milz wurden die Zellen gewaschen und gezählt. Nachdem die optimale Antikörperkonzentration mittels Titration bestimmt worden war, wurden 1×10^6 Zellen mit den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern in 50 μ l PBS für 30 Minuten im Kühlschrank (4°C) inkubiert. Anschließend wurden die phänotypischen Eigenschaften per FACS analysiert. Die Unterscheidung zwischen toten und lebenden Zellen wurde durch Verwendung der *LIVE/DEAD® Fixable Blue* -Lösung vorgenommen. Um die DZ in ihre Subpopulationen zu unterteilen, wurden diese bei der Auswertung mit der FlowJo™-Software in Gruppen mit hoher und niedriger CD11c-Expression getrennt (Abbildung 2.2).

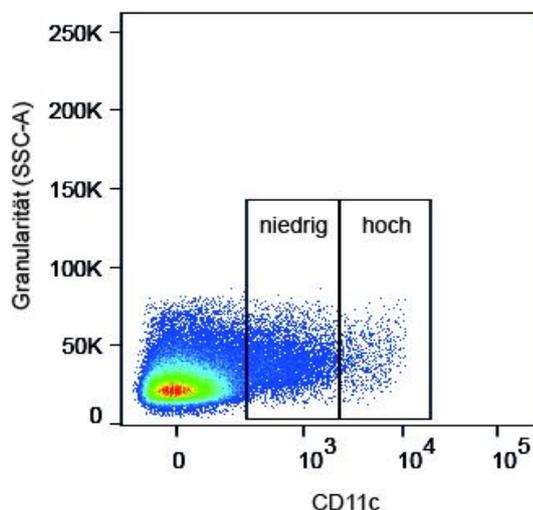


Abbildung 2.2: Durchflusszytometrische Darstellung der DZ-Einteilung in CD11c^{niedrig} und CD11c^{hoch}. Zuvor wurden tote Zellen mittels der *LIVE/DEAD® Fixable Blue* - Lösung von lebenden Zellen abgegrenzt.

2.2.6. Intrazellulärfärbung

Um die Expression intrazellulärer Zytokine zu messen, wurden isolierte Zellen aus der Milz zunächst in Basismedium (10 % FKS) mit PMA, Ionomycin und Brefeldin A (Verdünnung jeweils 1 : 1000) für 4h im Brutschrank stimuliert. Brefeldin A ist ein Inhibitor des intrazellulären Proteintransports und sorgt dafür, dass die produzierten Zytokine nicht aus der Zelle gelangen und daher gemessen werden können. Anschließend wurde das Stimulationsmedium abgewaschen und die Zellen, wie vorher beschrieben, in einer Oberflächenantikörperlösung inkubiert. Danach wurden sie mit Fixationspuffer fixiert (30 Minuten, 4°C), die Zellmembranen mit einem Permeabilisationspuffer permeabilisiert und die Zellen schließlich mit entsprechenden Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern gegen die Zytokine in 50 µl Permeabilisationspuffer inkubiert (40 Minuten, 4°C). Um die Zelltypen und deren jeweilige, intrazelluläre Proteine letztlich im FACS analysieren zu können, wurden sie erneut in FACS-Puffer aufgenommen.

2.2.7. Durchflusszytometrie

Um verschiedene Oberflächeneigenschaften sowie intrazelluläre Marker zu bestimmen, wurden die Zellen mit Antikörpern, die einen Fluoreszenzfarbstoff gebunden haben, gefärbt und mit Hilfe des BD LSR II Flow Cytometers analysiert. Die Daten wurden in der auch als Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) bekannten Methode unter Verwendung der BD FACSDiva™-Software gewonnen und anschließend mit der FlowJo™-Software ausgewertet. Um dabei ausschließlich dendritische Zellen zu analysieren, wurden folgende Gating Strategien angewendet:

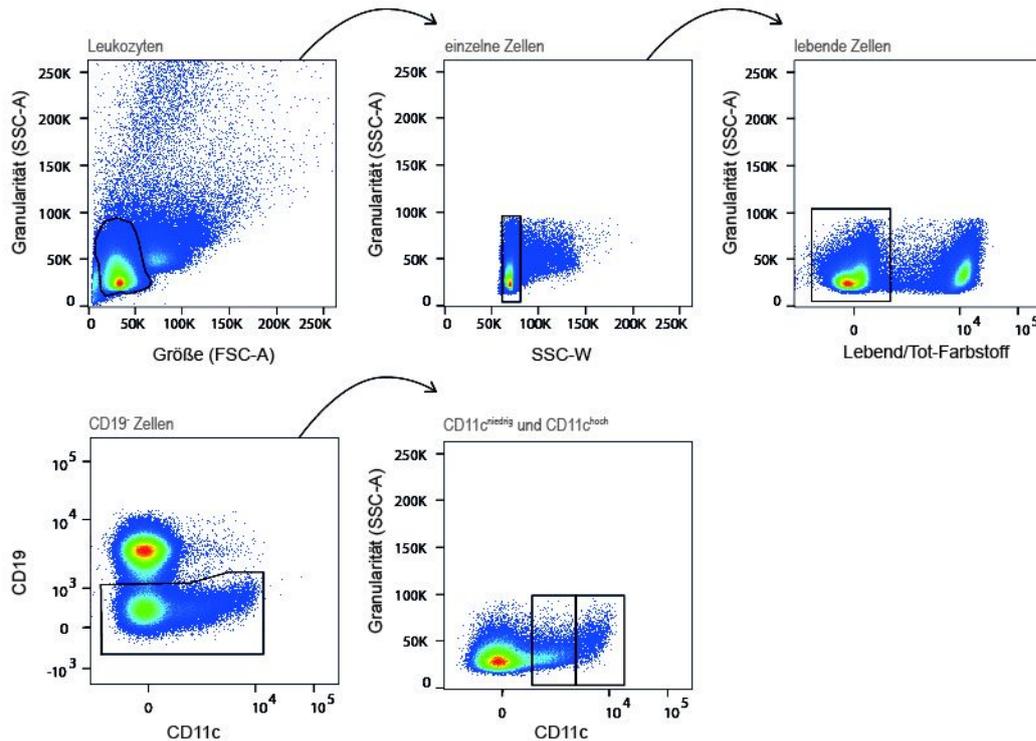


Abbildung 2.3: Gating-Strategien der FACS-Auswertung am Beispiel von wt-Splenozyten. Die $CD11c^+$ dendritischen Zellen wurden letztlich in $CD11c^{\text{niedrig}}$ und $CD11c^{\text{hoch}}$ eingeteilt.

2.2.8. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die verwendeten Reagenzien stammen aus dem ELISA-Kit und wurden nach Angaben des Herstellers entsprechend verwendet. Die ELISA-Platten wurden über Nacht mit 100 μl Fängerantikörper pro Loch bedeckt. Nach mehrmaligem Waschen wurden die Löcher am nächsten Tag zunächst mit 200 μl Blockpuffer pro Loch inkubiert (1 h, Raumtemperatur), bevor die Proben dazugegeben wurden. Nach Inkubation (2 h, Raumtemperatur) sowie mehrmaligem Waschen und Ausklopfen, wurden 100 μl eines Detektionsantikörpers pro Loch hinzugegeben und ebenfalls 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 100 μl eines Detektionsenzym (Avidin-HRP) in jedes Loch pipettiert, 30 Minuten inkubiert, gewaschen und letztlich noch 100 μl der TMB-Lösung (Substrat) zugefügt und 15 Minuten inkubiert.

Die Reaktion wurde abschließend mit 50 μl Stopplösung angehalten und die Platten bei 450 nm mit dem ELISA-Lesegerät und der Software Magellan™ 7.2 gemessen und ausgewertet. Als Referenz zu den Lichtwerten der Proben wurde zusätzlich eine Standardreihe auf die Platte pipettiert und abgelesen.

2.2.9. Magnetische Zellseparation

Um bestimmte Zellpopulationen zu isolieren, wurden die Zellen aus der Milz lysiert und gewaschen. Für die Separation der dendritischen Zellen wurden bis zu 1×10^8 Zellen mit $100 \mu\text{l}$ magnetgebundenen anti-CD11c-Antikörpern in $400 \mu\text{l}$ MACS Puffer 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und in einer MS-Säule in den Miltenyi-Magneten platziert. Die gebundenen DZ blieben im Magnetfeld haften (positive Selektion), während CD11c-negative Zellen durch 3-maliges Spülen ausgewaschen wurden. Nachdem die Säule aus dem Magneten entfernt worden war, konnten schließlich auch die CD11c-positiven DZ ausgewaschen werden. Die Isolierung der CD4^+ und CD8a^+ T-Zellen erfolgte durch ein ähnliches Protokoll mit biotingebundenen und magnetgekoppelten Antikörpern. Dabei werden Zellen gebunden, welche depletiert werden sollen (negative Selektion).

2.2.22. Anlegen einer In-vitro-Kokultur

Das Ansetzen einer Kokultur erfolgte unter sterilen Bedingungen an der Sicherheitswerkbank. Hierbei wurden die Zellen mit Basismedium (10 % FKS) in der gewünschten Konzentration eingestellt und in eine 96-Loch-Platte pipettiert. Diese wurde für 3 bzw. 5 Tage in einen Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C gestellt.

2.2.21. In-vitro-Inkubation mit therapeutischen Antikörpern

Um den direkten Einfluss der Immunkontrollpunkt-Inhibitoren $\alpha\text{-CTLA-4}$ - und $\alpha\text{-PD-1}$ -Antikörper auf dendritische Zellen zu testen, wurden 5×10^5 DZ mit jeweils $20 \mu\text{g}$ CTLA-4- und PD-1-Antikörpern in $200 \mu\text{l}$ 10 % Medium inkubiert. Die Überstände wurden nach 3 Tagen abgenommen und die Produktion der Interleukine 10 und 12 mit Hilfe des FACS- und Multiplex-Verfahren quantifiziert.

2.2.22. Allogene Stimulation

Um die allogene Stimulationsfähigkeit CD11c^+ dendritischer Zellen aus der Milz von Mäusen des C57BL/6-Stamms zu erfassen, wurden diese mit CD4^+ sowie CD8a^+ T-Lymphozyten kultiviert. Dabei wurde zwischen DZ aus Wildtyp-Mäusen sowie tumortragenden Mäusen vor und nach Behandlung unterschieden. Die T-Zellen wurden aus der Milz von Mäusen des

BALB/c-Stamms isoliert. Nach der magnetischen Selektion der jeweiligen Zellpopulationen wurden 1×10^4 dendritische Zellen mit jeweils 2×10^5 $CD4^+$, $CD8a^+$ oder $CD4^+$ und $CD8a^+$ T-Zellen im Verhältnis 1:1 in 200 μ l Basismedium inkubiert. Die Überstände der Kokulturen wurden nach 3 und 5 Tagen abgenommen und die IFN- γ -Konzentration mittels ELISA gemessen.

2.2.23. Peptidbeladung der dendritischen Zellen

Nach der magnetischen Selektion der dendritischen Zellen aus der Milz wurden diese in Basismedium (10 %) mit einer Peptidkonzentration von 1 μ g/ml aufgenommen und im Brutschrank inkubiert (3h, 37°C). Der eine Teil der dendritischen Zellen, welcher später mit $CD4^+$ T-Zellen aus einer OT-2-Maus inkubiert wird, wurde während der Inkubation mit dem OT-2-Peptid (OVA₃₂₃₋₃₃₉) beladen. Der andere Teil der DZ, welcher die $CD8a^+$ T-Zellen einer OT-1-Maus stimulieren wird, mit dem OT-1-Peptid SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄).

2.2.24. Peptidspezifische Stimulation

In einem weiteren Stimulationsversuch wurden dendritischen Zellen aus der Milz von Mäusen vom C57BL/6-Stamm mittels magnetischer Selektion isoliert und mit verschiedenen Peptiden beladen. Auch hier wurde zwischen DZ aus Wildtyp-Mäusen und tumortragenden Mäusen vor und nach Therapie unterschieden. Anschließend wurden 5×10^4 DZ, die mit dem Peptid SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄) beladen wurden, mit 1×10^5 $CD8a^+$ T-Zellen, die aus einer OT-1-Maus magnetisch isoliert wurden, in 200 μ l Basismedium inkubiert. $CD4^+$ T-Zellen aus einer OT-2-Maus wurden mit DZ, beladen mit dem OT-2-Peptid (OVA₃₂₃₋₃₃₉), im selben Verhältnis stimuliert. Die Überstände wurden nach 3 und 5 Tagen abgenommen und deren Zytokinmenge mittels ELISA quantifiziert.

3. ERGEBNISSE

3.1. Analyse der Oberflächenmarker dendritischer Zellen

3.1.1. Verhältnis der DZ-Subpopulationen

Immunzellen zeichnen sich durch bestimmte phänotypische Eigenschaften aus, aufgrund derer sie in verschiedene Populationen eingeteilt werden. Dendritische Zellen besitzen den charakteristischen Marker CD11c, welcher in unterschiedlichen Mengen auf ihrer Oberfläche exprimiert wird. Durch die Quantifizierung der CD11c-Expression lassen sich daher zwei DZ-Untergruppen bilden: CD11c^{niedrig}- und CD11c^{hoch}-exprimierende DZ, die sich in der Anzahl ihrer Reifemarker und kostimulatorischen Moleküle unterscheiden und unterschiedlich agieren. Tumorinfiltrierende CD11c^{niedrig} DZ werden auch als regulatorische DZ bezeichnet, die vor allem einen immunsuppressiven Einfluss haben. CD11c^{hoch} DZ besitzen im Vergleich dazu einen eher fördernden Einfluss auf die Antitumorantwort. Sie befinden sich vermutlich aufgrund der stärkeren Expression mehrerer kostimulatorischer Moleküle in einem reiferen Zustand und üben vor allem immunstimulierende Funktionen aus.

Aufgrund dieser unterschiedlichen und teils entgegengesetzten Eigenschaften ist gerade das Verhältnis beider DZ-Subgruppen entscheidend für den Gesamteinfluss auf die Immunantwort. In der FACS-Analyse der DZ aus tumorkranken λ -MYC-Mäusen war das Verhältnis der CD11c^{niedrig}- zur CD11c^{hoch}-Population im Vergleich zum Wildtyp erhöht (Abbildung 3.1a). Dies bestärkt die Annahme, dass die T-Zell-Stimulation durch dendritische Zellen unter Tumorlast nur noch eingeschränkt funktioniert. Durch die Behandlung mit Immunkontrollpunkt-Inhibitoren bei tumorkranken Mäusen konnte dieses Verhältnis signifikant reduziert werden (Abbildung 3.1a und b), was den positiven Einfluss der Immuntherapie auf die immunstimulierende Funktion dendritischer Zellen unterstreicht.

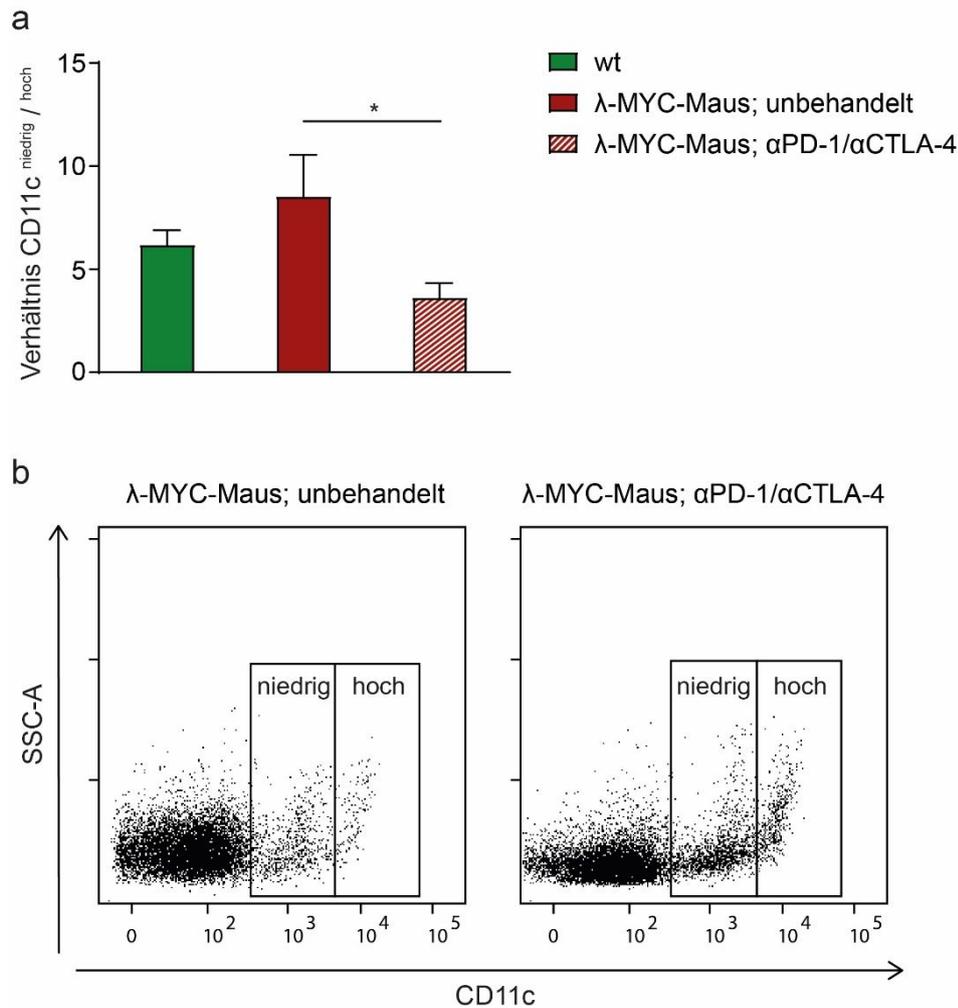


Abbildung 3.1: Verhältnis der DZ-Subpopulationen CD11c^{niedrig} und CD11c^{hoch}. **(a)** Vergleich der Relation CD11c^{niedrig} / hoch zwischen Wildtyp (n = 33) und tumortragender Maus vor (n = 24) und nach (n = 7) Behandlung. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte ± SEM abgebildet. Die Signifikanz wurde mithilfe des Student's t-Testes berechnet und wird durch * (p < 0,05), ** (p < 0,01) oder *** (p < 0,001) dargestellt. **(b)** Einteilung beider Subpopulationen anhand des Punktediagramms. Der Quotient CD11c^{niedrig} / hoch bei der tumortragenden Maus beträgt 5,12. Nach Behandlung liegt er bei 2,87. Typisches Ergebnis von insgesamt 24 Experimenten.

3.1.2 Reife- und Aktivierungsmarker

Um die Wirkung der Immunkontrollpunkt-Blockade auf den Reifegrad der DZ-Subpopulationen weiter zu untersuchen, wurden verschiedene kostimulatorische Moleküle auf der Zelloberfläche vor und nach Therapie analysiert.

Nachdem unreife dendritische Zellen ein fremdes Antigen aufgenommen und fragmentiert haben, präsentieren sie die Peptidmoleküle auf ihrer Oberfläche über den MHC-II. Im Zuge dieses Reifungsprozesses wird die Expression mehrerer kostimulatorischer Rezeptoren hochreguliert. CD80 und CD86 sind Reifemarker und unterstützen die Aktivierung von T-Zellen,

indem sie an deren CD28-Molekül binden. Eine erhöhte Expression von CD80/86, aber auch von Aktivierungsmarkern wie CD83 und CD40 wirkt sich daher fördernd auf die funktionellen Eigenschaften der dendritischen Zellen aus. (Aerts-Toegaert et al., 2007; Cella et al., 1996; Elgueta et al., 2009; Ma & Clark, 2009)

Perrot et al. zeigten, dass tumorinfiltrierende DZ des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms im Vergleich zu DZ aus gesundem Gewebe eine deutlich verminderte Expression dieser Moleküle aufwiesen. Auch bei Untersuchungen von Prostatakarzinomen besaßen die eingewanderten DZ eine niedrige Rate an CD80, CD86 und CD83 auf ihrer Oberfläche und waren in ihren T-Zell-stimulierenden Funktionen stark eingeschränkt (Watkins et al., 2011). Bei Naujoks et al. wiesen DZ aus dem B-Zell-Lymphom der λ -MYC-Maus dagegen eine erhöhte Anzahl der kostimulatorischen Markern auf, waren allerdings dennoch nicht fähig, die T-Zellen adäquat zu stimulieren. Es sollte nun untersucht werden, inwieweit sich der Einsatz von α -CTLA-4- und α -PD-1-Antikörpern auf die Menge der exprimierten Oberflächenmoleküle auswirkt. Dabei scheinen die beiden Reifemarker CD80 und CD86 besonders auf den CD11c^{niedrig} DZ nach Behandlung stärker exprimiert zu werden (Abbildung 3.2a+b), während CD83 in der CD11c^{niedrig} Subgruppe im Gegensatz dazu signifikant herabreguliert war (Abbildung 3.2c).

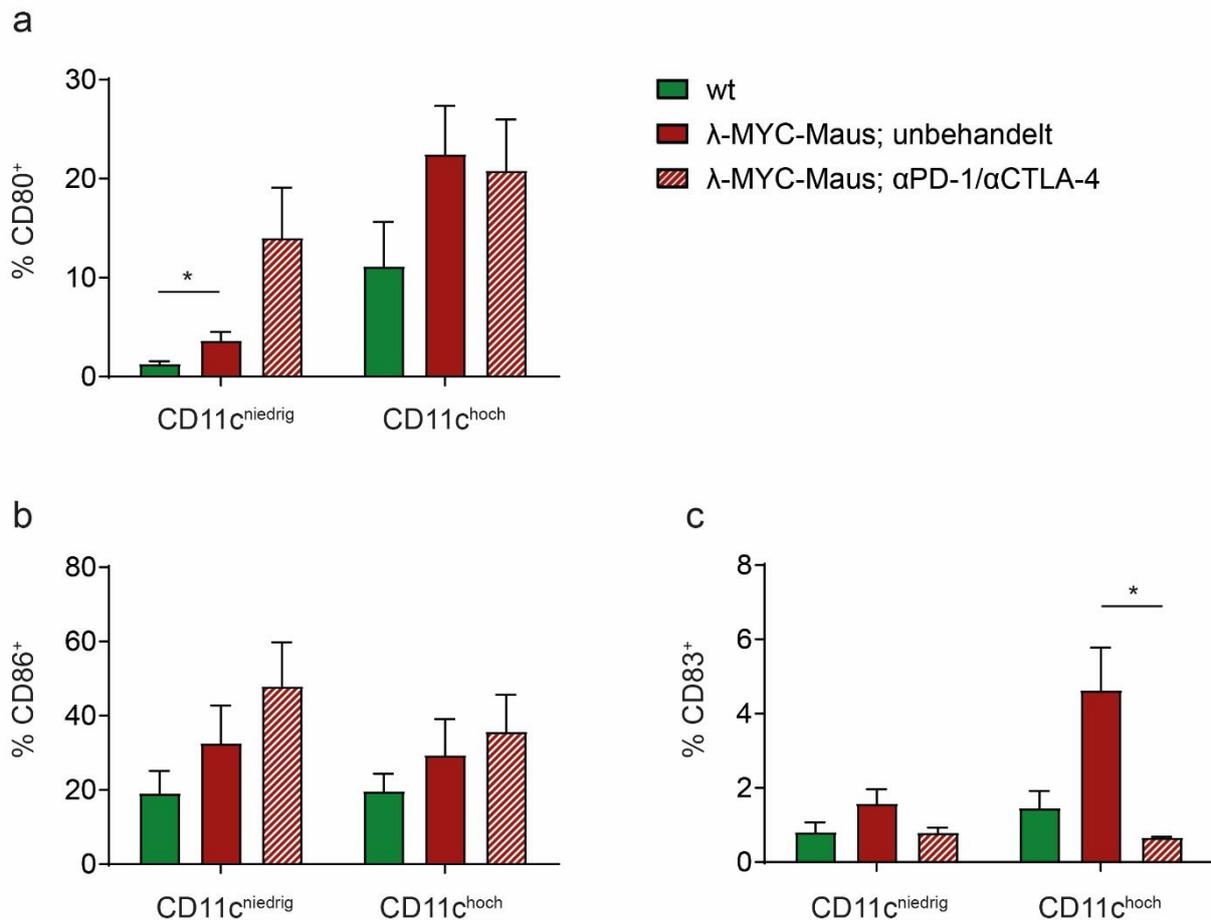


Abbildung 3.2: Expression verschiedener kostimulatorischer Moleküle auf der Oberfläche dendritischer Zellen. Für die Wildtypgruppe gilt $n = 13$, bei der tumortragenden Mausgruppe vor Behandlung gilt $n = 9$ und nach Behandlung $n = 4$. **(a)** Vor allem in der CD11c^{niedrig} Gruppe steigt die CD80⁺-Expression nach Therapie an. **(b)** Hochregulation des Reifemarkers CD86 in beiden DZ-Subpopulationen bei erkrankten Tieren, insbesondere nach Behandlung. **(c)** Verminderte Expression des Aktivierungsmarkers CD83 nach Behandlung. In der CD11c^{hoch} Gruppe ist dies signifikant. Alle Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels Student's t-Test berechnet und wird durch * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) oder *** ($p < 0,001$) dargestellt.

Der von dendritischen Zellen exprimierte Aktivierungsmarker CD40 besitzt verschiedene Funktionen, darunter die Hochregulierung von CD80/86 sowie die Induktion der Interleukin-12-Produktion. Durch die Bindung des CD40-Liganden auf T-Helferzellen wird zudem die Expression von MHC-II-Molekülen gesteigert, deren Stimulation die IL-12-Produktion weiter fördert. Letztlich bewirkt die gesteigerte IL-12-Menge eine Polarisierung der T-Helferzellen zum T_H1-Subtyp und triggert somit eine inflammatorische Immunreaktion. (Caux et al., 1994; Cella et al., 1996; Elgueta et al., 2009; Koch et al., 1996; Ma & Clark, 2009; Snijders et al., 1998)

Neben der Wirkung auf die DZ führt die Bindung des MHC-II durch den TZR auch zur Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen, die daraufhin spezifisch gegen das präsentierte Antigen gerichtet sind. Wie in Abbildung 3.3 zu erkennen ist, war die Menge des exprimierten CD40 wie auch des für die Antigenpräsentation essentiellen MHC-II unter den CD11c^{hoch} DZ aus kranken Mäusen im Vergleich zum Wildtyp verringert. Dagegen konnte die Therapie mit Immunkontrollpunkt-Inhibitoren die Expression von CD40 und MHC-II sogar über das Wildtyp-Niveau steigern.

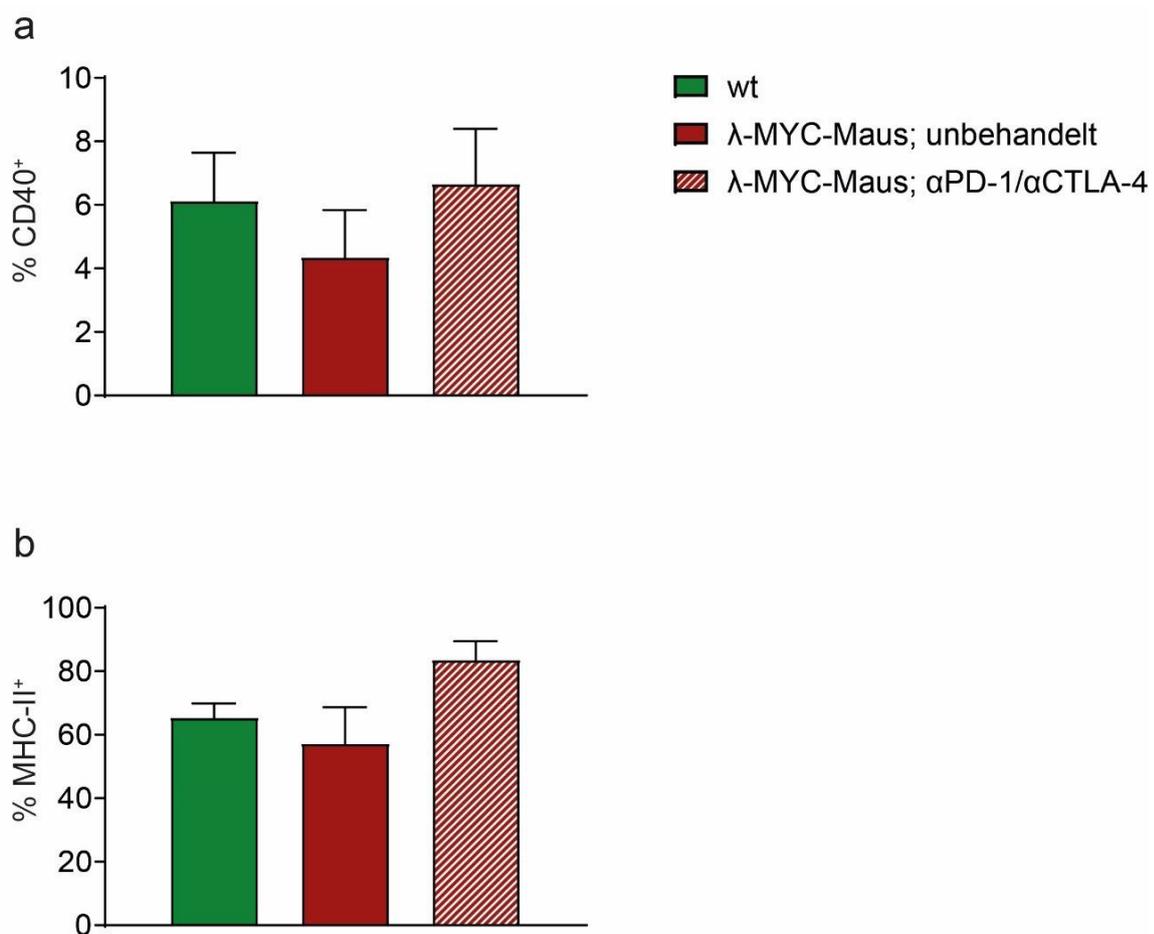


Abbildung 3.3: Expression des Aktivierungsmarkers CD40 (a) sowie des MHC-II (b). Nach der Therapie steigt die Expression beider Moleküle an und erreicht Werte oberhalb des Wildtypniveaus. Für die Wildtypgruppe gilt n = 11, bei der Gruppe ohne Behandlung gilt n = 7 und mit Behandlung n = 4. Alle Ergebnisse wurden als Mittelwerte ± SEM dargestellt.

3.1.3 PD-L1- und CTLA-4-Expression auf dendritischen Zellen

T-Lymphozyten besitzen verschiedene Oberflächenmoleküle, die die Aktivität der Zelle beeinflussen. Neben aktivierenden Rezeptoren exprimieren sie auch die sogenannten Immunkontrollpunkt-Moleküle PD-1 und CTLA-4. Werden diese gebunden, löst dies jeweils ein negatives Signal in der aktivierten T-Effektorzelle aus, wodurch deren inflammatorische Funktion gebremst wird. Über die Bindung von PD-1 durch dessen Liganden PD-L1 (B7-H1) können nicht nur Tumorzellen, sondern auch Antigen-präsentierende Zellen, darunter dendritische Zellen, die Funktion der T-Zellen unterdrücken (Freeman et al., 2000). Die Blockade von PD-L1 auf dendritischen Zellen führte zu einer gesteigerten T-Zell-Aktivierung und Zytokinproduktion, was die inhibitorische Wirkung des B7-1-Liganden nachweist (Brown et al., 2003).

Bei der Analyse der dendritischen Zellen aus kranken λ -MYC-Mäusen zeigte sich besonders bei der regulatorischen Subgruppe eine signifikant höhere Menge des PD-1-Liganden im Vergleich zu DZ aus Wildtyp-Mäusen. Nach Behandlung der tumorkranken Mäuse mit Immunkontrollpunkt-Inhibitoren wurde dagegen eine signifikant verminderte PD-L1-Expression unter den regulatorischen DZ gemessen (Abbildung 3.4a). Durch die Therapie konnten demnach die hemmenden Eigenschaften dieser DZ-Subgruppe deutlich reduziert werden.

Um zu untersuchen, ob neben T-Zellen und NK-Zellen (Stojanovic et al., 2014) auch dendritische Zellen CTLA-4-Moleküle auf der Oberfläche exprimieren, wurden diese aus Wildtyp-Mäusen und tumortragenden λ -MYC-Mäusen gewonnen und durchflusszytometrisch analysiert. Dabei konnte vor allem in der CD11c^{niedrig} Subgruppe aus kranken Mäusen gegenüber dem Wildtyp eine deutlich gesteigerte CTLA-4-Expression nachgewiesen werden (Abbildung 3.4b und c). Dies unterstützt die Aussage, dass gerade diese Subgruppe der dendritischen Zellen im Tumormilieu immunsuppressives Potential besitzt und somit die Funktion der T-Effektorzellen unterdrücken kann.

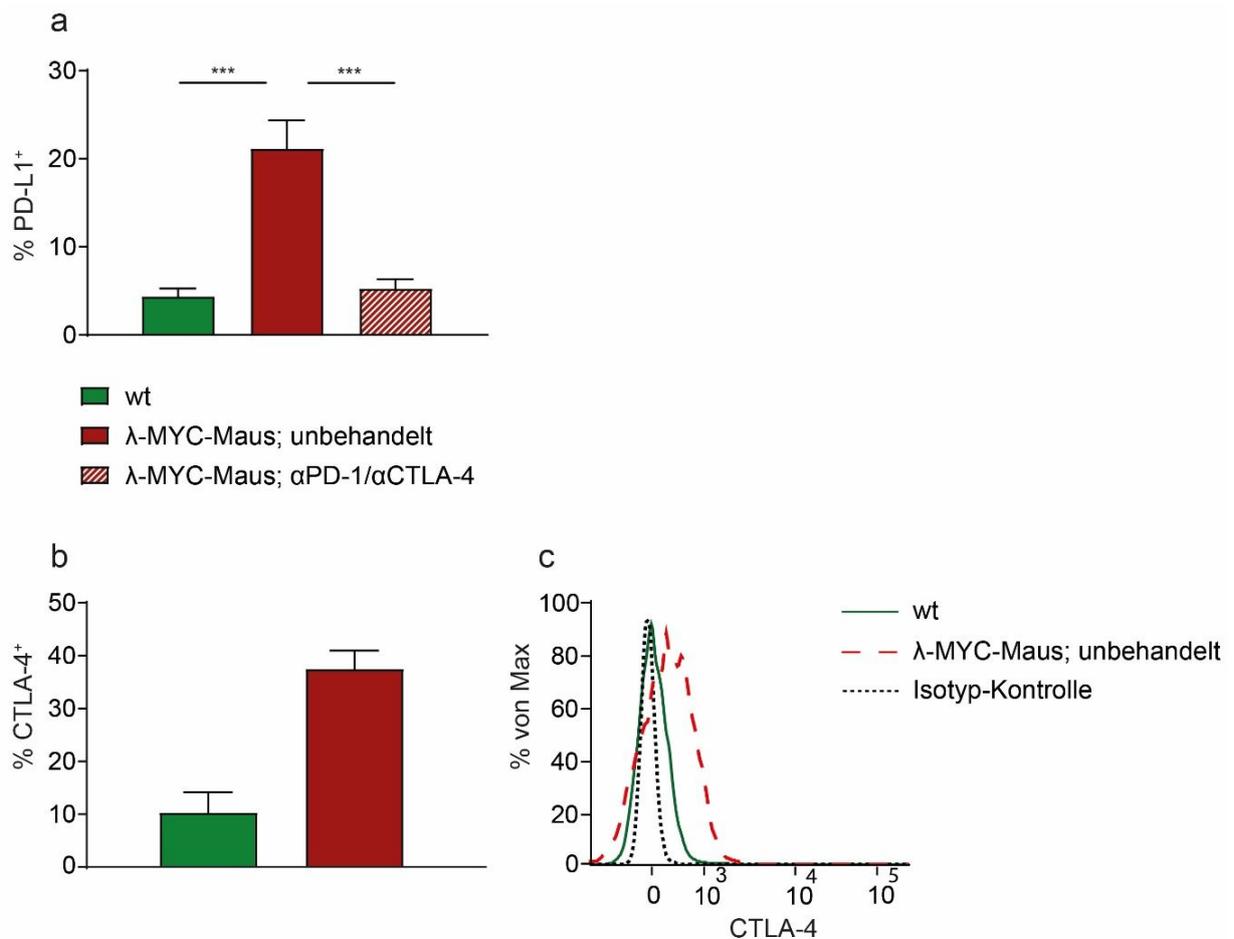


Abbildung 3.4: Expression von PD-L1 **(a)** und CTLA-4 **(b)** auf CD11c^{niedrig} DZ verschiedener Mausgruppen. Es gilt n = 25 (Wildtypgruppe), n = 15 (ohne Behandlung) und n = 7 (mit Behandlung) bei der PD-L1-Analyse. Bei der CTLA-4-Bestimmung gilt n = 2 (Wildtypgruppe) und n = 3 (ohne Behandlung). Dargestellt als Mittelwert ± SEM. Die Signifikanz wurde mittels Student's t-Test ermittelt und wird durch * (p < 0,05), ** (p < 0,01) oder *** (p < 0,001) dargestellt. **(c)** Histogramm-Darstellung der in **(b)** gezeigten CTLA-4-Expression.

3.2. Regulation der Immunantwort durch Zytokinexpression

3.2.1. IL-12-/IL-10-Verhältnis der dendritischen Zellen aus In-vivo-Versuchen

Zytokine, die von vielen Zellen als Botenstoffe sezerniert werden, haben vielfältige und auch entgegengesetzte Wirkungen auf das Immunsystem. Sie beeinflussen Zell-Zell-Interaktionen und steuern wichtige Abläufe wie beispielsweise die Immunreaktion gegenüber Krebszellen.

Das von einigen Immunzellen sezernierte IFN- γ stimuliert u.a. die Interleukin-12-Produktion in dendritischen Zellen. Dadurch wird die Polarisierung der T-Helferzellen zu T_H1-Zellen gefördert und eine inflammatorische Immunreaktion begünstigt. Przewoznik et al. konnten im λ -MYC-Mausmodell allerdings zeigen, dass die Menge des im Tumormilieu produzierten IFN- γ reduziert ist. Dies ist vermutlich ursächlich dafür, dass auch das Zytokinexpressionsmuster dendritischer Zellen im Vergleich zum Wildtyp ein eher immunsuppressives Profil aufweist, bei dem das Verhältnis der instruktiven Interleukine 12 und 10 zugunsten des letzteren verschoben ist (Naujoks et al., 2014). Dadurch wird die Bildung von T_H2-Zellen verstärkt, welche die Antitumorantwort unterdrücken und zur Toleranzinduktion führen. (Huang et al., 1995) konnten zudem nachweisen, dass auch Tumorzellen verschiedene antiinflammatorische Zytokine, wie IL-4 und IL-10, sezernieren. Dadurch verstärken sie das immunsuppressive Milieu und schützen sich so vor dem Angriff durch das Immunsystem.

Durch den Einsatz von mAK gegen die Immunkontrollpunkte CTLA-4 und PD-1 können tumorantigenspezifische T-Effektorzellen reaktiviert werden. Diese zeigten im λ -MYC-Mausmodell neben den wiederhergestellten Effektorfunktionen eine gesteigerte Sekretion von IFN- γ (Ahmetlic et al., 2021). Um zu untersuchen, welche Auswirkungen dies auf die Zytokinproduktion dendritischer Zellen hat, wurde eine durchflusszytometrische Analyse der Interleukin-12- und -10-Menge sowie deren Relation in DZ aus behandelten λ -MYC-Mäusen durchgeführt. Dabei zeigte sich nicht nur eine insgesamt erhöhte IL-12- und verminderte IL-10-Sekretion (Abbildung 3.5a und b), sondern auch eine Steigerung des Verhältnisses in der regulatorischen DZ-Subpopulation (Abbildung 3.5c). Dies ist besonders bemerkenswert, da gerade der CD11c^{niedrig} Untergruppe eher immunsuppressive Funktionen zugeschrieben werden (Liu et al., 2009). Um den essentiellen Beitrag von IFN- γ für die Umkehrung des Verhältnisses nachzuweisen, wurde die Zytokin-Sekretion zusätzlich in DZ aus λ -MYC-Mäusen gemessen, welche neben der Kontrollpunkt-Blockade auch IFN- γ -depletierende

Antikörper (XMG-1.2) erhalten hatten. Tatsächlich blieb der Effekt der therapeutischen Antikörper ohne die stimulierende Wirkung des Interferons aus. Das Verhältnis IL-12 zu IL-10 entsprach etwa dem der nicht-therapierten Mausgruppe (Abbildung 3.5c).

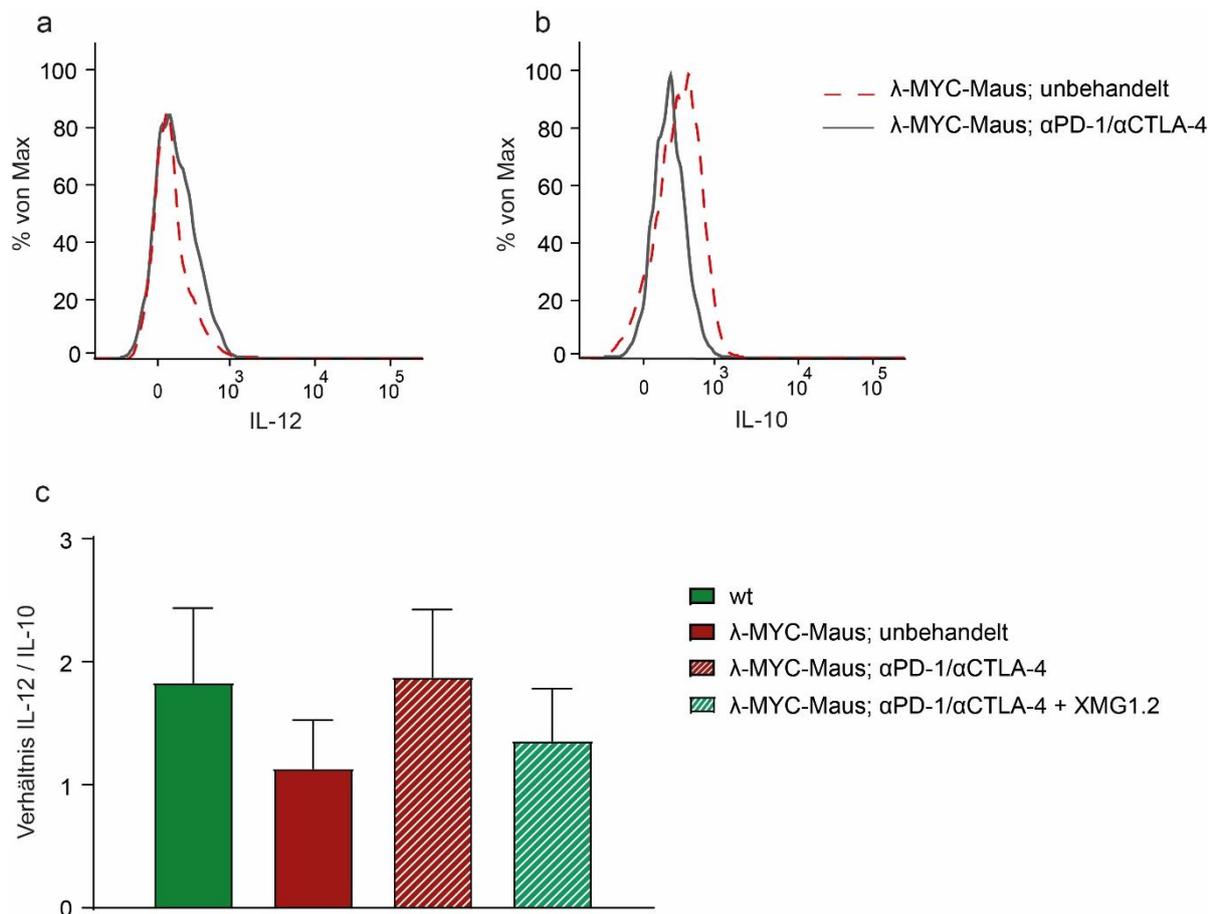


Abbildung 3.5: Expressionsmuster der instruktiven Zytokine IL-12 und IL-10 auf dendritischen Zellen verschiedener Mausgruppen. **(a)** IL-12- **(b)** IL-10-Expression im Vergleich zwischen kranker und mit α -CTLA-4- und α -PD-1-Antikörpern behandelter Maus. Jeweils dargestellt als Histogramm. **(c)** Vergleich des IL-12-/IL-10-Verhältnisses auf CD11c^{niedrig} DZ vor und nach Therapie mit CTLA-4- und α -PD-1-Antikörpern, als auch unter Behandlung mit IFN- γ -depletierenden XMG1.2-Antikörpern. Es gilt n = 16 (Wildtypgruppe), n = 9 (ohne Behandlung), n = 6 (mit Behandlung) und n = 3 (mit Behandlung und XMG1.2-Antikörpern). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM.

3.2.2. Zytokinexpression nach In-vitro-Inkubation mit therapeutischen Antikörpern

Da auch auf dendritischen Zellen PD-1- und CTLA-4-Moleküle exprimiert werden (Scheuerpflug et al., 2020), wurde im Folgenden getestet, ob auch eine direkte Interaktion mit den therapeutischen Antikörpern stattfindet. Dazu wurden dendritische Zellen aus λ -MYC-Mäusen 3 Tage lang mit α -PD-1- und α -CTLA-4-Antikörpern inkubiert. Anschließend wurde das Verhältnis der Interleukine 12 zu 10 bestimmt. Wie in Abbildung 2.6 zu erkennen ist, konnte dieses - wie auch nach der In-vivo-Behandlung der λ -MYC-Mäuse (Abbildung 3.6) - gesteigert werden. Dies zeigt, dass dendritische Zellen nicht nur indirekt über eine erhöhte IFN- γ -Produktion, sondern auch direkt durch die therapeutischen Antikörper stimuliert werden und dadurch vermutlich zum Erfolg der Immunkontrollpunkt-Blockade beitragen.

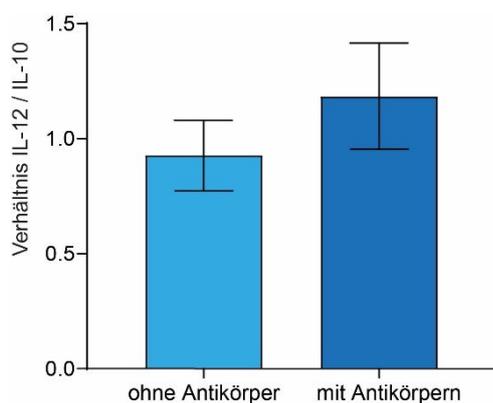


Abbildung 3.6: Direkter Einfluss der kombinierten Immunkontrollpunkt-Blockade mittels α -CTLA-4- und α -PD-1-Antikörpern auf dendritischen Zellen aus λ -MYC-Mäusen. Es gilt jeweils $n = 5$. Nach der Inkubation mit Antikörpern wiesen die dendritischen Zellen ein höheres Verhältnis der instruktiven Zytokine IL-12 zu IL-10 auf. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

3.3 Funktionalität dendritischer Zellen

Dendritische Zellen stellen eine Schnittstelle zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem dar. Über ihre Antigen-präsentierenden Fähigkeiten steuern sie die Aktivierung und Spezialisierung von T-Zellen und können so eine zielgerichtete Reaktion gegen die Tumorzellen einleiten (Gabrilovich et al., 1996).

Da das Potential dendritischer Zellen zur T-Zell-Stimulation in kranken λ -MYC-Mäusen reduziert ist (Naujoks et al., 2014), sollte nun untersucht werden, ob diese funktionelle Beeinträchtigung mithilfe der therapeutischen Antikörper verbessert werden kann.

Für diese Versuchsreihe wurden DZ aus therapierten λ -MYC-Mäusen und T-Zellen aus unbehandelten Mäusen eines anderen (allogenen) bzw. gleichen (syngenen) Stamms isoliert und in verschiedenen In-vitro-Ansätzen kokultiviert. Anschließend wurde die Konzentration von IFN- γ in den Überständen als Maß einer erfolgreichen T-Zell-Stimulation nach 3 und nach 5 Tagen bestimmt.

3.3.1 Allogene Stimulation

Für diesen Ansatz wurden sowohl CD4⁺, als auch CD8a⁺ T-Zellen aus Mäusen des BALB/c-Stamms und dendritische Zellen aus Mäusen mit C57BL/6-Hintergrund verwendet. Aufgrund der unterschiedlichen Abstammung der Mäuse besitzen deren Zellen unterschiedliche Gewebsmoleküle auf ihrer Oberfläche. T-Zellen erkennen die Proteine der dendritischen Zellen daher als fremd und werden nach deren Bindung aktiviert.

Während DZ aus Mäusen ohne Behandlung in ihrer Stimulationskapazität beeinträchtigt waren, konnte durch die Immunkontrollpunkt-Blockade bereits ab Tag 3 eine deutliche Steigerung erreicht werden. Dabei wurden sogar IFN- γ -Werte über denen der Wildtyp-Mausgruppe gemessen (Abbildung 3.7).

Unter den λ -MYC-Mäusen wurde zusätzlich zwischen klinisch gesunden und klinisch kranken Individuen unterschieden. Auch hier zeigte die antikörperbasierte Immuntherapie eine steigende Wirkung auf die T-Zell-Aktivierung durch DZ (Abbildung 3.7b).

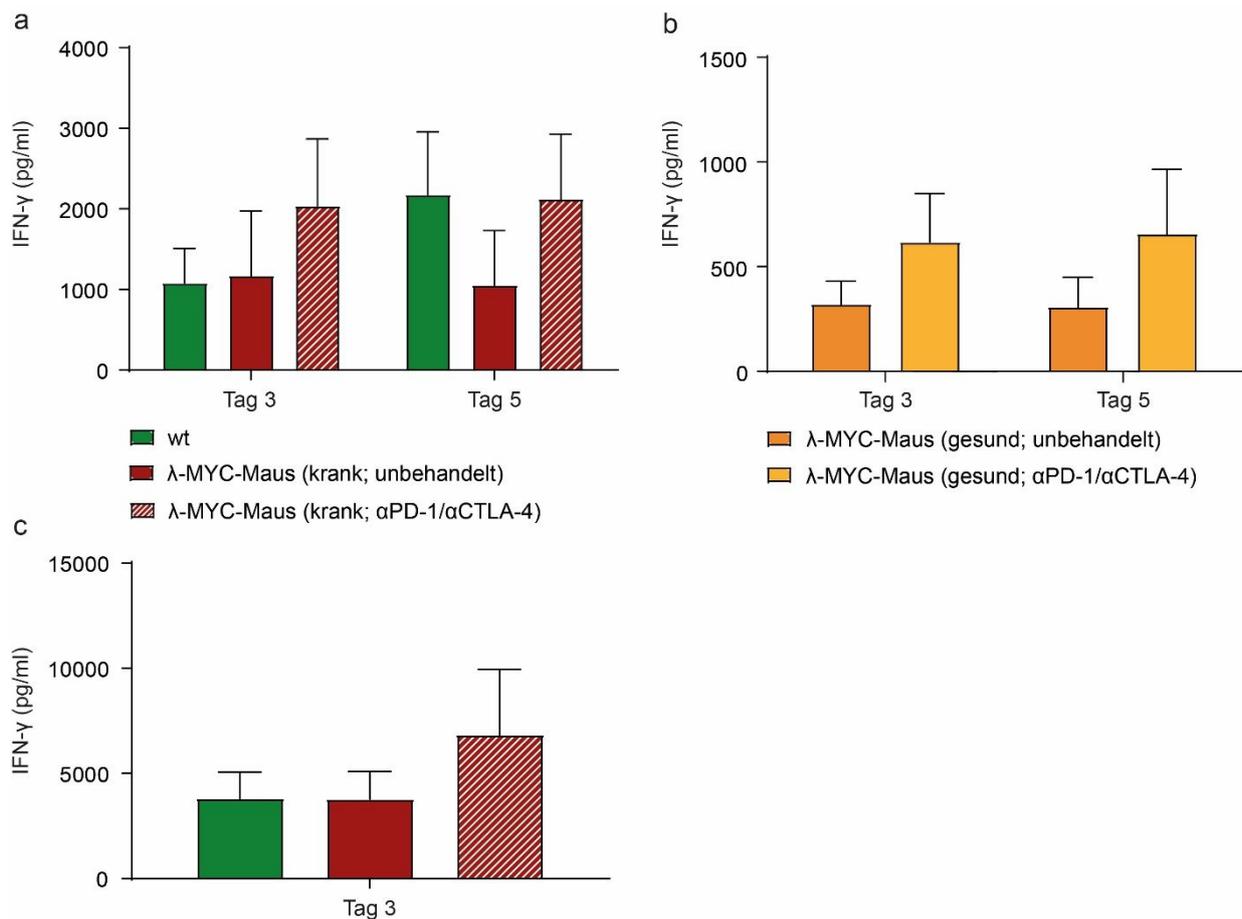


Abbildung 3.7: Ergebnisse der allogenen Stimulation nach 3 bzw. 5 Tagen. Bestimmung der IFN- γ -Menge als Parameter einer erfolgreichen T-Zell-Stimulation durch die dendritischen Zellen aus verschiedenen Mausgruppen. **(a)** Vergleich der klinisch kranken Mäuse ohne und mit Behandlung. Dargestellt ist die Inkubation der DZ mit CD4⁺ T-Zellen. Hier gilt n = 9 (Wildtypgruppe), n = 3 (ohne Behandlung) und n = 6 (mit Behandlung). **(b)** Vergleich der klinisch gesunden Mäuse ohne (n = 2) und mit Behandlung (n = 3). Hier erfolgte die Stimulation von CD4⁺ T-Zellen. **(c)** Vergleich der klinisch kranken Mäuse ohne (n = 3) und mit Behandlung (n = 5). Die Anzahl der Wildtypgruppe ist 9. Hier dargestellt ist die Inkubation der DZ mit CD8a⁺ T-Zellen. Alle Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

3.3.2 Peptidspezifische Stimulation

In diesem Versuch wurden dendritische Zellen aus Mäusen mit C57BL/6-Hintergrund isoliert. Diese sollen T-Zellen aus einem transgenen OT-Mausmodell stimulieren, deren TZR gegen ein spezifisches Ovalbumin-Protein (OVA-Protein) gerichtet ist.

Eine Hälfte der DZ wurde mit OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL) beladen und anschließend mit CD8a⁺ T-Zellen aus OT-I-Mäusen inkubiert. Die andere Hälfte wurde mit OVA₃₂₃₋₃₃₉ beladen, welches vom TZR der CD4⁺ T-Zellen aus OT-II-Mäusen erkannt wird. Dies wurde jeweils mit DZ aus kranken, nicht-therapierten sowie therapierten λ-MYC-Mäusen durchgeführt. Somit kann die Antigen-präsentierende Fähigkeit dendritischer Zellen aus Mäusen vor und nach Therapie miteinander verglichen werden. Durch die Bindung dieses OVA-spezifischen T-Zell-Rezeptors an den Protein-beladenen MHC der dendritischen Zellen wird ein stimulierendes Signal in der naiven T-Zelle ausgelöst. Sie wird aktiviert und produziert daraufhin IFN-γ. (Preynat-Seauve et al., 2006)

Als Kontrolle wurden auch nicht-beladene DZ mit CD4⁺ bzw. CD8a⁺ T-Zellen inkubiert. Die dabei sehr gering produzierten IFN-γ-Mengen (hier nicht gezeigt) wurden von denen der peptidspezifischen Stimulation abgezogen.

Wurden T-Zellen mit dendritischen Zellen aus kranken, nicht-therapierten λ-MYC-Mäusen inkubiert, war deren IFN-γ-Produktion deutlich beeinträchtigt. Dagegen konnte die Kapazität der dendritischen Zellen zur T-Zell-Stimulation verbessert werden, wenn die Mäuse vorher Immunkontrollpunkt-Inhibitoren erhalten hatten (Abbildung 3.8).

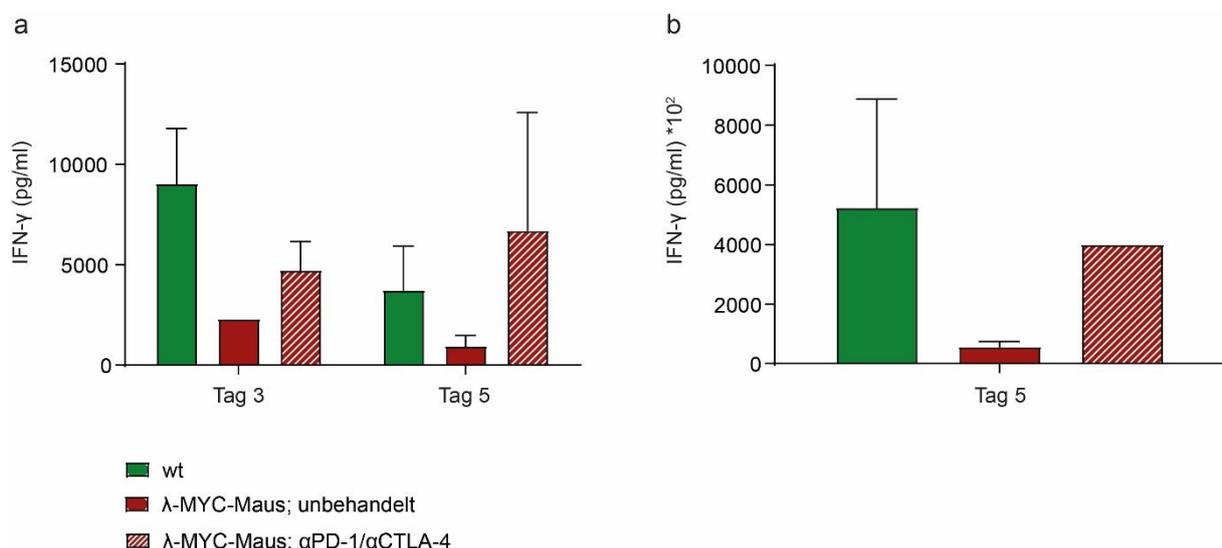


Abbildung 3.8: Ergebnisse der peptidspezifischen Stimulation nach 3 bzw. 5 Tagen. Bestimmung der IFN-γ-Menge als Parameter einer erfolgreichen T-Zell-Stimulation durch DZ aus verschiedenen Mausgruppen. **(a)** Inkubation der DZ mit CD4⁺ T-Zellen. Es gilt n = 5 (Wildtypgruppe), n = 1 bzw. 2 (Tag 3 bzw. 5 ohne Behandlung) und n = 3 (mit Behandlung). **(b)** Inkubation der DZ mit CD8a⁺ T-Zellen. Für die Wildtypgruppe gilt n = 3, in der Mausgruppe ohne Behandlung gilt n = 2 und in der behandelten Mausgruppe ist n = 1. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte ± SEM dargestellt.

4. DISKUSSION

4.1 Bedeutung der Therapie mit Immunkontrollpunkt-Inhibitoren

Krebserkrankungen stehen nach kardiovaskulären Ereignissen auf Platz 2 der häufigsten Todesursachen (Statistisches Bundesamt, 2021). Daher besteht großes Interesse an der Entwicklung geeigneter und effektiver Behandlungsmöglichkeiten von Tumoren. Neben den herkömmlichen Verfahren scheint die Stimulation des Immunsystems dabei ein vielversprechender Ansatz zu sein. In der Behandlung des fortgeschrittenen Melanoms beispielsweise gehört die Blockade der Immunkontrollpunkte CTLA-4 und PD-1 bereits zur Standardtherapie, durch welche unter anderem eine Verlängerung des durchschnittlichen Überlebens erreicht werden konnte (Rogiers et al., 2019). Auch bei der Behandlung des Lungenkarzinoms, einem der weltweit häufigsten und tödlichsten Tumorerkrankungen, kommen Kontrollpunktinhibitoren vielfach zum Einsatz (Xiong et al., 2021). Dennoch sprechen nicht alle Patienten auf die Behandlung mit α -PD-1- und α -CTLA-4-Antikörpern mit gleichem Erfolg an. Daher ist es notwendig, deren zugrunde liegenden Mechanismen genauer zu verstehen, um die Erfolgsquote bei den individuellen Tumorerkrankungen besser einschätzen und die Therapie letztlich weiter verbessern zu können (Beavis et al., 2018).

In dieser Arbeit wurde dafür das murine λ -MYC-Lymphommodell verwendet, dessen klinisches Bild mit dem menschlichen Burkitt-Lymphom vergleichbar ist. Unter der Therapie mit α -PD-1- und α -CTLA-4-Antikörpern kam es zu einer Hochregulation kostimulatorischer Moleküle und einem Wechsel zu einem T_H1 -polarisierenden Zytokinprofil der dendritischen Zellen. Auch konnten deren Antigen-präsentierende und T-Zell-stimulierende Funktionen regeneriert werden. Dies zeigt, dass hinter den Wirkmechanismen ein großes Netzwerk aus Immunzellen und Botenstoffen steckt, welche vielfältige Ansatzpunkte für eine spezifische Therapie bieten.

4.2 Die Effekte von IFN- γ

Endogen produziertes IFN- γ spielt eine essentielle Rolle in der Bekämpfung von spontan entstehenden Tumorerkrankungen. In Mäusen, denen die Sensitivität bzw. der Rezeptor für IFN- γ fehlte, entwickelten sich Krebszellen schneller und häufiger als in normalen Mäusen

(Kaplan et al., 1998). Unter Immuntherapie konnte bei NSCLC- oder Melanom-Patienten dagegen ein signifikant verlängertes, progressionsfreies Überleben erreicht werden, wenn bei diesen eine höhere IFN- γ -Expression vorlag (Karachaliou et al., 2018). Auch im λ -MYC-Mausmodell konnte die Notwendigkeit von IFN- γ für den Therapieerfolg gezeigt werden: Zusammen mit dem Tumornekrosefaktor (TNF) wird ein Zellzyklusarrest in Krebszellen induziert und eine im Sinne der Tumorbekämpfung gewünschte T_H1-Antwort gefördert (Braumüller et al., 2013; Brenner et al., 2020).

Für das verlängerte Überleben der λ -MYC-Mäuse konnten auch NK-Zellen verantwortlich gemacht werden, die unter Therapie vermutlich die Hauptquelle des produzierten IFN- γ darstellen (Ahmetlic et al., 2021). Diese Ergebnisse legen nahe, dass auch dendritische Zellen durch die Therapie beeinflusst werden und gemeinsam mit Natürlichen Killerzellen zur T-Zell-abhängigen Antitumorantwort beitragen.

Bei der Analyse der Oberflächenmarker tumorinfiltrierender DZ kam es unter Therapie zu einer gesteigerten Expression der kostimulatorischen Moleküle (Abschnitt 3.1.2). Dafür könnte das unter der antikörperbasierten Therapie vermehrt produzierte IFN- γ ursächlich sein (Ahmetlic et al., 2021). Dieses bewirkte bereits in einer In-vitro-Inkubation eine Hochregulation der Reifemoleküle CD80 und CD86 (Naujoks et al., 2014). Dennoch scheint zumindest die alleinige Bedeutung der Markerepression für die Induktion einer adäquaten Antitumorantwort fragwürdig, da TIDZ aus unbehandelten Mäusen teilweise ein ebenfalls reifes Profil aufwiesen. Zudem ist die Expression der Oberflächenmoleküle, vor allem von CD80 und CD86, abhängig von der Tumorentität (Preynat-Seauve et al., 2006). Während in einem Mammakarzinommodell der Maus wie auch in dem hier verwendeten λ -MYC-Mausmodell ein Großteil der TIDZ eine Hochregulation dieser Reifemarker aufwies, war die Expression der kostimulatorischen Moleküle in einem endogenen Melanommodell der Maus dagegen herabreguliert (Norian et al., 2009; Zhao et al., 2009).

Dagegen dürfte der Effekt von IFN- γ auf das Zytokinprofil der dendritischen Zellen entscheidend für den Therapieerfolg sein. Während TIDZ aus nicht-behandelten λ -MYC-Mäusen vermehrt IL-10 und weniger IL-12 bildeten, stieg das IL12-/IL-10-Verhältnis unter Therapie deutlich an (Abbildung 3.5). Auch in anderen Tumormodellen bewirkte das von benachbarten T-Lymphozyten sezernierte IFN- γ eine erhöhte IL-12-Produktion in dendriti-

schen Zellen, was wiederum eine T-Zell-vermittelte Antitumorreaktion einleitete (Garris et al., 2018).

Für die entsprechende Umkehrung des Zytokinverhältnisses könnte neben der indirekten Wirkung von IFN- γ auch die direkte Bindung von α -PD-1- und α -CTLA-4-Antikörpern an deren Rezeptoren auf dendritischen Zellen verantwortlich sein. Wie auch in anderen Tumormodellen (Han et al., 2014; Lamichhane et al., 2017) konnten die Immunkontrollpunkt-Moleküle auf der Oberfläche der DZ aus λ -MYC-Mäusen nachgewiesen werden (Abbildung 3.4). In vorausgegangenen Studien wurde durch agonistische CTLA-4-Antikörper eine Steigerung der IL-10-Produktion sowie Herabregulation der IL-12-Sekretion in dendritischen Zellen bewirkt (Laurent et al., 2010). Mithilfe der inhibitorischen α -PD-1- und α -CTLA-4-Antikörper konnte dieses ungünstige Zytokinverhältnis wieder umgekehrt werden (Abbildung 3.6). Allerdings scheint dieser antikörperbasierte Mechanismus nicht die Hauptursache der erfolgreichen In-vivo-Behandlung zu sein, da die Depletion von IFN- γ den Therapieeffekt fast vollständig verhinderte (Abbildung 3.5).

4.3 Stimulationskapazität der DZ

Wie auch in einem HPV16-Tumormodell der Maus (Sun et al., 2019), war die Kapazität zur T-Zell-Stimulation deutlich effektiver, wenn die DZ aus therapierten λ -MYC-Mäusen gewonnen wurden (Abbildung 3.7 und 3.8). Dazu tragen wahrscheinlich mehrere Faktoren bei. Zum einen werden durch die Therapie auch Natürliche Killerzellen verstärkt reaktiviert, die die Fähigkeit besitzen, Krebszellen direkt zu lysieren (Ohs et al., 2017). Die vermehrt entstehenden Tumorzellfragmente können von DZ aufgenommen und für die T-Zell-Stimulation verwendet werden. Zum anderen dürfte das durch die Therapie veränderte Zytokinmilieu der Tumorumgebung für eine vermehrte Bildung reifer dendritischer Zellen führen, welche zur effektiven T-Zell-Stimulation benötigt werden.

Auch in Melanommodellen hatte die vorausgehende Peptidbeladung dendritischer Zellen einen positiven Effekt auf die Rekrutierung einer T-Zell-Antwort und die damit verbundene Antitumorreaktion. Die Ag-Präsentationsfähigkeit konnte weiter verbessert werden, indem die dendritischen Zellen zusätzlich zu den OVA-Proteinen mit Zell-penetrierenden Peptiden inkubiert wurden. Im Vergleich zur Inkubation mit reinen OVA-Proteinen kam es dadurch zu einer gesteigerten Ag-Aufnahme und -Präsentation und folgend zu einer signifikant erhöhten

T-Zell-Proliferation und IFN- γ -Sekretion. In nachfolgenden In-vivo-Versuchen konnte dadurch eine Tumor-Metastasierung unterbunden und das Gesamtüberleben der Mäuse verlängert werden (Wang et al., 2002; Wu et al., 2019). Wurden dendritische Zellen mit tumorspezifischen Antigenen beladen, führte dies zu einer gesteigerten CD8a⁺-T-Zell-Antwort und -Infiltration in das Tumorareal. Die Wachstumshemmung der transplantierten Krebszellen durch die PD-1-Blockade mittels α -PD-1-AK konnte durch diesen synergistischen Effekt weiter verstärkt werden (Wculek et al., 2019).

4.4 Fazit und Ausblick

Über ihre Vermittlerrolle zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort spielen DZ eine zentrale Rolle in der Tumorbekämpfung. Eine erfolgreiche Antitumorreaktion erfordert dabei eine wirksame Antigenpräsentation und T-Zell-Stimulation. Durch das immunsuppressive Milieu können tumorinfiltrierende DZ dem allerdings nur unzureichend nachkommen. In dieser Arbeit konnte in einem endogenen Lymphommodell der Maus gezeigt werden, dass die Therapie mit Immunkontrollpunkt-Inhibitoren zu einer Regeneration dieser unterdrückten DZ-Funktionen führt. Dies wird unter anderem durch die stimulierende Wirkung von IFN- γ erreicht, welches unter Behandlung von reaktivierten T-Zellen und vor allem von NK-Zellen vermehrt produziert wird (Ahmetlic et al., 2021). Auch die dadurch beeinflusste Interleukinproduktion spielt eine tragende Rolle: Die Steigerung des IL12-/IL-10-Verhältnisses stellt eine wichtige Voraussetzung für die Polarisierung einer T_H1-gesteuerten Immunreaktion dar und steigert wiederum die IFN- γ -Sekretion der NK-Zellen (Gerosa et al., 2005; Walzer et al., 2005). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Zugabe von IL-12 auch die zytolytischen Fähigkeiten der NK-Zellen unter PD-1-Blockade steigert (Ohs et al., 2017). Wie für das menschliche Melanom beschrieben, scheinen dendritische Zellen auch im λ -MYC-Mausmodell daher mit den NK-Zellen eine gemeinsame Achse zu bilden, welche die T-Zell-basierte Antitumorantwort unterstützt (Barry et al., 2018).

Da das von TIDZ und Tumorzellen gebildete Interleukin-10 die Immunsuppression und das Tumorstadium fördert (Han et al., 2014), sollte durch dessen Neutralisierung dieser negative Effekt ausbleiben. Die Behandlung mit anti-IL-10-Antikörper erreichte tatsächlich nicht nur die Regeneration paralysierter TIDZ, sondern konnte gemeinsam mit PD-1-

blockierenden Antikörpern zur Regression des Ovarialkarzinoms führen (Lamichhane et al., 2017; Vicari, Chiodoni, et al., 2002). Auch bei nicht-soliden Tumorerkrankungen wie der chronisch lymphatischen Leukämie konnte die IL-10-Neutralisierung die Aktivität von T-Effektorzellen, die Prävalenz von Gedächtniszellen sowie die Produktion von IFN- γ erhöhen. Zudem konnte eine Reduktion der Tumorzelllast im Plasma festgestellt werden (Rivas et al., 2021). Im λ -MYC-Tumormodell der Maus erbrachte die antikörperbasierte IL-10-Neutralisierung ebenfalls eine verbesserte T-Zell-Funktion sowie signifikant verzögertes Tumorwachstum (Ma et al., 2021). Aufgrund dieser Ergebnisse dürfte die Neutralisierung von IL-10 eine vielversprechende Erweiterung in kommenden Therapieschemata darstellen.

5. LITERATURVERZEICHNIS

- Adam, C., King, S., Allgeier, T., Braumüller, H., Lüking, C., Mysliwietz, J., Kriegeskorte, A., Busch, D. H., Röcken, M., & Mocikat, R. (2005). DC-NK cell cross talk as a novel CD4+ T-cell-independent pathway for antitumor CTL induction. *Blood*, *106*(1), 338-344.
- Aerts-Toegaert, C., Heirman, C., Tuyaerts, S., Corthals, J., Aerts, J. L., Bonehill, A., Thielemans, K., & Breckpot, K. (2007). CD83 expression on dendritic cells and T cells: correlation with effective immune responses. *Eur J Immunol*, *37*(3), 686-695.
- 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. *J Immunother Cancer*, *9*(1).
- Banchereau, J., & Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, *392*(6673), 245-252.
- Barry, K. C., Hsu, J., Broz, M. L., Cueto, F. J., Binnewies, M., Combes, A. J., Nelson, A. E., Loo, K., Kumar, R., Rosenblum, M. D., Alvarado, M. D., Wolf, D. M., Bogunovic, D., Bhardwaj, N., Daud, A. I., Ha, P. K., Ryan, W. R., Pollack, J. L., Samad, B., Asthana, S., Chan, V., & Krummel, M. F. (2018). A natural killer-dendritic cell axis defines checkpoint therapy-responsive tumor microenvironments. *Nat Med*, *24*(8), 1178-1191.
- Batlevi, C. L., Matsuki, E., Brentjens, R. J., & Younes, A. (2016). Novel immunotherapies in lymphoid malignancies. *Nat Rev Clin Oncol*, *13*(1), 25-40.
- Beavis, P. A., Henderson, M. A., Giuffrida, L., Davenport, A. J., Petley, E. V., House, I. G., Lai, J., Sek, K., Milenkovski, N., John, L. B., Mardiana, S., Slaney, C. Y., Trapani, J. A., Loi, S., Kershaw, M. H., Haynes, N. M., & Darcy, P. K. (2018). Dual PD-1 and CTLA-4 Checkpoint Blockade Promotes Antitumor Immune Responses through CD4. *Cancer Immunol Res*, *6*(9), 1069-1081.
- 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 Immunol Immunother*, *54*(4), 307-314.
- Braumüller, H., Wieder, T., Brenner, E., Aßmann, S., Hahn, M., Alkhaled, M., Schilbach, K., Essmann, F., Kneilling, M., Griessinger, C., Ranta, F., Ullrich, S., Mocikat, R., Braungart, K., Mehra, T., Fehrenbacher, B., Berdel, J., Niessner, H., Meier, F., van den Broek, M., Häring, H. U., Handgretinger, R., Quintanilla-Martinez, L., Fend, F., Pesic, M., Bauer, J., Zender, L., Schaller, M., Schulze-Osthoff, K., & Röcken, M. (2013). T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature*, *494*(7437), 361-365.

- Brenner, 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. *Nat Commun*, *11*(1), 1335.
- Brown, J. A., Dorfman, D. M., Ma, F. R., Sullivan, E. L., Munoz, O., Wood, C. R., Greenfield, E. A., & Freeman, G. J. (2003). Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. *J Immunol*, *170*(3), 1257-1266.
- Caux, C., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Dubois, B., Van Kooten, C., Durand, I., & Banchereau, J. (1994). Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med*, *180*(4), 1263-1272.
- Cella, M., Scheidegger, D., Palmer-Lehmann, K., Lane, P., Lanzavecchia, A., & Alber, G. (1996). Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med*, *184*(2), 747-752.
- Chaux, P., Favre, N., Martin, M., & Martin, F. (1997). Tumor-infiltrating dendritic cells are defective in their antigen-presenting function and inducible B7 expression in rats. *Int J Cancer*, *72*(4), 619-624.
- Chen, D. S., & Mellman, I. (2013). Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity*, *39*(1), 1-10.
- Collins, A. V., Brodie, D. W., Gilbert, R. J., Iaboni, A., Manso-Sancho, R., Walse, B., Stuart, D. I., van der Merwe, P. A., & Davis, S. J. (2002). The interaction properties of costimulatory molecules revisited. *Immunity*, *17*(2), 201-210.
- Crespo, J., Sun, H., Welling, T. H., Tian, Z., & Zou, W. (2013). T cell anergy, exhaustion, senescence, and stemness in the tumor microenvironment. *Curr Opin Immunol*, *25*(2), 214-221.
- de Vries, J. E., Yssel, H., & Spits, H. (1989). Interplay between the TCR/CD3 complex and CD4 or CD8 in the activation of cytotoxic T lymphocytes. *Immunol Rev*, *109*, 119-141.
- Demoulin, S., Herfs, M., Delvenne, P., & Hubert, P. (2013). Tumor microenvironment converts plasmacytoid dendritic cells into immunosuppressive/tolerogenic cells: insight into the molecular mechanisms. *J Leukoc Biol*, *93*(3), 343-352.

- Dimri, G. P. (2005). What has senescence got to do with cancer? *Cancer Cell*, 7(6), 505-512.
- Dyck, L., & Mills, K. H. G. (2017). Immune checkpoints and their inhibition in cancer and infectious diseases. *Eur J Immunol*, 47(5), 765-779.
- Elgueta, R., Benson, M. J., de Vries, V. C., Wasiuk, A., Guo, Y., & Noelle, R. J. (2009). Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev*, 229(1), 152-172.
- Fernandez, N. C., Lozier, A., Flament, C., Ricciardi-Castagnoli, P., Bellet, D., Suter, M., Perricaudet, M., Tursz, T., Maraskovsky, E., & Zitvogel, L. (1999). Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat Med*, 5(4), 405-411.
- 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. *J Exp Med*, 192(7), 1027-1034.
- Gabrilovich, D. (2004). Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nat Rev Immunol*, 4(12), 941-952.
- Gabrilovich, D. I., Ciernik, I. F., & Carbone, D. P. (1996). Dendritic cells in antitumor immune responses. I. Defective antigen presentation in tumor-bearing hosts. *Cell Immunol*, 170(1), 101-110.
- García-Hernández, M. L., Hernández-Pando, R., Gariglio, P., & Berumen, J. (2002). Interleukin-10 promotes B16-melanoma growth by inhibition of macrophage functions and induction of tumour and vascular cell proliferation. *Immunology*, 105(2), 231-243.
- Garris, C. S., Arlauckas, S. P., Kohler, R. H., Trefny, M. P., Garren, S., Piot, C., Engblom, C., Pfirschke, C., Siwicki, M., Gungabeesoon, J., Freeman, G. J., Warren, S. E., Ong, S., Browning, E., Twitty, C. G., Pierce, R. H., Le, M. H., Algazi, A. P., Daud, A. I., Pai, S. I., Zippelius, A., Weissleder, R., & Pittet, M. J. (2018). Successful Anti-PD-1 Cancer Immunotherapy Requires T Cell-Dendritic Cell Crosstalk Involving the Cytokines IFN- γ and IL-12. *Immunity*, 49(6), 1148-1161.e1147.
- Gerosa, F., Gobbi, A., Zorzi, P., Burg, S., Briere, F., Carra, G., & Trinchieri, G. (2005). The reciprocal interaction of NK cells with plasmacytoid or myeloid dendritic cells profoundly affects innate resistance functions. *J Immunol*, 174(2), 727-734.

- Gerosa, F., Paganin, C., Peritt, D., Paiola, F., Scupoli, M. T., Aste-Amezaga, M., Frank, I., & Trinchieri, G. (1996). Interleukin-12 primes human CD4 and CD8 T cell clones for high production of both interferon-gamma and interleukin-10. *J Exp Med*, 183(6), 2559-2569.
- Greenwald, R. J., Freeman, G. J., & Sharpe, A. H. (2005). The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol*, 23, 515-548.
- Han, Y., Chen, Z., Yang, Y., Jiang, Z., Gu, Y., Liu, Y., Lin, C., Pan, Z., Yu, Y., Jiang, M., Zhou, W., & Cao, X. (2014). Human CD14+ CTLA-4+ regulatory dendritic cells suppress T-cell response by cytotoxic T-lymphocyte antigen-4-dependent IL-10 and indoleamine-2,3-dioxygenase production in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 59(2), 567-579.
- Hasegawa, H., & Matsumoto, T. (2018). Mechanisms of Tolerance Induction by Dendritic Cells. *Front Immunol*, 9, 350.
- Hecht, J. L., & Aster, J. C. (2000). Molecular biology of Burkitt's lymphoma. *J Clin Oncol*, 18(21), 3707-3721.
- Heufler, C., Koch, F., Stanzl, U., Topar, G., Wysocka, M., Trinchieri, G., Enk, A., Steinman, R. M., Romani, N., & Schuler, G. (1996). Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells. *Eur J Immunol*, 26(3), 659-668.
- 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., Lutzky, J., Lorigan, P., Vaubel, J. M., Linette, G. P., Hogg, D., Ottensmeier, C. H., Lebbé, C., Peschel, C., Quirt, I., Clark, J. I., Wolchok, J. D., Weber, J. S., Tian, J., Yellin, M. J., Nichol, G. M., Hoos, A., & Urba, W. J. (2010). Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*, 363(8), 711-723.
- Huang, M., Wang, J., Lee, P., Sharma, S., Mao, J. T., Meissner, H., Uyemura, K., Modlin, R., Wollman, J., & Dubinett, S. M. (1995). Human non-small cell lung cancer cells express a type 2 cytokine pattern. *Cancer Res*, 55(17), 3847-3853.
- Ilcus, C., Bagacean, C., Tempescul, A., Popescu, C., Parvu, A., Cenariu, M., Bocsan, C., & Zdrenghia, M. (2017). Immune checkpoint blockade: the role of PD-1-PD-L axis in lymphoid malignancies. *Onco Targets Ther*, 10, 2349-2363.
- Kaplan, D. H., Shankaran, V., Dighe, A. S., Stockert, E., Aguet, M., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (1998). Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(13), 7556-7561.

- Karachaliou, N., Gonzalez-Cao, M., Crespo, G., Drozdowskyj, A., Aldeguer, E., Gimenez-Capitan, A., Teixido, C., Molina-Vila, M. A., Viteri, S., De Los Llanos Gil, M., Algarra, S. M., Perez-Ruiz, E., Marquez-Rodas, I., Rodriguez-Abreu, D., Blanco, R., Puertolas, T., Royo, M. A., & Rosell, R. (2018). Interferon gamma, an important marker of response to immune checkpoint blockade in non-small cell lung cancer and melanoma patients. *Ther Adv Med Oncol*, *10*, 1758834017749748.
- Keir, M. E., Butte, M. J., Freeman, G. J., & Sharpe, A. H. (2008). PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*, *26*, 677-704.
- Kennedy, R., & Celis, E. (2008). Multiple roles for CD4+ T cells in anti-tumor immune responses. *Immunol Rev*, *222*, 129-144.
- Koch, F., Stanzl, U., Jennewein, P., Janke, K., Heufler, C., Kämpgen, E., Romani, N., & Schuler, G. (1996). High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. *J Exp Med*, *184*(2), 741-746.
- Kondělková, K., Vokurková, D., Krejsek, J., Borská, L., Fiala, Z., & Ctírad, A. (2010). Regulatory T cells (TREG) and their roles in immune system with respect to immunopathological disorders. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, *53*(2), 73-77.
- Kovalchuk, A. L., Qi, C. F., Torrey, T. A., Taddesse-Heath, L., Feigenbaum, L., Park, S. S., Gerbitz, A., Klobeck, G., Hoertnagel, K., Polack, A., Bornkamm, G. W., Janz, S., & Morse, H. C. (2000). Burkitt lymphoma in the mouse. *J Exp Med*, *192*(8), 1183-1190.
- 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 Res*, *77*(23), 6667-6678.
- Lanier, L. L. (2008). Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol*, *9*(5), 495-502.
- Larkin, J., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., Grob, J. J., Cowey, C. L., Lao, C. D., Schadendorf, D., Dummer, R., Smylie, M., Rutkowski, P., Ferrucci, P. F., Hill, A., Wagstaff, J., Carlino, M. S., Haanen, J. B., Maio, M., Marquez-Rodas, I., McArthur, G. A., Ascierto, P. A., Long, G. V., Callahan, M. K., Postow, M. A., Grossmann, K., Sznol, M., Dreno, B., Bastholt, L., Yang, A., Rollin, L. M., Horak, C., Hodi, F. S., & Wolchok, J. D. (2015). Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med*, *373*(1), 23-34.

- Laurent, S., Carrega, P., Saverino, D., Piccioli, P., Camoriano, M., Morabito, A., Dozin, B., Fontana, V., Simone, R., Mortara, L., Mingari, M. C., Ferlazzo, G., & Pistillo, M. P. (2010). CTLA-4 is expressed by human monocyte-derived dendritic cells and regulates their functions. *Hum Immunol*, 71(10), 934-941.
- Leach, D. R., Krummel, M. F., & Allison, J. P. (1996). Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science*, 271(5256), 1734-1736.
- Li, Y., Liu, J., Gao, L., Liu, Y., Meng, F., Li, X., & Qin, F. X. (2020). Targeting the tumor microenvironment to overcome immune checkpoint blockade therapy resistance. *Immunol Lett*, 220, 88-96.
- Liu, Q., Zhang, C., Sun, A., Zheng, Y., Wang, L., & Cao, X. (2009). Tumor-educated CD11b^{high}IL12^{low} regulatory dendritic cells suppress T cell response through arginase I. *J Immunol*, 182(10), 6207-6216.
- Ma, D. Y., & Clark, E. A. (2009). The role of CD40 and CD154/CD40L in dendritic cells. *Semin Immunol*, 21(5), 265-272.
- Ma, X., Yan, W., Zheng, H., Du, Q., Zhang, L., Ban, Y., Li, N., & Wei, F. (2015). Regulation of IL-10 and IL-12 production and function in macrophages and dendritic cells. *F1000Res*, 4.
- Ma, Y., Bauer, V., Riedel, T., Ahmetlić, F., Hömberg, N., Hofer, T. P., . . . Mocikat, R. (2021). Interleukin-10 counteracts T-helper type 1 responses in B-cell lymphoma and is a target for tumor immunotherapy. *Cancer Lett*, 503, 110-116.
- Mailliard, R. B., Egawa, S., Cai, Q., Kalinska, A., Bykovskaya, S. N., Lotze, M. T., Kapsenberg, M. L., Storkus, W. J., & Kalinski, P. (2002). Complementary dendritic cell-activating function of CD8⁺ and CD4⁺ T cells: helper role of CD8⁺ T cells in the development of T helper type 1 responses. *J Exp Med*, 195(4), 473-483.
- Marie, J. C., Letterio, J. J., Gavin, M., & Rudensky, A. Y. (2005). TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J Exp Med*, 201(7), 1061-1067.
- McArthur, H. L., & Page, D. B. (2016). Immunotherapy for the treatment of breast cancer: checkpoint blockade, cancer vaccines, and future directions in combination immunotherapy. *Clin Adv Hematol Oncol*, 14(11), 922-933.
- Mellman, I., Coukos, G., & Dranoff, G. (2011). Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*, 480(7378), 480-489.

- Mueller, D. L., Jenkins, M. K., & Schwartz, R. H. (1989). Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Annu Rev Immunol*, 7, 445-480.
- 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 Immunol Immunother*, 63(5), 491-499.
- Norian, L. A., Rodriguez, P. C., O'Mara, L. A., Zabaleta, J., Ochoa, A. C., Cella, M., & Allen, P. M. (2009). Tumor-infiltrating regulatory dendritic cells inhibit CD8⁺ T cell function via L-arginine metabolism. *Cancer Res*, 69(7), 3086-3094.
- Ohs, I., Ducimetière, L., Marinho, J., Kulig, P., Becher, B., & Tugues, S. (2017). Restoration of Natural Killer Cell Antimetastatic Activity by IL12 and Checkpoint Blockade. *Cancer Res*, 77(24), 7059-7071.
- Orange, J. S., & Biron, C. A. (1996). An absolute and restricted requirement for IL-12 in natural killer cell IFN-gamma production and antiviral defense. Studies of natural killer and T cell responses in contrasting viral infections. *J Immunol*, 156(3), 1138-1142.
- Pardoll, D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*, 12(4), 252-264.
- Pardoll, D. M., & Topalian, S. L. (1998). The role of CD4⁺ T cell responses in antitumor immunity. *Curr Opin Immunol*, 10(5), 588-594.
- Parkin, J., & Cohen, B. (2001). An overview of the immune system. *Lancet*, 357(9270), 1777-1789.
- Parry, R. V., Chemnitz, J. M., Frauwirth, K. A., Lanfranco, A. R., Braunstein, I., Kobayashi, S. V., Linsley, P. S., Thompson, C. B., & Riley, J. L. (2005). CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol*, 25(21), 9543-9553.
- Perrot, I., Blanchard, D., Freymond, N., Isaac, S., Guibert, B., Pachéco, Y., & Lebecque, S. (2007). Dendritic cells infiltrating human non-small cell lung cancer are blocked at immature stage. *J Immunol*, 178(5), 2763-2769.
- Postow, M. A., Callahan, M. K., & Wolchok, J. D. (2015). Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *J Clin Oncol*, 33(17), 1974-1982.

- Preynat-Seauve, O., Schuler, P., Contassot, E., Beermann, F., Huard, B., & French, L. E. (2006). Tumor-infiltrating dendritic cells are potent antigen-presenting cells able to activate T cells and mediate tumor rejection. *J Immunol*, *176*(1), 61-67.
- Przewoznik, M., Hömberg, N., Naujoks, M., Pözl, 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. *J Immunother*, *35*(3), 217-222.
- Rivas, J. R., Liu, Y., Alhakeem, S. S., Eckenrode, J. M., Marti, F., Collard, J. P., . . . Bondada, S. (2021). Interleukin-10 suppression enhances T-cell antitumor immunity and responses to checkpoint blockade in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, *35*(11), 3188-3200.
- Rogiers, A., Boekhout, A., Schwarze, J. K., Awada, G., Blank, C. U., & Neyns, B. (2019). Long-Term Survival, Quality of Life, and Psychosocial Outcomes in Advanced Melanoma Patients Treated with Immune Checkpoint Inhibitors. *J Oncol*, *2019*, 5269062.
- Ruffell, B., Chang-Strachan, D., Chan, V., Rosenbusch, A., Ho, C. M., Pryer, N., Daniel, D., Hwang, E. S., Rugo, H. S., & Coussens, L. M. (2014). Macrophage IL-10 blocks CD8+ T cell-dependent responses to chemotherapy by suppressing IL-12 expression in intratumoral dendritic cells. *Cancer Cell*, *26*(5), 623-637.
- 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. *J Immunol*, *155*(3), 1151-1164.
- Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M., & Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, *401*(6754), 708-712.
- Sato, K., Uto, T., Fukaya, T., & Takagi, H. (2017). Regulatory Dendritic Cells. *Curr Top Microbiol Immunol*, *410*, 47-71.
- Scheuerpflug, A., Ahmetlić, F., Bauer, V., Riedel, T., Röcken, M., & Mocikat, R. (2020). The role of dendritic cells for therapy of B-cell lymphoma with immune checkpoint inhibitors. *Cancer Immunol Immunother*.
- Schmitt, E. G., & Williams, C. B. (2013). Generation and function of induced regulatory T cells. *Front Immunol*, *4*, 152.

- Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T., & Hume, D. A. (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*, 75(2), 163-189.
- Shurin, M. R., Lu, L., Kalinski, P., Stewart-Akers, A. M., & Lotze, M. T. (1999). Th1/Th2 balance in cancer, transplantation and pregnancy. *Springer Semin Immunopathol*, 21(3), 339-359.
- Snijders, A., Kalinski, P., Hilkens, C. M., & Kapsenberg, M. L. (1998). High-level IL-12 production by human dendritic cells requires two signals. *Int Immunol*, 10(11), 1593-1598.
- Statistisches Bundesamt. (2021). *Tiefgegliederte Todesursachendaten (Datensatzstruktur), Berichtsjahr 2020*. Statistisches Bundesamt. Retrieved 23.05.2022 from <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Publicationen/Downloads-Todesursachen/todesursachenstatistik-5232101207015.html>
- Steinman, R., & Inaba, K. (1989). Immunogenicity: role of dendritic cells. *Bioessays*, 10(5), 145-152.
- Steinman, R. M. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol*, 9, 271-296.
- Stojanovic, A., Fiegler, N., Brunner-Weinzierl, M., & Cerwenka, A. (2014). CTLA-4 is expressed by activated mouse NK cells and inhibits NK Cell IFN- γ production in response to mature dendritic cells. *J Immunol*, 192(9), 4184-4191.
- Sun, N. Y., Chen, Y. L., Lin, H. W., Chiang, Y. C., Chang, C. F., Tai, Y. J., Chen, C. A., Sun, W. Z., Chien, C. L., & Cheng, W. F. (2019). Immune checkpoint Ab enhances the antigen-specific anti-tumor effects by modulating both dendritic cells and regulatory T lymphocytes. *Cancer Lett*, 444, 20-34.
- Tivol, E. A., Borriello, F., Schweitzer, A. N., Lynch, W. P., Bluestone, J. A., & Sharpe, A. H. (1995). Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity*, 3(5), 541-547.
- Topalian, S. L., Drake, C. G., & Pardoll, D. M. (2012). Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Curr Opin Immunol*, 24(2), 207-212.
- Topalian, S. L., Drake, C. G., & Pardoll, D. M. (2015). Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell*, 27(4), 450-461.

- Topalian, S. L., Hodi, F. S., Brahmer, J. R., Gettinger, S. N., Smith, D. C., McDermott, D. F., Powderly, J. D., Carvajal, R. D., Sosman, J. A., Atkins, M. B., Leming, P. D., Spigel, D. R., Antonia, S. J., Horn, L., Drake, C. G., Pardoll, D. M., Chen, L., Sharfman, W. H., Anders, R. A., Taube, J. M., McMiller, T. L., Xu, H., Korman, A. J., Jure-Kunkel, M., Agrawal, S., McDonald, D., Kollia, G. D., Gupta, A., Wigginton, J. M., & Sznol, M. (2012). Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med*, *366*(26), 2443-2454.
- Topalian, S. L., Sznol, M., McDermott, D. F., Kluger, H. M., Carvajal, R. D., Sharfman, W. H., Brahmer, J. R., Lawrence, D. P., Atkins, M. B., Powderly, J. D., Leming, P. D., Lipson, E. J., Puzanov, I., Smith, D. C., Taube, J. M., Wigginton, J. M., Kollia, G. D., Gupta, A., Pardoll, D. M., Sosman, J. A., & Hodi, F. S. (2014). Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab. *J Clin Oncol*, *32*(10), 1020-1030.
- Vicari, A. P., Caux, C., & Trinchieri, G. (2002). Tumour escape from immune surveillance through dendritic cell inactivation. *Semin Cancer Biol*, *12*(1), 33-42.
- Vicari, A. P., Chiodoni, C., Vaure, C., Aït-Yahia, S., Dercamp, C., Matsos, F., Reynard, O., Taverne, C., Merle, P., Colombo, M. P., O'Garra, A., Trinchieri, G., & Caux, C. (2002). Reversal of tumor-induced dendritic cell paralysis by CpG immunostimulatory oligonucleotide and anti-interleukin 10 receptor antibody. *J Exp Med*, *196*(4), 541-549.
- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., & Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. *Nat Immunol*, *9*(5), 503-510.
- Wakkach, A., Fournier, N., Brun, V., Breittmayer, J. P., Cottrez, F., & Groux, H. (2003). Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity*, *18*(5), 605-617.
- Walzer, T., Dalod, M., Vivier, E., & Zitvogel, L. (2005). Natural killer cell-dendritic cell crosstalk in the initiation of immune responses. *Expert Opin Biol Ther*, *5 Suppl 1*, S49-59.
- Wang, H. Y., Fu, T., Wang, G., Zeng, G., Perry-Lalley, D. M., Yang, J. C., Restifo, N. P., Hwu, P., & Wang, R. F. (2002). Induction of CD4(+) T cell-dependent antitumor immunity by TAT-mediated tumor antigen delivery into dendritic cells. *J Clin Invest*, *109*(11), 1463-1470.
- Watkins, S. K., Zhu, Z., Riboldi, E., Shafer-Weaver, K. A., Stagliano, K. E., Sklavos, M. M., Ambs, S., Yagita, H., & Hurwitz, A. A. (2011). FOXO3 programs tumor-associated DCs to become tolerogenic in human and murine prostate cancer. *J Clin Invest*, *121*(4), 1361-1372.

- Wculek, S. K., Amores-Iniesta, J., Conde-Garrosa, R., Khouili, S. C., Melero, I., & Sancho, D. (2019). Effective cancer immunotherapy by natural mouse conventional type-1 dendritic cells bearing dead tumor antigen. *J Immunother Cancer*, 7(1), 100.
- Wherry, E. J. (2011). T cell exhaustion. *Nat Immunol*, 12(6), 492-499.
- Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., Yamaguchi, T., Miyara, M., Fehervari, Z., Nomura, T., & Sakaguchi, S. (2008). CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science*, 322(5899), 271-275.
- Witkowska, M., & Smolewski, P. (2018). Immune Checkpoint Inhibitors to Treat Malignant Lymphomas. *J Immunol Res*, 2018, 1982423.
- Wu, H., Zhuang, Q., Xu, J., Xu, L., Zhao, Y., Wang, C., Yang, Z., Shen, F., Liu, Z., & Peng, R. (2019). Cell-Penetrating Peptide Enhanced Antigen Presentation for Cancer Immunotherapy. *Bioconjug Chem*, 30(8), 2115-2126.
- Xiong, W., Zhao, Y., Du, H., & Guo, X. (2021). Current Status of Immune Checkpoint Inhibitor Immunotherapy for Lung Cancer. *Front Oncol*, 11, 704336.
- Yang, Z. Z., Liang, A. B., & Ansell, S. M. (2015). T-cell-mediated antitumor immunity in B-cell non-Hodgkin lymphoma: activation, suppression and exhaustion. *Leuk Lymphoma*, 56(9), 2498-2504.
- Zamai, L., Ahmad, M., Bennett, I. M., Azzoni, L., Alnemri, E. S., & Perussia, B. (1998). Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *J Exp Med*, 188(12), 2375-2380.
- Zhao, F., Falk, C., Osen, W., Kato, M., Schadendorf, D., & Umansky, V. (2009). Activation of p38 mitogen-activated protein kinase drives dendritic cells to become tolerogenic in ret transgenic mice spontaneously developing melanoma. *Clin Cancer Res*, 15(13), 4382-4390.
- Zou, W. (2005). Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer*, 5(4), 263-274.

6. ANHANG

DANKSAGUNG

Zu allererst möchte ich mich bei meinem Doktorvater und Betreuer Prof. Dr. Ralph Mocikat dafür bedanken, dass ich in seiner Arbeitsgruppe promovieren durfte. Dank seiner stetigen Hilfsbereitschaft und Erreichbarkeit, fühlte ich mich zu jeder Zeit gut betreut und unterstützt. Sein leidenschaftliches Interesse für die Forschung war für mich stets motivierend und seine konstruktive Kritik trug maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit bei. Ich kann mich nur glücklich schätzen, eine derartige Betreuung gehabt zu haben!

Ein großes Dankeschön geht auch an die gesamte AG Mocikat! Ihr habt eine ganz wunderbare und konstruktive Arbeitsatmosphäre geschaffen und wart nicht nur Arbeitskollegen, sondern auch Freunde! Liebe Nadine, du hattest immer ein offenes Ohr für allerlei Fragen und falls etwas nicht klappte eine passende Lösung. Was wäre das Labor nur ohne dich? Und dir vielen Dank liebe Fa, für die vielen fachlichen Gespräche und Anregungen. Ich habe mich sehr gefreut, dass uns doch eine lange gemeinsame Zeit im Labor vergönnt war und wir daher viel gemeinsam erleben konnten! Auch möchte ich dir danken Albert, für die Hilfe und Unterstützung im Labor sowie beim Präparieren und Arbeiten mit den Mäusen. Nicht zuletzt auch für deine offene und lustige Art, die mir jeden Tag erhellt und das Arbeiten viel leichter gemacht hat. Vielen Dank auch an dich Vera, für den konstruktiven Austausch während unserer Laborarbeit!

Ein herzliches Dankeschön gilt auch der AG Nößner, für das freundliche Miteinander, die gemeinsamen Mittagspausen sowie die Unterstützung bei technischen Herausforderungen. Vielen Dank auch an alle Mitarbeiter des Tierstalls für die Hilfsbereitschaft und gute Zusammenarbeit!

Zuletzt möchte ich noch ein großes Dankeschön an meine Familie und Freunde richten, die mir zuversichtlich zur Seite standen, mich in vielerlei Hinsicht unterstützt und an mich geglaubt haben! Auch vielen Dank dir lieber Yannick, für deine Geduld und motivierenden Worte, durch die mir das Schreiben viel leichter gefallen ist!

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Scheuerpflug, Anne Catharina

Name, Vornamen

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

BEDEUTUNG DENDRITISCHER ZELLEN

FÜR DIE TUMORTHERAPIE MIT IMMUNKONTROLLPUNKT-INHIBITOREN

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, 26.03.2023

Anne Scheuerpflug