Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Klinik der Universität München

Leiter: Prof. Dr. Stefan Endres

Die Rolle der GM-CSF-CCL22 Achse in Homöostase und bei malignen Tumoren

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Natascha Ilona Röhrle

aus Wangen im Allgäu

2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. David Anz
Mitberichterstatter:	PD Dr. Robert Kammerer
	PD Dr. Philipp von Hundelshausen
	Prof. Dr. Jürgen Bernhagen
Mitbetreuung durch die	
promovierten Mitarbeiter:	Prof. Dr. Stefan Endres
	Dr. Carolin Perleberg
Dekan:	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung:	06.07.2023

Meiner Familie

Eidesstattliche Versicherung

Röhrle, Natascha

Name, Vorname

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

„Die Rolle der GM-CSF-CCL22 Achse in Homöostase und bei malignen Tumoren“

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

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

München, den 11.07.2023

Ort, Datum

Natascha Röhrle

INHALTSVERZEICHNIS

1 Einleitung 1

1.1 Das Immunsystem 1

1.1.1 Das angeborene Immunsystem 1

1.1.2 Das adaptive Immunsystem 2

1.2 Dendritische Zellen 3

1.2.1 Die dendritische Zelle als Schnittstelle zwischen angeborener und adaptiver Immunität 3

1.3 Regulatorische T-Zellen 4

1.3.1 Mechanismen der Immunsuppression durch regulatorische T-Zellen 4

1.3.2 Regulatorische T-Zellen im Tumor 6

1.4 Das Chemokin CCL22 7

1.4.1 CCL22 im Tumor 8

1.5 Das Zytokin GM-CSF 10

1.5.1 GM-CSF Biologie 11

1.6 Tumorimmunolgie 12

1.6.1 Immune surveillance 12

1.6.2 Tumorimmuntherapien 13

1.7 Fragestellung 16

2 Material und Methoden 17

2.1 Materialien 17

2.1.1 Geräte 17

2.1.2 Verbrauchsmittel 18

2.1.3 Chemikalien und Lösungen 18

2.1.4 Reagenziensätze 19

2.1.5 Materialien für die Zellkultur 20

2.1.6 Zelllinien 22

2.1.7 Zytokine, Wachstumsfaktoren und Stimulanzien 22

2.1.8 FACS Antikörper 22

2.1.9 In vivo Antikörper 23

2.1.10 qTR-PCR Primer 23

2.1.11 Software 23

2.2 Methoden 24

2.2.1 Zellbiologische Methoden ... 24
2.2.2 Immunologische Methoden ... 27
2.2.3 Molekularbiologische Methoden ... 29
2.2.4 Tierversuche ... 33

2.3 Statistische Analyse ... 34

3 Ergebnisse ... 35

3.1 T-Zellen vermitteln die konstitutive CCL22-Sekretion in dendritischen Zellen ... 35
3.1.1 CCL22 wird konstitutiv in hohen Mengen exprimiert ... 35
3.1.2 Konstitutive CCL22-Expression wird *in vitro* durch T-Zellen vermittelt ... 36
3.1.3 Konstitutive CCL22-Expression wird *in vivo* durch T-Zellen vermittelt ... 38

3.2 GM-CSF vermittelt die konstitutive CCL22-Sekretion ... 40
3.2.1 Lösliche Faktoren aus T-Zellen vermitteln die konstitutive CCL22-Sekretion ... 40
3.2.2 GM-CSF aus T-Zellen vermittelt konstitutive CCL22-Expression in dendritischen Zellen ... 41
3.2.3 GM-CSF und G-CSF induzieren CCL22 in humanen Zellen ... 44

3.3 GM-CSF wirkt bei CCL22-Defizienz potent antitumoral ... 46
3.3.1 Rekombinantes GM-CSF induziert CCL22 *in vivo* ... 46
3.3.2 Eine systemische Tumortherapie mit GM-CSF führt bei CCL22-Defizienz in einem murinen Pankreaskarzinom-modell zu verlangsamten Tumorwachstum ... 47
3.3.3 Eine systemische Tumortherapie mit GM-CSF führt bei CCL22-Defizienz in einem murinen Melanommodell zu verlangsamten Tumorwachstum ... 50
3.3.4 Der Therapieeffekt der GM-CSF-basierten Tumortherapie bei CCL22-Defizienz ist abhängig von einem stark exprimierten Tumorantigen ... 52
3.3.5 Der Therapieeffekt der GM-CSF-basierte Tumortherapie bei CCL22-Defizienz wird durch CD8+ Zellen vermittelt ... 54
3.3.6 Eine GM-CSF-basierte Tumortherapie führt zu verzögertem Tumor-wachstum und Verlängerung des Überlebens in *CCR4*$^{-/-}$ Mäusen ... 56

4 Diskussion ... 58

4.1 Die GM-CSF-CCL22-Achse in der Homöostase ... 58
4.1.1 GM-CSF aus T-Zellen vermittelt konstitutive CCL22-Expression in dendritischen Zellen ... 58
4.1.2 Rekombinantes GM-CSF induziert CCL22 *in vivo* ... 59

4.2 Die GM-CSF-CCL22-Achse im Tumor ... 61
4.2.1 GM-CSF-basierte Tumorimmuntherapien ... 61
4.2.2 Eine GM-CSF-basierte Tumorimmuntherapie wirkt in Abwesenheit von CCL22 stark antitumoral ... 63

4.2.3 Eine GM-CSF-basierte Tumorimmuntherapie wirkt in Abwesenheit von CCR4 stark antitumoral 68

5 Zusammenfassung 70

6 Abkürzungsverzeichnis 72

7 Literaturverzeichnis 75

8 Danksagung 92

9 Veröffentlichungen 93

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Jeder Mensch ist einer ständigen Bedrohung durch Krankheitserreger ausgesetzt, worunter sich eine Vielzahl an Viren, Bakterien und Pilzen befinden. Aber auch entartete körpereigene Zellen stellen fortwährend eine Gefahr für den Organismus dar. Um sich diesen exogenen wie endogenen Gefahren entgegen stellen zu können, hat sich im Laufe der Evolution ein faszinierend komplexes System entwickelt – das Immunsystem. Um seiner Aufgabe gerecht zu werden, muss es in der Lage sein, sicher zwischen Selbst und Fremd zu unterscheiden. Es muss also verhindert werden, dass sich unser Immunsystem einerseits gegen uns selbst richtet, andererseits muss aber auch gewährleistet werden, dass es Krankheitserreger sowie entartete Zellen effektiv als fremd erkennt und eliminiert. Um diese Aufgabe bewerkstelligen zu können, bedient es sich vielfältigster Mechanismen, zu denen nicht nur zelluläre Bestandteile gehören, sondern auch humorale. Man unterscheidet im Immunsystem grundsätzlich zwei Bereiche: das angeborene und das adaptive Immunsystem.

1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Beim angeborenen Immunsystem handelt es sich um den phylogenetisch älteren Anteil, der eindringenden Mikroorganismen die erste Front bietet und sofort verfügbar ist. Die Erreger werden dabei anhand bestimmter Muster erkannt. Es handelt es sich hierbei um evolutionär hochkonservierte Strukturen, die unter dem Begriff *Pathogen-associated molecular patterns* (PAMP) zusammengefasst werden. Dieser insgesamt heterogenen Gruppe an Strukturen ist gemeinsam, dass sie im Wirtsorganismus nicht vorkommen und so eine Differenzierung zwischen Fremd und Selbst erlauben. Die Erkennung der PAMP erfolgt über sogenannte *Pattern recognition receptors* (PRR, deren Spezifität genetisch determiniert ist und die insbesondere auf antigenpräsentierenden Zellen (APC) wie Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen (DC) und B-Zellen vorkommen (Murphy 2017). Die Kriterien für einen PRP erfüllt unter anderem die Gruppe der *Scavenge*-Rezeptoren, der Lektin-Rezeptoren, aber auch der *Retinoic acid inducible gene I* (RIG-I) *-like* Rezeptoren und *Nucleotide-binding oligomerization domain* (NOD)*-like* Rezeptoren. Eine weitere bekannte Gruppe an PRR stellen die sogenannten *Toll-like*-Rezeptoren (TLR) dar. Das Auslösen einer TLR-Signaltransduktionskaskade führt

letztlich initial zu einer lokalen, aber oft auch im Verlauf zu einer systemischen, Entzündungsreaktion mit Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine sowie Aktivierung verschiedenster Immunzellen, wie Natürliche Killer (NK)-Zellen, Makrophagen, Granulozyten und DC. Oft reichen diese Mechanismen jedoch nicht aus, um einen Erreger vollständig eliminieren zu können und es bedarf der Aktivität eines zweiten Systems, des adaptiven Immunsystems. Hier nehmen im Besonderen DC eine Schlüsselrolle ein, wobei sie als Schnittstelle zwischen dem angeborenem und adaptiven Immunsystem fungieren. Nach Phagozytose des Erregers wandern sie in den drainierenden Lymphknoten, mit dem Ziel, die prozessierten Antigene erregerspezifischen Lymphozyten zu präsentieren, diese zu aktivieren und damit eine gerichtete Immunantwort einzuleiten (Murphy 2017).

1.1.2 Das adaptive Immunsystem

Das adaptive Immunsystem kommt im Gegensatz zum angeborenen erst mit Verzögerung zum Tragen und muss in den ersten Lebensjahren des Menschen noch ausreifen. Allerdings beinhalten die Mechanismen des adaptiven Immunsystems eine bedeutend höhere Antigenspezifität und Effizienz bei der Erregerbekämpfung als die des angeborene Immunsystems. Zudem ermöglicht eine adaptive Immunantwort die Bildung eines „Immun-Gedächtnisses“, um so zukünftige Infektionen mit demselben Erreger schneller eindämmen zu können. Die Schlüsselspieler des adaptiven Immunsystems sind dabei antigenspezifische Lymphozyten. Durch somatische Rekombination während ihrer Entwicklung entstehen antigenspezifische Rezeptoren, wovon jeder Lymphozyt eine einzigartige Variante trägt. Dieser Prozess gewährleistet eine unglaublich hohe Vielfalt an antigenspezifischen Rezeptoren, um der Diversität von Mikroorganismen, die es zu bekämpfen gilt, gerecht zu werden (Murphy 2017). Grundsätzlich werden Lymphozyten unterteilt in B-, T-Zellen und NK-Zellen. T-Zellen wiederum lassen sich anhand ihrer Oberflächenmarker weiter in zwei Hauptgruppen einteilen: CD4+ T-Helferzellen und CD8+ zytotoxische T-Zellen. Ein wichtiges Merkmal aller T-Zellen ist es, dass sie, gerade im Gegensatz zu B-Zellen, ihre entsprechenden Antigene nur dann erkennen, wenn diese über MHC-Moleküle von APC präsentiert werden. Man bezeichnet sie daher auch als MHC-restringiert. Während CD4+ T-Zellen das Antigen gebunden an MHC-II erkennen, detektieren CD8+ T-Zellen ihre Antigene nur, wenn diese über MHC-I präsentiert werden (Murphy 2017). Zur vollständigen Aktivierung benötigen die T-Zellen jedoch noch zwei weitere Signale (Schwartz 2003). Hierbei handelt es sich zum einen um ein kostimulatorisches Signal, welches in der Regel nur von professionellen APC zur Verfügung gestellt wird. Aktivierte DC exprimieren hierfür die Moleküle CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2),

welche mit CD28 auf T-Zellen interagieren (Keir and Sharpe 2005). Diese Interaktion führt zur Aktivierung der T-Zellen, was auch als *Priming* bezeichnet wird. Durch die Notwendigkeit dieses zweiten Signals soll sichergestellt werden, dass es nicht fälschlicherweise zu einer Aktivierung potenziell autoreaktiver T-Zellen kommt (Steinman and Banchereau 2007; Steinman, Hawiger, and Nussenzweig 2003; Steinman and Nussenzweig 2002). Nach erfolgreichem Priming des entsprechenden T-Zellklons kommt es in der weiteren Folge durch autokrin sezerniertes Interleukin (IL-)2 zu einer starken klonalen Proliferation und damit Expansion des antigenspezifischen T-Zell-Klons (Boyman and Sprent 2012). Ein drittes Signal wird nun benötigt, um die weitere Differenzierung der T-Zelle festzulegen, ein Prozess, der auch als Polarisierung bezeichnet wird (Curtsinger et al. 1999). CD4+ T-Zellen weisen diesbezüglich charakteristischerweise eine ausgesprochen hohe Plastizität auf, welche durch das sie umgebende und von DC generierte Zytokinmilieu unterhalten wird. Die Differenzierung des T-Zellklons hat weitreichende Folgen für die Ausgestaltung der adaptiven Immunantwort. Sezerniert eine DC beispielsweise vor allem IL-12, so kommt es zu einer prädominanten T_{H1}-Polarisierung, was wiederum durch verstärkte T-Zell-vermittelte Ausschüttung von Interferon gamma (IFN-γ) zu einer starken Aktivierung von Makrophagen führt. Produziert die DC jedoch vorrangig IL-4, so kommt es zu einer T_{H2}-dominaten Immunreaktion mit verstärkter Sekretion von IL-4, aber auch IL-5, was eine wichtige Rolle spielt bei der Bekämpfung von Parasiten und bei allergischen Reaktionen (Zhu 2018).

1.2 Dendritische Zellen

Bei DC handelt es sich um eine Gruppe antigenpräsentierender Zellen, die eine Schlüsselrolle einnehmen in der Verzahnung von angeborener und erworbener Immunität. Die Namensgebung dieser Zellpopulation hat ihren Ursprung in ihrer Morphologie. Mit ihren multiplen Zellausläufern erinnern DC nämlich tatsächlich an die Ausläufer (Dendriten) von Neuronen (Steinman and Cohn 1973).

1.2.1 Die dendritische Zelle als Schnittstelle zwischen angeborener und adaptiver Immunität

Unreife konventionelle (c-)DC halten sich im nicht-stimulierten Zustand vorwiegend im peripheren Gewebe auf, wo sie eine besonders hohe phagozytotische Aktivität besitzen und unseren Körper ununterbrochen nach Fremdmaterial abtasten. Kommt es durch einen Krankheitserreger zu einer Infektion und dadurch auch zum Kontakt der DC mit dem

Erreger, durchläuft die DC einen Reifeprozess (engl. *maturation*), wodurch sie letzlich aktiviert wird (Murphy 2017). Auch Entzündungsmediatoren selbst oder Gewebsschäden können zu einer Aktivierung der DC führen. Um T-Zellen die prozessierten Erregerantigene präsentieren zu können, wandern DC durch Hochregulation des Chemokinrezeptors CCR7 in den drainierenden Lymphknoten (Randolph et al. 2005). Gleichzeitig kommt es zu einer deutlich gesteigerten Expression von Aktivierungsmarkern wie MHC-I- und II-Molekülen sowie den kostimulatorischen Molekülen CD80 und CD86 (Mellman and Steinman 2001; Sporri and Reis e Sousa 2005). Der dadurch erlangte Aktivitätszustand der DC bedeutet jedoch nicht zwingend auch die Einleitung einer spezifischen Immunantwort. Läuft etwa der DC-Maturierungsprozess unvollständig ab, kann es zur Generierung sogenannter tolerogener DC kommen, was dann Toleranz gegenüber dem prozessierten Antigen auslöst (Domogalla et al. 2017).

1.3 Regulatorische T-Zellen

Regulatorische T-Zellen (Treg) sind eine Subpopulation von CD4+ T-Zellen, die essenziell sind für die Aufrechterhaltung einer immunologischen Selbsttoleranz und zur Verhinderung überschießender Immunantworten (Hori, Nomura, and Sakaguchi 2003). 2003 gelang es den bislang wichtigsten Treg Marker zu identifizieren: den Transkriptionsfaktor *Forkhead-box-protein P3* (FoxP3) (Hori, Nomura, and Sakaguchi 2003). Dass FoxP3 tatsächlich auch entscheidend ist für die Funktion der Treg, zeigt sich in Mäusen, die eine bestimmte Mutation im FoxP3 Gen aufweisen. Diese Mutation hat zur Folge, dass die betroffenen Mäuse unter einer schweren systemischen Autoimmunität leiden, die innerhalb weniger Wochen *post partum* zum Tod der Mäuse führt (Godfrey et al. 1991). Auch beim Menschen präsentiert sich eine Mutation im FoxP3 Gen als ein ähnlich dramatisches Syndrom, dem Immundysregulation-Polyendokrinopathie-Enteropathie-X-chromosomal vererbtes (IPEX) Syndrom (Verbsky and Chatila 2013). Diese Krankheitsbilder untermauern die Wichtigkeit der Treg in der Aufrechterhaltung der Immunkontrolle, was bei deren Fehlen oder Dysfunktionalität eine fulminante Immundysregulation zur Folge haben kann.

1.3.1 Mechanismen der Immunsuppression durch regulatorische T-Zellen

Die Mechanismen, mit denen Treg dazu beitragen, die Immuntoleranz aufrecht zu erhalten, sind vielfältig und beinhalten sowohl kontaktabhängige als auch kontaktunabhängige Mechanismen. Ein zentraler Aspekt der Treg-vermittelten Immunsuppression ist jedoch die DC-Treg Interaktion (Sakaguchi et al. 2009). So konkurrieren Treg fortwährend mit

konventionellen T-Zellen um die Kontaktaufnahme mit DC. Eine verstärkte Aggregation von Treg um die DC reduziert die Kontaktmöglichkeiten anderer T-Zell-Populationen und nimmt damit auch Einfluss auf den DC-vermittelten Priming-Prozess (Onishi et al. 2008). Treg weisen zudem eine ausgesprochen hohe Expression an *Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4* (CTLA-4). CTLA-4 bindet mit besonders hoher Affinität an die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86, die vor allem von reifen DC exprimiert werden, wodurch letztlich das Priming konventioneller T-Zellen inhibiert wird (Wing et al. 2008). Darüber hinaus fördert die CTLA-4-CD80/86 Interaktion die Bildung des Enzyms Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) in DC. Dieses wiederum generiert ein wachstumshemmendes Milieu für konventionelle T-Zellen (Onodera et al. 2009). Treg nehmen zudem durch ihr konstitutiv exprimiertes Oberflächenmolekül CD25 Einfluss auf konventionelle T-Zellen. Durch die besonders hohe Expression dieser hochaffinen Untereinheit des IL-2-Rezeptors können sie den lokalen IL-2-Pool deutlich dezimieren (de la Rosa et al. 2004). IL-2 ist jedoch ein essenzielles Überlebenssignal für aktivierte, konventionelle T-Zellen. Über diesen Mechanismus können Treg also die klonale Proliferation aktivierter T-Zellen stark einschränken (de la Rosa et al. 2004). Treg können aber auch selbst Zytokine sezernieren, die nachfolgend immunsuppressiv wirken. So werden DC, CD4+ und CD8+ T-Zellen durch IL-10 (Hara et al. 2001), IL-35 (Collison et al. 2007) und den *Transforming growth factor* beta (TGF-β) (Letterio and Roberts 1998) aus Treg gehemmt. Auf CD8+ T-Zellen können Treg auch direkt zytotoxisch wirken, indem sie durch Ausschüttung von Granzymen eine Zytolyse in diesen Zellen auslösen (Cao et al. 2007). Treg leisten mit den genannten Mechanismen somit nicht nur einen wichtigen Beitrag zur Aufrechterhaltung der Immunhomöostase, sondern können auch dem Auftreten von Autoimmunität entgegenwirken. Im Falle eines Tumors jedoch können sich gerade diese, die Treg charakterisierenden Eigenschaften, kontraproduktiv auswirken, indem sie die Ausbildung einer effektiven antitumoralen Immunantwort deutlich erschweren oder sogar gänzlich verhindern können (Sakaguchi et al. 2020).

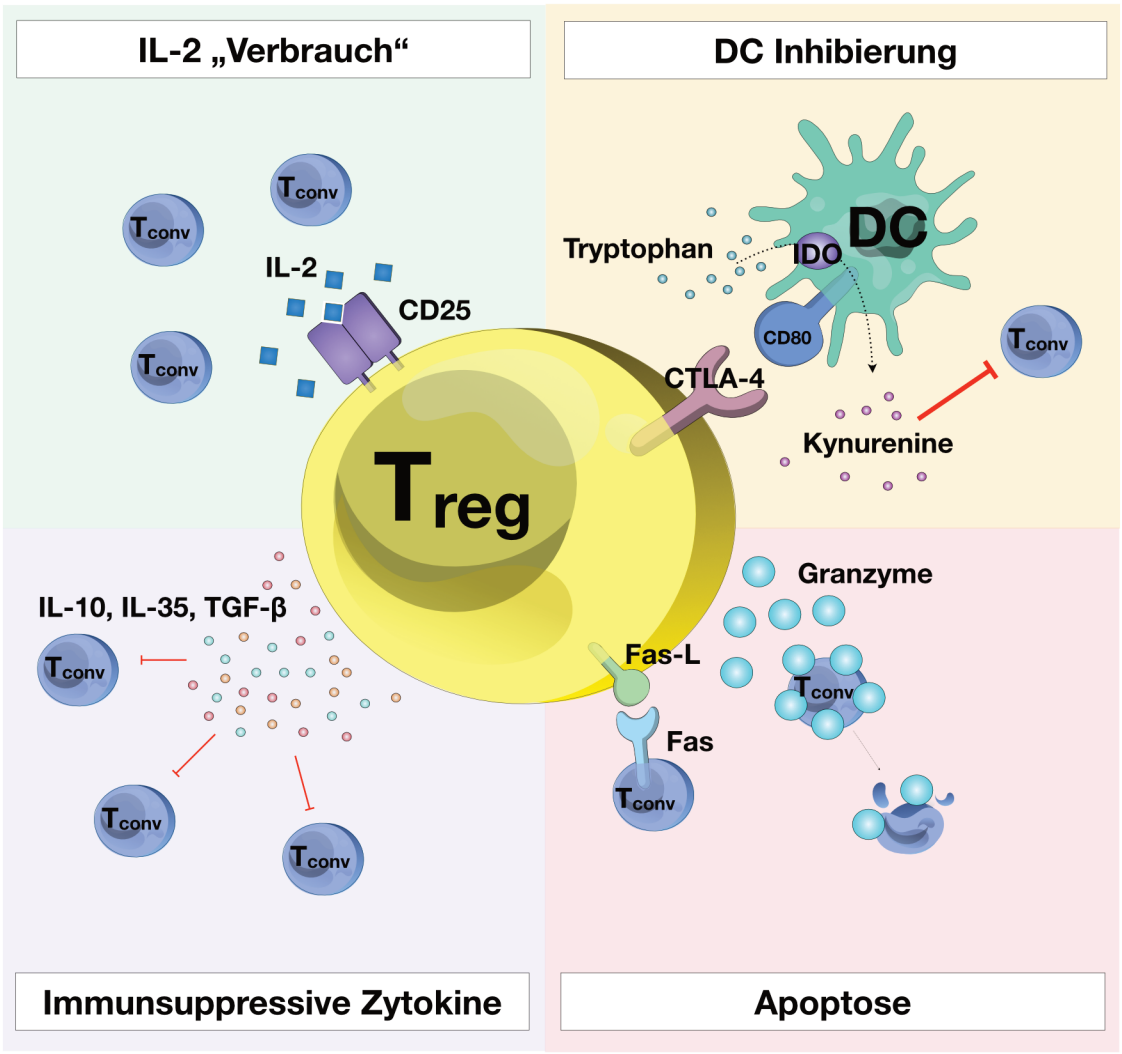

Abbildung 1.3.1: Immunsuppressive Mechanismen regulatorischer T-Zellen (1) Erhöhter „Verbrauch“ von IL-2 durch aufgrund hoher Expression von CD25 auf regulatorischen T-Zellen (Treg). (2) Hemmung dendritischer Zellen (DC) durch Interaktion von CTLA-4 auf Treg mit CD80/86 auf DC sowie Induktion von Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) mit Metabolisierung von Tryptophan zu Kynurenin und konsekutiver Hemmung konventioneller T-Zellen. (3) Induktion von Apoptose in konventionellen T-Zellen durch Interaktion von Fas mit dem Fas-Liganden auf Treg sowie Induktion von Zytolyse konventioneller T-Zellen durch Treg-vermittelte Ausschüttung von Granzymen. (4) Expression der immunsuppressiven Zytokine IL-10, IL-35 und TGF-β durch Treg.

1.3.2 Regulatorische T-Zellen im Tumor

In zahlreichen Tumorentitäten kann eine ausgeprägte Akkumulation von Treg beobachtet werden, die sich nicht nur auf das Tumorgewebe beschränkt, sondern auch im Blut, in Lymphknoten und in malignem Aszites vorzufinden ist (Curiel et al. 2004; Gobert et al. 2009; Marshall et al. 2004; Wolf et al. 2003). Die mechanistischen Grundlagen dieser Treg-Akkumulation sind komplex, lassen sich aber grundsätzlich auf drei Säulen reduzieren. Zum einen kann es, bedingt durch das lokale Tumormikromilieu selbst, zu einer lokalen

Expansion von Treg kommen. Besonders das von Tumorzellen oft in großen Mengen produzierte TGF-β und IL-10 wirkt förderlich auf die Treg-Expansion, zu Ungunsten konventioneller T-Zellen (Green et al. 2017; Halvorsen et al. 2019; Plitas et al. 2016). Eine weitere Erklärung für die ausgeprägte Treg-Anreicherung liegt darin begründet, dass es im Tumorgewebe verstärkt zu einer Differenzierung von CD4+ konventionellen T-Zellen hin zu Treg kommen kann (Sakaguchi et al. 2020). Aber auch die aktive Rekrutierung von Treg in den Tumor durch Chemokine leistet einen bedeutenden Beitrag zur Tumor-assoziierten Immunsuppression durch Treg. Insbesondere die Chemokine CCL22 (Curiel et al. 2004; Gobert et al. 2009; Li et al. 2013; Mizukami et al. 2008), CCL28 (Facciabene et al. 2011) und CCL1 (Plitas et al. 2016) sind bereits mehrfach als Treiber der Treg-Migration in den Tumor beschrieben worden, wobei CCL22 quantitativ wahrscheinlich den größten Anteil daran ausmacht.

1.4 Das Chemokin CCL22

Das Chemokin CCL22 wurde im Menschen zum ersten Mal 1997 von Godiska et al. beschrieben (Godiska et al. 1997). Bereits ein Jahr später konnte auch das murine Äquivalent identifiziert werden (Schaniel et al. 1998). Im Rahmen der Erstbeschreibung wurde CCL22 aus humanen Makrophagen isoliert und ist daher noch heute unter dem Namen *Macrophage-derived chemokine* (MDC) bekannt. In den letzten Jahren konnte jedoch eine Vielzahl weiterer Zelltypen identifiziert werden, die zur CCL22-Sekretion befähigt sind. Immunzellen monozytären Ursprungs, allen voran DC, haben sich dabei als die eigentlichen Hauptproduzenten von CCL22 herauskristallisiert (Rapp et al. 2019; Tang and Cyster 1999; Vulcano et al. 2001). Die Stärke der CCL22-Sekretion durch DC ist dabei von verschiedenen Faktoren abhängig, unter anderem vom Aktivierungszustand der DC. Während unreife DC *in vitro* nur geringe Mengen an CCL22 exprimieren, kann die CCL22-Expression nach Reifung der DC um ein Vielfaches gesteigert werden (Forster et al. 1999; Lieberam and Forster 1999; Sallusto et al. 1999). Die höchsten homöostatischen CCL22-Organlevel finden sich dabei in Thymus, Lymphknoten, Milz und Lunge (Chang et al. 1997; Godiska et al. 1997; Rapp et al. 2019; Schaniel et al. 1998; Tang and Cyster 1999).

CCL22 ist jedoch nicht als rein konstitutiv exprimiertes Chemokin zu verstehen, da es auch durch verschiedene inflammatorische Stimuli induziert werden kann (Olson and Ley 2002). Die proinflammatorischen Zytokine IL-1 und *Tumor necrosis factor-α* (TNF-α), aber auch die T_{H2}-typischen Zytokine IL-4 und IL-13, sowie bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) und

eine *T cell receptor* (TCR)-Stimulation sind in der Lage CCL22 potent zu induzieren (Bonecchi et al. 1998; Rodenburg et al. 1998; Vulcano et al. 2001). In diesem Zusammenhang konnte auch für aktivierte T- und B-Zellen eine gewisse CCL22-Expression nachgewiesen werden, wobei diese in der Regel nur vorübergehend und auf niedrigem Niveau zu beobachten ist (Iellem et al. 2001; Schaniel et al. 1998).

Der bislang einzig bekannte Rezeptor für CCL22 ist CCR4, welcher auch das Chemokin CCL17 bindet (Imai et al. 1998; Imai et al. 1999), wodurch beide Chemokine die gerichtete Wanderung CCR4-exprimierender Zellen steuern. In ersten Untersuchungen hierzu wurde die migrationsinduzierende Wirkung von CCL22 für T_{H2}-Zellen beschrieben (Imai et al. 1999). T_{H2}-Zellen müssen hierfür jedoch aktiviert sein, damit sie in ausreichender Menge CCR4 auf ihrer Oberfläche exprimieren, um auf CCL22 sowie dessen Schwesterchemokin CCL17 mit Migration antworten zu können (D'Ambrosio et al. 1998; Tang and Cyster 1999). Tatsächlich ist auch seit Längerem bekannt, dass CCL22 eine wichtige Rolle bei T_{H2}-vermittelten allergischen Erkrankungen wie der allergischen Rhinitis (Campbell et al. 2002), dem Asthma bronchiale (Pilette et al. 2004) und der atopischen Dermatitis (Vestergaard et al. 1999) spielt. Unter homöostatischen Bedingungen jedoch weisen Treg mit Abstand die höchste CCR4-Expression auf (Iellem et al. 2001). Die CCL22-CCR4-Treg-Achse fördert dabei vor allem die Ausbildung von Kontakten zwischen DC und Treg in sekundär lymphatischen Organen. Dies scheint ein wichtiger Mechanismus zu sein, um adaptive T-Zell-Antworten zu kontrollieren und in Schach zu halten (Rapp et al. 2019; Vitali et al. 2012). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass bei CCL22-Defizienz DC-Treg Kontakte stark reduziert waren, was zum einen eine erhöhte Anfälligkeit für Autoimmunität zur Folge hatte, zum anderen aber auch zu verstärkter antitumoraler Immunität beitrug (Rapp et al. 2019; Vitali et al. 2012).

1.4.1 CCL22 im Tumor

Eine hohe intratumorale CCL22-Expression konnte in zahlreichen Tumoren bereits hinreichend nachgewiesen werden, was oft mit einer schlechten Prognose assoziiert war (Gobert et al. 2009; Li et al. 2013; Mizukami et al. 2008; Wu et al. 2018; Yang et al. 2012). Curiel et al. waren dabei die ersten, die in einem murinen Ovarialkarzinommodell nachweisen konnten, dass dabei vor allem CCR4-exprimierende Treg CCL22-abhängig in den Tumor rekrutiert werden (Curiel et al. 2004). Lange Zeit war der zelluläre Ursprung von Tumor-assoziiertem CCL22 allerdings unklar. Neben Makrophagen wurden für einige Zeit auch Tumorzellen selbst als CCL22-Produzenten diskutiert (Faget et al. 2011). Letztlich

aber sind es vor allem Immunzellen wie DC und Makrophagen, die für den größten Anteil des intratumoralen CCL22 verantwortlich zu sein scheinen (Anz et al. 2015; Wiedemann et al. 2016). Besonders inflammatorische Mediatoren wie IL-1α aus Tumorzellen und Prostagladin E2 (PGE2) aus tumorassoziierten Stromazellen scheinen dabei die Induktion von CCL22 in intratumoralen DC zu vermitteln (Muthuswamy et al. 2008; Wiedemann et al. 2016). Im Rahmen von Tumorerkrankungen sind erhöhte CCL22-Level jedoch oft nicht ausschließlich auf den Tumor beschränkt, sondern finden sich auch beispielsweise in Lymphknoten und Serum (Jafarzadeh et al. 2015; Tsujikawa et al. 2013). CCL22 scheint dabei auch das T-Zell-Priming im Lymphknoten negativ zu beeinflussen (Rapp et al. 2019). Während in der Homöostase eine CCL22-vermittelte Interaktion zwischen DC und Treg Immunantworten kontrolliert, könnte sich gerade diese Interaktion auch als Checkpoint bei Tumoren im Sinne eines *Immune-escape*-Mechanismus herausstellen. Die Abwesenheit von CCL22 hat in einem murinen Pankreaskarzinommodell zu einer deutlich verstärkten antitumoralen Immunität geführt, was nicht auf eine verminderte Treg Akkumulation im Tumor zurückzuführen war und am ehesten durch ein modifiziertes T-Zell-Priming zu erklären ist (Rapp et al. 2019)von CCL22 hat in einem murinen Pankreaskarzinommodell zu einer deutlich verstärkten antitumoralen Immunität geführt, was nicht auf eine verminderte Treg Akkumulation im Tumor zurückzuführen war und am ehesten durch ein modifiziertes T-Zell-Priming zu erklären ist (Rapp et al. 2019)

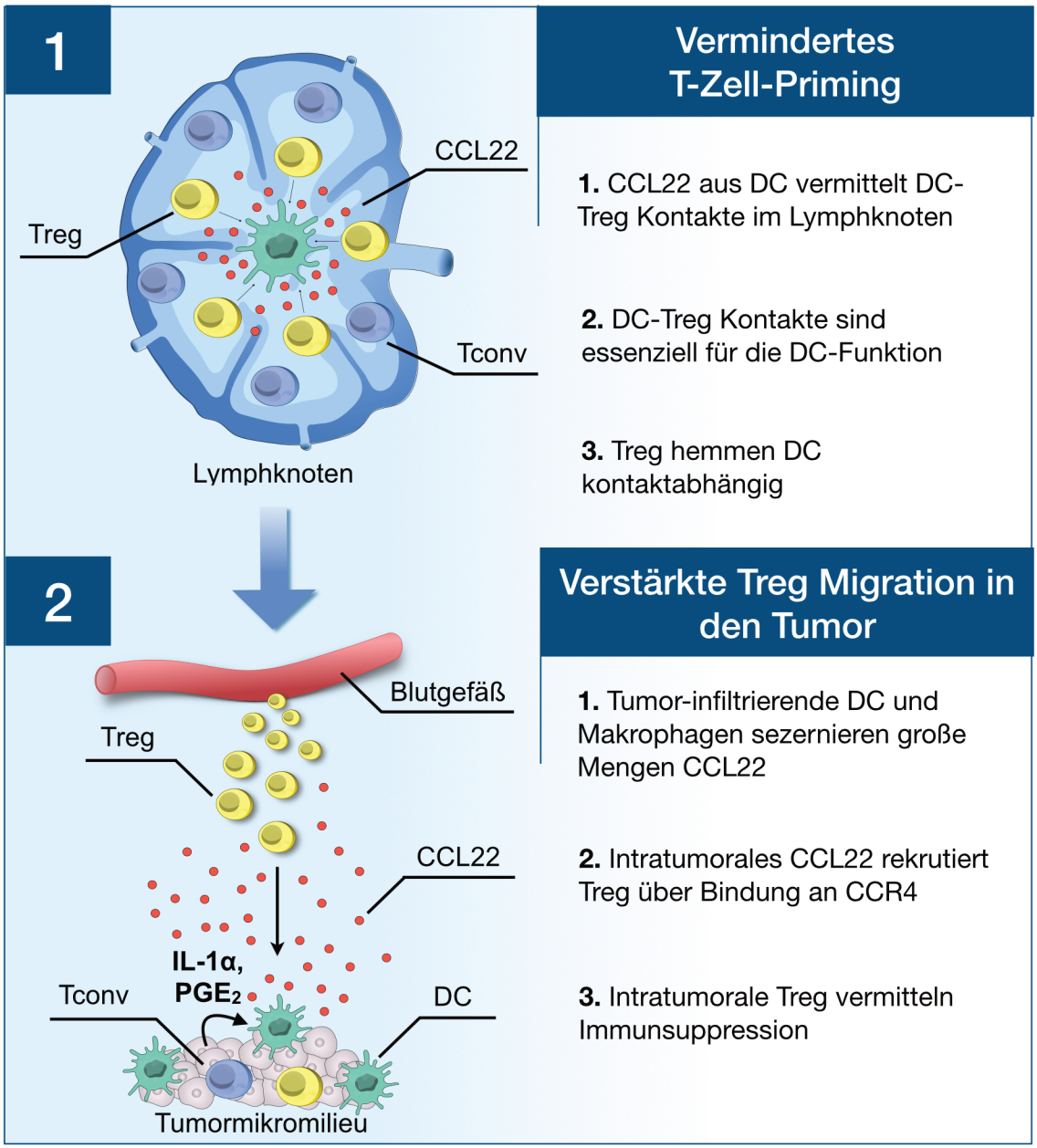

Abbildung 1.4.1 Mechanismen der CCL22-vermittelten Immunsuppression im Tumor (1) Eingeschränktes T-Zell-Priming durch verstärkte Kontakte zwischen regulatorischen T-Zellen (Treg) und dendritischen Zellen (DC). (2) Verstärkte Migration von Treg in den Tumor mit lokaler Induktion von Immunsuppression durch Tumor-vermittelte Ausschüttung von CCL22. Modifiziert nach (Rohrle, Knott, and Anz 2020).

1.5 Das Zytokin GM-CSF

Zytokine stellen eine heterogene Gruppe kleiner Signalmoleküle dar, die der interzellulären Kommunikation dienen, wobei sie sowohl autokrin als auch parakrin wirken können. Zytokine kann man anhand ihrer Hauptfunktion in fünf Gruppen einteilen: Interferone, Interleukine, Chemokine, TNF und *Colony-stimulating factors* (CSF) (Murphy 2017). Bei den

CSF im Speziellen handelt es sich um Wachstumsfaktoren für hämatopoetische Zellen. Neben Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) und Macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) ist auch *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) ein wichtiger Vertreter dieser Gruppe (Metcalf 1989).

1.5.1 GM-CSF Biologie

GM-CSF ist ein kleines Glykoprotein, das der Gruppe der hämatopoetischen Zytokine und der Gruppe der CSF zuzuordnenn ist (Metcalf 1989). Seine Namensgebung hat es seiner Fähigkeit zu verdanken, *in vitro* die Ausreifung von Makrophagen und Granulozyten zu fördern (Gough et al. 1984). GM-CSF wird von einer Vielzahl an Zellen produziert, darunter aktivierte T-Zellen, Natürliche Killer Zellen, T_{H17}-Zellen, Fibroblasten und Epithelzellen (Anzai et al. 2017; Bar et al. 2014; Hirota et al. 2018; Sheih, Parks, and Ziegler 2017). Seine Wirkung entfaltet es dabei durch Bindung an den GM-CSF Rezeptor. Es handelt sich dabei um einen heterodimeren Rezeptor, bestehend aus einer β-und einer α-Untereinheit. GM-CSF wird in diesem Zusammenhang auch zur Gruppe der βc-Zytokine gezählt, wozu auch IL-3 und IL-5 gehören. Während die β-Rezeptoruntereinheit für diese drei Zytokine identisch ist, ist die α-Untereinheit verantwortlich für die zytokinspezifische Wirkung (Broughton et al. 2012). Die GM-CSF-Effekte sind vielfältig und gehen über die rein wachstumsstimulierende Wirkung auf Makrophagen und Granulozyten weit hinaus. GM-CSF scheint in der Homöostase auch nur bedingt zur *steady-state* Produktion myeloischer Zellen beizutragen, sodass auch bei völliger Abwesenheit von GM-CSF kein relevanter Abfall dieser Zellpopulationen zu beobachten ist (Nishinakamura et al. 1996). Während GM-CSF also in der Homöostase für die Myelopoese entbehrlich zu sein scheint, ist es umso wichtiger für eine schnelle Expansion myeloischer Zellen während einer Immunstimulation und bei Entzündungsprozessen (Anzai et al. 2017; Becher, Tugues, and Greter 2016). Aufgrund der immunstimulierenden Wirkungen von GM-CSF erscheint es zunächst verwunderlich, dass GM-CSF Makrophagen auch zur Sekretion von Amphiregulin anregt, ein wichtiger Faktor im Rahmen von Gewebsreparatur, der das Entzündungsgeschehen eher hemmt (Fujiu et al. 2017). Schon an dieser Stelle lässt sich die Pleiotropie der GM-CSF-Effekte erahnen, die sowohl proinflammatorische als auch tolerogene und reparative Komponenten beinhaltet. Auch im Tumor ist die Rolle von GM-CSF sehr ambivalent. Während in einigen Tumorentitäten die antitumoralen Eigenschaften von GM-CSF im Vordergrund stehen, so sind es in anderen Tumorentitäten wiederum mehr die tumorprogressiven Effekte (Ninck et al. 2003; Pandiyan et al. 2007; Revoltella, Menicagli, and Campani 2012).

1.6 Tumorimmunolgie

1.6.1 Immune surveillance

Der Ursprung einer Krebserkrankung liegt letztendlich in der Akkumulation genetischer Veränderungen in einer Zelle, welche dadurch die Fähigkeit zu unbegrenztem und unkontrolliertem Wachstum erlangt. Durch diese genetischen Veränderungen unterscheiden sich transformierte Zellen aber auch häufig von gesunden Zellen, beispielsweise durch die Expression sogenannter *Tumor-associated antigens* (TAA) (Klein 1966). Aufgrund der Wächterfunktion des Immunsystems besteht dadurch grundsätzlich auch die Möglichkeit zur Tumorerkennung mit nachfolgender Elimination desselben (Boon and Old 1997; Old and Boyse 1964). Die zugrundeliegenden Mechanismen sind zwar noch unvollständig verstanden, involvieren jedoch in einem ersten Schritt meist die Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch die Anwesenheit tumorassoziierter Gefahrensignale (Smyth, Godfrey, and Trapani 2001; Street et al. 2002). Dadurch wird die Etablierung eines entzündlichen Tumormilieus gefördert, welches wiederum Phagozytose und Aktivierung von DC unterstützt, die dann durch Präsentation von Tumorantigenen vor allem CD8+ T-Zellen aktivieren. Die dadurch induzierte klonale Expansion der tumorspezifischen Effektorzellen leitet so eine spezifische antitumorale Immunantwort ein, mit dem Ziel der vollständigen Eliminierung des Tumors (Dunn et al. 2002), oft noch bevor ein Tumor überhaupt klinisch apparent wird.

Wenn es Tumorzellen jedoch schaffen, diesem Prozess zu entkommen, kommt es zu einem sogenannten Equilibrium, in dem sich Tumorproliferation und immunvermittelte Tumorzelllyse die Waage halten. Diese Phase kann mehrere Jahre in Anspruch nehmen und ist gekennzeichnet durch einen andauernden Selektionsdruck auf die Tumorzellen, welcher die Ausbildung besonders resistenter Tumorzellklone fördert, ein Prozess, der auch als *Immune selection* bezeichnet wird (Dunn et al. 2002). Dies führt nicht selten zur Etablierung eines besonders immunsuppressiven Tumormikromilieus mit oft stark herabgesetzter Tumorimmunogenität (Zitvogel, Tesniere, and Kroemer 2006) und leitet schließlich die dritte Phase ein, den sogenannte *Escape*, in der die Tumorzellen der Immunkontrolle entkommen (Zou 2005). Die beschriebenen Prozesse, sowohl die Veränderungen des Tumors durch das Immunsystem als auch die Anpassungsvorgänge des Tumors selbst darauf, werden unter dem Begriff *Immune surveillance* zusammengefasst (Dunn et al. 2002; Schreiber, Old, and Smyth 2011; Zou 2005).

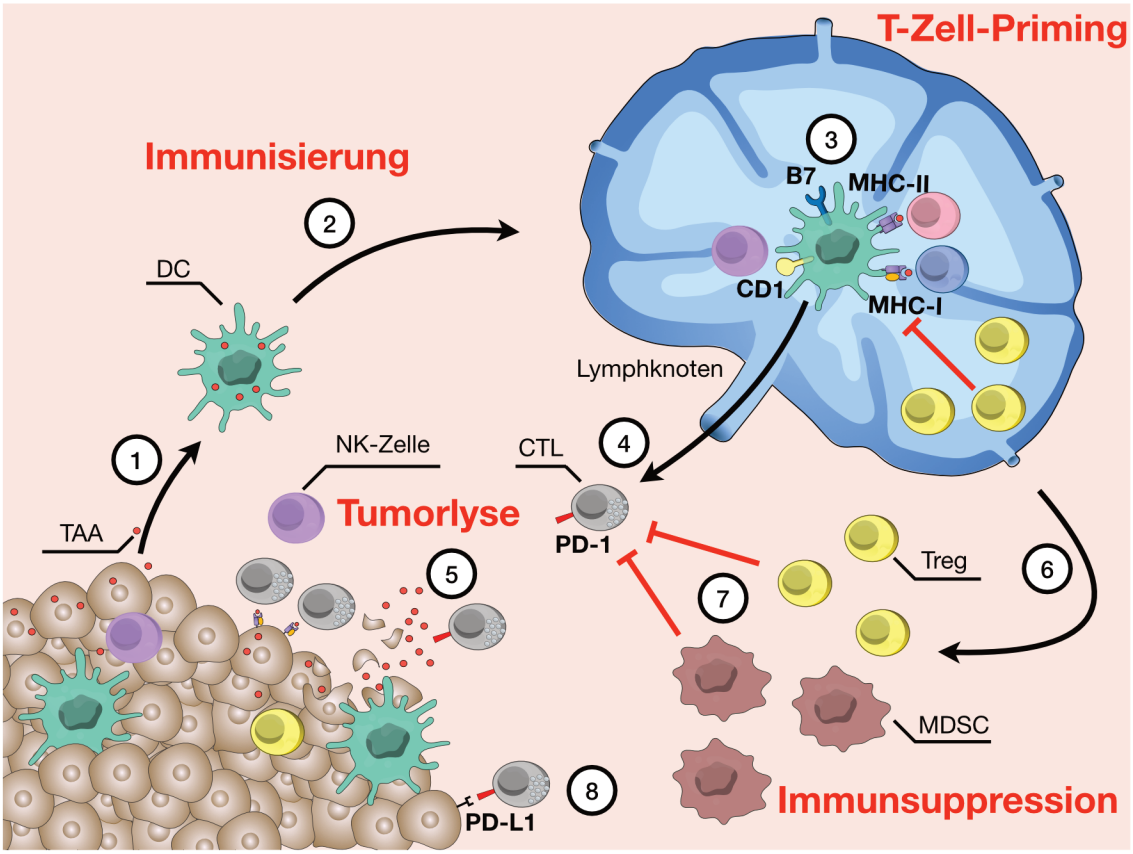

Abbildung 1.6: Ablauf einer antitumoralen Immunantwort (1) Aufnahme von *Tumor-associated antigens* (TAA) durch dendritische Zellen (DC) (2) Wanderung der DC in den tumor-drainierenden Lymphknoten (3) Präsentation der TAA durch die DC an CD4+ und CD8+ T-Zellen (4) Aktivierung zytotoxischer CD8+ T-Zellen (CTL) (5) Tumorlyse durch CTL (6) Hemmung der T-Zellaktivierung im Lymphknoten durch regulatorische T-Zellen (Treg) (7) Hemmung der CTL durch Treg und *Myeloid-derived suppressor cells* (MDSC) (8) Verhinderung der Tumorlyse durch Interaktion von Programmed death ligand 1 (PD-L1) auf Tumorzellen und Programmed death 1 (PD-1) auf T-Zellen.

1.6.2 Tumorimmuntherapien

Die Idee, das Immunsystem für die Krebstherapie nutzbar zu machen, wurde maßgeblich durch den New Yorker Chirurgen William Coley geprägt. Er behandelte Anfang des vergangenen Jahrhunderts ausgewählte Krebspatienten mit einem bakteriellen Extrakt hitzeinaktivierter *Streptococcus pyogenes* und *Serratia marcescens* Spezies. Dieser Extrakt wies eine unspezifische immunstimulierende Wirkung auf und konnte zumindestens teilweise zu einem Rückgang der Tumoren beitragen. Jedoch rückte diese neuartige Therapiestrategie für einige Jahrzehnte in den Hintergrund, was vor allem auf die fehlende Reproduzierbarkeit der initial erzielten Ergebnisse zurückzuführen war, aber auch auf die Entdeckung anderer vielversprechenderer Therapiemodalitäten wie der Radio- und der Chemotherapie (Oiseth and Aziz 2017). So musste fast ein weiteres Jahrhundert vergehen, bis Tumorimmuntherapien erstmals Einzug in den klinischen Alltag erlangten, wobei sie sich

mittlerweile als feste Säule der Krebstherapie etabliert haben (Oiseth and Aziz 2017). Die aktuell zugelassenen Therapiestrategien im Rahmen der Tumorimmuntherapie sind im Wesentlichen drei Ansätzen zuzuordnen: der Checkpoint-Blockade, dem adoptiven T-Zelltransfer, inklusive der *Chimeric antigen receptor* (CAR) T-Zell Therapie und der Tumorvakzine.

Die Checkpoint-Blockade fußt vor allem auf der Blockade von CTLA-4 auf der einen und der *Programmed death 1*(PD-1)-*Programmed death ligand 1* (PD-L1)-Achse auf der anderen Seite. So erhielt Ipilumumab, ein monoklonaler IgGκ anti-CTLA-4 Antikörper 2011 von der *Food and Drug Administration* (FDA) die Zulassung für das nicht-resektable Melanom im Stadium III/IV mit beeindruckenden Langzeitergebnissen (Hodi et al. 2010; Schadendorf et al. 2015). Auch die monoklonalen anti-PD1-Antikörper Pembrolizumab und Nivolumab erhielten nur wenig später hierfür die Zulassung (Gong et al. 2018; Robert et al. 2015; Weber et al. 2015). Das Indikationsspektrum dieser Therapien hat sich seitdem stark erweitert und umfasst für Pembrolizumab beispielsweise nun auch das PD-L1-exprimierende *Small cell lung cancer* (SCLC) (Herbst et al. 2016; Reck 2018), das Hodgkin-Lymphom (Moskowitz 2016), einige Kopf-Hals Tumore (Moskowitz 2016), das Urothelkarzinom (Sharma et al. 2017), Tumore des gastro-ösophagealen Übergangs (Fuchs et al. 2018), aber auch Tumoren mit Mikrosatelliten-Instabilität (MSI) unabhängig von der Tumorentität (Boyiadzis et al. 2018). Pembrolizumab ist damit das erste Tumortherapeutikum überhaupt, das eine Zulassung allein auf Basis eines molekularen Biomarkers, hier der MSI, erhielt. Aber auch seltene und schwierig zu behandelnde Tumore wie das Merkelzellkarzinom oder das fortgeschrittene Nierenzellkarzinom können heute sehr erfolgreich mit dem monoklonalen anti-PD-L1 Antikörper Avelumab behandelt werden (Kaufman et al. 2016; Motzer et al. 2019).

Eine weitere Strategie ist der adoptive T-Zell Transfer. Erste Entwicklungen in den 1980er Jahren diesbezüglich konzentrierten sich dabei zunächst auf die Expansion tumor-infiltrierender T-Zellen (TIL) *ex vivo* mit anschließendem Transfer (Rosenberg et al. 1988). Ein wesentlicher Nachteil dieser Strategie liegt allerdings darin, dass TIL tumor-assoziierte Antigene nur erkennen, wenn diese von den Tumorzellen auch über MHC-Moleküle präsentiert werden (Perica et al. 2015). Tumoren zeigen aber oft nur eine spärliche MHC-Expression, wodurch die Effektivität dieser Form des adoptiven T-Zelltransfers begrenzt ist (Perica et al. 2015). Um dieses Problem zu umgehen, wurden sogenannte CAR-T-Zellen entwickelt. Hierbei handelt es sich um autologe oder allogene T-Zellen, die *ex vivo* genetisch so modifiziert werden, dass eine variable antigen-bindende

Domäne mit einer signal-transduzierenden Domäne des T-Zell-Rezeptors verbunden wird, wobei intrazellulär zusätzlich verschiedene kostimulierende Domänen assembliert werden können (Finney, Akbar, and Lawson 2004; Imai et al. 2004; Kuhn et al. 2019; Maher et al. 2002). Derzeit existieren verschiedene CAR-T-Zell-Therapien in klinischer Anwendung, beispielsweise Tisagenleucel und Axicabtagene Ciloleucel, die beide derzeit zugelassen sind für die akute B-Zell-Leukämie (B-ALL) und das großzellige B-Zell-Lymphom (DGBL) (Brentjens et al. 2013; Hernandez, Prasad, and Gellad 2018; Neelapu et al. 2017; Park et al. 2018).

Tumorvakzinen existieren als prophylaktische und als therapeutische Vakzinen. Prophylaktische Tumorvakzinen zielen beispielsweise darauf ab, eine Infektion mit onkogenen Viren zu verhindern, wodurch die Inzidenz sowohl der HPV (Humanes Papillomavirus)-assoziierten Zervixkarzinome, als auch der Hepatitis B-assoziierten HCC (Hepatozelluläres Karzinom) signifikant reduziert werden konnte (Guo et al. 2013). Therapeutische Vakzinen wiederum sollen das Immunsystem sozusagen bewaffnen, wenn bereits maligne Tumorzellen vorhanden sind (Guo C. et al. 2013). Die aktuell einzige klinische Anwendung einer therapeutischen Vakzine ist *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG), ein attenuiertes *Mykobakterium bovis*, das zur Instillation bei frühen Stadien des Blasenkarzinom zugelassen ist (Morales, Eidinger, and Bruce 1976). Nichtsdestotrotz werden zahlreiche Tumorvakzinen derzeit vor allem im Rahmen von Phase I und II Studien untersucht (Guo et al. 2013).

Gerade die Kombination verschiedener Strategien scheint besonders vielversprechend zu sein. So kann die Kombination eines CTLA-4-Inhibitors mit einem PD-1-Inhibitor zu einem signifikanten Überlebensvorteil in einigen Tumorentitäten führen und hat hierfür auch die Zulassung erhalten (Motzer et al. 2018; Wolchok et al. 2017). Aber auch die Kombination aus Radiotherapie und Checkpoint-Blockade scheint aussichtsreich zu sein (Twyman-Saint V. et al. 2015). Auch Tumorvakzinen können als Kombinationspartner hierbei einen relevanten Beitrag leisten. So konnte gezeigt werden, dass die Kombination aus GM-CSF und dem anti-CTLA-4 Antikörper Ipilimumab im Vergleich zur alleinigen Gabe von Ipilimumab das Gesamtüberleben von Patienten mit fortgeschrittenem Melanom signifikant verlängern konnte (Hodi et al. 2014). Gerade Kombinationstherapien sind es, die derzeit in vielen klinischen Studien intensiv untersucht werden (Drake 2012; Joshi and Durden 2019).

1.7 Fragestellung

Tumore bedienen sich einer Vielzahl an Mechanismen, um der Tumorkontrolle durch das Immunsystem zu entkommen. Dabei modifiziert der Tumor häufig grundlegende immunologische Checkpoints und missbraucht sie für seine eigenen Zwecke. Die Identifizierung und Charakterisierung solcher immunologischen Stellschrauben ist elementar, um einerseits ein besseres Verständnis der Tumorbiologie selbst zu erlangen und um andererseits diese Erkenntnisse möglicherweise therapeutisch nutzbar machen zu können. Die CCL22-CCR4-Achse stellt einen wichtigen solchen immunologischen Checkpoint dar. Das von DC konstitutiv exprimierte CCL22 vermittelt eine intensive Kontaktbildung zwischen DC und Treg was im Lymphknoten T-Zell Immunität kontrolliert. Dies kann auf der einen Seite zwar das Auftreten von Autoimmunität reduzieren, auf der anderen Seite jedoch auch zu abgeschwächter Tumorkontrolle durch das Immunsystem führen (Rapp et al. 2019). CCL22 wird dabei von einer Vielzahl an Tumoren exprimiert, wobei eine erhöhte CCL22-Expression oft einen negativen prognostischen Faktor darstellt (Li et al. 2013; Wu et al. 2018). Die Mechanismen, die zur Hochregulation von CCL22 im Tumor führen sind zum Teil bereits verstanden (Muthuswamy et al. 2008; Wiedemann et al. 2016). Wie es jedoch in der Homöostase zur konstitutiven CCL22-Sekretion durch DC kommt, ist bisher noch größtenteils ungeklärt. Im ersten Teil dieser Arbeit sollte daher dem hier zugrundeliegenden Mechanismus auf den Grund gegangen werden. Es sollte dabei untersucht werden, ob DC allein zur CCL22-Sekretion fähig sind, oder ob sie auf die Hilfe anderer Zellpopulationen angewiesen sind und welche Faktoren in diesem Zusammenhang entscheidend sind. Im zweiten Abschnitt sollte untersucht werden, ob und inwiefern diese Erkenntnisse auch in Tumoren eine Rolle spielen und inwiefern die identifizierten Mechanismen überdies therapeutisch relevant sein könnten.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Axiovert-40C-Lichtmikroskop	Zeiss, Jena, D
Brutbegasungsschrank	Heraeus, ThermoFisherScientific, Waltham, USA
FACS Canto II	BD Biosciences, New Jersey, USA
FACS Fortessa	BD Biosciences, New Jersey, USA
Lamin Air	Heraeus, Hanau, D
Light Cycler LC480	Roche, Mannheim, D
NanoDrop 2000c	Thermo Fisher, Massachusetts, USA
MACS Magnet MiniMACS, QuadroMACS	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, D
Minizentrifuge Sprout	Biozym, Hessisch Oldendorf, D
Mithras LB 940 ELISA Reader	Berthold, Bad Wildbad, D
Mr Frosty Kryogefäße	ThermoFisherScientific, Waltham, USA
Multifuge X3 FR	Heraeus, Hanau, D
Multifuge 4 KR	Heraeus, Hanau, D
Multistepper	Eppendorf, München, D
Neubauer Zählkammer	Optik Labor Frischknecht, Balgach, D
pH-Meter	WTW, Weilheim, D
Rotina 420 R	Hettich, Tuttlingen, D
Flow (Sterilbank) HeraSafe KS	ThermoFisherScientific, Waltham, USA
Thermo Cyler T3	Biometra, Göttingen, D
Thermo Schüttler	Eppendorf, Hamburg, D
Tischzentrifuge Fresco 17	Heraeus, Hanau, D
T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen, D

Vortexer VF2	Janke & Kunkel KG, Staufen, D
Waage KB 240-3N	KERN, Balingen-Frommern, D
Wasserbad GFL 1083	GFL, Burgwedel, D
Zentrifuge Rotina 420R	Hettich GmbH, Tuttlingen, D

2.1.2 Verbrauchsmittel

BD Perfusionsspritze 50 ml	Becton-Dickinson, Franklin Lakes, USA
ELISA Mikrotiterplatten	Corning, Corning, USA
FACS Röhrchen	Becton-Dickinson, Franklin Lakes, USA
Kryoröhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
MACS-Säulen (LD, LS, MS)	Corning, Corning, USA
Perfusionsspritzen-Luer-Lock Tip (50ml)	Becton-Dickinson, Franklin Lakes, USA
Serologische Pipetten (25ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Serologische Pipetten (5ml, 10ml)	Costa Corning, New York, USA
Spritzen (10ml)	Becton-Dickinson, Franklin Lakes, USA
Tubes (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt, Nürmbrecht, D
Zellkulturflaschen	Costa Corning, New York, USA
Zellsiebe Smartstrainer 30µm	Miltenyi, Bergisch Gladbach, D
Zentrifugationsröhrchen (Falcons)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
96-Well-Platten	Costa Corning, New York, USA

2.1.3 Chemikalien und Lösungen

Bovines Serum Albumin (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Biocoll Trennlösung (d=1,077g/ml)	MERCK, Berlin, D
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Ethanol absolut	MERCK, Darmstadt, D

Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Liquid Stickstoff	Linde AG, Pullach, D
Heparin-Natrium 25.000 I.E./5ml	Rathiopharm, Ulm, D
Isopropanol 100%	Carl Roth, Karlsruhe, D
NaCl 0,9%	Baxter, Unterschleißheim, D
Natronlauge 1 N	Carl Roth, Karlsruhe, D
Nuclease- Free Water	Thermo Fisher, Germering, D
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt, D
Percoll Zentrifugationsmedium	Thermo Fisher, Germering, D
Phosphate buffered saline (PBS)	Sigma Aldrich, Steinheim, D
PBS Pulver	MERCK, Darmstadt, D
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Salzsäure 1 N	LMU Apotheke Innenstadt, München, D
Schwefelsäure 2N	Carl Roth, Karlsruhe, D
TriFast	VWR, Ismanning, D
Tris	Carl Roth, Karlsruhe, D
Trypanblau	Lonza, Verviers, BEL
Trypsin (10X)	Lonza, Verviers, BEL
Tween-20	Carl Roth, Karlsruhe, D

2.1.4 Reagenziensätze

<u>MACS</u>	
Blood Dendritic Cell Isolation Kit II für humane Zellen	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, D
CD11c MicroBeads UltraPure für murine Zellen	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, D
Pan T cell isolation kit II, mouse	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, D
CD3ε MicroBeads, mouse	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, D

CD4+ T Cell Isolation Kit, mouse	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, D
CD8α MicroBeads, mouse	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, D
CD45R (B220) MicroBeads, mouse	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, D
CD3 MicroBeads, human	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, D
CD19 MicroBeads, human	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, D
EasySep Human CD4+ T cell isolation kit	Stem Cell Technologies, Vancouver, CA
EasySep Human CD8+ T cell isolation kit	Stem Cell Technologies, Vancouver, CA

Organlysate

Bio-Plex Cell Lysis Kit	Bio-Rad, München, D

ELISA

Mouse CCL22/MDC DuoSet ELISA	R&D Systems, Wiesbaden, D
Human CCL22/MDC DuoSet ELISA	R&D Systems, Wiesbaden, D
Mouse GM-CSF ELISA MAX Standard	BioLegend, London, UK
Human GM-CSF ELISA MAX Standard	BioLegend, London, UK

Reverse Transkription und qPCR

RevertAid RT Reverse Transcription Kit	Thermo Fisher, Germering, D
KAPA PROBE FAST Universal Kit	Sigma Aldrich, Steinheim, D

2.1.5 Materialien für die Zellkultur

β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Fetale Calf Serum (FCS)	Gibco Products, Grand Islands, USA
Humanes Serum	Sigma Aldrich, Steinheim, D

L-Glutamin 200mM	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Non-essential amino acids (MEM-NEAA)	Gibco Products, Grand Islands, USA
Natriumpyruvat	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Penicillin und Streptamycin, jeweils 10000 U/ml	Lonza, Verviers, BEL
PBS	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Trypanblau	Lonza, Verviers, BEL
Trypsin (10X)	Lonza, Verviers, BEL
VLE RPMI 1640	MERCK, Berlin, D

Verwendete gemischte Medien

Humanes T-Zell-Medium:	Kryo-Medium:
VLE RPMI 1640	10% DMSO
10% humanes Serum	90% FCS
2mM L-Glutamin	
100 IU/ml Penicillin	
100 µg/ml Streptamycin	
1% MEM-NEAA	
50µM β-Mercaptoethanol	

RPMI Vollmedium:	DMEM Vollmedium:
RPMI	DMEM
10% FCS	10% FCS
2mM L-Glutamin	2mM L-Glutamin
100 IU/ml Penicillin	100 IU/ml Penicillin
100 µg/ml Streptamycin	100 µg/ml Streptamycin

2.1.6 Zelllinien

Name	Zelltyp	Spezies	Medium
Panc02-OVA	Pankreaskarzinom	Murin, C57BL/6	DMEM Vollmedium
Panc02	Pankreaskarzinom	Murin, C57BL/6	DMEM Vollmedium
B16-OVA	Melanom	Murin, C57BL/6	DMEM Vollmedium

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Zelllinien

Die Panc02 Zelllinie wurde vom ATCC (Manassas, VA, USA) erworben. Panc02-OVA und B16-OVA wurden uns freundlicherweise von Prof. Sebastian Kobold (Abteilung für Klinische Pharmakologie, Ludwig-Maximilians-Universität München) zur Verfügung gestellt.

2.1.7 Zytokine, Wachstumsfaktoren und Stimulanzien

Bezeichnung:	Hersteller:
Humanes G-CSF	Peprotech GmBH, Hamburg, D
Humanes GM-CSF	Peprotech GmBH, Hamburg, D
Humanes M-CSF	Peprotech GmBH, Hamburg, D
Murines G-CSF	Peprotech GmBH, Hamburg, D
Murines GM-CSF	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, D
Murines M-CSF	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, D

2.1.8 FACS Antikörper

Antikörper	Hersteller	Konzentration
Anti-murin CD11c-APC	BioLegend	1 µg/ml

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten FACS Antikörper

2.1.9 In vivo Antikörper

Antikörper	Hersteller
InVivoMAb anti-mouse CD8alpha	Bio X Cell
InVivoMAb rat IgG2b isotype control	Bio X Cell

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten in vivo Antikörper

2.1.10 qTR-PCR Primer

Gen	Sequenz (5' → 3')	Sondennummer
mHPRT forward	TCC TCC TCA GAC CGC TTT	95
mHPRT reverse	CCT GGT TCA TCA TCG CTA	95
mCCL22 forward	TCT TGC TGT GGC AAT TCA	84
mCCL22 reverse	GAG GGT GAC GGA TGT AGT	84

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten qPCR Primer

2.1.11 Software

Affinity Designer	Serif, Nottingham, Vereinigtes Königreich
BD FACSDiva	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
EndNote X9	Clarivate Analytics, Philadelphia, USA
Flow Jo 10.2	FlowJo LLC, Ashland, USA
GraphPad PRISM Version 8	GraphPad Software, La Jolla, USA
Keynote	Apple, Cupertino, USA
LightCycler 480 SW 1.5	Roche, Mannheim, D
Microsoft Office 365	Microsoft, Redmond, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen an einer Laminar-Air-Flow Werkbank. Die Zellen wurden in Brutbegasungsschränken bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO_2 kultiviert.

2.2.1.2 Bestimmung von Zellzahl und Vitalität

Zur Bestimmung der Zellzahl und deren Vitalität wurden die Zellen vereinzelt und 1:10 mit Trypanblau verdünnt (Verdünnungsfaktor). Anschließend konnten die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt und ihre Vitalität beurteilt werden. Die Zellzahl wurde wie folgt berechnet:

Zellen/ml = Zellzahl in Zählkammer / 4 x 10^4 x Verdünnungsfaktor

Vitale Zellen exkludieren dabei den Farbstoff, während tote Zellen durch die gestörte Membranpermeabilität den Farbstoff intrazellulär aufnehmen, was sie unter dem Lichtmikroskop dunkel erscheinen lässt.

2.2.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren der Zellen wurde jeweils 100 µl DMSO in Kryo-Röhrchen vorgelegt. 5-10 Millionen Zellen wurden in je 900 µl FCS gelöst und in die Kryo-Röhrchen pipettiert. Die Zellen wurden anschließend für 24 h bei -80 °C gelagert, bevor sie in flüssigen Stickstoff umgelagert wurden.
Zum Auftauen der Zellen wurden diese aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und in vorgewärmtem Medium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde dann für 5 Minuten bei 400 g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes konnten die Zellen in frischem Medium aufgenommen und in Zellkulturflaschen überführt werden.

2.2.1.4 Kultivierung von Tumorzellen

Tumorzellen wurden in Zellkulturflaschen kultiviert und regelmäßig lichtmikroskopisch auf Zelltod sowie auf Anzeichen mikrobieller Verunreinigung überprüft. Waren die

Kulturflaschen mit den adhärenten Zellen konfluent bewachsen, wurden sie 1:10 gesplittet, was in der Regel drei Mal pro Woche erfolgte. Hierbei wurde das Kulturmedium abgenommen und die Zellen für drei Minuten mit Trypsin-EDTA behandelt, sodass sich die adhärenten Zellen lösten. Anschließend wurden sie gewaschen und in frischem Medium aufgenommen.

2.2.1.5 Isolation von murinen Splenozyten

Nach Tötung der Mäuse durch zervikale Dislokation erfolgte die Entnahme der Milzen. Unter Zuhilfenahme eines 30 µm Zellsiebs wurden Splenozyten-Einzelzellsuspensionen generiert. Nach Zentrifugation der Suspension bei 400 g für 5 Minuten erfolgte eine Lyse der Erythrozyten (kurz: Erylyse) zur Entfernung der Erythrozyten aus dem Zellgemisch. Hierzu wurde das Zellpellet in Erylyse-Puffer aufgenommen und für 2 Minuten inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation konnte das Pellet zur Weiterverarbeitung in das entsprechenden Zellmedium aufgenommen werden.

2.2.1.6 *In vitro* Stimulation muriner dendritischer Zellen

Nach Aufreinigung der DC mittels magnetischer Zellseparation wurden je 100 000 DC pro Well in einer 96-Well-Platte ausplattiert. Für die *in vitro* Stimulation wurde murines GM-CSF, G-CSF, sowie M-CSF in den angegebenen Konzentrationen hinzugegeben. Eine Inkubation erfolgte dann für 48 Stunden. Anschließend wurde der Überstand nach Zentrifugation für 5 Minuten bei 400 g abgenommen und bei -20 °C eingefroren oder direkt zur Zytokinbestimmung mittels *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) weiterverarbeitet.

2.2.1.7 *In vitro* Generierung primärer T-Zellen

Aus Wildtyp (WT) Mäusen gewonnene Splenozyten wurden in murinem T-Zell Medium (TCM) aufgenommen, auf eine Konzentration von 2 x 10^6 Zellen pro ml eingestellt und in einer 6-Well Platte ausplattiert. Es erfolgte die Zugabe von IL-2 (10 IU), β-Mercaptoethanol (1µg/ml), anti-mouse CD3 (1µg/ml) und anti-mouse CD28 (0,1µg/ml). Hieran schloss sich eine Inkubationsperiode im Brutschrank über Nacht an. Die weitere Expansion der so generierten primären T-Zellen erfolgte mit IL-15 (50 ng/ml) circa alle 2-3 Tage.

2.2.1.8 Herstellung von Organlysaten

Zur Konzentrationsbestimmung des Chemokins CCL22 in verschiedenen Organen wurden die frisch entnommenen Organe zunächst in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann mit einem vorgekühlten Mörser pulverisiert. Das so entstandene Organpulver wurde in Eppendorf Röhrchen überführt und je nach Organmenge mit 30 bis 150 µl Bio-Rad Zelllyse-Puffer versetzt. Nach Vortexen der Masse für 30 Sekunden schloss sich eine Inkubationsperiode von 15 Minuten auf Eis an. Daraufhin erfolgte ein erneutes Vortexen des Lysats für 30 Sekunden und eine Zentrifugation für 15 Minuten bei 17000 g und 4 °C. Der flüssige Überstand wurde abgenommen, in ein neues Eppendorf Röhrchen überführt und konnte nun bei -80 °C zwischengelagert oder direkt weiterverarbeitet werden.

2.2.1.9 Gewinnung von murinem Serum

Zur Gewinnung von murinem Serum erfolgte eine venöse Blutabnahme in Isofluran-Kurznarkose. Hierzu wurde mit einer heparinisierten Kapillare über den inneren Augenwinkel der Maus der retrobulbäre Venenplexus unter einer leicht drehenden Bewegung punktiert. Mit dieser Methode wurden circa 500 µl Blut in einem Eppendorf Röhrchen aufgefangen. Zur Trennung von Serum und zellulären Bestandteil erfolgte daraufhin eine Zentrifugation bei 500 g und 4 °C für 15 Minuten. Das Serum konnte anschließend vorsichtig abgenommen werden und für weitere Untersuchungen entweder direkt verwendet oder bei -80 °C zwischengelagert werden.

2.2.1.10 Gewinnung humaner mononukleärer Zellen des peripheren Blutes

Die Anreicherung humaner mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMC) erfolgte nach dem Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation. Hierzu wurden 50 ml Perfusor-Spritzen zunächst mit je 250 I.E. Heparin benetzt. Anschließend erfolgte damit die venöse Blutabnahme. Das so gewonnene venöse Vollblut wurde mit einer 0,9 %igen, sterilen Natriumchlorid- Lösung verdünnt, wobei je 25 ml Vollblut mit 20 ml Natriumchlorid-Lösung vermischt wurden. Je 30 ml verdünntes Vollblut wurde vorsichtig auf 15 ml Biocoll geschichtet und im Anschluss bei 1000 g und 20 °C für 20 Minuten ohne Bremse zentrifugiert. PBMC wurden dadurch als weißer Ring zwischen der Biocoll-Schicht und dem Serum sichtbar und konnten in ein neues Falcon überführt werden. Hierauf folgten drei Waschschritte mit 0,9 % Natriumchlorid, wobei die erste Waschung bei 520 g und 20 °C für 10 Minuten erfolgte, die zweite und dritte jeweils bei 400 g und 4 °C für 10 Minuten.

Abschließend wurden die PBMC in humanem T-Zellmedium aufgenommen und konnten nun für weitere Experimente verwendet werden.

2.2.1.11 *In vitro* Stimulation von humanen dendritischen Zellen

Nach Aufreinigung von DC mittels magnetischer Zellseparation wurden je 25 000 DC pro Well in einer 96-Well-Platte ausplattiert. Für die *in vitro* Stimulation wurde humanes GM-CSF, G-CSF, sowie M-CSF in den angegebenen Konzentrationen hinzugegeben. Eine Inkubation erfolgte für 48 Stunden. Anschließend wurde der Überstand nach Zentrifugation für 5 Minuten bei 400 g abgenommen und bei -20 °C zwischengelagert.

2.2.2 Immunologische Methoden

2.2.2.1 Magnetische Zellseparation

Bei der magnetischen Zellseparation (MACS) handelt es sich um eine antikörpervermittelte Separation von Zellen. Die Zellen werden dazu mit magnetischen Mikropartikeln für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert, wodurch die Partikel an spezifische Oberflächenproteine der jeweiligen Zellpopulation binden. Es folgt dann ein Waschschritt, bei dem nicht-gebundene Mikropartikel entfernt werden, mit anschließender Aufnahme der Zellen in einem MACS-Puffer. Hierbei handelt es sich um eine 0,5 % PBS-Lösung, der 2mM EDTA zugesetzt wurde, um die Vitalität der Zellen aufrecht zu erhalten. Daraufhin wird die Zellsuspension über eine Säule geleitet, welche sich in einem starken Magnetfeld befindet. Zellen, die magnet-gekoppelte Antikörper gebunden haben werden hierdurch in der Säule zurückgehalten. Nicht-gebundenen Zellen können unterhalb der Säule in einem Falcon aufgefangen werden, wodurch die Separation der Zellen erfolgt. Bei Positivselektion verbleiben die Zielzellen durch die gebundenen magnetischen Mikropartikel in der Säule und können anschließend mithilfe eines Stempels aus der Säule gedrückt werden. Bei der Negativselektion kann die gewünschte Zellpopulation als Durchfluss aufgefangen werden. Die Reinheit der Aufreinigungsprozedur wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden folgenden Zellpopulationen nach Herstellerprotokoll mittels MACS aufgereinigt: murine CD11c+ DC, murine CD3+ T-Zellen, murine B220+ B-Zellen, sowie humane BDCA1+/BDCA3+/BDCA4+ DC, humane CD3+ T-Zellen, humane CD19+ B-Zellen, humane CD4+ T-Zellen und humane CD8+ T-Zellen. Humane CD3+ T-Zellen und CD19+ B-Zellen wurden zunächst durch Negativselektion aufgereinigt und anschließend zusätzlich einer Positivselektion unterzogen, um eine ausreichend hohe Reinheit

(durchflusszytometrisch über 90%) zu erreichen. Alle weiteren Zellpopulation wurden entweder mit einer Positiv- oder einer Negativselektion isoliert.

2.2.2.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie, auch *Fluorescence-activated cell sorting* (FACS) genannt, ist eine Methode zur Analyse und Quantifizierung von Zellen aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften. Zur Analyse bestimmter Zellcharakteristika können fluoreszenz-gekoppelte Antikörper verwendet werden, die an die entsprechenden Oberflächenmoleküle der Zellen binden. Diese Fluorochrome emittieren Licht einer gewissen Wellenlänge, wenn sie zuvor mit einem Laser einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden, was dann durch Detektoren in ein elektrisches Signal umgewandelt wird.
Um extrazelluläre Antigene zu analysieren, wurden jeweils 1 x 10^6 Zellen in 50 µl PBS aufgenommen und fluorochrom-gekoppelte Antikörper gegen die gewünschten Antigene hinzugefügt. Die Zellsuspension wurde nun für 30 Minuten unter Lichtabschluss und bei 4 °C inkubiert, bevor überschüssige Antikörper mittels zweimaligen Waschens entfernt werden konnten. Anschließend wurden die Zellen in 100 µl FACS-Puffer (PBS mit 2 % FCS) aufgenommen und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Auswertung erfolgte mit der FlowJo Software.

2.2.2.3 Enzyme-linked immunsorbent assay

Zur Konzentrationsbestimmung von Zytokinen aus Zellkulturüberständen und Organlysaten wurde der *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) verwendet. Hierbei handelt es sich um ein antikörpervermitteltes Verfahren zur Detektion und Konzentrationsbestimmung von antigenen Strukturen. Das gesuchte Antigen wird dabei zunächst über sogenannte *coating*- Antikörper am Boden einer ELISA-Platte fixiert. Anschließend werden enzymgekoppelte Antikörper zugegeben, die spezifisch an das Antigen binden. Durch Zugabe einer Substratlösung kann der resultierende Farbumschlag dann photometrisch quantifiziert werden. Zur exakten Berechnung dienen Standardverdünnungen des Antigens mit bekannter Konzentration. In dieser Arbeit wurde mithilfe des sogenannten Sandwich- ELISA das Chemokin CCL22 und das Zytokin GM-CSF in humanen sowie in murinen Zellkulturüberständen quantifiziert. Darüber hinaus erfolgte die Konzentrationsbestimmung von CCL22 aus murinen Organlysaten. Die Detektion wurde mit kommerziellen Kits von R&D Systems nach dem jeweiligen Hersteller- Protokoll durchgeführt.

2.2.2.4 Immunhistochemie

Für die Analyse der CCL22 Expression wurden 3 µm dicke Paraffin-Schnitte aus murinen Lymphknoten angefertigt. Die Schnitte wurden dann zunächst deparaffinisiert und in Tris-EDTA Puffer mit 0,5 % Tween-20 und bei pH 9,0 erhitzt. CCL22 wurde daraufhin mit einem monoklonalen *rabbit* anti-CCL22-Antikörper in einer Verdünnung von 1:200 markiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit einem sekundären anti-*rabbit* Antikörper in einer Verdünnung von 1:2000. Die Färbung wurde mit 3,3-diaminobenzidine (Sette et al.) entwickelt. Eine Gegenfärbung der Schnitte erfolgte mit Hämatoxylin.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die hier verwendete Messung der Proteinkonzentration basiert auf der Bradford-Methode. Hierfür wurde der Bio-Rad Protein Assay verwendet. Es handelt sich dabei um eine kolorimetrische Methode, bei der die Zugabe einer Kupferlösung zum Proteingemisch zunächst Komplexe mit den Peptidbindungen der Proteine bildet. Nach Zugabe des Folin-Ciocalteu-Reagenzes wird dasselbe reduziert, wodurch Molybdänblau entsteht. Dadurch verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 465 nm auf 750 nm. Mithilfe einer Standardkurve kann anschließend die Proteinkonzentration der jeweiligen Lösung bestimmt werden. Je nach Menge des Organlysates wurde die Proteinlösung zuvor 1:10 bis 1:100 in PBS verdünnt. Anschließend wurden 5 µl von jeder Verdünnung in Duplikaten auf eine 96-Well Flat Well Platte aufgebracht. Bio-Rad- Reagenzien wurden nach Protokoll hinzugefügt. Die darauffolgende Messung der Absorption erfolgte mit dem Mithras Plattenleser bei 750 nm. Um die exakte Proteinkonzentration zu errechnen, wurde eine Standardreihe mit bekannter Verdünnung einer Bovinen Serumalbumin (BSA) Stocklösung erstellt.

2.2.3.2 Extraktion zytoplasmatischer RNA

Die zytoplasmatische RNA-Extraktion wurde mit Trizol durchgeführt. Die in dieser Arbeit durchgeführte RNA-Extraktion erfolgte mit jeweils 50 – 100 mg gemörsertem Gewebe. Dieses wurde zunächst in 1 ml Trizol gelöst. Jeweils 200 µl Chloroform wurden hinzugefügt und die Lösung bei 12000 g und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Etwa 60 % der Lösung stellte daraufhin die wässrige Phase dar, die in ein frisches Eppendorf-Röhrchen überführt wurde und mit Isopropanol ausgefällt wurde. Nach erneuter Zentrifugation bei 12000 g und 4 °C für 10 Minuten wurde ein Pellet am Boden des Eppendorf-Röhrchens sichtbar. Dieses wurde mit 75 %igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert bei 7500 g und 4°C für 5

Minuten. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet für 10 Minuten luftgetrocknet, bevor es in 25 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert werden konnte. Daraufhin erfolgte eine Inkubation für 10 min bei 56 °C. Die RNA-Konzentration und -Reinheit konnte anschließend mittels NanoDrop photometrisch bestimmt werden. Alle Arbeiten wurden mit RNase-freien Materialien durchgeführt und die RNA wurde im Anschluss zur Extraktion direkt zur reversen Transkription weiterverwendet.

2.2.3.3 Reverse Transkription

Um die RNA amplifizieren zu können, muss diese zunächst in eine *copy* DNA (cDNA) umgewandelt werden. Anschließend kann der so entstandene DNA-Einzelstrang vervielfältigt werden. Nachdem photometrischer Bestimmung der RNA-Konzentration, wurde hierfür jeweils 1 µg RNA für die reverse Transkription eingesetzt. Diese wurde mit dem Fermentas RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit durchgeführt. Der verwendete Mastermix, sowie das Thermocycler-Programm sind in den nachfolgenden Tabellen dargestellt.

Reagenzien	Menge [µl]
RNA [µg]	1
H_2O	10
Reaction Buffer (5X)	4,0
Oligo(dt)-Primer	1,0
dNTP (10mM)	2,0
RNAse-Inhibitor (20U/µl)	1,0
Reverse Transkriptase (200 U/µl)	1,0
Gesamtvolumen	20,0

Tabelle 5: RT-PCR Reaktionsansatz

Phase	Zeit [min]	Temperatur [°C]
Transkription	60 min	42 °C
Termination	10 min	70 °C
Abkühlung	hold	4 °C

Tabelle 6: PCR-Cycler Programm für die RT-PCR

2.2.3.4 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode zur Amplifikation von DNA. Bei dieser kann es sich beispielsweise um eine aus *messenger* RNA (mRNA) umgeschriebene cDNA handeln, aber auch um aus Zellen isolierter DNA. Der DNA-Strang dient hierbei als Matrix und benötigt für dessen Vervielfältigung sequenzspezifische Primer. Die Primer flankieren hierbei das zu amplifizierende Gen und sind homolog zu dessen Enden. Die Reaktion beinhaltet drei Schritte:

1. Denaturierung der DNA: Auftrennung des DNA Doppelstrangs
2. Hybridisierung der Primer: Anlagerung der Primer an ihre homologe DNA-Sequenz
3. Elongation: Anfügen von dNTP an die Primer, um die Lücken zu schließen

Die dadurch neu synthetisierte DNA-Sequenz kann im nächsten Schritt als zusätzliche Matrix dienen, sodass über die Zeit eine exponentielle Zunahme der DNA-Menge ermöglicht wird.

2.2.3.5 Quantitative Real-Time PCR (qPCR)

Die über die reverse Transkription gewonnene cDNA kann nun mithilfe der qPCR-Methode amplifiziert und entweder absolut oder relativ quantifiziert werden. Hierbei sind sequenzspezifische Sonden an ihrem 3'-Ende mit einem Quencher versehen, an ihrem 5'-Ende befindet sich ein Fluoreszinmolekül (Reporter). Der Quencher verhindert durch die räumliche Nähe zum Reporter zunächst die Entstehung einer messbaren freien Fluoreszenz. Erst wenn die Taq-Polymerase im Verlauf der DNA-Amplifikation die Sonde zerstört und dadurch den Quencher und den Reporter räumlich voneinander trennt, kann die dadurch entstehende Fluoreszenz detektiert werden.
Zur Bestimmung der spezifischen mRNA-Expression wird die Anzahl der Kopien des zu untersuchenden Gens ins Verhältnis gesetzt zu einem Referenzgen. Bei diesem handelt es sich um ein ubiquitär vorhandenes und konstitutiv exprimiertes Gen. In dieser Arbeit wurde mit dem β-Aktin Gen als Referenz gearbeitet. Für die qPCR wurde das KAPA PROBE FAST Universal Kit verwendet.

Reagenzien	Menge [µl]
Primer forward	0,4 µl
Primer reverse	0,4 µl
Sonde	0,2 µl
PCR Mix	5 µl
H2O	2 µl
cDNA	2 µl
Gesamtvolumen	10 µl

Tabelle 7: qPCR Reaktionsansatz

Programm	Zyklen	Temperatur
Denaturieren	1	95 °C
Amplifizieren	45	95 °C
Kühlen	1	40 °C

Tabelle 8: qPCR Programm für LightCycler LC480

Verwendete qRT-PCR Primer:

- GM-CSF: forward 59-GCATGTAGAGGCCATCAAAGA-39, reverse 59-CGGGTCTGCACACATGTTA-39
- IL-7: forward 59-CGCAGACCATGTTCCATGT-39, reverse 59-TCTTTAATGTGGCACTCAGA-39
- Beta-Aktin: forward 59-CTAAGGCCAACCGGGAAAAG-39, reverse 59-ACCAGAGGCATACAGGGACA-39)

Die Primer wurden mit Hilfe der Roche Universal Probe Library entworfen und von Metabion (München, Deutschland) erworben.

2.2.4 Tierversuche

2.2.4.1 Tiere

Als Versuchstiere wurden weibliche und männliche C57BL/6J WT-Mäuse von Janvier (Saint-Berthevin Cedex, Frankreich) erworben. *CCL22*$^{-/-}$ Mäuse auf C57BL6 Hintergrund entstammen dem *Knockout Mouse Project (KOMP) Repository,* einem Projekt des *National Institutes of Health (NIH)*. *CCR4*$^{-/-}$ Mäuse auf C57BL6 Hintergrund wurden uns freundlicherweise von Frau Prof. Anne Krug (Institut für Immunologie, Ludwig-Maximilians-Universität München) zur Verfügung gestellt. *Rag1*$^{-/-}$ Mäuse wurden von Charles River Laboratories (Wilmington, MA, USA) bezogen, *Csf2*$^{-/-}$ Mäuse von Prof. Manfred Kopf (ETH Zürich, Schweiz), beide auf C57BL6 Hintergrund. Alle verwendeten Versuchstiere waren zu Versuchsbeginn zwischen 4 und 10 Wochen alt, wobei für jedes Experiment altersgematchte Mäuse verwendet wurden. Alle Tierversuche wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt.

2.2.4.2 *In vivo* Injektionen

Die *in vivo* Stimulation mit 0,5 µg murinem rekombinatem GM-CSF gelöst in 100 µl PBS erfolgte durch subkutane Injektion in die linke Flanke. Die Injektion von Zellen erfolgte als adoptiver T-Zelltransfer durch intravenöse Injektion von jeweils 10 x 10^6 T-Zellen in die Schwanzvene der Tiere. Anti-CD8 Antikörper oder Isotop-Kontrollen (jeweils 500 µg) wurden gelöst in 100 µl PBS intraperitoneal appliziert.

2.2.4.3 *In vivo* Tumormodelle

Die verwendeten Tumorzellen wurden einen Tag vor geplanter Inokulation 1:2 gesplittet. Am Tag des Versuches wurden die zunächst noch adhärenten Zellen mit Trypsin-EDTA gelöst und anschließend dreimal gewaschen, um FCS-Reste zu entfernen. Die gewaschenen und vereinzelten Zellen wurden mit der Tryplanblau-Exklusionstechnik gezählt, entsprechend eingestellt und in PBS aufgenommen. 0,5 beziehungsweise 2 Mio. Tumorzellen wurden in jeweils 100 µl PBS unter Isofluoran-Kurznarkose subkutan in die linke Flanke der Mäuse injiziert. Das Tumorwachstum wurde dreimal pro Woche mithilfe eines elektronischen Messschiebers kontrolliert (Länge des Tumors in mm x Breite des Tumors in mm). Bei Überschreiten einer Tumorgröße von 225 mm^2, Exulzeration des Tumors, tumorbedingter Verschlechterung des Allgemeinzustands oder bei Auftreten einer Tumorkachexie wurden die Mäuse getötet. Die Tötung erfolgte mittels zervikaler Dislokation.

2.3 Statistische Analyse

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden als arithmetischen Mittel angegeben, die Streuung als Standardfehler des Mittelwertes (*Standard error of the mean* = SEM). Statistische Signifikanzen zwischen den einzelnen Gruppen für unverbundene Stichproben wurden mit Hilfe des zweiseitigen Student-t-Test berechnet. Die Analyse von Unterschieden der Tumorgrößen wurde mit Hilfe der *two-way* ANOVA Varianzanalyse durchgeführt. Statistische Unterschiede im Überleben wurden über den *log-rank* (Mantel-Cox) Test berechnet. Die statistischen Berechnungen wurden mit GraphPad Prism vorgenommen und eine Signifikanz wurde für $p < 0,05$ angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 T-Zellen vermitteln die konstitutive CCL22-Sekretion in dendritischen Zellen

3.1.1 CCL22 wird konstitutiv in hohen Mengen exprimiert

Es gibt mittlerweile starke Hinweise darauf, dass die konstitutive Expression von CCL22 in lymphoiden Organen sowohl in der Homöostase als auch unter pathophysiologischen Gesichtspunkten in der Aufrechterhaltung der Immunkontrolle eine zentrale Rolle spielt. Unter Zuhilfenahme von Proteinexpressionsanalysen konnte eine hohe CCL22-Expression in lymphoiden Organen durch Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe bereits in verschiedenen Organen nachgewiesen werden (Rapp et al. 2019). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten wir die hohe CCL22-Expression zusätzlich durch eine immunhistochemischen Analyse muriner Lymphknoten bestätigen (Abbildung 3.1 A). Morphologisch handelte es sich bei den CCL22-produzierenden Zellen um Immunzellen myeloiden Ursprungs, die am ehesten DC darstellen (Abbildung 3.1.1 A). Ob CCL22 auch im Menschen in hohen Mengen konstitutiv exprimiert wird, wollten wir in einem nächsten Schritt herausfinden. Hierfür isolierten wir humane PBMC aus venösem Blut gesunder Spender und beobachteten anschließend *in vitro* die CCL22-Sekretion über die Zeit. Humane PBMC sezernierten ohne Stimulation tatsächlich große Mengen an CCL22 (Abbildung 3.1.1 B). Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten zudem ein ähnliches CCL22-Sekretionsmuster in murinen Splenozyten nachweisen (Piseddu et al. 2020).

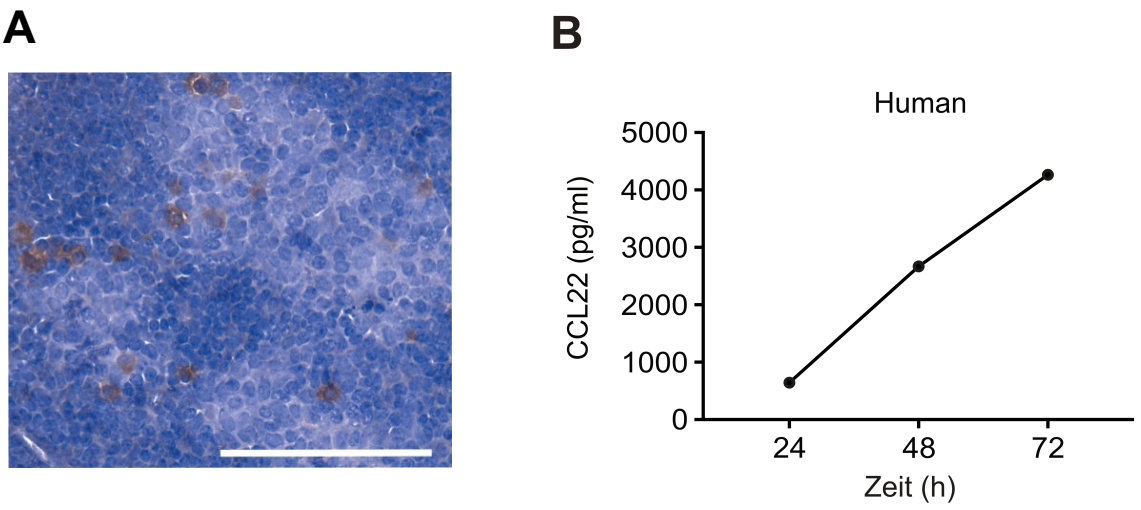

Abbildung 3.1.1: CCL22 wird konstitutiv murin und human exprimiert (A) CCL22 wurde mittels Immunhistochemie in murinen mesenterialen Lymphknoten detektiert (Skalenbalken 100µm). (B) 1 x 10^6 PBMC wurden aus humanem Blut isoliert und kultiviert. CCL22-Level wurden aus den Kulturüberständen jeweils nach 24, 48 und 72 h mittels ELISA bestimmt. Gezeigte Daten stehen repräsentativ für 3 unabhängig durchgeführte Experimente.

3.1.2 Konstitutive CCL22-Expression wird *in vitro* durch T-Zellen vermittelt

Nachdem wir im vorangehenden Abschnitt zeigen konnten, dass CCL22 auch im Menschen konstitutiv und in großen Mengen exprimiert wird, wollten wir nun herausfinden, wie diese konstitutive CCL22-Sekretion im Genaueren zustande kommt. Es ist bereits bekannt, dass DC die Hauptproduzenten von CCL22 sind (Katou et al. 2001; Penna et al. 2002; Rapp et al. 2019; Tang and Cyster 1999). Überraschenderweise konnten wir nach MACS-basierter Aufreinigung von DC in deren Kulturüberstand jedoch keine relevanten Mengen an CCL22 feststellen (Abbildung 3.1.2 A). Diese Beobachtung führte uns zu der Hypothese, dass humane DC möglicherweise auf die Hilfe anderer Zellpopulationen angewiesen sind, um CCL22 sezernieren zu können. Um diese Hypothese näher zu untersuchen, gewannen wir zunächst humane PBMC, aus denen wir anschließend DC isolierten. Die verbliebenen PBMC, exklusive der isolierten DC, wurden im weiteren Verlauf als Non-DC bezeichnet und beinhalteten größtenteils T- und B-Zellen. DC und Non-DC wurden nun separat kultiviert und schließlich die CCL22-Sekretion im Überstand mittels ELISA analysiert. Tatsächlich sezernierte weder die DC-Fraktion noch die Non-DC-Fraktion allein CCL22 in nennenswerten Mengen (Abbildung 3.1.2). Erst durch Kokultivierung der beiden Zellfraktionen wurde CCL22 wieder in ähnlich hohen Mengen sezerniert wie in frisch isolierten und nicht-separierten PBMC (Abbildung 3.1.2 A). Dies spricht dafür, dass die CCL22-Sekretion durch DC durch weitere Zellpopulationen vermittelt wird (Abbildung 3.1.2 A).

Im Folgenden beschäftigten wir uns daher mit dem Einfluss der einzelnen Zellpopulationen auf die CCL22-Sekretion durch DC. Hierfür reinigten wir erneut humane PBMC aus peripherem Blut auf und isolierten daraus DC. Non-DC wurden an dieser Stelle weiter aufgetrennt in CD3+ T-Zellen und CD19+ B-Zellen. Die isolierten DC wurden anschließend jeweils mit T- beziehungsweise B-Zellen kokultiviert und CCL22-Level im Überstand bestimmt. Während die Kokultur von DC mit B-Zellen keine nennenswerte Induktion von CCL22 zeigte, führte eine Kokultur von DC mit T-Zellen zu einer deutlichen Steigerung der CCL22-Sekretion im Vergleich zu DC allein (Abbildung 3.1.2 B). Humane DC benötigen also die Hilfe von T-Zellen, um konstitutiv CCL22 exprimieren zu können.

T-Zellen stellen allerdings keine einheitliche Zellpopulation dar, sondern lassen sich grob weiter in CD4+ T-Zellen und CD8+ T-Zellen unterteilen. Es war deshalb nun interessant herauszufinden, welchen Anteil die jeweiligen T-Zell Subtypen an der homöostatischen CCL22-Sekretion haben. Um dieser Frage nachzugehen, wurden nach Gewinnung von DC und T-Zellen aus humanen PBMC, die T-Zellen weiter aufgetrennt in CD4+ und CD8+ T-Zellen und anschließend mit DC kokultiviert. Es zeigte sich, dass innerhalb der T-Zell-Fraktion vor allem CD4+ T-Zellen die starke CCL22-Induktion in DC vermitteln, während der Beitrag CD8+ T-Zellen minimal zu sein scheint (Abbildung 3.1.2 C).

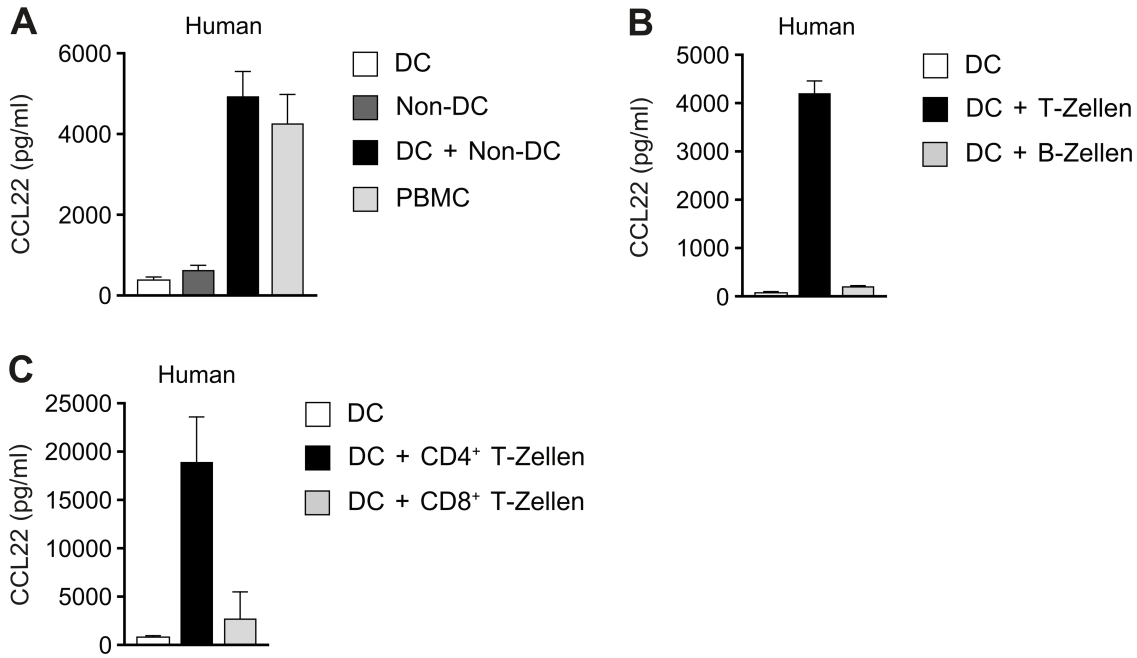

Abbildung 3.1.2: Konstitutive CCL22-Expression in DC wird *in vitro* durch T-Zellen vermittelt PBMC wurden aus humanen Blutproben gesunder Spender gewonnen, kultiviert und CCL22-Proteinlevel im Überstand mittels ELISA bestimmt. DC, T- und B-Zellen wurde mittels MACS-Aufreinigung isoliert. Die Reinheit der Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt und lag über 90%. Graphen stehen repräsentativ für jeweils 3 unabhängig durchgeführte Experimente (n = 3 PBMC-Donoren). Gezeigt sind Mittelwerte + SEM. (A) 2,5 x 10^4 DC und 2,5 x 10^5 Non-DC wurden für 72 h getrennt kultiviert. 2,5 x 10^5 Nicht-separierte PBMC wurden als Kontrolle verwendet. (B, C) 2,5 x 10^4 DC wurden allein oder zusammen mit 1 x10^5 naiven $CD3^+$ T-Zellen oder 1 x10^5 $CD19^+$ B-Zellen (B) beziehungsweise mit 1 x 10^6 CD4+ T-Zellen oder 1 x 10^6 CD8+ T-Zellen (C) für 72 h kultiviert.

3.1.3 Konstitutive CCL22-Expression wird *in vivo* durch T-Zellen vermittelt

Wir konnten bisher erstmals zeigen, dass humane DC für die konstitutive CCL22-Sekretion *in vitro* auf die Hilfe von T-Zellen angewiesen sind. Da sich diese Erkenntnis auch mit Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe im murinen System deckt (Piseddu et al. 2020), sollte im nächsten Schritt untersucht werden, inwieweit diese Beobachtungen auch *in vivo* eine Rolle spielen. Eine hohe homöostatische CCL22-Expression ist *in vivo* bereits mehrfach beschrieben worden, insbesondere in lymphoiden Organen (Godiska et al. 1997; Rapp et al. 2019; Schaniel et al. 1998; Tang and Cyster 1999). Auch *in vivo* sind DC dabei als die Hauptproduzenten von CCL22 beschrieben (Rapp et al. 2019; Vulcano et al. 2001). Um die Rolle von T-Zellen in der Unterhaltung homöostatischer CCL22-Level *in vivo* aufzuklären, verwendeten wir *Recombination activating gene 1* (*Rag1*)$^{-/-}$ Mäuse. Durch das fehlende Gen *Rag1* kommt es in diesen Mäusen zu einem Ausbleiben der V(D)J- Rekombination, was die Ausbildung reifer B- und T-Zellen verhindert. Die Reifung myeloider Zellen wie DC ist bei diesen Mäusen jedoch nicht beeinträchtigt (Mombaerts et al. 1992). Das Fehlen insbesondere der T-Zellen in diesen Mäusen ließ uns postulieren, dass CCL22-Level in den lymphoiden Organen von *Rag1*$^{-/-}$ Mäusen erniedrigt sein müssten, falls T-Zellen für die CCL22-Expression auch *in vivo* relevant sein würden. Um diese Hypothese zu überprüfen, verglichen wir zunächst die CCL22-Organlevel von *Rag1*$^{-/-}$-Mäusen mit denen von WT-Mäusen. Hierzu wurden CCL22-Level in Lysaten von Lymphknoten, Milz und Thymus mittels ELISA analysiert. Tatsächlich waren die CCL22-Level sowohl in peripheren als auch in mesenterialen Lymphknoten sowie im Thymus signifikant niedriger als in WT-Mäusen. Auch in der Milz waren die CCL22-Level von *Rag1*$^{-/-}$ Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen im Trend reduziert, wenn auch nicht signifikant (Abbildung 3.1.3 A).

Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob WT T-Zellen in der Lage sind, homöostatische CCL22-Level in *Rag1*$^{-/-}$ Mäusen zu rekonstituieren. Hierfür generierten wir primäre T-Zellen aus WT-Splenozyten, welche wir anschließend *Rag1*$^{-/-}$ Mäusen adoptiv intravenös transferierten. Da davon auszugehen ist, dass die von uns generierten T-Zellen in einem aktivierten Zustand transferiert wurden, analysierten wir die CCL22-Organlevel der *Rag1*$^{-/-}$ Mäuse erst vier Wochen später. Zu diesem Zeitpunkt sollten die transferierten WT T-Zellen aufgrund fehlender Präsentation fremder Antigene wieder einen Ruhezustand erreicht haben (Pennock et al. 2013). Für die Analyse wurden die Tiere getötet und Lymphknoten, Milz und Thymus entnommen. Die Organe wurden lysiert und CCL22 mittels ELISA bestimmt. Der adoptive Transfer von WT T-Zellen in *Rag1*$^{-/-}$ Mäuse führte tatsächlich

zu einem signifikanten Anstieg von CCL22 in mesenterialen und peripheren Lymphknoten. Auch in der Milz zeigte sich eine gesteigerte CCL22-Sekretion, die jedoch nicht signifikant war. Im Thymus hingegen konnte keine CCL22-Induktion festgestellt werden (Abbildung 3.1.3 B), was jedoch nicht verwunderlich ist, da reife T-Zellen den Thymus in der Regel nicht mehr besiedeln (Michie, Kirkpatrick, and Rouse 1988). Es konnte also gezeigt werden, dass adoptiv transferierte WT T-Zellen in *Rag1*$^{-/-}$ Mäusen die niedrigen CCL22-*Baseline level* signifikant erhöhen konnten.

Zusammenfassend konnten wir in diesem Abschnitt demonstrieren, dass T-Zellen auch *in vivo* für die konstitutive CCL22-Sekretion in Lymphknoten verantwortlich sind.

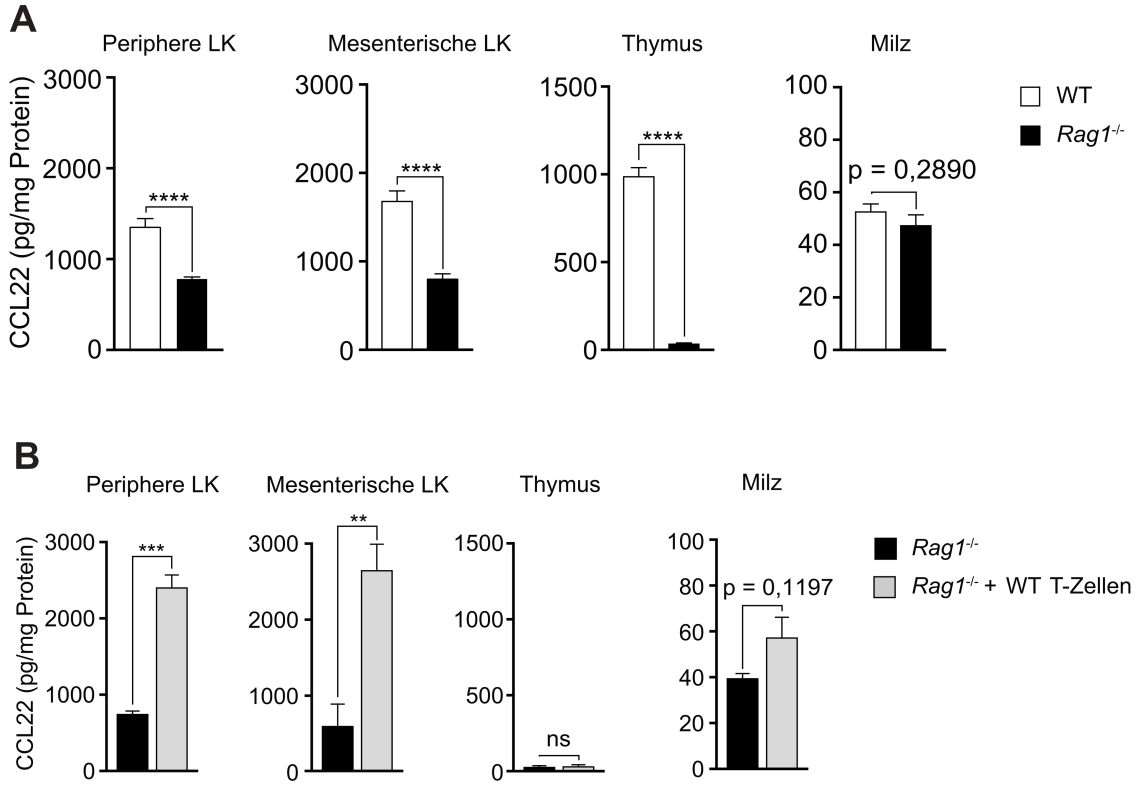

Abbildung 3.1.3 T-Zellen vermitteln konstitutive CCL22 Sekretion *in vivo* CCL22-Level wurden in Organlysaten mittels ELISA gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, ns: nicht signifikant). (A) CCL22-Level wurden in peripheren Lymphknoten (periphere LK), mesenterialen Lymphknoten (mesenteriale LK), Thymus und Milz von WT (n = 10) und *Rag1*$^{-/-}$ Mäusen (n = 10) bestimmt. Die T-Zellen für den adoptiven T-Zelltransfer (B, C) wurden *in vitro* aus Splenozyten generiert. Dargestellt sind Daten aus 3 unabhängig durchgeführten Experimenten (B) CCL22-Level wurden in peripheren Lymphknoten, mesenterialen Lymphknoten, Thymus und Milz von *Rag1*$^{-/-}$ Mäusen 4 Wochen nach intravenöser Injektion von entweder PBS (n = 8 Mäuse) oder 10 x 10^6 WT T-Zellen (n = 8 Mäuse) bestimmt. Dargestellt sind die Daten aus 3 unabhängigen Experimenten.

3.2 GM-CSF vermittelt die konstitutive CCL22-Sekretion

3.2.1 Lösliche Faktoren aus T-Zellen vermitteln die konstitutive CCL22-Sekretion

Nachdem wir herausgefunden haben, dass humane DC für eine konstitutive CCL22-Sekretion auf die Hilfe von T-Zellen angewiesen sind, stellten wir uns nun der Frage, ob diese Interaktion auf einen zellkontaktabhängigen Mechanismus zurückzuführen war oder ob von T-Zellen sezernierte lösliche Faktoren hierfür verantwortlich sind. Um dies herauszufinden, generierten wir zunächst T-Zell-Überstände. Dafür kultivierten wir aus PBMC isolierte humane T-Zellen. Der Überstand der Kultur mit den von T-Zellen sezernierten löslichen Faktoren wurde zu frisch isolierten humanen DC gegeben. Nach Kultivierung der DC im T-Zell Überstand wurde CCL22 mittels ELISA bestimmt. Es zeigte sich, dass allein der T-Zell-Überstand eine signifikante CCL22-Induktion in humanen DC bewirkte (Abbildung 3.2.1). Dies spricht dafür, dass tatsächlich ein von T-Zellen sezernierter löslicher Faktor die CCL22-Induktion in DC vermittelt, eine Erkenntnis, die sich auch mit Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe im murinen System deckt (Piseddu et al. 2020).

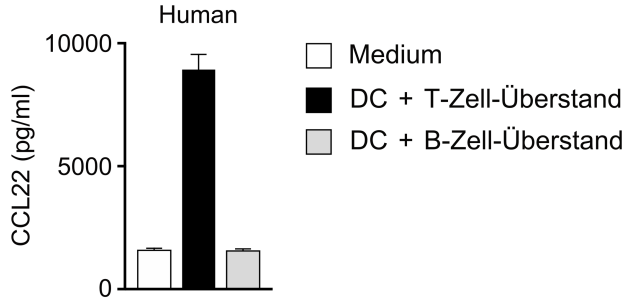

Abbildung 3.2.1: Ein von T-Zellen produzierter Faktor vermittelt die konstitutive CCL22-Sekretion in DC
CCL22-Level wurden mittels ELISA aus dem Kulturüberstand bestimmt. DC, T- und B-Zellen wurde mittels MACS-Aufreinigung isoliert. Die Reinheit der Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt und lag über 90%. 2,5 x 10^4 humane DC wurden entweder in frischem Medium kultiviert oder zusammen mit dem gewonnenen Überstand aus einer zuvor erfolgten 72-stündigen T- beziehungsweise B-Zell Kultur. Dargestellte Daten stehen repräsentativ für 3 unabhängig durchgeführte Experimente. Gezeigt sind Mittelwerte + SEM.

3.2.2 GM-CSF aus T-Zellen vermittelt konstitutive CCL22-Expression in dendritischen Zellen

Nachdem wir zeigen konnten, dass ein von T-Zellen sezernierter Faktor verantwortlich zu sein scheint für die homöostatische CCL22-Sekretion in DC, war es nun von größtem Interesse herauszufinden, um welchen Faktor es sich hierbei handelt. Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits in Vorarbeiten mithilfe eines Zytokinscreen zeigen, dass CCL22 in murinen DC durch Stimulation mit einer Reihe von rekombinaten Zytokinen induziert werden kann. Insbesondere GM-CSF und IL-7 konnten dabei als potente Induktoren von CCL22 identifiziert werden (Piseddu et al. 2020).

Um zu untersuchen welchen Beitrag GM-CSF und IL-7 jeweils in der T-Zell vermittelten CCL22-Induktion in DC leisten, wurden murine T-Zellen zunächst auf die Expression der jeweiligen Zytokine analysiert. Hierzu isolierten wir WT T-Zellen aus murinen Splenozyten. Aus Splenozyten isolierte B-Zellen dienten als Kontrollkondition. Anschließend analysierten wir T- und B-Zellen auf mRNA-Ebene, ob sie GM-CSF beziehungsweise IL-7 in relevanten Mengen exprimieren. In T-Zellen konnten wir dabei im Vergleich zu B-Zellen zwar eine GM-CSF Expression nachweisen, jedoch keine IL-7 Expression nachweisen (Abbildung 3.2.2 A). Während GM-CSF durchaus von T-Zellen exprimiert wird, wird im Gegensatz dazu IL-7 vor allem von nicht-hämatopoetischen Zellen produziert (Fry and Mackall 2002; Griffin et al. 1990). Neben der Expression von GM-CSF durch T-Zellen auf mRNA-Ebene konnten wir auch dessen Sekretion *in vitro* nachweisen in dem wir T-Zellen aus murinen Splenozyten beziehungsweise humanen PBMC isolierten, kultivierten und anschließend GM-CSF im Überstand mittels ELISA bestimmten. Hier zeigte sich vor allem im Vergleich zu B-Zellen eine deutliche Sekretion von GM-CSF, sowohl murin als auch human (Abbildung 3.2.2 B).

Aufgrund dieser Beobachtungen beschäftigten wir uns nun näher mit der Rolle von GM-CSF in der T-Zell vermittelten CCL22-Expression in DC. Wir wollten im nächsten Schritt klären, ob die CCL22-Sekretion durch DC aufgehoben werden kann, wenn anstatt WT T-Zellen, GM-CSF-Knockout (*Csf2*$^{-/-}$) T-Zellen mit DC kokultiviert werden. Hierfür isolierten wir zunächst T-Zellen aus den Milzen von *Csf2*$^{-/-}$ beziehungsweise WT-Mäusen. Die so gewonnenen *Csf2*$^{-/-}$ T-Zellen und WT T-Zellen wurden anschließend jeweils mit WT DC kokultiviert und CCL22 im Überstand mittels ELISA bestimmt. Die Kokultur mit *Csf2*$^{-/-}$ T-Zellen führte im Vergleich zu WT T-Zellen zu beinahe CCL22-freien Überständen (Abbildung 3.2.2 C), was die Hypothese der GM-CSF vermittelten CCL22-Induktion in DC weiter unterstützt.

Um die Abhängigkeit der CCL22-Induktion in DC durch den von T-Zellen sezernierten löslichen Faktor GM-CSF weiter zu validieren, inkubierten wir erneut WT DC, allerdings diesmal nur mit den Überständen von *Csf2*$^{-/-}$ T-Zellen beziehungsweise WT T-Zellen. Auch hier konnten wir nach Inkubation der DC mit dem Überstand von *Csf2*$^{-/-}$ T-Zellen im Vergleich zu WT T-Zellen deutlich reduzierte CCL22-Level feststellen (Abbildung 3.2.2 D). Diese Beobachtung impliziert, dass der von T-Zellen sezernierte Faktor GM-CSF *in vitro* tatsächlich ein essenzieller Faktor ist, der die CCL22-Expression durch DC vermittelt.

Nachdem wir *in vitro* zeigen konnten, dass GM-CSF aus T-Zellen ein elementarer Mediator für die homöostatische CCL22-Sekretion durch DC ist, wollten wir diese Beobachtung auch *in vivo* untersuchen. Hierfür injizierten wir *Rag1*$^{-/-}$ Mäusen rekombinates GM-CSF beziehungsweise PBS und analysierten die CCL22-Level in den Lymphknoten 12 h später. Falls GM-CSF auch *in vivo* eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung hoher CCL22 Organlevel spielt, dann sollten die CCL22-Level in den Lymphknoten von *Rag1*$^{-/-}$ Mäusen nach GM-CSF Gabe deutlich angehoben werden. Es zeigte sich in unserem Modell auch tatsächlich eine signifikante Steigerung der CCL22-Sekretion sowohl in peripheren als auch in mesenterialen Lymphknoten nach GM-CSF-Injektion (Abbildung 3.2.2 E).

Zusammenfassend konnte in diesem Abschnitt gezeigt werden, dass GM-CSF aus T-Zellen eine Schlüsselrolle einnimmt in der Vermittlung homöostatischer CCL22-Expression durch DC, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*.

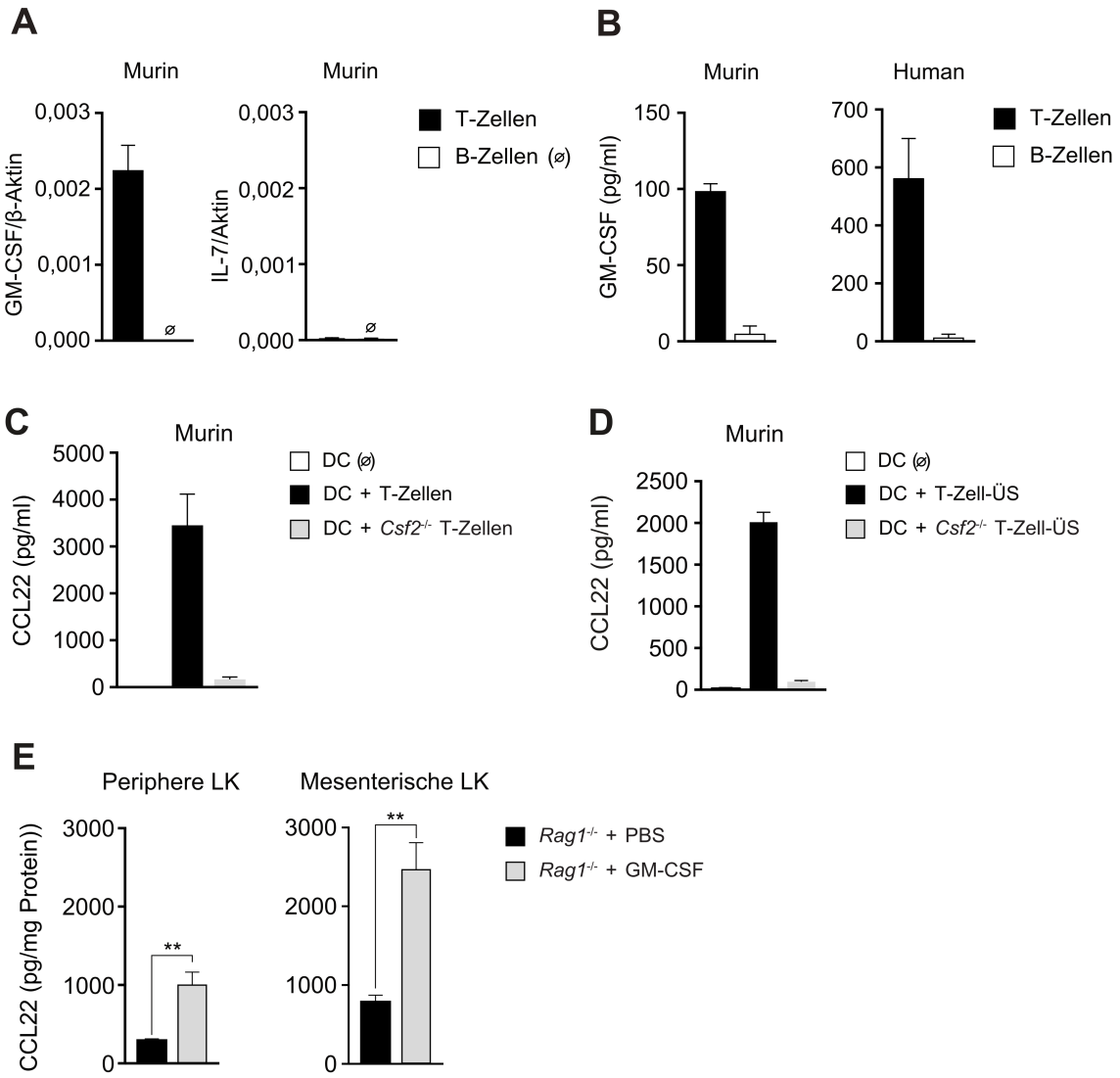

Abbildung 3.2.2: GM-CSF aus T-Zellen vermittelt konstitutive CCL22-Sekretion in DC (A) 1 x 10^6 murine $CD3^+$ T-Zellen oder B-Zellen wurden für 48 h kultiviert. mRNA aus T- und B-Zellen wurde isoliert und die Genexpression von GM-CSF (n = 2) und IL-7 (n = 3) mittels qRT-PCR bestimmt. DC, T- und B-Zellen wurde mittels MACS-Aufreinigung isoliert. Die Reinheit der Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt und lag über 90%. (B) 1 x 10^6 murine oder humane T- und B-Zellen wurden für 48 h kultiviert. GM-CSF Proteinlevel wurden im Überstand mittels ELISA bestimmt. Gezeigte Daten stehen repräsentativ für 3 (murin) beziehungsweise 1 (human) unabhängig durchgeführte(s) Experiment(e). (C) 1 x 10^5 WT DC wurden entweder alleine oder zusammen mit 1 x 10^6 WT oder *Csf2*$^{-/-}$ T-Zellen für 72 h kultiviert und CCL22 im Kulturüberstand mittels ELISA gemessen. Gezeigte Daten stehen repräsentativ für 3 unabhängig durchgeführte Experimente. (D) 1 x 10^6 WT beziehungsweise *Csf2*$^{-/-}$ T-Zellen wurden jeweils alleine für 48 h kultiviert. Überstände wurden abgenommen und 1 x 10^5 frisch isolierten WT DC damit für 72 h inkubiert. CCL22-Level wurde im Überstand gemessen. Gezeigte Daten stehen repräsentativ für 3 unabhängig durchgeführte Experimente. (E) Relative CCL22-Proteinlevel wurde in peripheren Lymphknoten (LK) sowie in mesenterialen Lymphknoten (LK) 12 h nach subkutaner Injektion von PBS oder 0,5 µg rekombinatem GM-CSF in *Rag1*$^{-/-}$ Mäusen (n = 7) bestimmt. Dargestellt sind die Daten aus 2 unabhängig durchgeführten Experimenten. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM (** $p < 0,01$).

3.2.3 GM-CSF und G-CSF induzieren CCL22 in humanen Zellen

Der vorangegangene Abschnitt dieser Arbeit konnte zeigen, dass GM-CSF aus T Zellen die CCL22-Sekretion durch DC unterhält, was auf eine bisher noch nicht bekannte Rolle von GM-CSF in der homöostatischen Immunkontrolle hinweist. Es stellte sich nun die Frage, ob mit GM-CSF verwandte Zytokine ebenfalls eine Rolle spielen in der Regulation von CCL22. So gehört GM-CSF unter anderem zur Gruppe der CSF, zu denen auch G-CSF und M-CSF gehören, welche auch teilweise überlappende Eigenschaften mit GM-CSF aufweisen (Metcalf 1989, 2013).

Wir wollten im nächsten Schritt daher die Partnerzytokine GM-CSF, G-CSF und M-CSF untersuchen hinsichtlich ihrer Potenz CCL22 in DC zu induzieren. Hierfür isolierten wir zunächst murine DC aus Splenozyten sowie humane DC aus peripherem Blut gesunder Spender. Diese wurden anschließend stimuliert mit unterschiedlichen Konzentrationen von rekombinantem murinen beziehungsweise humanem GM-CSF, G-CSF oder M-CSF. Nach einer Inkubationsperiode von 48 h wurden die Überstände abgenommen und daraus CCL22-Level mittels ELISA bestimmt. GM-CSF führte dabei wie zu erwarten zu einer starken CCL22-Induktion sowohl in murinen DC als auch in humanen (Abbildung 3.2.3 A). Interessanterweise führte G-CSF zwar in humanen DC, nicht jedoch in murinen DC zu einer signifikanten Steigerung der CCL22-Sekretion. Im Vergleich zu GM-CSF bewegte sich diese Induktion allerdings auf einem deutlich niedrigeren Niveau (Abbildung 3.2.3 B). Ein ähnliches Bild zeigte sich auch bei der DC-Stimulation mit M-CSF. Auch hier kam es zu einer leichten, aber signifikanten CCL22-Induktion in humanen, nicht jedoch in murinen DC (Abbildung 3.2.3 C).

In Zusammenschau der erhobenen Daten kann festgehalten werden, dass G-CSF und M-CSF CCL22 in humanen DC zwar leicht induzieren können, GM-CSF jedoch eindeutig als der stärkste Induktor von CCL22 innerhalb der Gruppe der untersuchten CSF aufzufassen ist.

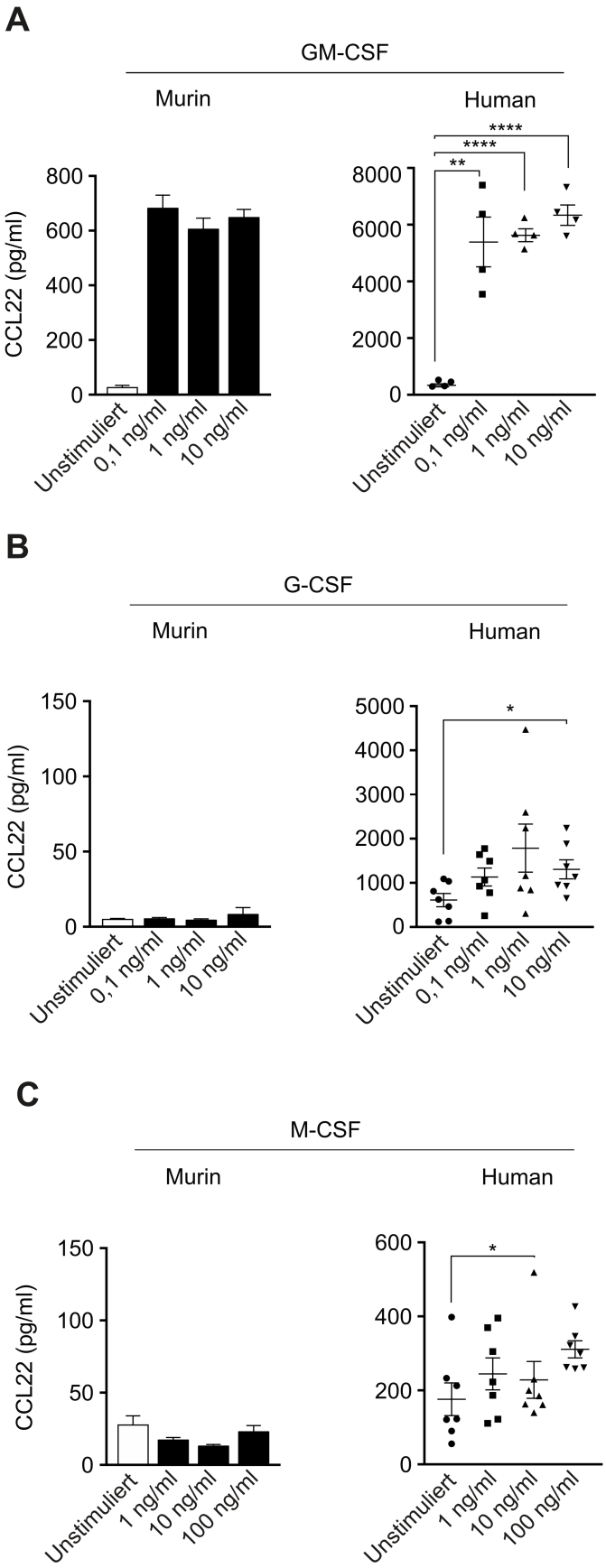

Abbildung 3.2.3: Rekombinantes GM-CSF, G-CSF und M-CSF induzieren CCL22 in unterschiedlichem Ausmaß *in vitro* CCL22-Level wurden aus Kulturüberständen mittels ELISA bestimmt. Graphen zeigen Daten aus 3 (murin) und 7 (human G-CSF, M-CSF) beziehungsweise 4 (human GM-CSF) unabhängigen Experimenten. Daten zeigen Mittelwerte + SEM (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$). DC wurde mittels MACS-Aufreinigung isoliert. Die Reinheit der Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt und lag über 90%. DC (5 x 10^4 murin, 2,5 x 10^4 human) wurden entweder in frischem Medium (unstimuliert) oder mit verschiedenen Konzentrationen von rekombinatem murinen und humanen (A) GM-CSF (0,1 ng/ml, 1 ng/ml oder 10 ng/ml), (B) G-CSF (0,1 ng/ml, 1 ng/ml oder 10 ng/ml), (C) M-CSF (1 ng/ml, 10 ng/ml oder 100 ng/ml) jeweils für 48 h inkubiert.

3.3 GM-CSF wirkt bei CCL22-Defizienz potent antitumoral

3.3.1 Rekombinantes GM-CSF induziert CCL22 *in vivo*

Im vorangegangenen Abschnitt dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass GM-CSF aus T-Zellen wesentlich mitbeteiligt ist an der konstitutiven CCL22-Produktion durch DC und innerhalb der Gruppe der CSF der stärkste Induktor von CCL22 *in vitro* darstellt. Da CCL22 als immunologischer Checkpoint maßgeblich in der Regulation der Stärke von T-Zell Antworten beteiligt ist (Rapp et al. 2019), stellte sich nun die Frage, ob die von uns neu identifizierte GM-CSF-CCL22-Achse auch in verschiedenen pathologischen Prozessen und Erkrankungen eine Rolle spielt. So ist eine erhöhte Expression von GM-CSF bei einer Reihe von immunologischen Erkrankungen beschrieben, unter anderem bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen (Hamilton 2020; Lotfi et al. 2019), aber auch bei Tumoren (Hong I. et al. 2016).

Um die Rolle von CCL22 in GM-CSF-vermittelten pathologischen Prozessen zu verstehen, wollten wir in einem ersten Schritt herausfinden, ob rekombinantes GM-CSF *in vivo* CCL22-Level auch über das physiologische Maß hinaus anheben kann. Hierfür injizierten wir WT-Mäusen rekombinantes GM-CSF oder PBS subkutan. CCL22-Level wurde anschließend über die Zeit analysiert in Milz, peripheren und mesenterialen Lymphknoten sowie im Serum. Tatsächlich konnte in allen untersuchten Organen nach GM-CSF Applikation eine signifikante CCL22-Induktion nachgewiesen werden (Abbildung 3.3.1). Interessanterweise war der beobachtete CCL22-Anstieg jedoch nur transient und *baseline* CCL22-Level wurden bereits nach annähernd 24 h wieder erreicht (Abbildung 3.3.1). Zudem zeigte sich in den verschiedenen Organen eine unterschiedliche Kinetik im Hinblick auf die Dynamik des CCL22-Anstiegs. So führte die GM-CSF Applikation im Serum und in der Milz zu einem sehr schnellen Anstieg der CCL22-Konzentration und erreichte ihr Maximum bereits nach 6 h, während der Anstieg in den Lymphknoten verzögert auftrat und erst nach etwa 12 h eine maximale Konzentration aufwies (Abbildung 3.3.1). Es ist durchaus denkbar, dass die subkutane Applikationsart hier einen Einfluss hat auf die beobachtete CCL22-Kinetik in den verschiedenen Organen.

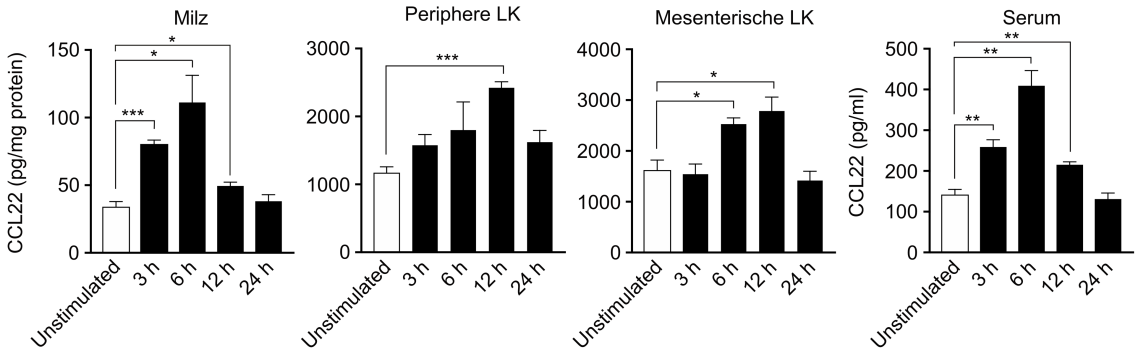

Abbildung 3.3.1: Rekombinantes GM-CSF induziert CCL22 *in vivo* in lymphoiden Organen Relative CCL22-Proteinlevel wurden in Milz, peripheren Lymphknoten (periphere LK), mesenterialen Lymphknoten (mesenteriale LK), sowie im Serum 3, 6, 12 und 24 h nach subkutaner Injektion von entweder PBS (unstimuliert) oder 0,5µg murinem rekombinantem GM-CSF in WT-Mäusen (n = 3) bestimmt. Gezeigte Daten zeigen Mittelwerte + SEM und stehen repräsentativ für 2 unabhängig durchgeführte Experimente. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

3.3.2 Eine systemische Tumortherapie mit GM-CSF führt bei CCL22-Defizienz in einem murinen Pankreaskarzinom-modell zu verlangsamten Tumorwachstum

Nachdem gezeigt werden konnte, dass GM-CSF nicht nur ein wichtiger Mediator des immunregulatorischen Chemokins CCL22 in der Homöostase ist, sondern, dass darüber hinaus rekombinantes GM-CSF die CCL22-Konzentration *in vivo* auf deutlich supraphysiologische Level anheben kann, wollten wir in einem nächsten Schritt untersuchen, inwieweit die GM-CSF-CCL22-Achse nun konkret bei pathologischen Prozessen eine Rolle spielt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es in diesem Zusammenhang insbesondere die Rolle der GM-CSF-CCL22-Achse im Tumor aufzuklären. GM-CSF stellt für DC nicht nur in der Homöostase ein wichtiges Maturierungs- und Aktivierungsignal dar, sondern eben auch in Tumoren (Mach et al. 2000). Im Rahmen von Tumorerkrankungen sind gerade reife und ausreichend aktivierte DC die Grundvoraussetzung für ein effektives T-Zell-Priming und damit für die Initiierung einer antitumoralen Immunantwort (Fu and Jiang 2018; Kurts, Robinson, and Knolle 2010). Aufgrund dieser Eigenschaften wurde GM-CSF bereits intensiv als potenzielles Immunstimulanz für antitumorale Immuntherapien in präklinischen Modellen aber auch in klinischen Studien evaluiert (Yan et al. 2017). Während einige dieser Studien tatsächlich ein initiales Ansprechen zeigten, konnte im weiteren Verlauf jedoch oft kein Überlebensvorteil verzeichnet werden (Jinushi and Tahara 2009; Metcalf 2013). Hierfür werden unter anderem tumorprogressive Effekte von GM-CSF verantwortlich gemacht, die zum Teil auf die Rekrutierung und Expansion von immunsuppressiven

Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) und Treg zurückzuführen sind, insgesamt jedoch noch wenig verstanden sind (Parmiani et al. 2007). Daher war es für uns von großem Interesse herausfinden, ob die GM-CSF vermittelte Induktion von CCL22 möglicherweise einen weiteren Mechanismus darstellt, der zum tumorprogressiven Potenzial von GM-CSF im Rahmen von Tumortherapien beiträgt.

Um dieser Frage nachzugehen, etablierten wir zunächst ein passendes GM-CSF-basiertes Therapieregime zur Behandlung von Tumoren im Mausmodell. Um den Einfluss von CCL22 hierbei näher untersuchen zu können, wollten wir *CCL22*$^{-/-}$ Mäuse mit WT-Mäusen vergleichen, hinsichtlich des Ansprechens auf unsere GM-CSF-basierte Tumortherapie. Erste Untersuchungen sollten dabei mit dem Pankreaskarzinommodell Panc02-OVA durchgeführt werden. Vor Initiierung der GM-CSF Therapie sollte nach Tumorzellinokulation jedoch ein ausreichendes Anwachsen der Tumoren (hier: 25 mm^2) abgewartet werden. Nach Erreichen der von uns festgelegten Tumorgröße sollten sowohl WT-Mäuse als auch *CCL22*$^{-/-}$ Mäuse jeweils in zwei Gruppen aufgeteilt werden, wobei eine Gruppe mit GM-CSF behandelt werden sollte, die jeweils andere Gruppe sollte zur Kontrolle eine äquivalente Menge PBS erhalten. Die Therapie sollte dabei als systemische Therapie subkutan erfolgen. Zur Behandlung wählten wir eine Injektionsdosis von 0,5 µg GM-CSF pro Maus, die zweimal pro Woche verabreicht werden sollte. Die Therapie sollte dabei so lange durchgeführt werden, bis die von uns festgelegten Abbruchkriterien (Tumorgröße > 225 mm^2, Exulzeration des Tumors, Verhaltensauffälligkeiten, Tumorkachexie) erreicht waren. Für die praktische Umsetzung unseres GM-CSF Therapieregimes wurden WT und *CCL22*$^{-/-}$ Mäusen zunächst subkutane Panc02-OVA Tumore gesetzt. Nach wenigen Tagen entwickelte die Mäuse solide Tumoren. In dem hier dargestellten Experiment erfolgte ab einer durchschnittlichen Tumorgröße von etwa 25 mm^2 eine Therapie mit rekombinantem GM-CSF oder PBS. Die Tumorwachstumsgeschwindigkeit war in behandelten und unbehandelten WT-Mäusen vergleichbar und führte nach nur 3-4 Wochen zum Tod der Mäuse. Die systemische GM-CSF Therapie hat in unserem Modell in WT-Mäusen also keinen Effekt auf Tumorwachstum und Überleben. Auch unbehandelte *CCL22*$^{-/-}$ Mäuse zeigten keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich Tumorwachstum und Überleben im Vergleich zu den WT-Mäusen (Abbildung 3.3.2). Umso erstaunlicher war daher die Beobachtung, dass die GM-CSF Therapie in tumortragenden *CCL22*$^{-/-}$ Mäusen zu einem signifikanten Tumorrückgang führte (Abbildung 3.3.2 A). Dieser Effekt war bereits wenige Tage nach Therapiestart zu beobachten und hielt über mehrere Wochen an (Abbildung 3.3.2 A). Auch hinsichtlich des Überlebens schnitten Therapie-erhaltende CCL22$^{-/-}$ Mäuse signifikant besser ab als nicht-therapierte (Abbildung 3.3.2 B).

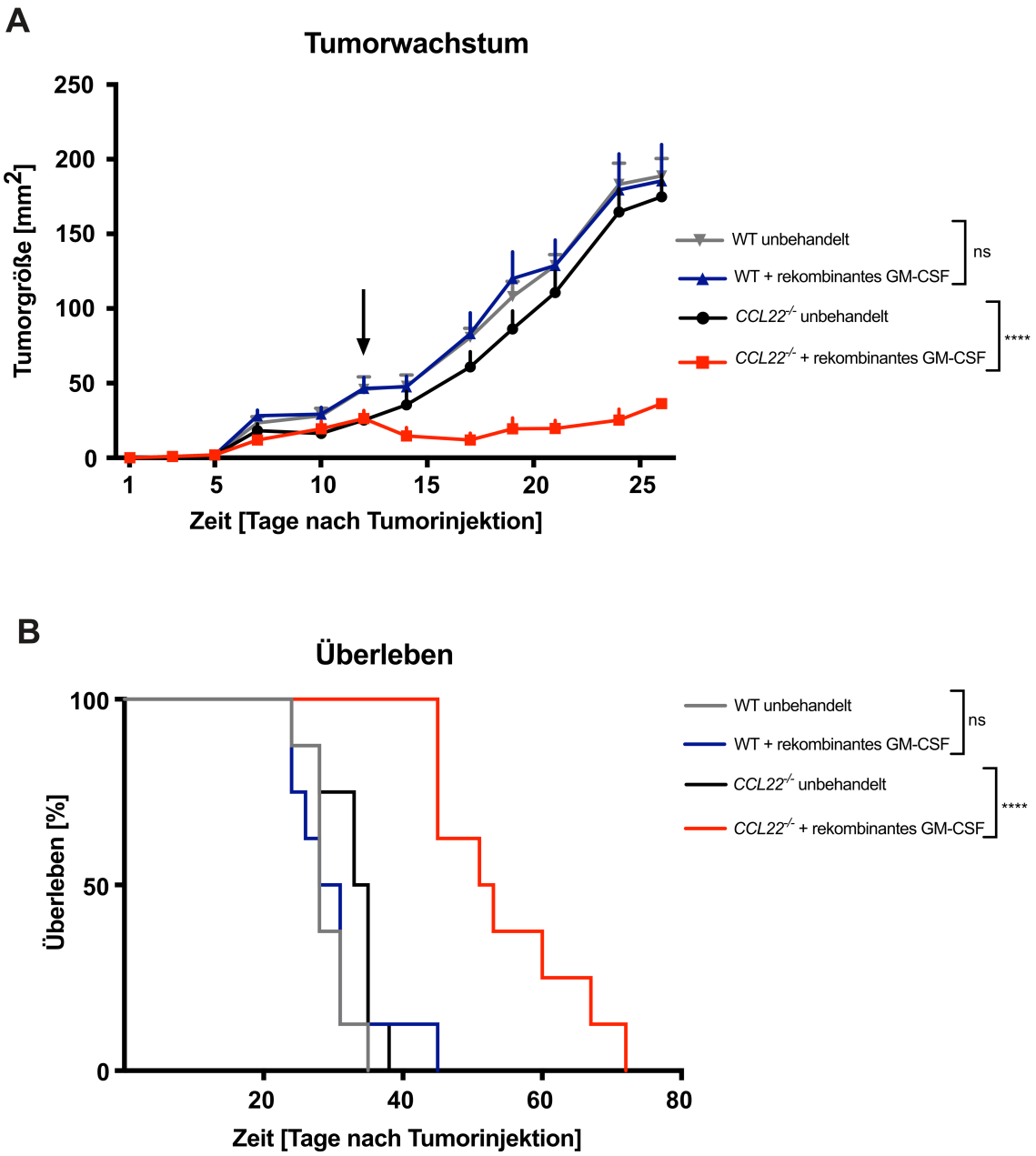

Abbildung 3.3.2: Tumorwachstum und Überleben GM-CSF behandelter Panc02-OVA-tumortragender WT und CCL22$^{-/-}$-Mäuse (A, B) WT-Mäusen sowie in *CCL22*$^{-/-}$ Mäusen wurden subkutane Tumoren gesetzt, wobei 2 Mio. Panc02-OVA-Zellen pro Maus injiziert wurden. Ab einer durchschnittlichen Tumorgröße von 25 mm^2 (Pfeil) wurden WT-Mäusen (n = 10) und CCL22$^{-/-}$-Mäusen (n = 10) zweimal pro Woche 0,5 µg GM-CSF subkutan und peritumoral appliziert. Als Kontrolle wurden je eine Gruppe tumortragender WT-Mäuse (n = 5) und CCL22$^{-/-}$-Mäuse (n = 5) mit PBS behandelt. (A) Tumorwachstum und (B) Überleben wurden über die Zeit bis zum Erreichen der Abbruchkriterien verfolgt. Die Größe der Tumoren wurden alle 2-3 Tage bestimmt und bei Erreichen der Abbruchkriterien (Tumorgröße > 225 mm^2, Exulzeration des Tumors, Verhaltensauffälligkeiten, Tumorkachexie) wurden die Mäuse getötet. Messwerte sind dargestellt als Mittelwerte + SEM (**** $p < 0{,}0001$, ns: nicht signifikant) und stehen repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Experimente.

3.3.3 Eine systemische Tumortherapie mit GM-CSF führt bei CCL22-Defizienz in einem murinen Melanommodell zu verlangsamten Tumorwachstum

Nachdem wir zeigen konnten, dass eine systemische GM-CSF-basierte Tumortherapie bei CCL22-Defizienz signifikante antitumorale Effekte im Panc02-OVA Tumormodell erzielt, interessierte uns, ob dieser Effekt tumormodell-spezifisch ist oder ob er auch auf andere Tumormodelle übertragbar ist. Exemplarisch verwendeten wir hierfür das B16-OVA-Tumormodell. Bei B16 handelt es sich um ein murines Melanommodell das normalerweise einen besonders aggressiven Verlauf zeigt und oft innerhalb von Tagen bis wenigen Wochen zum Tod der tumortragenden WT-Mäuse führt. Die Eradikation von B16 Tumoren ist selbst unter Verwendung potenter antitumoraler Immuntherapien außerordentlich schwierig und auf eine starke Aktivierung CD8+ T-Zellen angewiesen (Xiao et al. 2013).

In Analogie zu Abbildung 3.3.2 applizierten wir B16-OVA Tumorzellen in WT und *CCL22*$^{-/-}$ Mäuse, die innerhalb einiger Tage zu soliden subkutanen Tumoren heranwuchsen. Nach Erreichen einer durchschnittlichen Tumorgröße von 25 mm^2 initiierten wir die Therapie mit entweder GM-CSF oder PBS. Tatsächlich zeigte sich auch hier im Trend ein ähnliches Bild wie im Panc02-OVA-Modell (Abbildung 3.3.3). Sowohl unbehandelte als auch behandelte WT-Mäuse und unbehandelte *CCL22*$^{-/-}$ Mäuse zeigten ein vergleichbar schnelles Tumorwachstum, was nur wenige Wochen nach Versuchsstart zum Tod der Mäuse führte. Behandelte *CCL22*$^{-/-}$ Mäuse hingegen zeigten im Vergleich dazu ein signifikant verlangsamtes Tumorwachstum (Abbildung 3.3.3 A) sowie ein signifikant verlängertes Überleben (Abbildung 3.3.3 B).

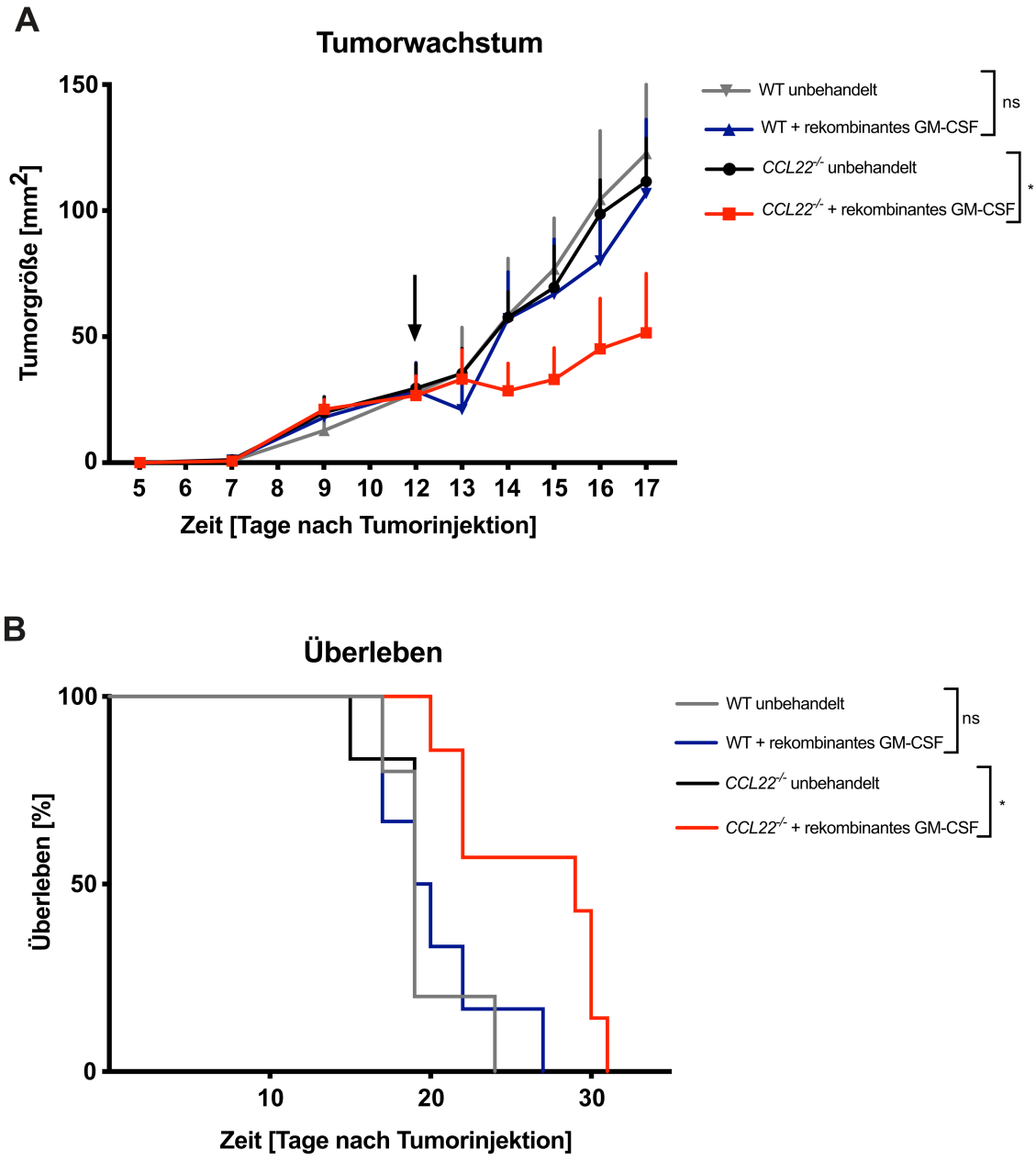

Abbildung 3.3.3: Tumorwachstum und Überleben GM-CSF behandelter B16-F10-OVA-tumortragender WT und *CCL22*$^{-/-}$ Mäuse (A, B) WT-Mäusen sowie in *CCL22*$^{-/-}$ Mäusen wurden subkutane Tumoren gesetzt, wobei 0,5 Mio. B16-F10-OVA-Zellen pro Maus injiziert wurden. Ab einer durchschnittlichen Tumorgröße von 25 mm^2 (Pfeil) wurden WT-Mäusen (n = 8) und CCL22$^{-/-}$ Mäusen (n = 8) zweimal pro Woche 0,5 µg GM-CSF subkutan und peritumoral appliziert. Als Kontrolle wurden je eine Gruppe tumortragender WT-Mäuse (n = 8) und CCL22$^{-/-}$ Mäuse (n = 8) mit PBS behandelt. (A) Tumorwachstum und (B) Überleben wurden über die Zeit bis zum Erreichen der Abbruchkriterien verfolgt. Die Größe der Tumoren wurden alle 2-3 Tage bestimmt und bei Erreichen der Abbruchkriterien (Tumorgröße > 225 mm^2, Exulzeration des Tumors, Verhaltensauffälligkeiten, Tumorkachexie) wurden die Mäuse getötet. Messwerte sind dargestellt als Mittelwerte + SEM (* $p < 0,01$, ns: nicht signifikant) und stehen repräsentativ für ein durchgeführtes Experiment.

3.3.4 Der Therapieeffekt der GM-CSF-basierten Tumortherapie bei CCL22-Defizienz ist abhängig von einem stark exprimierten Tumorantigen

In einem nächsten Schritt wollten wir der Frage nachgehen, wie der beobachtete therapeutische Effekt in *CCL22*$^{-/-}$ Mäusen zustande kommt. In diesem Zusammenhang sollte auch geklärt werden, ob das durch Panc02-OVA exprimierte Ovalbumin (OVA) Einfluss hat auf den beobachteten Effekt. Bei OVA handelt es sich um ein Glykoprotein aus Hühnereiweiß, das groß und komplex genug ist, um in der Maus immunogen zu wirken (Karandikar et al. 2019).

Um zu überprüfen ob OVA als stark exprimiertes Tumorantigen für den beobachteten Effekt notwendig ist, wiederholten wir den bereits in Abbildung 3.3.2 dargestellten Versuch mit dem Panc02 Tumormodell ohne OVA. Hierzu setzten wir WT und *CCL22*$^{-/-}$ Mäusen subkutane Panc02 Tumore. Ab einer durchschnittlichen Tumorgröße von etwa 25 mm^2 erhielten die Tiere eine Therapie mit GM-CSF oder PBS. In dem dargestellten Experiment zeigte sich kein Unterschied im Tumorwachstum oder Überleben der behandelten und unbehandelten WT-oder *CCL22*$^{-/-}$-Mäusen.

Der im Panc02-OVA Modell nachgewiesene Therapieeffekt durch GM-CSF in *CCL22*$^{-/-}$ Mäusen konnte somit in diesem Modell nicht bestätigt werden (Abbildung 3.3.4). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Wachstum der Tumore (Abbildung 3.3.4 A) oder im Überleben (Abbildung 3.3.4 B) der *CCL22*$^{-/-}$ Mäuse mit oder ohne GM-CSF Therapie. Der einzige Unterschied zwischen der Panc02 und der Panc02 OVA Zelllinie ist die Expression des OVA-Antigens. Es ist daher möglich, dass der synergistische Effekt von GM-CSF und CCL22-Defizienz von einem stark exprimierten Antigen abhängt.

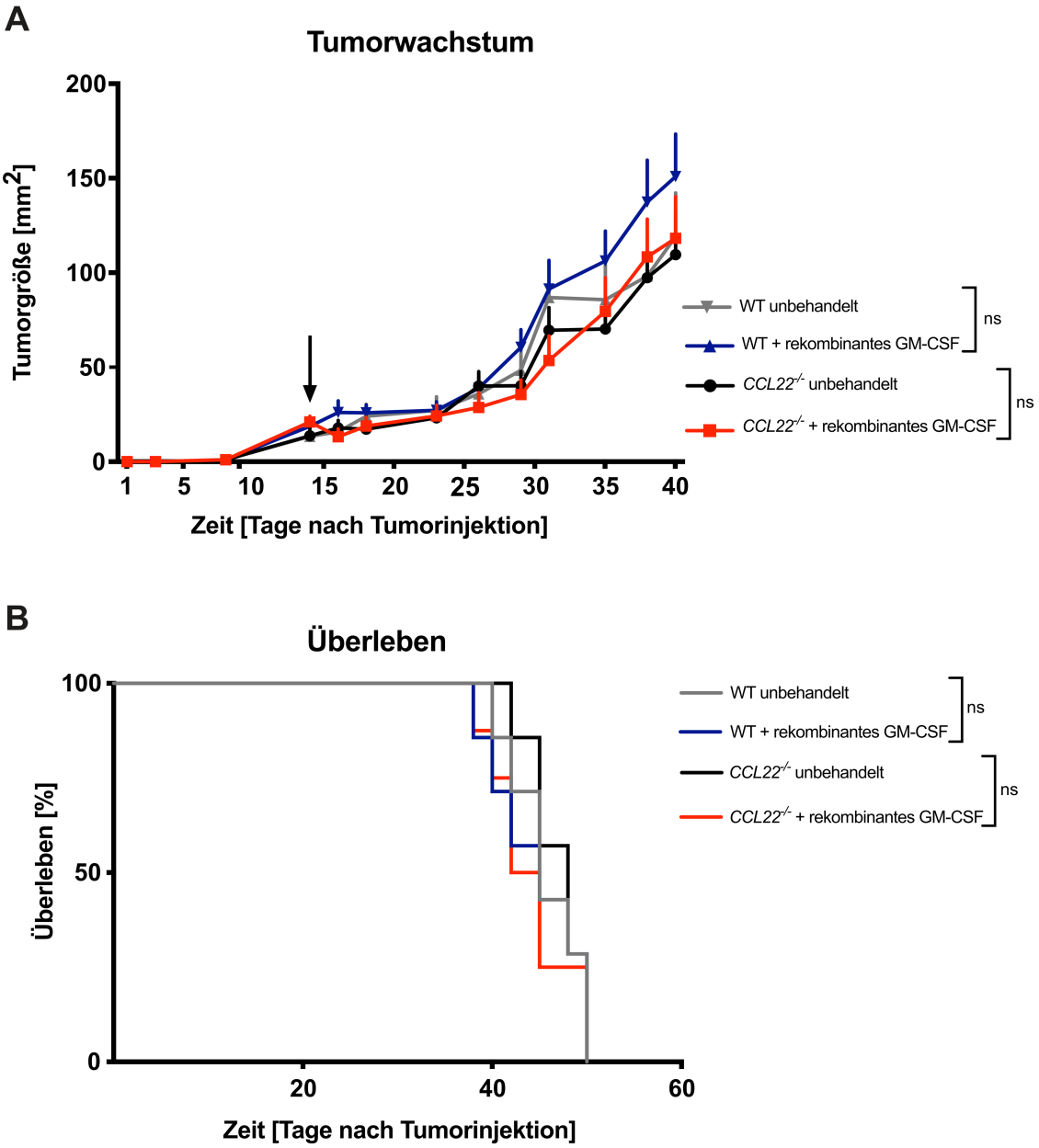

Abbildung 3.3.4: Tumorwachstum und Überleben GM-CSF behandelter Panc02-tumortragender WT und *CCL22*$^{-/-}$ Mäuse (A, B) WT-Mäusen sowie in *CCL22*$^{-/-}$ Mäusen wurden subkutane Tumoren gesetzt, wobei 2 Mio. Panc02-Zellen pro Maus injiziert wurden. Ab einer durchschnittlichen Tumorgröße von 25 mm^2 (Pfeil) wurden WT-Mäusen (n = 8) und CCL22$^{-/-}$ Mäusen (n = 8) zweimal pro Woche 0,5 µg GM-CSF subkutan und peritumoral appliziert. Als Kontrolle wurden je eine Gruppe tumortragender WT- (n = 8) und CCL22$^{-/-}$ Mäuse (n = 8) mit PBS behandelt. (A) Tumorwachstum und (B) Überleben wurden über die Zeit bis zum Erreichen der Abbruchkriterien verfolgt. Die Größe der Tumoren wurden alle 2-3 Tage bestimmt und bei Erreichen der Abbruchkriterien (Tumorgröße > 225 mm^2, Exulzeration des Tumors, Verhaltensauffälligkeiten, Tumorkachexie) wurden die Mäuse getötet. Messwerte sind dargestellt als Mittelwerte + SEM (ns: nicht signifikant) und stehen repräsentativ für zwei unabhängig durchgeführte Experimente.

3.3.5 Der Therapieeffekt der GM-CSF-basierte Tumortherapie bei CCL22-Defizienz wird durch CD8+ Zellen vermittelt

Bisher konnten wir zeigen, dass eine systemische GM-CSF-basierte Tumortherapie bei CCL22-Defizienz eine potente antitumorale Wirkung zeigt, wobei diese von einem stark exprimierten Tumorantigen abzuhängen scheint. Der deutlich tumorregressive Effekt in *CCL22*$^{-/-}$ Mäusen im Panc02-OVA Tumormodell ließ uns vermuten, dass hieran vor allem CD8+ T-Zellen beteiligt sein müssten, die die Tumorlyse letztlich vermitteln. Die Anwesenheit von ausreichend aktivierten CD8+ T-Zellen im Tumor ist in vielen Tumorentitäten mit einer guten Prognose vergesellschaftet (Kondratiev et al. 2004; Mahmoud et al. 2011; Schumacher et al. 2001; Sharma et al. 2017) vor allem wenn dadurch das Verhältnis von CD8+ T-Zellen zu Treg zu Gunsten der CD8+ T-Zellen verschoben wird (Huang et al. 2012; Sato et al. 2005; Shen et al. 2010; Suzuki et al. 2010). Die Abhängigkeit unseres beobachteten Therapieeffektes in Versuch 4.8 von CD8+ T-Zellen ist auch deshalb zu vermuten, da bei CCL22-Defizienz das DC-vermittelte Priming von T-Zellen verstärkt abläuft, was die Initiierung einer T-Zell-spezifischen antitumoralen Immunantwort erleichtern kann (Rapp et al. 2019). Um unsere Hypothese zu überprüfen, untersuchten wir, ob der Therapieeffekt in *CCL22*$^{-/-}$ Mäusen durch eine CD8-Depletion aufgehoben werden kann. Hierfür wurden *CCL22*$^{-/-}$ Mäusen subkutane Panc02-OVA-Tumore gesetzt. Nach Erreichen einer durchschnittlichen Tumorgröße von etwa 25 mm^2 wurden die Mäuse für das weitere Vorgehen in zwei Gruppen eingeteilt. Eine Gruppe erhielt im Anschluss einen CD8-depletierenden Antikörper injiziert, was sieben Tage später wiederholt wurde. Zwei Tage danach wurde die subkutane GM-CSF Therapie begonnen. Die Kontrollgruppe erhielt einen Isotyp-Antikörper in analoger Weise appliziert. Auch in dieser Gruppe erfolgte zwei Tage drauf die Initiierung der GM-CSF Therapie. Es zeigte sich, dass CCL22$^{-/-}$ Mäuse bei denen CD8+ Zellen depletiert wurden tatsächlich ein deutlich schlechteres Ansprechen auf die GM-CSF Therapie zeigten als nicht CD8-depletierte CCL22$^{-/-}$ Mäuse. Dies spiegelte sich sowohl in einem beschleunigten Tumorwachstum (Abbildung 3.3.5 A) als auch in einem verkürzten Überleben (Abbildung 3.3.5 B) der depletierten im Vergleich zu den nicht-depletierten Mäusen wider. Offenbar sind also CD8+ T-Zellen maßgeblich an dem GM-CSF induzierten antitumoralen Effekt unter CCL22-Defizienz beteiligt.

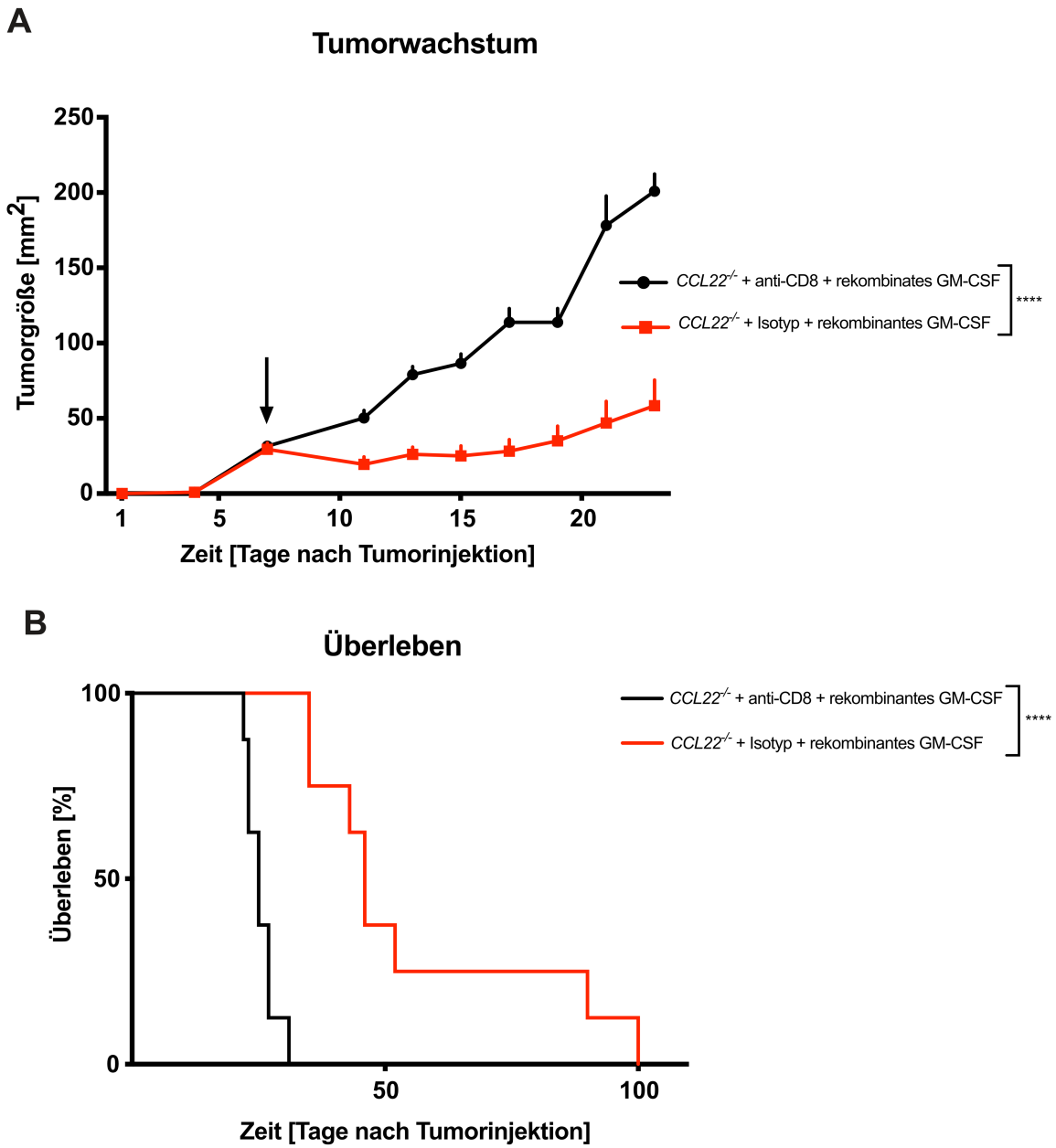

Abbildung 3.3.5: Tumorwachstum und Überleben mit GM-CSF und anti-CD8α Antikörpern behandelter Panc02-OVA-tumortragender WT und *CCL22*$^{-/-}$ Mäuse (A, B) *CCL22*$^{-/-}$ Mäusen wurden subkutane Tumoren gesetzt, wobei 2 Mio. Panc02-OVA-Zellen pro Maus injiziert wurden. Ab einer durchschnittlichen Tumorgröße von 25 mm^2 erhielt eine Gruppe *CCL22*$^{-/-}$ Mäuse (n = 8) zur Depletion CD8+ Zellen 500 µg eines anti-CD8 Antikörper gelöst in 100 µl PBS intraperitoneal appliziert. Kontrolltiere (n = 8) erhielten eine äquivalente Menge eines Isotyp-Antikörpers. Die CD8 Depletion wurde 7 Tage später in analoger Weise wiederholt. 2 Tage nach der ersten CD8-Depletion wurde die GM-CSF Therapie begonnen (Pfeil). Hierzu erhielten sowohl die CD8-depletierten Mäuse als auch die Kontrolltiere zweimal pro Woche 0,5 µg GM-CSF subkutan und peritumoral appliziert. (A) Tumorwachstum und (B) Überleben wurden über die Zeit bis zum Erreichen der Abbruchkriterien verfolgt. Die Größe der Tumoren wurden alle 2-3 Tage bestimmt und bei Erreichen der Abbruchkriterien (Tumorgröße > 225 mm^2, Exulzeration des Tumors, Verhaltensauffälligkeiten, Tumorkachexie) wurden die Mäuse getötet. Messwerte sind dargestellt als Mittelwerte + SEM (**** $p < 0{,}0001$) und stehen repräsentativ für ein durchgeführtes Experiment.

3.3.6 Eine GM-CSF-basierte Tumortherapie führt zu verzögertem Tumorwachstum und Verlängerung des Überlebens in *CCR4*$^{-/-}$ Mäusen

Nachdem wir im vorangegangenen Abschnitt zeigen konnten, dass unsere GM-CSF-basierte Tumortherapie erst bei Abwesenheit von CCL22 effektiv ist, stellte sich nun auch die Frage inwiefern diese Erkenntnis therapeutisch nutzbar zu machen ist. Um klinisch CCL22 zu antagonisieren, könnte man sich beispielsweise CCL22-neutralisierende Antikörper vorstellen. Jedoch gibt es bis heute weder eine klinische Indikation für den Einsatz CCL22-neutralisierender Antikörper noch einen kommerziell verfügbaren und für größere *in vivo* Experimente einsetzbaren CCL22-neutralisierender Antikörper. Im Gegensatz dazu gibt es für CCR4, den Rezeptor von CCL22, bereits kommerziell verfügbare blockierende Antikörper und Antagonisten, die auch teilweise bereits Einzug in den klinischen Alltag gefunden haben. So ist der monoklonale anti-CCR4 Antikörper Mogamulizumab bereits seit 2018 zugelassen für die Behandlung von Patienten mit den refraktären Sézary Syndorm oder Mycoides fungoides (beides T-Zell-Lymphome) (Agency 2022, April 28).

Wir wollten daher zunächst klären, ob die ein Fehlen von CCR4 ebenfalls den beobachteten therapeutischen Effekt zeigt wie eine CCL22-Defizienz. Hierfür verglichen wir analog zu Versuch 3.3.2 das Tumorwachstum von GM-CSF-behandelten WT-Mäusen mit GM-CSF-behandelten *CCR4*$^{-/-}$ Mäusen. Während WT-Mäuse wie zu erwarten nicht auf die GM-CSF-Therapie ansprachen, konnten wir bei *CCR4*$^{-/-}$ Mäusen ein signifikantes Therapieansprechen feststellen, was sich sowohl in einem signifikant verlangsamten Tumorwachstum (Abbildung 3.3.6 A) als auch in einem signifikant verlängertem Überleben (Abbildung 3.3.6 B) zeigte. Insgesamt sprechen tumortragende *CCR4*$^{-/-}$ Mäuse auf eine GM-CSF Therapie also ähnlich gut an wie *CCL22*$^{-/-}$-Mäuse.

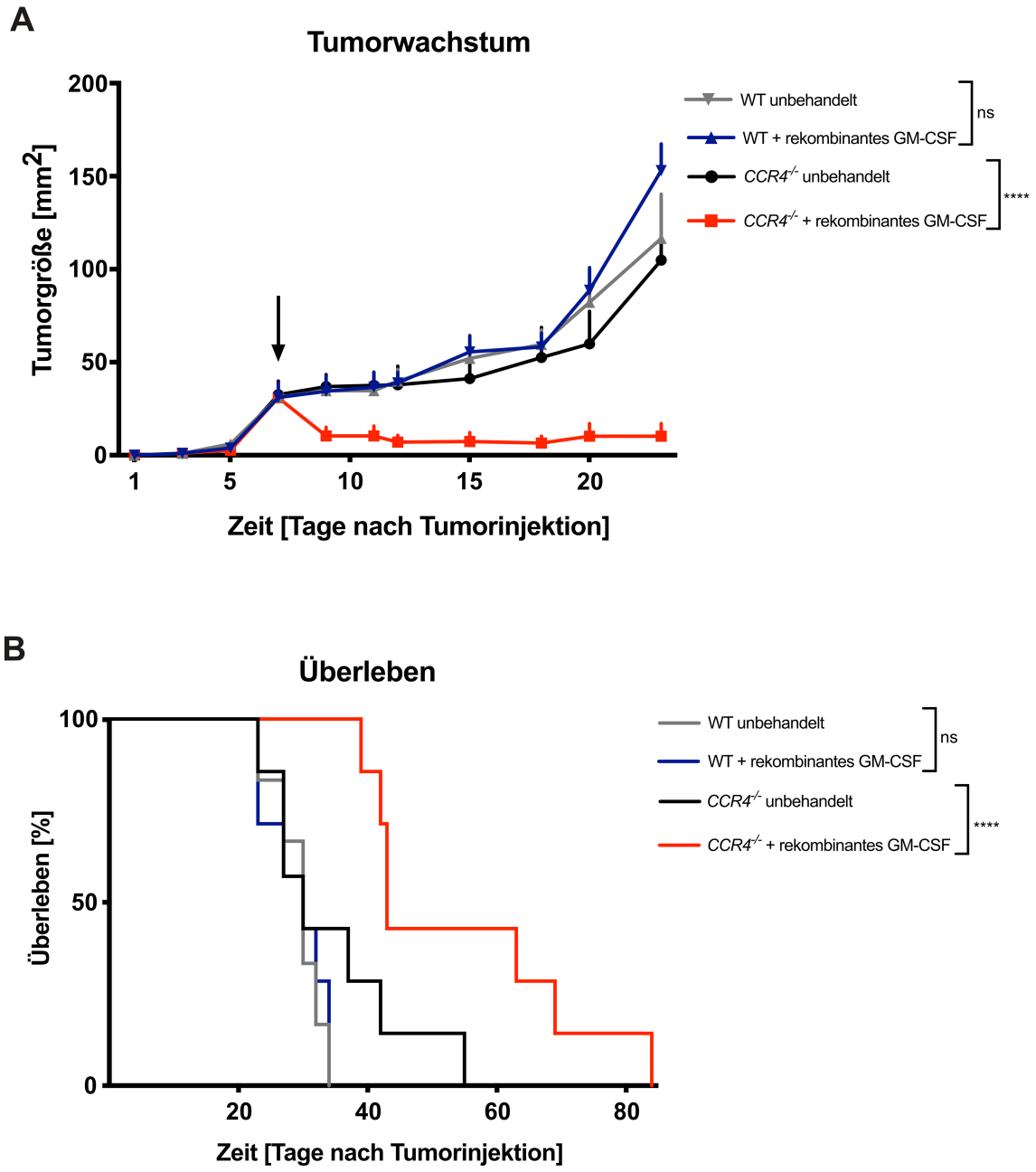

Abbildung 3.3.6 Tumorwachstum und Überleben GM-CSF behandelter Panc02-OVA-tumortragender WT und CCR4$^{-/-}$ Mäuse (A, B) WT-Mäusen sowie in *CCR4*$^{-/-}$ Mäusen wurden subkutane Tumoren gesetzt, wobei 2 Mio. Panc02-OVA-Zellen pro Maus injiziert wurden. Ab einer durchschnittlichen Tumorgröße von 25 mm^2 (Pfeil) wurden WT-Mäusen (n = 8) und *CCR4*$^{-/-}$ Mäusen (n = 8) zweimal pro Woche 0,5 µg GM-CSF subkutan und peritumoral appliziert. Als Kontrolle wurden je eine Gruppe tumortragender WT- (n = 8) und *CCR4*$^{-/-}$ Mäusen (n = 8) mit PBS behandelt. (A) Tumorwachstum und (B) Überleben wurden über die Zeit bis zum Erreichen der Abbruchkriterien verfolgt. Die Größe der Tumoren wurden alle 2-3 Tage bestimmt und bei Erreichen der Abbruchkriterien (Tumorgröße > 225 mm^2, Exulzeration des Tumors, Verhaltensauffälligkeiten, Tumorkachexie) wurden die Mäuse getötet. Messwerte sind dargestellt als Mittelwerte + SEM (**** p < 0,0001, ns: nicht signifikant) und stehen repräsentativ für ein durchgeführtes Experiment.

4 Diskussion

4.1 Die GM-CSF-CCL22-Achse in der Homöostase

4.1.1 GM-CSF aus T-Zellen vermittelt konstitutive CCL22-Expression in dendritischen Zellen

CCL22 wird konstitutiv in großen Mengen von DC in lymphoiden Organen exprimiert (Rapp et al. 2019; Schaniel et al. 1998; Tang and Cyster 1999). Konstitutiv exprimierte Chemokine erfüllen essenzielle Aufgaben im Organismus (Bachmann, Kopf, and Marsland 2006; Forster et al. 1999) und fungieren nicht nur als Mediatoren gerichteter Zellwanderung im Gewebe, sondern vermitteln oft auch lokal die Etablierung von Zell-Zell-Kontakten (Castellino et al. 2006; Rapp et al. 2016). Während viele konstitutiv exprimierte Chemokine wie CCL21 oder CXCL12 bereits detailliert charakterisiert worden sind, konnten wichtige Aspekte der Rolle von CCL22 in Homöostase erst kürzlich aufgeklärt werden. Es konnte gezeigt werden, dass CCL22 eine Schlüsselrolle einnimmt in der Kontrolle adaptiver T-Zell-Immunität (Rapp et al. 2019). Im Lymphknoten fördert CCL22 eine ausgeprägte Kontaktbildung zwischen DC und CCR4-exprimierenden Treg, was die Kontaktaufnahme von T-Effektorzellen mit DC wiederum limitiert (Rapp et al. 2019). DC-Treg Interaktionen sind dabei elementar für die Ausübung von Immunsuppression durch Treg (Misra et al. 2004; Onishi et al. 2008; Sakaguchi et al. 2009; Tang and Cyster 1999; Wing et al. 2008). Fehlt CCL22, so führt dies zu verstärkter T-Zell-Immunität was sich zum einen in einer robusten antitumoralen Immunität äußern kann, zum anderen aber auch in exzessiven und fehlgerichteten Immunantworten mit Neigung zu Autoimmunität (Rapp et al. 2019). Interessanterweise ist eine ausgesprochen hohe CCL22-Expression vor allem in CD103+CD8+ DC beschrieben worden, ein DC Subtyp, der für seine immunregulatorischen Eigenschaften bekannt ist (del Rio et al. 2010; Evers et al. 2016; Khare et al. 2013; Rapp et al. 2019; Scott, Aumeunier, and Mowat 2011), was wiederum die Rolle von CCL22 in der Immunkontrolle unterstreicht. Die Mechanismen, die zu dieser konstitutiven CCL22-Sekretion führen und damit letztlich Immunkontrolle mit unterhalten, waren bislang jedoch weitgehend ungeklärt.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden daher die Mechanismen dieser konstitutiven CCL22-Sekretion untersucht. Wir konnten dabei zunächst zeigen, dass frisch isolierte humane PBMC eine spontane und hohe CCL22-Sekretion *in vitro* aufweisen. Allerdings waren daraus isolierte DC nicht in der Lage CCL22 zu sezernieren (Abbildung 3.1.2 A).

Diese Beobachtung deckt sich auch mit Daten aus der Literatur, die zeigen, dass aus der Milz isolierte DC nur geringe Mengen an CCL22 sezernieren (Fujita et al. 2005). Jedoch sind DC eigentlich als die Hauptproduzenten von homöostatischem CCL22 in der Literatur beschrieben (Fujita et al. 2005; Katou et al. 2001; Onodera et al. 2009; Penna et al. 2002; Rapp et al. 2019; Tang and Cyster 1999). Diese scheinbare Diskrepanz haben wir daher näher untersucht. Wir konnten zum ersten Mal zeigen, dass humane DC für die konstitutive CCL22-Sekretion auf die Hilfe von T-Zellen angewiesen sind (Abbildung 3.1.2 B). Diese Beobachtung deckt sich auch mit Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe im murinen System (Piseddu et al. 2020). Insbesondere das von T-Zellen sezernierte GM-CSF induziert CCL22 in DC (Abbildung 4.5). Dies war zunächst überraschend, da GM-CSF bisher noch nicht in der Regulation von CCL22 beschrieben worden ist. Besonders interessant war dabei auch die Beobachtung, dass CCL22 in DC vor allem durch CD4+ T-Zellen induziert wird und nur zu einem geringeren Grad durch CD8+ T-Zellen (Abbildung 4.2 C). GM-CSF produzierende konventionelle T-Zellen scheinen also eine wichtige immunregulatorische Funktion auszuüben, bei der sie CCL22 in DC induzieren, was wiederum adaptive T-Zell-Immunität limitiert (Rapp et al. 2019), und damit immunsuppressiv zu wirken scheint.

4.1.2 Rekombinantes GM-CSF induziert CCL22 *in vivo*

Wir konnten darüber hinaus zeigen, dass die Gabe von rekombinantem GM-CSF die CCL22-Konzentrationen über das physiologische Maß hinaus weiter anheben kann (Abbildung 3.3.1). Dies ist insofern relevant, als dass GM-CSF bei bestimmten Erkrankungen immunsuppressive Funktionen zugeschrieben werden. Beispielsweise verhindert GM-CSF im Mausmodell sowohl die Entwicklung als auch das Fortschreiten einer Autoimmunthyreoiditis (Vasu et al. 2003), einer Myasthenia gravis (Sheng et al. 2006), einer Colitis (Xu, Hunt, and Bao 2008) sowie eines Typ I Diabetes mellitus (Gaudreau et al. 2007). Analog dazu führt die Gabe von rekombinantem GM-CSF bei Patienten mit Morbus Crohn, einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung, zu einer deutlichen Reduktion der Krankheitsaktivität sowie zu einem verminderten Bedarf an Kortikosteroiden (Dieckgraefe and Korzenik 2002; Korzenik et al. 2005; Valentine et al. 2009). Es ist durchaus denkbar, dass GM-CSF durch Induktion von CCL22 in diesen Erkrankungen immunsuppressiv wirkt, wobei hier jedoch weitere Untersuchungen nötig sind.

Allerdings wurden GM-CSF gerade bei entzündlichen Prozessen auch potente proinflammatorische Effekte zugeschrieben. So führte in klinischen Studien die Gabe des GM-CSF-Rezeptor Antagonisten Mavrilimumab oder des GM-CSF Inhibitors MOR103 zu einer signifikanten klinischen Verbesserung von Patienten mit rheumatoider Arthritis

(Behrens et al. 2015; Burmester et al. 2017; Dieckgraefe and Korzenik 2002; Korzenik et al. 2005; Valentine et al. 2009). In einer Follow-up-Studie war das Ansprechen auf Mavrilimumab in Kombination mit Methotrexat sogar vergleichbar mit der des *anti-tumor necrosis* (TNF)-α Antikörpers Golimumab (Burmester et al. 2018). Die genauen Mechanismen dieser divergierenden Wirkungen von GM-CSF in der Regulation inflammatorischer und autoimmuner Erkrankungen sind bisher nur unvollständig verstanden. Es wäre interessant zu untersuchen, welche Rolle die hier identifizierte GM-CSF-CCL22-Achse in den verschiedenen Pathologien einnimmt und inwiefern daraus therapeutischer Nutzen gezogen werden kann. Die pleiotropen Effekte von GM-CSF scheinen aber auch in der Tumorbiologie eine wichtige Rolle zu spielen, wobei sowohl antitumorale als auch tumorprogressive Effekte beschrieben worden sind. In der vorliegenden Arbeit wurde im Besonderen die Rolle der GM-CSF-CCL22 im Tumor näher untersucht.

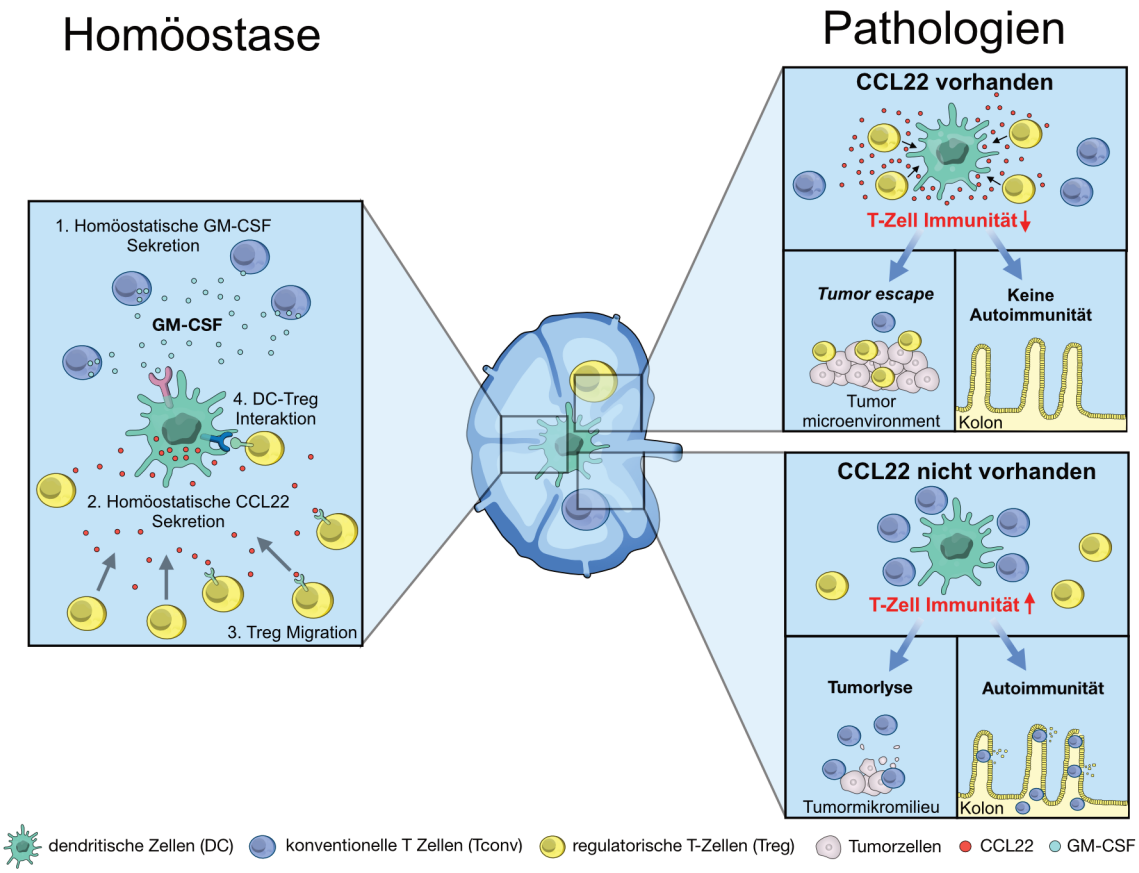

Abbildung 4.1.2: CCL22 Regulation (links) Von T-Zellen sezerniertes GM-CSF vermittelt in dendritischen Zellen (DC) die Expression von CCL22. Das Chemokin CCL22 wiederum fördert die Kontaktbildung von regulatorischen T-Zellen (Treg) mit DC. (rechts) Eine CCL22-vemittelte Kontaktaufnahme zwischen Treg und DC kontrolliert T-Zell Immunität im Lymphknoten und trägt zur Verhinderung von Autoimmunität bei, aber auch zu einer verminderten Tumorkontrolle durch das Immunsystem. Modifiziert nach (Rohrle, Knott, and Anz 2020).

4.2 Die GM-CSF-CCL22-Achse im Tumor

4.2.1 GM-CSF-basierte Tumorimmuntherapien

Das Zytokin GM-CSF wird nicht nur in der Tumorbiologie, sondern auch im Rahmen von Tumorimmuntherapien viel und kontrovers diskutiert, wobei es hier oft als zweischneidiges Schwert dargestellt wird. Eine besondere Herausforderung besteht darin, die durch GM-CSF vermittelten antitumoralen Effekte klinisch nutzbar zu machen, bei gleichzeitiger Minimierung der GM-CSF-provozierten tumorprogressiven Effekte (Bhattacharya et al. 2015; Hong 2016; Serafini et al. 2004; Yan et al. 2017).

Die Eigenschaft von GM-CSF myeloide Vorläuferzellen zur Proliferation anzuregen, führte in den 90er-Jahren des 20. Jahrhunderts zur Zulassung von rekombinantem GM-CSF für die hämatopoetische Rekonstitution nach Stammzelltransplantation oder Hochdosischemotherapie (Nemunaitis 1997). Neben seiner Rolle als hämatopoetischer Wachstumsfaktor erwies sich GM-CSF jedoch nach und nach auch als bedeutsamer Mediator von Proliferation, Differenzierung und Aktivierung von Monozyten, DC, Makrophagen und Natürliche Killer T-Zellen (Gillessen et al. 2003; Hamilton 2008; Mach et al. 2000; McKenna 2001). Interessanterweise wurde dabei beobachtet, dass mit GM-CSF stimulierte Monozyten und Makrophagen potente antitumorale zytotoxische Effekte zeigten (Grabstein et al. 1986; Wing et al. 2008). Das wird zumindestens teilweise auf die Stimulation antigenpräsentierender DC durch GM-CSF zurückgeführt, die dadurch eine T-Zell-basierte Immunantwort gegen den Tumor induzieren ((Gillessen et al. 2003; Hamilton 2008; Mach et al. 2000; McKenna 2001), (Dranoff et al. 1993). Im Hinblick auf das antitumorale Potenzial von GM-CSF, führt GM-CSF als Bestandteil eines Fusionsproteins mit dem Prostata-spezifischem Antigen (PSA) tatsächlich auch zu einer potenten DC-Stimulation mit Induktion einer antitumoralen Immunantwort im Prostatakarzinom. Dadurch konnte das mediane Gesamtüberleben von Patienten mit refraktären und metastasiertem Prostatakarzinom signifikant verlängert werden, was 2010 zur Zulassung dieser Tumorvakzine führte, die unter Namen Sipuleucel-T vermarktet wird (Kantoff et al. 2010). Ein weiteres Beispiel einer erfolgreichen klinischen Implementierung einer GM-CSF-basierten Tumorvakzine stellt Talimogene laherparepvec (T-VEC) dar- ein genmodifiziertes und GM-CSF produzierendes onkolytisches Herpes Virus, welches als intratumorale Injektion zur Behandlung nicht operabler metastasierter Melanomläsionen zugelassen ist (Andtbacka et al. 2015). Eingesetzt als Monotherapie ist T-VEC zwar nur schwach wirksam,

jedoch in Kombination mit anderen Immuntherapeutika wie dem CTLA-4 Inhibitoren Ipilimumab konnten bedeutsame synergistische Therapieeffekte verzeichnet werden (Puzanov et al. 2016).

Darüber hinaus wird auch die Tumorvakzine GVAX (*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene-transfected tumor cell vaccine*) in vielen Tumorentitäten intensiv untersucht. Das Prinzip dieser GM-CSF-überexprimierenden Tumorzellvakzine besteht darin, dass vom Patienten entnommene und anschließend *ex vivo* bestrahlte Tumorzellen nicht nur als Antigenquelle für DC dienen, sondern gleichzeitig durch genetische Modifikation auch große Mengen GM-CSF bereitstellen, was bei Re-Injektion in den Patienten eine starke antitumorale Immunantwort induzieren soll, unter anderem durch Rekrutierung und Aktivierung von DC (Chang et al. 2000; Simons et al. 1997; Soiffer et al. 1998). Selbst in besonders aggressiven Tumormodellen wie dem B16 Melanommodell, führt eine GVAX-Therapie dann in der Maus zu einer potenten und langanhaltenden antitumoralen Immunantwort (Dranoff et al. 1993). Diese vielversprechenden präklinischen Daten veranlassten dann auch zur Evaluierung von GVAX im Menschen. Initial konnten tatsächlich einige Erfolge vor allem in Phase I und II Studien verzeichnet werden, hierunter bei der chronischen myeloischen Leukämie (CML) (Smith et al. 2010), im Melanom (Lipson et al. 2015; Luiten et al. 2005) sowie im Nierenzell- (Simons et al. 1997), Prostata- (Simons et al. 1999), Lungen- (Nemunaitis et al. 2004) und Pankreaskarzinom (Jaffee et al. 2001). Allerdings wiesen auch einige große Phase III Studien verstärkt auf tolerogene und immunsuppressive Effekte von GM-CSF hin, die sich unter Umständen sogar insgesamt als schädlich erweisen könnten. So gibt es bis heute keine einzige erfolgreiche Phase III Studie zu GVAX (Yan et al. 2017). Die Applikation vor allem hoher Dosen GM-CSF führte in einigen Untersuchungen zur Expansion immunsuppressiver Zellpopulationen wie Treg und MDSC, was eine spezifisch tumorgerichtete Effektor-T-Zell-Antwort deutlich erschwert (Bronte et al. 1999; Dufait et al. 2015; Jinushi et al. 2007; Morales et al. 2010). Die tolerogenen durch GM-CSF vermittelten Effekte sind derzeit Gegenstand intensiver Untersuchungen. Die von uns erstmals beschriebene CCL22-Induktion durch GM-CSF könnte dabei ein weiterer Schlüsselmechanismus der GM-CSF-vermittelten Immunsuppression im Tumor darstellen.

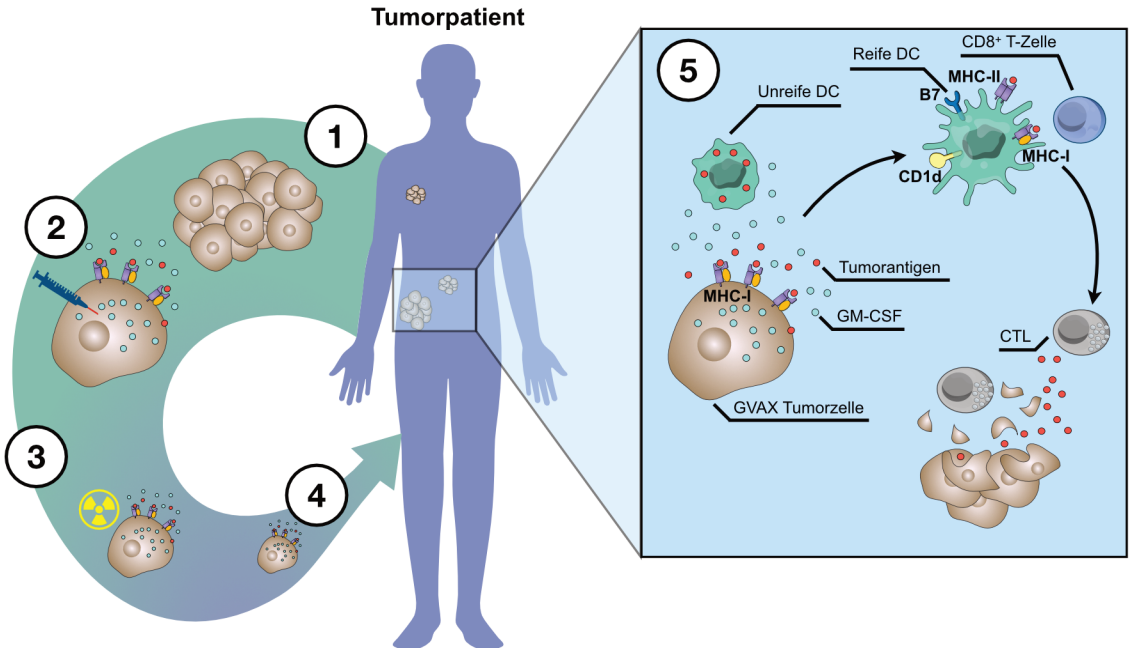

Abbildung 4.2.1: Therapiestrategie GVAX (*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene-transfected tumor cell vaccine*) (1) Entnahme von Tumorgewebe aus dem Patienten. (2) Genetische Modifikation der Tumorzellen *ex vivo*, sodass die Tumorzellen GM-CSF überexprimieren. (3) Radioaktive Bestrahlung der genetisch modifizierten Tumorzellen zur Proliferationshemmung. (4) Reinjektion der veränderten Tumorzellen in den Patienten. (5) Genetisch veränderte Tumorzellen (GVAX-Tumorzellen) teilen sich im Patienten nicht mehr, sezernieren aber noch für einige Tage GM-CSF. Dendritische Zellen (DC) nehmen Tumorantigene auf und reifen unter dem Einfluss von GM-CSF. Reife DC präsentieren die Tumorantigene an zytotoxische CD8+ T-Zellen und aktivieren diese. Aktivierte zytotoxische T-Zellen (CTL) erkennen und lysieren Tumorzellen des Primärtumors sowie von Metastasen.

4.2.2 Eine GM-CSF-basierte Tumorimmuntherapie wirkt in Abwesenheit von CCL22 stark antitumoral

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente konnten zeigen, dass GM-CSF potent CCL22 induziert, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Diese Induktion zeigte sich dabei nicht nur in der Maus, sondern auch im Menschen (Abbildung 3.6 und 3.7). CCL22 wiederum führt zur Migration von CCR4-exprimierenden Treg, sowohl in Homöostase als auch im Tumor (Anz et al. 2015; Curiel et al. 2004; Rapp et al. 2019). Eine erhöhte CCL22-Expression im Tumor konnte bereits für verschiedene Tumorentitäten nachgewiesen werden, was oft mit einer Akkumulation von Treg und einer schlechten Prognose vergesellschaftet war (Gobert et al. 2009; Li et al. 2013; Mizukami et al. 2008; Yang et al. 2012). Wir konnten zeigen, dass die GM-CSF vermittelte CCL22-Induktion auch bei Tumoren ein effizienter immunsuppressiver Mechanismus sein könnte. Während die Gabe einer subkutanen GM-CSF-Therapie in Panc02-OVA tragenden WT-Mäusen zu

keiner Tumorreduktion führte, induzierte die Therapie in *CCL22*$^{-/-}$ Mäusen potente tumorregressive Effekte, was sich auch in einem verlängerten Überleben der Mäuse widerspiegelte (Abbildung 3.3.2). Jedoch kam es einige Wochen nach Initiierung der Therapie auch in den CCL22$^{-/-}$ Mäusen wieder zu einem gesteigertem Tumorwachstum (Daten nicht gezeigt). Es ist von größtem Interesse herauszufinden, welche Mechanismen zum Nachlassen des therapeutischen Effektes führen. Dabei ist es durchaus denkbar, dass Modifikationen des Therapieregimes die Therapie insgesamt effektiver gestalten könnten. Beispielsweise könnte sich eine Umspritzung des Tumors mit GM-CSF als vorteilhafter herausstellen als die in dieser Arbeit durchgeführte peritumorale Injektion, welche begrenzt war auf nur eine Seite des Tumors. Für Zytokin-basierte Tumorvakzine konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass multiple Injektionsstellen zur Applikation der Vakzine den antitumoralen Therapieeffekt deutlich verstärken können (Jaffee et al. 1996). Mit dieser Technik soll vor allem das T-Zell-Priming verbessert werden, welches durch diese Injektionstechnik in multiplen tumor-drainierenden Lymphknotenstationen ablaufen soll. Dies soll letztlich dazu dienen die Anzahl aktivierter und tumor-spezifischer T-Zellen zu erhöhen (Jaffee et al. 1996). Es wird vermutet, dass naive T-Zellen in den jeweiligen Lymphknotenstationen eine limitierte Spezifität für Tumorantigene aufweisen. Die Erhöhung der Injektionsstellen könnte deshalb die Wahrscheinlichkeit erhöhen, dass T-Zellen gegen ein größeres Spektrum an Tumorantigenen lizensiert werden, was insgesamt die T-Zell-vermittelte antitumorale Immunantwort erhöhen könnte (Borrello and Pardoll 2002).

Darüber hinaus spielt bei GM-CSF-basierten Tumorimmuntherapien auch die applizierte Dosis eine wichtige Rolle und stellt in gewisser Hinsicht eine Gratwanderung dar zwischen Induktion antitumoraler auf der einen und dem Auftreten tumorprogressiver Effekte auf der anderen Seite. Um mit GVAX eine antitumoralen Immunantwort induzieren zu können ist eine minimale Dosis von etwa 40 ng/10^6 Tumorzellen/24h nötig (Hege, Jooss, and Pardoll 2006). Während eine Dosis von 300 ng/10^6 Tumorzellen/24h noch effektiv zu sein scheint, führt eine Dosis über 1500 ng/10^6 Tumorzellen/24h schon früh nach Vakzinierung zu einer massiven Rekrutierung von MDSC in den Tumor mit nachfolgender Immunsuppression (Serafini et al. 2004). Auch nach subkutaner oder intradermaler Applikation von GM-CSF scheinen die von GM-CSF vermittelten Effekte dosisabhängig zu sein. So führte in klinischen Studien die Applikation von als „niedrig“ klassifizierten Dosen GM-CSF (40 – 80 µg/Injektion) tendenziell zu einer verstärkten antitumoralen Immunantwort (Gjertsen et al. 2001; Scheibenbogen et al. 2000; Ullenhag et al. 2003), während höhere Dosen (100 – 500 µg/Injektion) deutlich weniger immunstimulierend wirkten und zum Teil sogar mit einer

schlechteren Prognose vergesellschaftet waren (Dillman et al. 2003; Marshall et al. 2005; Ramanathan et al. 2002).

Gerade die GM-CSF-induzierte Rekrutierung von MDSC könnte auch in unserem Modell daher durchaus eine nicht unerhebliche Rolle spielen und den Therapieeffekt im Langzeitverlauf begrenzen. Daten verschiedener Autoren deuten darauf hin, dass in Mäusen die lokale Administration von GM-CSF zwar normalerweise zu einer verstärkten Immunreaktion führt, sobald jedoch dauerhaft hohe systemische GM-CSF Spiegel erreicht werden, führt dies zur verstärkten Produktion und Mobilisierung von MDSC aus dem Knochenmark (Reali et al. 2005; Serafini et al. 2004). Dieser Mechanismus könnte ein Grund sein, warum es auch bei uns in einigen GM-CSF behandelten tumortragenden *CCL22*$^{-/-}$ Mäuse nach zwar initial gutem Ansprechen einige Zeit später zu einem Tumorprogress kam.

Die genauen, in unserem Modell zugrundeliegenden Mechanismen, müssen jedoch in weiteren Untersuchungen aufgeklärt werden mit dem Ziel der möglichst vollständigen Ausschöpfung des Therapieeffekts. Interessant wäre es auch zu untersuchen, ob eine zusätzliche Immunstimulation die Effizienz unserer Therapie zu verbessern vermag. So sollte GM-CSF beispielsweise in Form einer GXAV-Therapie in CCL22-defizienten Mäusen untersucht werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass die durch Bestrahlung der Tumorzellen induzierte Apoptose zu einer starken zusätzlichen Immunstimulation führt, welche mitverantwortlich ist für den in GVAX-Therapien oft beobachteten potenten antitumoralen Effekt (Scheffer et al. 2003). Es ist durchaus vorstellbar, dass sich unsere GM-CSF-basierte Tumortherapie durch die Anwendung als GVAX bei simultaner Ausschaltung der CCL22-CCR4-Achse wesentlich optimieren lässt und sollte daher weiter untersucht werden.

Bedeutsam in unserem Model ist allerdings die Tatsache, dass eine Tumorregression in *CCL22*$^{-/-}$ Mäusen eben schon durch eine systemische Therapie mit GM-CSF zu erreichen war und gerade nicht auf einen zusätzlichen immunologischen Boost durch den Einsatz einer Vakzine angewiesen war. Dies ist insofern bemerkenswert da eine systemische Vakzin-freie GM-CSF Gabe in klinischen Phase III Studien bisher noch keine signifikanten antitumoralen Effekte zeigte (Yan et al. 2017). Erwähnenswert ist zudem, dass wir die GM-CSF Therapie erst bei gut tastbaren Tumoren initiiert haben mit dem Ziel das Anwachsen der Tumore durch die Therapie nicht zu beeinflussen. Im Gegensatz dazu wird eine GVAX-Therapie im Mausmodell standardmäßig bereits sehr früh an Tag 3-4 nach Tumorzellinokulation begonnen (Dranoff et al. 1993; Leao et al. 2008; Soares et al. 2015).

In diesem Stadium sind die Tumore oft nur marginal zu tasten. Der potente therapeutische Effekt von GVAX-Therapien im Mausmodell könnte unter Umständen zumindestens teilweise auch durch den sehr frühen Therapiebeginn zu erklären sein. Es ist durchaus vorstellbar, dass ein früherer Therapiebeginn auch in unserem Modell die Effektivität der systemischen GM-CSF Therapie deutlich verbessern könnte.

Von Bedeutung ist darüber hinaus der beobachtete therapeutische Effekt in einem weiteren Tumormodell. So konnten wir den Effekt nicht nur im Panc02-OVA-Tumormodell zeigen, sondern im Trend auch im B16-OVA-Tumormodell, einem besonders aggressiven Tumor (Abbildung 3.3.3). Dies liefert erste Hinweise darauf, dass eine GM-CSF-basierte Tumortherapie bei Abwesenheit von CCL22 möglicherweise eine Therapiestrategie darstellt, die unabhängig von der zugrundeliegenden Tumorentität anwendbar ist. Die Übertragbarkeit des erarbeiteten GM-CSF-basierten Therapieregimes ist jedoch aktuell noch am ehesten als Hypothese zu verstehen, die zwar durch die bisher durchgeführten Untersuchungen gestützt wird, deren Beweis jedoch noch aussteht, und wofür prospektiv vor allem die Untersuchung in weiteren Tumormodellen nötig ist.

Überraschenderweise mussten wir jedoch feststellen, dass der therapeutische Effekt von GM-CSF in *CCL22*$^{-/-}$ Mäusen im Panc02 Tumormodell ohne OVA ausblieb (Abbildung 3.3.4). Ein stark exprimiertes Tumorantigen scheint gewissermaßen eine Voraussetzung zu sein, um nach GM-CSF Applikation eine effektive Immunantwort gegen den Tumor initiieren zu können. Diese Vermutung wird auch dadurch unterstützt, dass der von uns beobachtete Therapieeffekt maßgeblich von CD8+ Zellen abhängig zu sein scheint (Abbildung 3.3.5). Für ein effizientes Priming CD8+T-Zellen, die letztlich die antitumorale Immunantwort exekutieren, ist es von größter Wichtigkeit, dass DC zuvor durch die Darbietung immunogener Tumorantigene ausreichend stimuliert werden. Mit GM-CSF stimulierte DC zeichnen sich dabei durch ein besonders ausgeprägtes Potenzial zur Phagozytose apoptotischer Tumorzellen aus, sowie durch eine prominente Expression der kostimulierenden Moleküle CD80 und CD86 (Murtaza, Kuchroo, and Freeman 1999). Briseno et al. beobachteten in diesem Zusammenhang eine durch GM-CSF induzierte Differenzierung von Monozyten in CD11b^{+} monozytäre DC (moDC), ein DC-Subtyp, der sich durch hohe phagozytische Aktivität und eine effiziente Kreuzpräsentation auszeichnet (Briseno et al. 2016). Diese Merkmale verstärken das Priming von CD8+ T-Zellen (Goyal et al. 2018). Mechanistisch führte GM-CSF hier zu einer gesteigerten Expression von PPARγ, was die Reifung der moDC förderte (Goyal et al. 2018). Effizientes T-Zell-Priming wird auch durch die GM-CSF-vermittelte Induktion kostimulatorischer Moleküle wie B7 und CD1d auf

DC unterstützt (Gillessen et al. 2003; Mach et al. 2000), was letztlich die Initiierung einer systemischen antitumoralen Immunantwort ermöglicht. Die ausbleibende Induktion des Chemokins CCL22 durch GM-CSF in *CCL22*$^{-/-}$ Mäusen führt möglicherweise zu einem verstärkten Priming zytotoxischer T-Zellen, was den von uns beobachteten Therapieeffekt im Panc02-OVA Modell erklären würde. In diesem Zusammenhang sollte jedoch auch geklärt werden, ob andere immunogene Tumorantigene, wie beispielsweise *Epithelial cell adhesion molecule* (EpCAM), in der Lage sind eine ähnlich potente Immunantwort gegen den Tumor auszulösen.

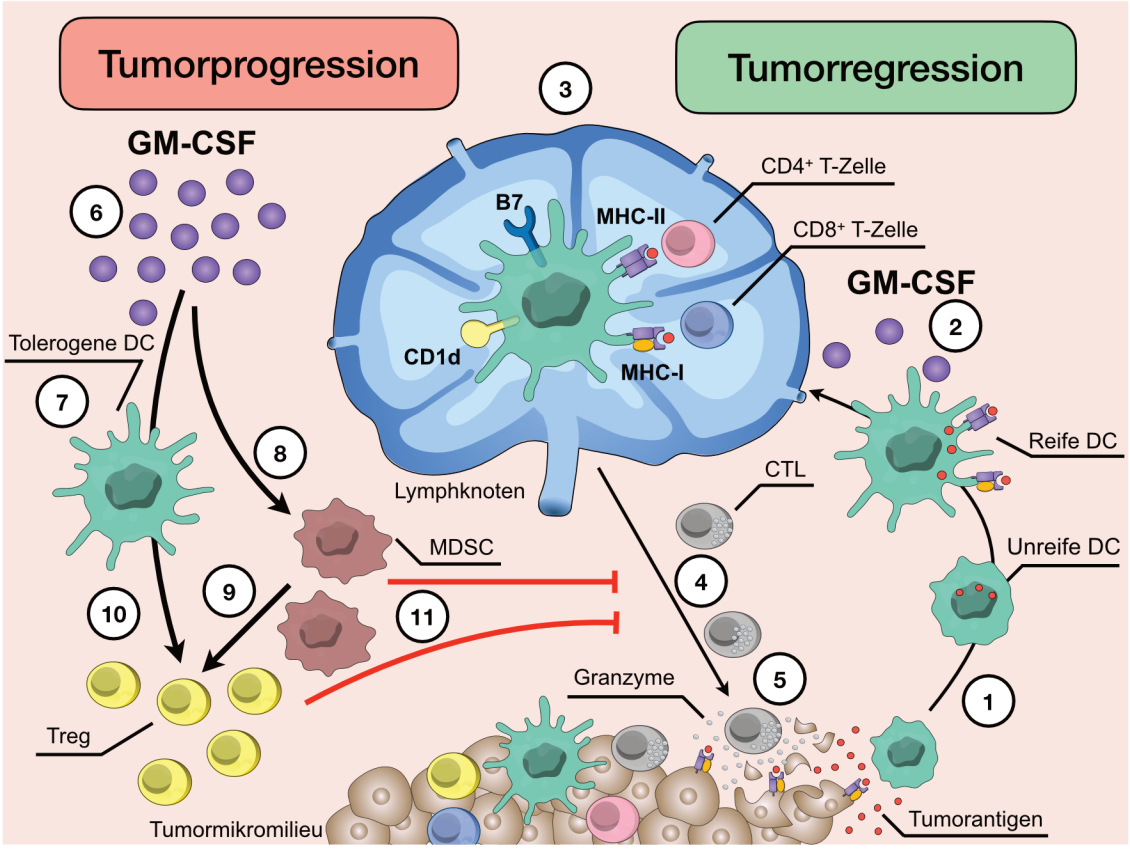

Abbildung 4.2.2: GM-CSF-vermittelte tumorprogressive und -regressive Effekte (1) Aufnahme von Tumorantigenen durch tumorinfiltrierende unreife dendritische Zellen (DC). (2) Reifung der DC durch GM-CSF mit Hochregulation von MHC-Molekülen und den kostimulatorischen Markern B7 und CD1d. (3) Antigenpräsentation durch DC an T-Zellen im tumordrainierenden Lymphknoten. (4) Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen (CTL) und Migration der CTL in den Tumor. (5) Tumorlyse durch CTL. (6) Induktion tolerogener DC durch hohe Mengen an GM-CSF. (7) Induktion von *Myeloid-derived suppressor cells* (MDSC) durch GM-CSF.

4.2.3 Eine GM-CSF-basierte Tumorimmuntherapie wirkt in Abwesenheit von CCR4 stark antitumoral

Wir konnte im Rahmen dieser Arbeit zeigen, dass die GM-CSF-CCL22-Achse nicht nur in der Homöostase, sondern auch bei malignen Tumoren, in Form einer GM-CSF-basierten Tumorimmuntherapie eine grundlegende Rolle spielt. So scheint die GM-CSF-vermittelte Induktion von CCL22 immunsuppressive Signalwege zu induzieren, wodurch antitumorale Effekte offenbar konterkariert werden. Da CCL22 vor allem CCR4-exprimierende Treg rekrutiert, ist zu vermuten, dass GM-CSF dadurch Treg auch verstärkt in den Tumor lockt. CCL22-vermittelte Treg-Migration könnte auf der anderen Seite jedoch auch im drainierenden Lymphknoten das T-Zell-Priming negativ beeinflussen durch verstärkte Kontaktaufnahme mit antigenpräsentierenden DC. Eine Blockade von CCL22 und damit letztlich von gerichteter Treg-Migration könnte deshalb die Effizienz einer GM-CSF-basierten Tumorimmuntherapie deutlich verbessern. Diese Vermutung wird auch durch verschiedene Untersuchungen aus der Literatur untermauert, die zeigen, dass eine GM-CSF-basierte Tumorimmuntherapie durch Depletion oder Modulation von Treg bedeutend verbessert werden konnte (Hodi et al. 2014; Liang et al. 2013; van Elsas, Hurwitz, and Allison 1999; van Elsas et al. 2001). Da Treg-depletierende Therapien jedoch nicht nur tumorinfiltrierende Treg depletieren, sondern häufig den gesamten Treg-Pool dezimieren, ist dies oft assoziiert mit nicht unerheblichen Kollateralschäden im Sinne prominenter autoimmuner Phänomene (Attia et al. 2005; Kapadia and Fong 2005). Eine pharmakologische Modulation Treg-assoziierter Immunsuppression könnte daher eine interessante Alternative zur Treg-Depletion sein.

Speziell die Treg-rekrutierende CCL22-CCR4-Achse könnte sich hierfür besonders gut eignen. Bisher sind CCL22 neutralisierende Antikörper jedoch noch nicht in klinischer Anwendung. Wir konnten im Rahmen dieser Arbeit zeigen, dass eine Blockade von CCR4 ein ähnlich großes Potenzial aufweist, eine GM-CSF-basierte Tumorimmuntherapie zu verbessern. Die Applikation von GM-CSF in tumortragenden *CCR4*$^{-/-}$ Mäusen führte in unseren Experimenten zu einer ähnlich eindrücklichen Tumorregression wie in *CCL22*$^{-/-}$ Mäusen. Um eine Kombinationstherapie aus GM-CSF und CCR4-Blockade für eine potenziell klinische Anwendung bei Tumoren praktisch durchführen zu können, sollten zukünftige Experimente vor allem darauf abzielen, CCR4 durch Antikörper oder *small molecule* Antagonisten in WT-Mäusen ausreichend zu blockieren und dies mit GM-CSF im Rahmen einer Tumortherapie zu kombinieren. Dies ist von größtem Interesse, da CCR4-

neutralisierende Antikörper sowie *Small molecules* bereits kommerziell verfügbar sind und für einige Indikationen auch klinisch zugelassen sind. Mogamulizumab war der erste 2018 von der FDA und EMA zugelassene anti-CCR4-Antikörper, der die Migration CCR4-positiver maligner Lymphozyten verhindert und gleichzeitig durch *Antibody-dependent cellular cytotoxicity* (ADCC) zu deren Depletion führt (Ollila, Sahin, and Olszewski 2019). CCR4-blockierende Antikörper ohne ADCC oder aber auch *Small molecules* führen zur Inhibierung der Treg-Migration, ohne gleichzeitig zu deren Depletion zu führen (Sugiyama et al. 2013). Hierzu wurden bereits vielversprechende präklinische Daten veröffentlicht (Ketcham, Marshall, and Talay 2018; Kindon et al. 2017; Pere et al. 2011), welche derzeit in klinischen Studien untersucht werden (Jackson et al. 2019; Cinier et al. 2021). Ein wichtiger nächster Schritt ist es daher zu untersuchen, ob eine Kombinationstherapie aus anti-CCR4-Antikörper oder -Antagonist mit GM-CSF in WT-Mäusen den Phänotyp von $CCR4^{-/-}$ Mäusen erreichen kann.

5 Zusammenfassung

Das Chemokin CCL22 wird von dendritischen Zellen im Lymphknoten in großen Mengen und konstitutiv exprimiert. CCL22 stellt dabei einen wichtigen immunologischen Checkpoint dar, der das Ausmaß adaptiver T-Zell-Antworten kontrolliert (Rapp et al. 2019). Die Mechanismen, die unter homöostatischen Bedingungen zur CCL22-Sekretion führen, sowie deren biologische Relevanz waren bisher jedoch noch weitgehend unverstanden. Es war Ziel der vorliegenden Arbeit die Mechanismen, die zur konstitutiven CCL22-Sekretion beitragen, aufzuklären und diese auf deren klinische Relevanz hin zu untersuchen.

Mit dieser Arbeit konnten wir erstmals zeigen, dass humane dendritische Zellen erst durch die Anwesenheit von CD4+ T-Zellen in der Lage sind hohe Mengen an CCL22 zu sezernieren. Auch *in vivo* im Mausmodell konnte demonstriert werden, dass T-Zellen zur Aufrechterhaltung homöostatischer CCL22-Level in lymphatischen Organen essenziell sind. So hatten *Rag1*$^{-/-}$ Mäuse, die über keine T-Zellen verfügen, deutlich reduzierte CCL22-Konzentrationen in lymphoiden Organen. Dies konnte durch adoptiven Transfer von Wildtyp T-Zellen rekonstituiert werden. Als entscheidender Faktor für die Induktion von CCL22 konnte das Zytokin GM-CSF identifiziert werden. Diese Zusammenhänge wurden hier erstmals beschrieben und decken eine neue Funktion von GM-CSF als Immunregulator auf.

Auf Grund der Eigenschaft als potenter Aktivator von dendritischen Zellen wird GM-CSF in zahlreichen Studien als Immuntherapie gegen maligne Tumoren evaluiert. Die Effizienz dieser Therapien in klinischen Studien ist oft limitiert und es existiert daher keine Zulassung für GM-CSF als Immuntherapeutikum. Wir stellten die Hypothese auf, dass diese limitierte Antitumorwirkung an der GM-CSF-vermittelten CCL22-Induktion liegen könnte, da CCL22 immunsuppressiv agiert. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass eine Monotherapie mit GM-CSF in CCL22-defizienten Mäusen eine hohe antitumorale Wirkung aufweist, während sie in Wildtyp Mäusen wirkungslos ist. Als Tumormodell wurden Panc02-OVA-Tumore in C57BL/6 Mäusen verwendet. Die Ergebnisse konnten in ähnlicher Weise auch in CCR4-defizienten Mäusen und im B16OVA-Tumormodell erzielt werden. Letztlich konnte somit ein bislang unbekannter Synergismus von GM-CSF und der CCL22-CCR4-Achse aufgedeckt werden, der großes Potential für die Immuntherapie maligner Tumore birgt.

6 Abkürzungsverzeichnis

ADCC	Antibody-dependent cellular cytotoxicity
APC	Antigen-presenting cells
APC	Allophycocyanin
B-ALL	Akute B-Zell Leukämie
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BSA	Bovines Serum-Albumin
cDNA	copy DNA
CCL22$^{-/-}$	CCL22-Knockout
CCR4$^{-/-}$	CCR4-Knockout
CAR	Chimeric antigen receptor
CML	Chronische myeloische Leukämie
CSF	Colony-stimulating factor
Csf2$^{-/-}$	GM-CSF-Knockout
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
DC	Dendritische Zelle
DGBL	Diffuses großzelliges B-Zell Lymphom
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	2'-Desoxynukleosid 5'-Triphosphat
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EpCAM	Epithelial cell adhesion molecule
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fötales Kälberserum
FoxP3	Forkhead Box Protein 3
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GVAX	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene-transfected tumor cell vaccine
HCC	Hepatozelluläres Karzinom

HPV	Humanes Papillomavirus
IDO	Indolamin-2,3-dioxygenase
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IPEX	Immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	Magnetic-activated cell sorting
MCSF	Macrophage colony-stimulating factor
MDC	Macrophage-derived chemokine
MDSC	Myeloid-derived suppressor cells
Min	Minute(n)
Mio	Million(en)
MEM-NEAA	Non-essential amino acids
moDC	Monozytäre dendritische Zellen
mRNA	Messenger-RNA
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
NOD	Nucleotide-binding and oligomerization domain
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
OVA	Ovalbumin
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PD-1	Programmed death 1
PD-L1	Programmed death ligand 1
PGE2	Prostaglandin E2
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
PRR	Pattern recognition receptor
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
qPCR	Quantitative PCR
Rag1$^{-/-}$	Recombination activating gene 1 Knockout
RIG-I	Retinoic acid inducible gene I
RT	Raumtemperatur

SEM	Standard error of mean
SCLC	Small cell lung cancer
TAA	Tumor-associated antigen
TCM	T cell medium
TCR	T cell receptor
TGF-ß	Transforming growth factor-ß
TIL	Tumor-infiltrating lymphocyte
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF-α	Tumor necrosis factor-α
Treg	Regulatorische T-Zellen
T-VEC	Talimogen laherparepvec
WT	Wildtyp

7 Literaturverzeichnis

Agency, European Medicines. 2022, April 28. 'Poteligeo'. https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/poteligeo.

Andtbacka, R. H., H. L. Kaufman, F. Collichio, T. Amatruda, N. Senzer, J. Chesney, K. A. Delman, L. E. Spitler, I. Puzanov, S. S. Agarwala, M. Milhem, L. Cranmer, B. Curti, K. Lewis, M. Ross, T. Guthrie, G. P. Linette, G. A. Daniels, K. Harrington, M. R. Middleton, W. H. Miller, Jr., J. S. Zager, Y. Ye, B. Yao, A. Li, S. Doleman, A. VanderWalde, J. Gansert, and R. S. Coffin. 2015. 'Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma', J Clin Oncol, 33: 2780-8.

Anz, D., M. Rapp, S. Eiber, V. H. Koelzer, R. Thaler, S. Haubner, M. Knott, S. Nagel, M. Golic, G. M. Wiedemann, F. Bauernfeind, C. Wurzenberger, V. Hornung, C. Scholz, D. Mayr, S. Rothenfusser, S. Endres, and C. Bourquin. 2015. 'Suppression of intratumoral CCL22 by type i interferon inhibits migration of regulatory T cells and blocks cancer progression', Cancer Res, 75: 4483-93.

Anzai, A., J. L. Choi, S. He, A. M. Fenn, M. Nairz, S. Rattik, C. S. McAlpine, J. E. Mindur, C. T. Chan, Y. Iwamoto, B. Tricot, G. R. Wojtkiewicz, R. Weissleder, P. Libby, M. Nahrendorf, J. R. Stone, B. Becher, and F. K. Swirski. 2017. 'The infarcted myocardium solicits GM-CSF for the detrimental oversupply of inflammatory leukocytes', J Exp Med, 214: 3293-310.

Attia, P., A. V. Maker, L. R. Haworth, L. Rogers-Freezer, and S. A. Rosenberg. 2005. 'Inability of a fusion protein of IL-2 and diphtheria toxin (Denileukin Diftitox, DAB389IL-2, ONTAK) to eliminate regulatory T lymphocytes in patients with melanoma', J Immunother, 28: 582-92.

Bachmann, M. F., M. Kopf, and B. J. Marsland. 2006. 'Chemokines: more than just road signs', Nat Rev Immunol, 6: 159-64.

Bar, E., P. G. Whitney, K. Moor, C. Reis e Sousa, and S. LeibundGut-Landmann. 2014. 'IL-17 regulates systemic fungal immunity by controlling the functional competence of NK cells', Immunity, 40: 117-27.

Becher, B., S. Tugues, and M. Greter. 2016. 'GM-CSF: From Growth Factor to Central Mediator of Tissue Inflammation', Immunity, 45: 963-73.

Behrens, F., P. P. Tak, M. Ostergaard, R. Stoilov, P. Wiland, T. W. Huizinga, V. Y. Berenfus, S. Vladeva, J. Rech, A. Rubbert-Roth, M. Korkosz, D. Rekalov, I. A. Zupanets, B. J. Ejbjerg, J. Geiseler, J. Fresenius, R. P. Korolkiewicz, A. J. Schottelius, and H. Burkhardt. 2015. 'MOR103, a human monoclonal antibody to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, in the treatment of patients with moderate rheumatoid arthritis: results of a phase Ib/IIa randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial', Ann Rheum Dis, 74: 1058-64.

Bhattacharya, P., I. Budnick, M. Singh, M. Thiruppathi, K. Alharshawi, H. Elshabrawy, M. J. Holterman, and B. S. Prabhakar. 2015. 'Dual Role of GM-CSF as a Pro-Inflammatory and a Regulatory Cytokine: Implications for Immune Therapy', J Interferon Cytokine Res, 35: 585-99.

Bonecchi, R., S. Sozzani, J. T. Stine, W. Luini, G. D'Amico, P. Allavena, D. Chantry, and A. Mantovani. 1998. 'Divergent effects of interleukin-4 and interferon-gamma on macrophage-derived chemokine production: an amplification circuit of polarized T helper 2 responses', Blood, 92: 2668-71.

Boon, T., and L. J. Old. 1997. 'Cancer Tumor antigens', Curr Opin Immunol, 9: 681-3.

Borrello, I., and D. Pardoll. 2002. 'GM-CSF-based cellular vaccines: a review of the clinical experience', Cytokine Growth Factor Rev, 13: 185-93.

Boyiadzis, M. M., J. M. Kirkwood, J. L. Marshall, C. C. Pritchard, N. S. Azad, and J. L. Gulley. 2018. 'Significance and implications of FDA approval of pembrolizumab for biomarker-defined disease', J Immunother Cancer, 6: 35.

Boyman, O., and J. Sprent. 2012. 'The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system', Nat Rev Immunol, 12: 180-90.

Brentjens, R. J., M. L. Davila, I. Riviere, J. Park, X. Wang, L. G. Cowell, S. Bartido, J. Stefanski, C. Taylor, M. Olszewska, O. Borquez-Ojeda, J. Qu, T. Wasielewska, Q. He, Y. Bernal, I. V. Rijo, C. Hedvat, R. Kobos, K. Curran, P. Steinherz, J. Jurcic, T. Rosenblat, P. Maslak, M. Frattini, and M. Sadelain. 2013. 'CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia', Sci Transl Med, 5: 177ra38.

Briseno, C. G., M. Haldar, N. M. Kretzer, X. Wu, D. J. Theisen, W. Kc, V. Durai, G. E. Grajales-Reyes, A. Iwata, P. Bagadia, T. L. Murphy, and K. M. Murphy. 2016. 'Distinct Transcriptional Programs Control Cross-Priming in Classical and Monocyte-Derived Dendritic Cells', Cell Rep, 15: 2462-74.

Bronte, V., D. B. Chappell, E. Apolloni, A. Cabrelle, M. Wang, P. Hwu, and N. P. Restifo. 1999. 'Unopposed production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by tumors inhibits CD8+ T cell responses by dysregulating antigen-presenting cell maturation', J Immunol, 162: 5728-37.

Broughton, S. E., U. Dhagat, T. R. Hercus, T. L. Nero, M. A. Grimbaldeston, C. S. Bonder, A. F. Lopez, and M. W. Parker. 2012. 'The GM-CSF/IL-3/IL-5 cytokine receptor family: from ligand recognition to initiation of signaling', Immunol Rev, 250: 277-302.

Burmester, G. R., I. B. McInnes, J. M. Kremer, P. Miranda, J. Vencovsky, A. Godwood, M. Albulescu, M. A. Michaels, X. Guo, D. Close, and M. Weinblatt. 2018. 'Mavrilimumab, a Fully Human Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Receptor alpha Monoclonal Antibody: Long-Term Safety and Efficacy in Patients With Rheumatoid Arthritis', Arthritis Rheumatol, 70: 679-89.

Burmester, G. R., I. B. McInnes, J. Kremer, P. Miranda, M. Korkosz, J. Vencovsky, A. Rubbert-Roth, E. Mysler, M. A. Sleeman, A. Godwood, D. Sinibaldi, X. Guo, W. I. White, B. Wang, C. Y. Wu, P. C. Ryan, D. Close, M. E. Weinblatt, and Earth Explorer study investigators. 2017. 'A randomised phase IIb study of mavrilimumab, a novel GM-CSF receptor alpha monoclonal antibody, in the treatment of rheumatoid arthritis', Ann Rheum Dis, 76: 1020-30.

Campbell, J. D., M. J. Stinson, F. E. Simons, and K. T. HayGlass. 2002. 'Systemic chemokine and chemokine receptor responses are divergent in allergic versus non-allergic humans', Int Immunol, 14: 1255-62.

Cao, X., S. F. Cai, T. A. Fehniger, J. Song, L. I. Collins, D. R. Piwnica-Worms, and T. J. Ley. 2007. 'Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance', Immunity, 27: 635-46.

Castellino, F., A. Y. Huang, G. Altan-Bonnet, S. Stoll, C. Scheinecker, and R. N. Germain. 2006. 'Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8+ T cells to sites of CD4+ T cell-dendritic cell interaction', Nature, 440: 890-5.

Chang, A. E., Q. Li, D. K. Bishop, D. P. Normolle, B. D. Redman, and B. J. Nickoloff. 2000. 'Immunogenetic therapy of human melanoma utilizing autologous tumor cells transduced to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor', Hum Gene Ther, 11: 839-50.

Chang, Ms, J. McNinch, C. Elias, 3rd, C. L. Manthey, D. Grosshans, T. Meng, T. Boone, and D. P. Andrew. 1997. 'Molecular cloning and functional characterization of a novel CC chemokine, stimulated T cell chemotactic protein (STCP-1) that specifically acts on activated T lymphocytes', J Biol Chem, 272: 25229-37.

Cinier, J., M. Hubert, L. Besson, A. Di Roio, C. Rodriguez, V. Lombardi, C. Caux, and C. Menetrier-Caux. 2021. 'Recruitment and Expansion of Tregs Cells in the Tumor Environment-How to Target Them?', Cancers (Basel), 13.

Collison, L. W., C. J. Workman, T. T. Kuo, K. Boyd, Y. Wang, K. M. Vignali, R. Cross, D. Sehy, R. S. Blumberg, and D. A. Vignali. 2007. 'The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function', Nature, 450: 566-9.

Curiel, T. J., G. Coukos, L. Zou, X. Alvarez, P. Cheng, P. Mottram, M. Evdemon-Hogan, J. R. Conejo-Garcia, L. Zhang, M. Burow, Y. Zhu, S. Wei, I. Kryczek, B. Daniel, A. Gordon, L. Myers, A. Lackner, M. L. Disis, K. L. Knutson, L. Chen, and W. Zou. 2004. 'Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival', Nat Med, 10: 942-9.

Curtsinger, J. M., C. S. Schmidt, A. Mondino, D. C. Lins, R. M. Kedl, M. K. Jenkins, and M. F. Mescher. 1999. 'Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ T cells', J Immunol, 162: 3256-62.

D'Ambrosio, D., A. Iellem, R. Bonecchi, D. Mazzeo, S. Sozzani, A. Mantovani, and F. Sinigaglia. 1998. 'Selective up-regulation of chemokine receptors CCR4 and CCR8 upon activation of polarized human type 2 Th cells', J Immunol, 161: 5111-5.

de la Rosa, M., S. Rutz, H. Dorninger, and A. Scheffold. 2004. 'Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function', Eur J Immunol, 34: 2480-8.

del Rio, M. L., G. Bernhardt, J. I. Rodriguez-Barbosa, and R. Forster. 2010. 'Development and functional specialization of CD103+ dendritic cells', Immunol Rev, 234: 268-81.

Dieckgraefe, B. K., and J. R. Korzenik. 2002. 'Treatment of active Crohn's disease with recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor', Lancet, 360: 1478-80.

Dillman, R. O., M. Wiemann, S. K. Nayak, C. DeLeon, K. Hood, and C. DePriest. 2003. 'Interferon-gamma or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor administered as adjuvants with a vaccine of irradiated autologous tumor cells from short-term cell line cultures: a randomized phase 2 trial of the cancer biotherapy research group', J Immunother, 26: 367-73.

Domogalla, M. P., P. V. Rostan, V. K. Raker, and K. Steinbrink. 2017. 'Tolerance through Education: How Tolerogenic Dendritic Cells Shape Immunity', Front Immunol, 8: 1764.

Drake, C. G. 2012. 'Combination immunotherapy approaches', Ann Oncol, 23 Suppl 8: viii41-6.

Dranoff, G., E. Jaffee, A. Lazenby, P. Golumbek, H. Levitsky, K. Brose, V. Jackson, H. Hamada, D. Pardoll, and R. C. Mulligan. 1993. 'Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity', Proc Natl Acad Sci U S A, 90: 3539-43.

Dufait, I., J. K. Schwarze, T. Liechtenstein, W. Leonard, H. Jiang, D. Escors, M. De Ridder, and K. Breckpot. 2015. 'Ex vivo generation of myeloid-derived suppressor cells that model the tumor immunosuppressive environment in colorectal cancer', Oncotarget, 6: 12369-82.

Dunn, G. P., A. T. Bruce, H. Ikeda, L. J. Old, and R. D. Schreiber. 2002. 'Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape', Nat Immunol, 3: 991-8.

Evers, B. D., D. R. Engel, A. M. Bohner, A. P. Tittel, T. A. Krause, C. Heuser, N. Garbi, W. Kastenmuller, M. Mack, G. Tiegs, U. Panzer, P. Boor, I. Ludwig-Portugall, and C. Kurts. 2016. 'CD103+ Kidney Dendritic Cells Protect against Crescentic GN by Maintaining IL-10-Producing Regulatory T Cells', J Am Soc Nephrol, 27: 3368-82.

Facciabene, A., X. Peng, I. S. Hagemann, K. Balint, A. Barchetti, L. P. Wang, P. A. Gimotty, C. B. Gilks, P. Lal, L. Zhang, and G. Coukos. 2011. 'Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T(reg) cells', Nature, 475: 226-30.

Faget, J., C. Biota, T. Bachelot, M. Gobert, I. Treilleux, N. Goutagny, I. Durand, S. Leon-Goddard, J. Y. Blay, C. Caux, and C. Menetrier-Caux. 2011. 'Early detection of tumor cells by innate immune cells leads to T(reg) recruitment through CCL22 production by tumor cells', Cancer Res, 71: 6143-52.

Finney, H. M., A. N. Akbar, and A. D. Lawson. 2004. 'Activation of resting human primary T cells with chimeric receptors: costimulation from CD28, inducible costimulator, CD134, and CD137 in series with signals from the TCR zeta chain', J Immunol, 172: 104-13.

Forster, R., A. Schubel, D. Breitfeld, E. Kremmer, I. Renner-Muller, E. Wolf, and M. Lipp. 1999. 'CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs', Cell, 99: 23-33.

Fry, T. J., and C. L. Mackall. 2002. 'Interleukin-7: from bench to clinic', Blood, 99: 3892-904.

Fu, C., and A. Jiang. 2018. 'Dendritic Cells and CD8 T Cell Immunity in Tumor Microenvironment', Front Immunol, 9: 3059.

Fuchs, C. S., T. Doi, R. W. Jang, K. Muro, T. Satoh, M. Machado, W. Sun, S. I. Jalal, M. A. Shah, J. P. Metges, M. Garrido, T. Golan, M. Mandala, Z. A. Wainberg, D. V. Catenacci, A. Ohtsu, K. Shitara, R. Geva, J. Bleeker, A. H. Ko, G. Ku, P. Philip, P. C. Enzinger, Y. J. Bang, D. Levitan, J. Wang, M. Rosales, R. P. Dalal, and H. H. Yoon. 2018. 'Safety and Efficacy of Pembrolizumab Monotherapy in Patients With Previously Treated Advanced Gastric and Gastroesophageal Junction Cancer: Phase 2 Clinical KEYNOTE-059 Trial', JAMA Oncol, 4: e180013.

Fujita, H., A. Asahina, M. Sugaya, K. Nakamura, P. Gao, H. Fujiwara, and K. Tamaki. 2005. 'Differential production of Th1- and Th2-type chemokines by mouse Langerhans cells and splenic dendritic cells', J Invest Dermatol, 124: 343-50.

Fujiu, K., M. Shibata, Y. Nakayama, F. Ogata, S. Matsumoto, K. Noshita, S. Iwami, S. Nakae, I. Komuro, R. Nagai, and I. Manabe. 2017. 'A heart-brain-kidney network controls adaptation to cardiac stress through tissue macrophage activation', Nat Med, 23: 611-22.

Gaudreau, S., C. Guindi, M. Menard, G. Besin, G. Dupuis, and A. Amrani. 2007. 'Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor prevents diabetes development in NOD mice by inducing tolerogenic dendritic cells that sustain the suppressive function of CD4+CD25+ regulatory T cells', J Immunol, 179: 3638-47.

Gillessen, S., Y. N. Naumov, E. E. Nieuwenhuis, M. A. Exley, F. S. Lee, N. Mach, A. D. Luster, R. S. Blumberg, M. Taniguchi, S. P. Balk, J. L. Strominger, G. Dranoff, and S. B. Wilson. 2003. 'CD1d-restricted T cells regulate dendritic cell function and antitumor immunity in a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-dependent fashion', Proc Natl Acad Sci U S A, 100: 8874-9.

Gjertsen, M. K., T. Buanes, A. R. Rosseland, A. Bakka, I. Gladhaug, O. Soreide, J. A. Eriksen, M. Moller, I. Baksaas, R. A. Lothe, I. Saeterdal, and G. Gaudernack. 2001. 'Intradermal ras peptide vaccination with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as adjuvant: Clinical and immunological responses in patients with pancreatic adenocarcinoma', Int J Cancer, 92: 441-50.

Gobert, M., I. Treilleux, N. Bendriss-Vermare, T. Bachelot, S. Goddard-Leon, V. Arfi, C. Biota, A. C. Doffin, I. Durand, D. Olive, S. Perez, N. Pasqual, C. Faure, I. Ray-Coquard, A. Puisieux, C. Caux, J. Y. Blay, and C. Menetrier-Caux. 2009. 'Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome', Cancer Res, 69: 2000-9.

Godfrey, V. L., J. E. Wilkinson, E. M. Rinchik, and L. B. Russell. 1991. 'Fatal lymphoreticular disease in the scurfy (sf) mouse requires T cells that mature in a sf thymic environment: potential model for thymic education', Proc Natl Acad Sci U S A, 88: 5528-32.

Godiska, R., D. Chantry, C. J. Raport, S. Sozzani, P. Allavena, D. Leviten, A. Mantovani, and P. W. Gray. 1997. 'Human macrophage-derived chemokine (MDC), a novel chemoattractant for monocytes, monocyte-derived dendritic cells, and natural killer cells', J Exp Med, 185: 1595-604.

Gong, J., A. Chehrazi-Raffle, S. Reddi, and R. Salgia. 2018. 'Development of PD-1 and PD-L1 inhibitors as a form of cancer immunotherapy: a comprehensive review of registration trials and future considerations', J Immunother Cancer, 6: 8.

Gough, N. M., J. Gough, D. Metcalf, A. Kelso, D. Grail, N. A. Nicola, A. W. Burgess, and A. R. Dunn. 1984. 'Molecular cloning of cDNA encoding a murine haematopoietic growth regulator, granulocyte-macrophage colony stimulating factor', Nature, 309: 763-7.

Goyal, G., K. Wong, C. J. Nirschl, N. Souders, D. Neuberg, N. Anandasabapathy, and G. Dranoff. 2018. 'PPARgamma Contributes to Immunity Induced by Cancer Cell Vaccines That Secrete GM-CSF', Cancer Immunol Res, 6: 723-32.

Grabstein, K. H., D. L. Urdal, R. J. Tushinski, D. Y. Mochizuki, V. L. Price, M. A. Cantrell, S. Gillis, and P. J. Conlon. 1986. 'Induction of macrophage tumoricidal activity by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor', Science, 232: 506-8.

Green, J. A., N. Arpaia, M. Schizas, A. Dobrin, and A. Y. Rudensky. 2017. 'A nonimmune function of T cells in promoting lung tumor progression', J Exp Med, 214: 3565-75.

Griffin, J. D., S. A. Cannistra, R. Sullivan, G. D. Demetri, T. J. Ernst, and Y. Kanakura. 1990. 'The biology of GM-CSF: regulation of production and interaction with its receptor', Int J Cell Cloning, 8 Suppl 1: 35-44; discussion 44-5.

Guo, C., M. H. Manjili, J. R. Subjeck, D. Sarkar, P. B. Fisher, and X. Y. Wang. 2013. 'Therapeutic cancer vaccines: past, present, and future', Adv Cancer Res, 119: 421-75.

Halvorsen, E. C., S. E. Franks, B. J. Wadsworth, B. T. Harbourne, R. A. Cederberg, C. A. Steer, I. Martinez-Gonzalez, J. Calder, W. W. Lockwood, and K. L. Bennewith. 2019. 'IL-33 increases ST2(+) Tregs and promotes metastatic tumour growth in the lungs in an amphiregulin-dependent manner', Oncoimmunology, 8: e1527497.

Hamilton, J. A. 2008. 'Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity', Nat Rev Immunol, 8: 533-44.

———. 2020. 'GM-CSF in inflammation', J Exp Med, 217.

Hara, M., C. I. Kingsley, M. Niimi, S. Read, S. E. Turvey, A. R. Bushell, P. J. Morris, F. Powrie, and K. J. Wood. 2001. 'IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo', J Immunol, 166: 3789-96.

Hege, K. M., K. Jooss, and D. Pardoll. 2006. 'GM-CSF gene-modifed cancer cell immunotherapies: of mice and men', Int Rev Immunol, 25: 321-52.

Herbst, R. S., P. Baas, D. W. Kim, E. Felip, J. L. Perez-Gracia, J. Y. Han, J. Molina, J. H. Kim, C. D. Arvis, M. J. Ahn, M. Majem, M. J. Fidler, G. de Castro, Jr., M. Garrido, G. M. Lubiniecki, Y. Shentu, E. Im, M. Dolled-Filhart, and E. B. Garon. 2016. 'Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial', Lancet, 387: 1540-50.

Hernandez, I., V. Prasad, and W. F. Gellad. 2018. 'Total Costs of Chimeric Antigen Receptor T-Cell Immunotherapy', JAMA Oncol, 4: 994-96.

Hirota, K., M. Hashimoto, Y. Ito, M. Matsuura, H. Ito, M. Tanaka, H. Watanabe, G. Kondoh, A. Tanaka, K. Yasuda, M. Kopf, A. J. Potocnik, B. Stockinger, N. Sakaguchi, and S. Sakaguchi. 2018. 'Autoimmune Th17 Cells Induced Synovial Stromal and Innate

Lymphoid Cell Secretion of the Cytokine GM-CSF to Initiate and Augment Autoimmune Arthritis', Immunity, 48: 1220-32 e5.

Hodi, F. S., S. Lee, D. F. McDermott, U. N. Rao, L. H. Butterfield, A. A. Tarhini, P. Leming, I. Puzanov, D. Shin, and J. M. Kirkwood. 2014. 'Ipilimumab plus sargramostim vs ipilimumab alone for treatment of metastatic melanoma: a randomized clinical trial', JAMA, 312: 1744-53.

Hodi, F. S., S. J. O'Day, D. F. McDermott, R. W. Weber, J. A. Sosman, J. B. Haanen, R. Gonzalez, C. Robert, D. Schadendorf, J. C. Hassel, W. Akerley, A. J. van den Eertwegh, J. Lutzky, P. Lorigan, J. M. Vaubel, G. P. Linette, D. Hogg, C. H. Ottensmeier, C. Lebbe, C. Peschel, I. Quirt, J. I. Clark, J. D. Wolchok, J. S. Weber, J. Tian, M. J. Yellin, G. M. Nichol, A. Hoos, and W. J. Urba. 2010. 'Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma', N Engl J Med, 363: 711-23.

Hong, I. S. 2016. 'Stimulatory versus suppressive effects of GM-CSF on tumor progression in multiple cancer types', Exp Mol Med, 48: e242.

Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2003. 'Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3', Science, 299: 1057-61.

Huang, Y., F. M. Wang, T. Wang, Y. J. Wang, Z. Y. Zhu, Y. T. Gao, and Z. Du. 2012. 'Tumor-infiltrating FoxP3+ Tregs and CD8+ T cells affect the prognosis of hepatocellular carcinoma patients', Digestion, 86: 329-37.

Iellem, A., M. Mariani, R. Lang, H. Recalde, P. Panina-Bordignon, F. Sinigaglia, and D. D'Ambrosio. 2001. 'Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells', J Exp Med, 194: 847-53.

Imai, C., K. Mihara, M. Andreansky, I. C. Nicholson, C. H. Pui, T. L. Geiger, and D. Campana. 2004. 'Chimeric receptors with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia', Leukemia, 18: 676-84.

Imai, T., D. Chantry, C. J. Raport, C. L. Wood, M. Nishimura, R. Godiska, O. Yoshie, and P. W. Gray. 1998. 'Macrophage-derived chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor 4', J Biol Chem, 273: 1764-8.

Imai, T., M. Nagira, S. Takagi, M. Kakizaki, M. Nishimura, J. Wang, P. W. Gray, K. Matsushima, and O. Yoshie. 1999. 'Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine', Int Immunol, 11: 81-8.

Jackson, J. J., J. M. Ketcham, A. Younai, B. Abraham, B. Biannic, H. P. Beck, M. H. T. Bui, D. Chian, G. Cutler, R. Diokno, D. X. Hu, S. Jacobson, E. Karbarz, P. D. Kassner, L. Marshall, J. McKinnell, C. Meleza, A. Okal, D. Pookot, M. K. Reilly, O. Robles, H. P. Shunatona, O. Talay, J. R. Walker, A. Wadsworth, D. J. Wustrow, and M. Zibinsky. 2019. 'Discovery of a Potent and Selective CCR4 Antagonist That Inhibits Treg Trafficking into the Tumor Microenvironment', J Med Chem, 62: 6190-213.

Jafarzadeh, A., H. Fooladseresht, K. Minaee, M. R. Bazrafshani, A. Khosravimashizi, M. Nemati, M. Mohammadizadeh, M. M. Mohammadi, and A. Ghaderi. 2015. 'Higher circulating levels of chemokine CCL22 in patients with breast cancer: evaluation of the influences of tumor stage and chemokine gene polymorphism', Tumour Biol, 36: 1163-71.

Jaffee, E. M., R. H. Hruban, B. Biedrzycki, D. Laheru, K. Schepers, P. R. Sauter, M. Goemann, J. Coleman, L. Grochow, R. C. Donehower, K. D. Lillemoe, S. O'Reilly, R. A. Abrams, D. M. Pardoll, J. L. Cameron, and C. J. Yeo. 2001. 'Novel allogeneic granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-secreting tumor vaccine for pancreatic cancer: a phase I trial of safety and immune activation', J Clin Oncol, 19: 145-56.

Jaffee, E. M., M. C. Thomas, A. Y. Huang, K. M. Hauda, H. I. Levitsky, and D. M. Pardoll. 1996. 'Enhanced immune priming with spatial distribution of paracrine cytokine vaccines', J Immunother Emphasis Tumor Immunol, 19: 176-83.

Jinushi, M., Y. Nakazaki, M. Dougan, D. R. Carrasco, M. Mihm, and G. Dranoff. 2007. 'MFG-E8-mediated uptake of apoptotic cells by APCs links the pro- and antiinflammatory activities of GM-CSF', J Clin Invest, 117: 1902-13.

Jinushi, M., and H. Tahara. 2009. 'Cytokine gene-mediated immunotherapy: current status and future perspectives', Cancer Sci, 100: 1389-96.

Joshi, S., and D. L. Durden. 2019. 'Combinatorial Approach to Improve Cancer Immunotherapy: Rational Drug Design Strategy to Simultaneously Hit Multiple Targets to Kill Tumor Cells and to Activate the Immune System', J Oncol, 2019: 5245034.

Kantoff, P. W., C. S. Higano, N. D. Shore, E. R. Berger, E. J. Small, D. F. Penson, C. H. Redfern, A. C. Ferrari, R. Dreicer, R. B. Sims, Y. Xu, M. W. Frohlich, P. F. Schellhammer, and Impact Study Investigators. 2010. 'Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer', N Engl J Med, 363: 411-22.

Kapadia, D., and L. Fong. 2005. 'CTLA-4 blockade: autoimmunity as treatment', J Clin Oncol, 23: 8926-8.

Karandikar, S. H., J. Sidney, A. Sette, M. J. Selby, A. J. Korman, and P. K. Srivastava. 2019. 'New epitopes in ovalbumin provide insights for cancer neoepitopes', JCI Insight, 5.

Katou, F., H. Ohtani, T. Nakayama, K. Ono, K. Matsushima, A. Saaristo, H. Nagura, O. Yoshie, and K. Motegi. 2001. 'Macrophage-derived chemokine (MDC/CCL22) and CCR4 are involved in the formation of T lymphocyte-dendritic cell clusters in human inflamed skin and secondary lymphoid tissue', Am J Pathol, 158: 1263-70.

Kaufman, H. L., J. Russell, O. Hamid, S. Bhatia, P. Terheyden, S. P. D'Angelo, K. C. Shih, C. Lebbe, G. P. Linette, M. Milella, I. Brownell, K. D. Lewis, J. H. Lorch, K. Chin, L. Mahnke, A. von Heydebreck, J. M. Cuillerot, and P. Nghiem. 2016. 'Avelumab in patients with chemotherapy-refractory metastatic Merkel cell carcinoma: a multicentre, single-group, open-label, phase 2 trial', Lancet Oncol, 17: 1374-85.

Keir, M. E., and A. H. Sharpe. 2005. 'The B7/CD28 costimulatory family in autoimmunity', Immunol Rev, 204: 128-43.

Ketcham, J. M., L. A. Marshall, and O. Talay. 2018. 'CCR4 Antagonists Inhibit Treg Trafficking into the Tumor Microenvironment', ACS Med Chem Lett, 9: 953-55.

Khare, A., N. Krishnamoorthy, T. B. Oriss, M. Fei, P. Ray, and A. Ray. 2013. 'Cutting edge: inhaled antigen upregulates retinaldehyde dehydrogenase in lung CD103+ but not plasmacytoid dendritic cells to induce Foxp3 de novo in CD4+ T cells and promote airway tolerance', J Immunol, 191: 25-9.

Kindon, N., G. Andrews, A. Baxter, D. Cheshire, P. Hemsley, T. Johnson, Y. Z. Liu, D. McGinnity, M. McHale, A. Mete, J. Reuberson, B. Roberts, J. Steele, B. Teobald, J. Unitt, D. Vaughan, I. Walters, and M. J. Stocks. 2017. 'Discovery of AZD-2098 and AZD-1678, Two Potent and Bioavailable CCR4 Receptor Antagonists', ACS Med Chem Lett, 8: 981-86.

Klein, G. 1966. 'Tumor antigens', Annu Rev Microbiol, 20: 223-52.

Kondratiev, S., E. Sabo, E. Yakirevich, O. Lavie, and M. B. Resnick. 2004. 'Intratumoral CD8+ T lymphocytes as a prognostic factor of survival in endometrial carcinoma', Clin Cancer Res, 10: 4450-6.

Korzenik, J. R., B. K. Dieckgraefe, J. F. Valentine, D. F. Hausman, M. J. Gilbert, and Group Sargramostim in Crohn's Disease Study. 2005. 'Sargramostim for active Crohn's disease', N Engl J Med, 352: 2193-201.

Kuhn, N. F., T. J. Purdon, D. G. van Leeuwen, A. V. Lopez, K. J. Curran, A. F. Daniyan, and R. J. Brentjens. 2019. 'CD40 Ligand-Modified Chimeric Antigen Receptor T Cells

Enhance Antitumor Function by Eliciting an Endogenous Antitumor Response', Cancer Cell, 35: 473-88 e6.

Kurts, C., B. W. Robinson, and P. A. Knolle. 2010. 'Cross-priming in health and disease', Nat Rev Immunol, 10: 403-14.

Leao, I. C., P. Ganesan, T. D. Armstrong, and E. M. Jaffee. 2008. 'Effective depletion of regulatory T cells allows the recruitment of mesothelin-specific CD8 T cells to the antitumor immune response against a mesothelin-expressing mouse pancreatic adenocarcinoma', Clin Transl Sci, 1: 228-39.

Letterio, J. J., and A. B. Roberts. 1998. 'Regulation of immune responses by TGF-beta', Annu Rev Immunol, 16: 137-61.

Li, Y. Q., F. F. Liu, X. M. Zhang, X. J. Guo, M. J. Ren, and L. Fu. 2013. 'Tumor secretion of CCL22 activates intratumoral Treg infiltration and is independent prognostic predictor of breast cancer', PLoS One, 8: e76379.

Liang, S. C., M. Moskalenko, M. Van Roey, and K. Jooss. 2013. 'Depletion of regulatory T cells by targeting folate receptor 4 enhances the potency of a GM-CSF-secreting tumor cell immunotherapy', Clin Immunol, 148: 287-98.

Lieberam, I., and I. Forster. 1999. 'The murine beta-chemokine TARC is expressed by subsets of dendritic cells and attracts primed CD4+ T cells', Eur J Immunol, 29: 2684-94.

Lipson, E. J., W. H. Sharfman, S. Chen, T. L. McMiller, T. S. Pritchard, J. T. Salas, S. Sartorius-Mergenthaler, I. Freed, S. Ravi, H. Wang, B. Luber, J. D. Sproul, J. M. Taube, D. M. Pardoll, and S. L. Topalian. 2015. 'Safety and immunologic correlates of Melanoma GVAX, a GM-CSF secreting allogeneic melanoma cell vaccine administered in the adjuvant setting', J Transl Med, 13: 214.

Lotfi, N., R. Thome, N. Rezaei, G. X. Zhang, A. Rezaei, A. Rostami, and N. Esmaeil. 2019. 'Roles of GM-CSF in the Pathogenesis of Autoimmune Diseases: An Update', Front Immunol, 10: 1265.

Luiten, R. M., E. W. Kueter, W. Mooi, M. P. Gallee, E. M. Rankin, W. R. Gerritsen, S. M. Clift, W. J. Nooijen, P. Weder, W. F. van de Kasteele, J. Sein, P. C. van den Berk, O. E. Nieweg, A. M. Berns, H. Spits, and G. C. de Gast. 2005. 'Immunogenicity, including vitiligo, and feasibility of vaccination with autologous GM-CSF-transduced tumor cells in metastatic melanoma patients', J Clin Oncol, 23: 8978-91.

Mach, N., S. Gillessen, S. B. Wilson, C. Sheehan, M. Mihm, and G. Dranoff. 2000. 'Differences in dendritic cells stimulated in vivo by tumors engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or Flt3-ligand', Cancer Res, 60: 3239-46.

Maher, J., R. J. Brentjens, G. Gunset, I. Riviere, and M. Sadelain. 2002. 'Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCRzeta /CD28 receptor', Nat Biotechnol, 20: 70-5.

Mahmoud, S. M., E. C. Paish, D. G. Powe, R. D. Macmillan, M. J. Grainge, A. H. Lee, I. O. Ellis, and A. R. Green. 2011. 'Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer', J Clin Oncol, 29: 1949-55.

Marshall, J. L., J. L. Gulley, P. M. Arlen, P. K. Beetham, K. Y. Tsang, R. Slack, J. W. Hodge, S. Doren, D. W. Grosenbach, J. Hwang, E. Fox, L. Odogwu, S. Park, D. Panicali, and J. Schlom. 2005. 'Phase I study of sequential vaccinations with fowlpox-CEA(6D)-TRICOM alone and sequentially with vaccinia-CEA(6D)-TRICOM, with and without granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, in patients with carcinoembryonic antigen-expressing carcinomas', J Clin Oncol, 23: 720-31.

Marshall, N. A., L. E. Christie, L. R. Munro, D. J. Culligan, P. W. Johnston, R. N. Barker, and M. A. Vickers. 2004. 'Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma', Blood, 103: 1755-62.

McKenna, H. J. 2001. 'Role of hematopoietic growth factors/flt3 ligand in expansion and regulation of dendritic cells', Curr Opin Hematol, 8: 149-54.

Mellman, I., and R. M. Steinman. 2001. 'Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines', Cell, 106: 255-8.

Metcalf, D. 1989. 'The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in haemopoietic cells', Nature, 339: 27-30.

———. 2013. 'The colony-stimulating factors and cancer', Cancer Immunol Res, 1: 351-6.

Michie, S. A., E. A. Kirkpatrick, and R. V. Rouse. 1988. 'Rare peripheral T cells migrate to and persist in normal mouse thymus', J Exp Med, 168: 1929-34.

Misra, N., J. Bayry, S. Lacroix-Desmazes, M. D. Kazatchkine, and S. V. Kaveri. 2004. 'Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells', J Immunol, 172: 4676-80.

Mizukami, Y., K. Kono, Y. Kawaguchi, H. Akaike, K. Kamimura, H. Sugai, and H. Fujii. 2008. 'CCL17 and CCL22 chemokines within tumor microenvironment are related to accumulation of Foxp3+ regulatory T cells in gastric cancer', Int J Cancer, 122: 2286-93.

Mombaerts, P., J. Iacomini, R. S. Johnson, K. Herrup, S. Tonegawa, and V. E. Papaioannou. 1992. 'RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes', Cell, 68: 869-77.

Morales, A., D. Eidinger, and A. W. Bruce. 1976. 'Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors', J Urol, 116: 180-3.

Morales, J. K., M. Kmieciak, K. L. Knutson, H. D. Bear, and M. H. Manjili. 2010. 'GM-CSF is one of the main breast tumor-derived soluble factors involved in the differentiation of CD11b-Gr1- bone marrow progenitor cells into myeloid-derived suppressor cells', Breast Cancer Res Treat, 123: 39-49.

Moskowitz, C. 2016. 'Novel agents and strategies in transplant-eligible patients with relapsed and refractory Hodgkin lymphoma', Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2016: 331-38.

Motzer, R. J., K. Penkov, J. Haanen, B. Rini, L. Albiges, M. T. Campbell, B. Venugopal, C. Kollmannsberger, S. Negrier, M. Uemura, J. L. Lee, A. Vasiliev, W. H. Miller, Jr., H. Gurney, M. Schmidinger, J. Larkin, M. B. Atkins, J. Bedke, B. Alekseev, J. Wang, M. Mariani, P. B. Robbins, A. Chudnovsky, C. Fowst, S. Hariharan, B. Huang, A. di Pietro, and T. K. Choueiri. 2019. 'Avelumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma', N Engl J Med, 380: 1103-15.

Motzer, R. J., N. M. Tannir, D. F. McDermott, O. Aren Frontera, B. Melichar, T. K. Choueiri, E. R. Plimack, P. Barthelemy, C. Porta, S. George, T. Powles, F. Donskov, V. Neiman, C. K. Kollmannsberger, P. Salman, H. Gurney, R. Hawkins, A. Ravaud, M. O. Grimm, S. Bracarda, C. H. Barrios, Y. Tomita, D. Castellano, B. I. Rini, A. C. Chen, S. Mekan, M. B. McHenry, M. Wind-Rotolo, J. Doan, P. Sharma, H. J. Hammers, B. Escudier, and Investigators CheckMate. 2018. 'Nivolumab plus Ipilimumab versus Sunitinib in Advanced Renal-Cell Carcinoma', N Engl J Med, 378: 1277-90.

Murphy, K., Weaver, C. 2017. 'Janeway's Immunobiology.', Taylor & Francis Group.

Murtaza, A., V. K. Kuchroo, and G. J. Freeman. 1999. 'Changes in the strength of co-stimulation through the B7/CD28 pathway alter functional T cell responses to altered peptide ligands', Int Immunol, 11: 407-16.

Muthuswamy, R., J. Urban, J. J. Lee, T. A. Reinhart, D. Bartlett, and P. Kalinski. 2008. 'Ability of mature dendritic cells to interact with regulatory T cells is imprinted during maturation', Cancer Res, 68: 5972-8.

Neelapu, S. S., F. L. Locke, N. L. Bartlett, L. J. Lekakis, D. B. Miklos, C. A. Jacobson, I. Braunschweig, O. O. Oluwole, T. Siddiqi, Y. Lin, J. M. Timmerman, P. J. Stiff, J. W. Friedberg, I. W. Flinn, A. Goy, B. T. Hill, M. R. Smith, A. Deol, U. Farooq, P. McSweeney, J. Munoz, I. Avivi, J. E. Castro, J. R. Westin, J. C. Chavez, A. Ghobadi, K. V. Komanduri, R. Levy, E. D. Jacobsen, T. E. Witzig, P. Reagan, A. Bot, J. Rossi,

L. Navale, Y. Jiang, J. Aycock, M. Elias, D. Chang, J. Wiezorek, and W. Y. Go. 2017. 'Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma', N Engl J Med, 377: 2531-44.

Nemunaitis, J. 1997. 'A comparative review of colony-stimulating factors', Drugs, 54: 709-29.

Nemunaitis, J., D. Sterman, D. Jablons, J. W. Smith, 2nd, B. Fox, P. Maples, S. Hamilton, F. Borellini, A. Lin, S. Morali, and K. Hege. 2004. 'Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene-modified autologous tumor vaccines in non-small-cell lung cancer', J Natl Cancer Inst, 96: 326-31.

Ninck, S., C. Reisser, G. Dyckhoff, B. Helmke, H. Bauer, and C. Herold-Mende. 2003. 'Expression profiles of angiogenic growth factors in squamous cell carcinomas of the head and neck', Int J Cancer, 106: 34-44.

Nishinakamura, R., A. Miyajima, P. J. Mee, V. L. Tybulewicz, and R. Murray. 1996. 'Hematopoiesis in mice lacking the entire granulocyte-macrophage colony-stimulating factor/interleukin-3/interleukin-5 functions', Blood, 88: 2458-64.

Oiseth, Stanley J., and Mohamed S. Aziz. 2017. 'Cancer immunotherapy: a brief review of the history, possibilities, and challenges ahead', Journal of Cancer Metastasis and Treatment, 3: 250-61.

Old, L. J., and E. A. Boyse. 1964. 'Immunology of Experimental Tumors', Annu Rev Med, 15: 167-86.

Ollila, T. A., I. Sahin, and A. J. Olszewski. 2019. 'Mogamulizumab: a new tool for management of cutaneous T-cell lymphoma', Onco Targets Ther, 12: 1085-94.

Olson, T. S., and K. Ley. 2002. 'Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking', Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 283: R7-28.

Onishi, Y., Z. Fehervari, T. Yamaguchi, and S. Sakaguchi. 2008. 'Foxp3+ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation', Proc Natl Acad Sci U S A, 105: 10113-8.

Onodera, T., M. H. Jang, Z. Guo, M. Yamasaki, T. Hirata, Z. Bai, N. M. Tsuji, D. Nagakubo, O. Yoshie, S. Sakaguchi, O. Takikawa, and M. Miyasaka. 2009. 'Constitutive expression of IDO by dendritic cells of mesenteric lymph nodes: functional involvement of the CTLA-4/B7 and CCL22/CCR4 interactions', J Immunol, 183: 5608-14.

Pandiyan, P., L. Zheng, S. Ishihara, J. Reed, and M. J. Lenardo. 2007. 'CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells', Nat Immunol, 8: 1353-62.

Park, J. H., I. Riviere, M. Gonen, X. Wang, B. Senechal, K. J. Curran, C. Sauter, Y. Wang, B. Santomasso, E. Mead, M. Roshal, P. Maslak, M. Davila, R. J. Brentjens, and M. Sadelain. 2018. 'Long-Term Follow-up of CD19 CAR Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia', N Engl J Med, 378: 449-59.

Parmiani, G., C. Castelli, L. Pilla, M. Santinami, M. P. Colombo, and L. Rivoltini. 2007. 'Opposite immune functions of GM-CSF administered as vaccine adjuvant in cancer patients', Ann Oncol, 18: 226-32.

Penna, G., M. Vulcano, A. Roncari, F. Facchetti, S. Sozzani, and L. Adorini. 2002. 'Cutting edge: differential chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells', J Immunol, 169: 6673-6.

Pennock, N. D., J. T. White, E. W. Cross, E. E. Cheney, B. A. Tamburini, and R. M. Kedl. 2013. 'T cell responses: naive to memory and everything in between', Adv Physiol Educ, 37: 273-83.

Pere, H., Y. Montier, J. Bayry, F. Quintin-Colonna, N. Merillon, E. Dransart, C. Badoual, A. Gey, P. Ravel, E. Marcheteau, F. Batteux, F. Sandoval, O. Adotevi, C. Chiu, S. Garcia, C. Tanchot, Y. C. Lone, L. C. Ferreira, B. H. Nelson, D. Hanahan, W. H. Fridman, L. Johannes, and E. Tartour. 2011. 'A CCR4 antagonist combined with

vaccines induces antigen-specific CD8+ T cells and tumor immunity against self antigens', Blood, 118: 4853-62.

Perica, K., J. C. Varela, M. Oelke, and J. Schneck. 2015. 'Adoptive T cell immunotherapy for cancer', Rambam Maimonides Med J, 6: e0004.

Pilette, C., J. N. Francis, S. J. Till, and S. R. Durham. 2004. 'CCR4 ligands are up-regulated in the airways of atopic asthmatics after segmental allergen challenge', Eur Respir J, 23: 876-84.

Piseddu, I., N. Rohrle, M. M. L. Knott, S. Moder, S. Eiber, K. Schnell, V. Vetter, B. Meyer, P. Layritz, B. Kuhnemuth, G. M. Wiedemann, J. Gruen, C. Perleberg, M. Rapp, S. Endres, and D. Anz. 2020. 'Constitutive Expression of CCL22 Is Mediated by T Cell-Derived GM-CSF', J Immunol, 205: 2056-65.

Plitas, G., C. Konopacki, K. Wu, P. D. Bos, M. Morrow, E. V. Putintseva, D. M. Chudakov, and A. Y. Rudensky. 2016. 'Regulatory T Cells Exhibit Distinct Features in Human Breast Cancer', Immunity, 45: 1122-34.

Puzanov, I., M. M. Milhem, D. Minor, O. Hamid, A. Li, L. Chen, M. Chastain, K. S. Gorski, A. Anderson, J. Chou, H. L. Kaufman, and R. H. Andtbacka. 2016. 'Talimogene Laherparepvec in Combination With Ipilimumab in Previously Untreated, Unresectable Stage IIIB-IV Melanoma', J Clin Oncol, 34: 2619-26.

Ramanathan, R. K., D. M. Potter, C. P. Belani, S. A. Jacobs, S. Gravenstein, F. Lim, H. Kim, S. Savona, T. Evans, D. Buchbarker, M. B. Simon, J. K. Depee, and D. L. Trump. 2002. 'Randomized trial of influenza vaccine with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or placebo in cancer patients', J Clin Oncol, 20: 4313-8.

Rapp, M., S. Grassmann, M. Chaloupka, P. Layritz, S. Kruger, S. Ormanns, F. Rataj, K. P. Janssen, S. Endres, D. Anz, and S. Kobold. 2016. 'C-C chemokine receptor type-4 transduction of T cells enhances interaction with dendritic cells, tumor infiltration and therapeutic efficacy of adoptive T cell transfer', Oncoimmunology, 5: e1105428.

Rapp, M., M. W. M. Wintergerst, W. G. Kunz, V. K. Vetter, M. M. L. Knott, D. Lisowski, S. Haubner, S. Moder, R. Thaler, S. Eiber, B. Meyer, N. Rohrle, I. Piseddu, S. Grassmann, P. Layritz, B. Kuhnemuth, S. Stutte, C. Bourquin, U. H. von Andrian, S. Endres, and D. Anz. 2019. 'CCL22 controls immunity by promoting regulatory T cell communication with dendritic cells in lymph nodes', J Exp Med, 216: 1170-81.

Reali, E., D. Canter, H. Zeytin, J. Schlom, and J. W. Greiner. 2005. 'Comparative studies of Avipox-GM-CSF versus recombinant GM-CSF protein as immune adjuvants with different vaccine platforms', Vaccine, 23: 2909-21.

Reck, M. 2018. 'Pembrolizumab as first-line therapy for metastatic non-small-cell lung cancer', Immunotherapy, 10: 93-105.

Revoltella, R. P., M. Menicagli, and D. Campani. 2012. 'Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as an autocrine survival-growth factor in human gliomas', Cytokine, 57: 347-59.

Robert, C., G. V. Long, B. Brady, C. Dutriaux, M. Maio, L. Mortier, J. C. Hassel, P. Rutkowski, C. McNeil, E. Kalinka-Warzocha, K. J. Savage, M. M. Hernberg, C. Lebbe, J. Charles, C. Mihalcioiu, V. Chiarion-Sileni, C. Mauch, F. Cognetti, A. Arance, H. Schmidt, D. Schadendorf, H. Gogas, L. Lundgren-Eriksson, C. Horak, B. Sharkey, I. M. Waxman, V. Atkinson, and P. A. Ascierto. 2015. 'Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation', N Engl J Med, 372: 320-30.

Rodenburg, R. J., R. F. Brinkhuis, R. Peek, J. R. Westphal, F. H. Van Den Hoogen, W. J. van Venrooij, and L. B. van de Putte. 1998. 'Expression of macrophage-derived chemokine (MDC) mRNA in macrophages is enhanced by interleukin-1beta, tumor necrosis factor alpha, and lipopolysaccharide', J Leukoc Biol, 63: 606-11.

Rohrle, N., M. M. L. Knott, and D. Anz. 2020. 'CCL22 Signaling in the Tumor Environment', Adv Exp Med Biol, 1231: 79-96.

Rosenberg, S. A., B. S. Packard, P. M. Aebersold, D. Solomon, S. L. Topalian, S. T. Toy, P. Simon, M. T. Lotze, J. C. Yang, C. A. Seipp, and et al. 1988. 'Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report', N Engl J Med, 319: 1676-80.

Sakaguchi, S., N. Mikami, J. B. Wing, A. Tanaka, K. Ichiyama, and N. Ohkura. 2020. 'Regulatory T Cells and Human Disease', Annu Rev Immunol, 38: 541-66.

Sakaguchi, S., K. Wing, Y. Onishi, P. Prieto-Martin, and T. Yamaguchi. 2009. 'Regulatory T cells: how do they suppress immune responses?', Int Immunol, 21: 1105-11.

Sallusto, F., B. Palermo, D. Lenig, M. Miettinen, S. Matikainen, I. Julkunen, R. Forster, R. Burgstahler, M. Lipp, and A. Lanzavecchia. 1999. 'Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function', Eur J Immunol, 29: 1617-25.

Sato, E., S. H. Olson, J. Ahn, B. Bundy, H. Nishikawa, F. Qian, A. A. Jungbluth, D. Frosina, S. Gnjatic, C. Ambrosone, J. Kepner, T. Odunsi, G. Ritter, S. Lele, Y. T. Chen, H. Ohtani, L. J. Old, and K. Odunsi. 2005. 'Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer', Proc Natl Acad Sci U S A, 102: 18538-43.

Schadendorf, D., F. S. Hodi, C. Robert, J. S. Weber, K. Margolin, O. Hamid, D. Patt, T. T. Chen, D. M. Berman, and J. D. Wolchok. 2015. 'Pooled Analysis of Long-Term Survival Data From Phase II and Phase III Trials of Ipilimumab in Unresectable or Metastatic Melanoma', J Clin Oncol, 33: 1889-94.

Schaniel, C., E. Pardali, F. Sallusto, M. Speletas, C. Ruedl, T. Shimizu, T. Seidl, J. Andersson, F. Melchers, A. G. Rolink, and P. Sideras. 1998. 'Activated murine B lymphocytes and dendritic cells produce a novel CC chemokine which acts selectively on activated T cells', J Exp Med, 188: 451-63.

Scheffer, S. R., H. Nave, F. Korangy, K. Schlote, R. Pabst, E. M. Jaffee, M. P. Manns, and T. F. Greten. 2003. 'Apoptotic, but not necrotic, tumor cell vaccines induce a potent immune response in vivo', Int J Cancer, 103: 205-11.

Scheibenbogen, C., A. Schmittel, U. Keilholz, T. Allgauer, U. Hofmann, R. Max, E. Thiel, and D. Schadendorf. 2000. 'Phase 2 trial of vaccination with tyrosinase peptides and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with metastatic melanoma', J Immunother, 23: 275-81.

Schreiber, R. D., L. J. Old, and M. J. Smyth. 2011. 'Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion', Science, 331: 1565-70.

Schumacher, K., W. Haensch, C. Roefzaad, and P. M. Schlag. 2001. 'Prognostic significance of activated CD8(+) T cell infiltrations within esophageal carcinomas', Cancer Res, 61: 3932-6.

Schwartz, R. H. 2003. 'T cell anergy', Annu Rev Immunol, 21: 305-34.

Scott, C. L., A. M. Aumeunier, and A. M. Mowat. 2011. 'Intestinal CD103+ dendritic cells: master regulators of tolerance?', Trends Immunol, 32: 412-9.

Serafini, P., R. Carbley, K. A. Noonan, G. Tan, V. Bronte, and I. Borrello. 2004. 'High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells', Cancer Res, 64: 6337-43.

Sette, M., P. D'Addabbo, G. Kelly, A. Cicconi, E. Micheli, S. Cacchione, A. Poma, C. Gargioli, V. Giambra, and D. Frezza. 2016. 'Evidence for a quadruplex structure in the polymorphic hs1.2 enhancer of the immunoglobulin heavy chain 3' regulatory regions and its conservation in mammals', Biopolymers, 105: 768-78.

Sharma, P., M. Retz, A. Siefker-Radtke, A. Baron, A. Necchi, J. Bedke, E. R. Plimack, D. Vaena, M. O. Grimm, S. Bracarda, J. A. Arranz, S. Pal, C. Ohyama, A. Saci, X. Qu, A. Lambert, S. Krishnan, A. Azrilevich, and M. D. Galsky. 2017. 'Nivolumab in metastatic urothelial carcinoma after platinum therapy (CheckMate 275): a multicentre, single-arm, phase 2 trial', Lancet Oncol, 18: 312-22.

Sheih, A., W. C. Parks, and S. F. Ziegler. 2017. 'GM-CSF produced by the airway epithelium is required for sensitization to cockroach allergen', Mucosal Immunol, 10: 705-15.

Shen, Z., S. Zhou, Y. Wang, R. L. Li, C. Zhong, C. Liang, and Y. Sun. 2010. 'Higher intratumoral infiltrated Foxp3+ Treg numbers and Foxp3+/CD8+ ratio are associated with adverse prognosis in resectable gastric cancer', J Cancer Res Clin Oncol, 136: 1585-95.

Sheng, J. R., L. Li, B. B. Ganesh, C. Vasu, B. S. Prabhakar, and M. N. Meriggioli. 2006. 'Suppression of experimental autoimmune myasthenia gravis by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is associated with an expansion of FoxP3+ regulatory T cells', J Immunol, 177: 5296-306.

Simons, J. W., E. M. Jaffee, C. E. Weber, H. I. Levitsky, W. G. Nelson, M. A. Carducci, A. J. Lazenby, L. K. Cohen, C. C. Finn, S. M. Clift, K. M. Hauda, L. A. Beck, K. M. Leiferman, A. H. Owens, Jr., S. Piantadosi, G. Dranoff, R. C. Mulligan, D. M. Pardoll, and F. F. Marshall. 1997. 'Bioactivity of autologous irradiated renal cell carcinoma vaccines generated by ex vivo granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene transfer', Cancer Res, 57: 1537-46.

Simons, J. W., B. Mikhak, J. F. Chang, A. M. DeMarzo, M. A. Carducci, M. Lim, C. E. Weber, A. A. Baccala, M. A. Goemann, S. M. Clift, D. G. Ando, H. I. Levitsky, L. K. Cohen, M. G. Sanda, R. C. Mulligan, A. W. Partin, H. B. Carter, S. Piantadosi, F. F. Marshall, and W. G. Nelson. 1999. 'Induction of immunity to prostate cancer antigens: results of a clinical trial of vaccination with irradiated autologous prostate tumor cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor using ex vivo gene transfer', Cancer Res, 59: 5160-8.

Smith, B. D., Y. L. Kasamon, J. Kowalski, C. Gocke, K. Murphy, C. B. Miller, E. Garrett-Mayer, H. L. Tsai, L. Qin, C. Chia, B. Biedrzycki, T. C. Harding, G. H. Tu, R. Jones, K. Hege, and H. I. Levitsky. 2010. 'K562/GM-CSF immunotherapy reduces tumor burden in chronic myeloid leukemia patients with residual disease on imatinib mesylate', Clin Cancer Res, 16: 338-47.

Smyth, M. J., D. I. Godfrey, and J. A. Trapani. 2001. 'A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy', Nat Immunol, 2: 293-9.

Soares, K. C., A. A. Rucki, A. A. Wu, K. Olino, Q. Xiao, Y. Chai, A. Wamwea, E. Bigelow, E. Lutz, L. Liu, S. Yao, R. A. Anders, D. Laheru, C. L. Wolfgang, B. H. Edil, R. D. Schulick, E. M. Jaffee, and L. Zheng. 2015. 'PD-1/PD-L1 blockade together with vaccine therapy facilitates effector T-cell infiltration into pancreatic tumors', J Immunother, 38: 1-11.

Soiffer, R., T. Lynch, M. Mihm, K. Jung, C. Rhuda, J. C. Schmollinger, F. S. Hodi, L. Liebster, P. Lam, S. Mentzer, S. Singer, K. K. Tanabe, A. B. Cosimi, R. Duda, A. Sober, A. Bhan, J. Daley, D. Neuberg, G. Parry, J. Rokovich, L. Richards, J. Drayer, A. Berns, S. Clift, L. K. Cohen, R. C. Mulligan, and G. Dranoff. 1998. 'Vaccination with irradiated autologous melanoma cells engineered to secrete human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor generates potent antitumor immunity in patients with metastatic melanoma', Proc Natl Acad Sci U S A, 95: 13141-6.

Sporri, R., and C. Reis e Sousa. 2005. 'Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4+ T cell populations lacking helper function', Nat Immunol, 6: 163-70.

Steinman, R. M., and J. Banchereau. 2007. 'Taking dendritic cells into medicine', Nature, 449: 419-26.

Steinman, R. M., and Z. A. Cohn. 1973. 'Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution', J Exp Med, 137: 1142-62.

Steinman, R. M., D. Hawiger, and M. C. Nussenzweig. 2003. 'Tolerogenic dendritic cells', Annu Rev Immunol, 21: 685-711.

Steinman, R. M., and M. C. Nussenzweig. 2002. 'Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance', Proc Natl Acad Sci U S A, 99: 351-8.

Street, S. E., J. A. Trapani, D. MacGregor, and M. J. Smyth. 2002. 'Suppression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon gamma', J Exp Med, 196: 129-34.

Sugiyama, D., H. Nishikawa, Y. Maeda, M. Nishioka, A. Tanemura, I. Katayama, S. Ezoe, Y. Kanakura, E. Sato, Y. Fukumori, J. Karbach, E. Jager, and S. Sakaguchi. 2013. 'Anti-CCR4 mAb selectively depletes effector-type FoxP3+CD4+ regulatory T cells, evoking antitumor immune responses in humans', Proc Natl Acad Sci U S A, 110: 17945-50.

Suzuki, H., N. Chikazawa, T. Tasaka, J. Wada, A. Yamasaki, Y. Kitaura, M. Sozaki, M. Tanaka, H. Onishi, T. Morisaki, and M. Katano. 2010. 'Intratumoral CD8(+) T/FOXP3 (+) cell ratio is a predictive marker for survival in patients with colorectal cancer', Cancer Immunol Immunother, 59: 653-61.

Tang, H. L., and J. G. Cyster. 1999. 'Chemokine Up-regulation and activated T cell attraction by maturing dendritic cells', Science, 284: 819-22.

Tsujikawa, T., T. Yaguchi, G. Ohmura, S. Ohta, A. Kobayashi, N. Kawamura, T. Fujita, H. Nakano, T. Shimada, T. Takahashi, R. Nakao, A. Yanagisawa, Y. Hisa, and Y. Kawakami. 2013. 'Autocrine and paracrine loops between cancer cells and macrophages promote lymph node metastasis via CCR4/CCL22 in head and neck squamous cell carcinoma', Int J Cancer, 132: 2755-66.

Ullenhag, G. J., J. E. Frodin, S. Mosolits, S. Kiaii, M. Hassan, M. C. Bonnet, P. Moingeon, H. Mellstedt, and H. Rabbani. 2003. 'Immunization of colorectal carcinoma patients with a recombinant canarypox virus expressing the tumor antigen Ep-CAM/KSA (ALVAC-KSA) and granulocyte macrophage colony- stimulating factor induced a tumor-specific cellular immune response', Clin Cancer Res, 9: 2447-56.

Valentine, J. F., R. N. Fedorak, B. Feagan, P. Fredlund, R. Schmitt, P. Ni, and T. J. Humphries. 2009. 'Steroid-sparing properties of sargramostim in patients with corticosteroid-dependent Crohn's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 study', Gut, 58: 1354-62.

van Elsas, A., A. A. Hurwitz, and J. P. Allison. 1999. 'Combination immunotherapy of B16 melanoma using anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-producing vaccines induces rejection of subcutaneous and metastatic tumors accompanied by autoimmune depigmentation', J Exp Med, 190: 355-66.

van Elsas, A., R. P. Sutmuller, A. A. Hurwitz, J. Ziskin, J. Villasenor, J. P. Medema, W. W. Overwijk, N. P. Restifo, C. J. Melief, R. Offringa, and J. P. Allison. 2001. 'Elucidating the autoimmune and antitumor effector mechanisms of a treatment based on cytotoxic T lymphocyte antigen-4 blockade in combination with a B16 melanoma vaccine: comparison of prophylaxis and therapy', J Exp Med, 194: 481-9.

Vasu, C., R. N. Dogan, M. J. Holterman, and B. S. Prabhakar. 2003. 'Selective induction of dendritic cells using granulocyte macrophage-colony stimulating factor, but not fms-like tyrosine kinase receptor 3-ligand, activates thyroglobulin-specific CD4+/CD25+ T cells and suppresses experimental autoimmune thyroiditis', J Immunol, 170: 5511-22.

Verbsky, J. W., and T. A. Chatila. 2013. 'Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked (IPEX) and IPEX-related disorders: an evolving web of heritable autoimmune diseases', Curr Opin Pediatr, 25: 708-14.

Vestergaard, C., H. Yoneyama, M. Murai, K. Nakamura, K. Tamaki, Y. Terashima, T. Imai, O. Yoshie, T. Irimura, H. Mizutani, and K. Matsushima. 1999. 'Overproduction of Th2-specific chemokines in NC/Nga mice exhibiting atopic dermatitis-like lesions', J Clin Invest, 104: 1097-105.

Vitali, C., F. Mingozzi, A. Broggi, S. Barresi, F. Zolezzi, J. Bayry, G. Raimondi, I. Zanoni, and F. Granucci. 2012. 'Migratory, and not lymphoid-resident, dendritic cells maintain peripheral self-tolerance and prevent autoimmunity via induction of iTreg cells', Blood, 120: 1237-45.

Vulcano, M., C. Albanesi, A. Stoppacciaro, R. Bagnati, G. D'Amico, S. Struyf, P. Transidico, R. Bonecchi, A. Del Prete, P. Allavena, L. P. Ruco, C. Chiabrando, G. Girolomoni, A. Mantovani, and S. Sozzani. 2001. 'Dendritic cells as a major source of macrophage-derived chemokine/CCL22 in vitro and in vivo', Eur J Immunol, 31: 812-22.

Weber, J. S., S. P. D'Angelo, D. Minor, F. S. Hodi, R. Gutzmer, B. Neyns, C. Hoeller, N. I. Khushalani, W. H. Miller, Jr., C. D. Lao, G. P. Linette, L. Thomas, P. Lorigan, K. F. Grossmann, J. C. Hassel, M. Maio, M. Sznol, P. A. Ascierto, P. Mohr, B. Chmielowski, A. Bryce, I. M. Svane, J. J. Grob, A. M. Krackhardt, C. Horak, A. Lambert, A. S. Yang, and J. Larkin. 2015. 'Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial', Lancet Oncol, 16: 375-84.

Wiedemann, G. M., M. M. Knott, V. K. Vetter, M. Rapp, S. Haubner, J. Fesseler, B. Kuhnemuth, P. Layritz, R. Thaler, S. Kruger, S. Ormanns, D. Mayr, S. Endres, and D. Anz. 2016. 'Cancer cell-derived IL-1alpha induces CCL22 and the recruitment of regulatory T cells', Oncoimmunology, 5: e1175794.

Wing, K., Y. Onishi, P. Prieto-Martin, T. Yamaguchi, M. Miyara, Z. Fehervari, T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2008. 'CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function', Science, 322: 271-5.

Wolchok, J. D., V. Chiarion-Sileni, R. Gonzalez, P. Rutkowski, J. J. Grob, C. L. Cowey, C. D. Lao, J. Wagstaff, D. Schadendorf, P. F. Ferrucci, M. Smylie, R. Dummer, A. Hill, D. Hogg, J. Haanen, M. S. Carlino, O. Bechter, M. Maio, I. Marquez-Rodas, M. Guidoboni, G. McArthur, C. Lebbe, P. A. Ascierto, G. V. Long, J. Cebon, J. Sosman, M. A. Postow, M. K. Callahan, D. Walker, L. Rollin, R. Bhore, F. S. Hodi, and J. Larkin. 2017. 'Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma', N Engl J Med, 377: 1345-56.

Wolf, A. M., D. Wolf, M. Steurer, G. Gastl, E. Gunsilius, and B. Grubeck-Loebenstein. 2003. 'Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients', Clin Cancer Res, 9: 606-12.

Wu, S., H. He, H. Liu, Y. Cao, R. Li, H. Zhang, H. Li, Z. Shen, J. Qin, and J. Xu. 2018. 'C-C motif chemokine 22 predicts postoperative prognosis and adjuvant chemotherapeutic benefits in patients with stage II/III gastric cancer', Oncoimmunology, 7: e1433517.

Xiao, H., Y. Peng, Y. Hong, L. Huang, Z. S. Guo, D. L. Bartlett, N. Fu, D. H. Munn, A. Mellor, and Y. He. 2013. 'Local administration of TLR ligands rescues the function of tumor-infiltrating CD8 T cells and enhances the antitumor effect of lentivector immunization', J Immunol, 190: 5866-73.

Xu, Y., N. H. Hunt, and S. Bao. 2008. 'The role of granulocyte macrophage-colony-stimulating factor in acute intestinal inflammation', Cell Res, 18: 1220-9.

Yan, W. L., K. Y. Shen, C. Y. Tien, Y. A. Chen, and S. J. Liu. 2017. 'Recent progress in GM-CSF-based cancer immunotherapy', Immunotherapy, 9: 347-60.

Yang, P., Q. J. Li, Y. Feng, Y. Zhang, G. J. Markowitz, S. Ning, Y. Deng, J. Zhao, S. Jiang, Y. Yuan, H. Y. Wang, S. Q. Cheng, D. Xie, and X. F. Wang. 2012. 'TGF-beta-miR-34a-CCL22 signaling-induced Treg cell recruitment promotes venous metastases of HBV-positive hepatocellular carcinoma', Cancer Cell, 22: 291-303.

Zhu, J. 2018. 'T Helper Cell Differentiation, Heterogeneity, and Plasticity', Cold Spring Harb Perspect Biol, 10.

Zitvogel, L., A. Tesniere, and G. Kroemer. 2006. 'Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion', Nat Rev Immunol, 6: 715-27.

Zou, W. 2005. 'Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance', Nat Rev Cancer, 5: 263-74.

8 Danksagung

Mein Dank gilt zuallererst Prof. Dr. med. Stefan Endres für die Ermöglichung der Durchführung meiner Doktorarbeit in seiner Abteilung für Klinische Pharmakologie. Hier lernte ich wissenschaftliches Arbeiten in einem unglaublich inspirierenden und unterstützenden Umfeld kennen, was maßgeblich zu meiner Persönlichkeitsentwicklung beitrug. Durch seine zusammenführende Art und seine Freude am Erfolg anderer prägte er während meiner gesamten Laborzeit das überaus angenehme Arbeitsklima in der gesamten Abteilung, was mir bis heute sehr imponiert.

Mein ganz besonderer Dank geht natürlich an meinen Doktorvater Prof. Dr. med. David Anz, der mir während meiner gesamten Promotionszeit und auch weit darüber hinaus als unermüdlicher Mentor und Wegbegleiter immer zur Seite stand. Seine beispiellose Leidenschaft für die Medizin und die Wissenschaft sowie sein herausragender Optimismus machen ihn für mich zu einem meiner größten Vorbilder!

Des Weiteren möchte ich mich ganz herzlich bei der gesamten AG Anz bedanken für die liebevolle Betreuung, den anregenden wissenschaftlichen Diskurs, die lockere und freundschaftliche Atmosphäre sowie die vielen tollen Momente abseits vom Labor. Insbesondere bedanken möchte ich mich an dieser Stelle bei Carolin Perleberg, Patrick Layritz, Ignazio Piseddu, Max Knott und Bastian Meyer.

Von ganzem Herzen möchte ich meiner Familie danken, für das Vertrauen und die immerwährende Unterstützung in jeder Hinsicht. Meinen Eltern, die mich immer und überall unterstützt haben und immer an mich geglaubt haben. Meinem Bruder Nicolas, der mich tagtäglich inspiriert und der zweifellos zu meinen größten Vorbildern gehört. Danke, dass du immer für mich da bist! Meiner Oma Helga möchte ich an dieser Stelle ebenfalls meine tiefste Dankbarkeit ausdrücken für ihr offenes Ohr und ihren immerwährenden und erhebenden Ansporn. Vielen, vielen Dank auch an meine Freunde und meinen Partner für ihren so wichtigen Rückhalt.

Danke!

9 Veröffentlichungen

Orginalarbeiten

2019 Wiedemann GM, **Röhrle N**, Makeshin MC, Fesseler J, Endres S, Mayr D and Anz D. (2019) Peritumoral CCL1 and CCL22 expressing cells in hepatocellular carcinomas shape the tumor immune infiltrate. *Pathology*, 51 (6): 586-592.

Rapp M, Wintergerst MWM, Kunz WG, Vetter VK, Knott MML, Lisowski D, Hauber S, Moder S, Thaler R, Eiber S, Meyer B, **Röhrle N**, Piseddu I, Grassmann S, Layritz P, Kühnemuth B, Stutte S, Bourquin C, von Andrian UH , Endres S and Anz D (2019). CCL22 controls immunity by promoting regulatory T cell communication with dendritic cells in lymph nodes. *Journal of Experimental Medicine*, 216 (5): 1170-1181

2020 Piseddu I*, **Röhrle N***, Knott MML, Moder S, Eiber S, Schnell K, Vetter V, Meyer B, Layritz P, Kühnemuth B, Wiedemann GM, Gruen J, Perleberg C, Rapp M, Endres S and Anz D. (2020) Constitutive expression of CCL22 is mediated by T cell-derived GM-CSF. T cell derived GM-CSF induces homeostatic CCL22 in DC. *Journal of Immunology,* 205 (8) 2056-2065. ***these authors contributed equally**

Buchbeitrag

2020 **Röhrle N**, Knott MML, Anz D (2020). CCL22 Signaling in the Tumor Environment. In: Birbrair A. (eds) Tumor Microenvironment. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 1231. Springer

Abstract

2021 Grün J, Piseddu I, Perleberg C, **Röhrle N**, Endres S and Anz D (2021). P01.02 TLR-mediated suppression of the CCL22-CCR4 axis as a new target for tumor immunotherapy. *Journal for Immunotherapy of Cancer*.

Präsentationen

2019 **Röhrle N**. (2019) Characterization of the GM-CSF CCL22 axis. 4th Annual Retreat, i-Target, Abtei Frauenwörth am Chiemsee (Vortrag)

Röhrle N. (2019) The GM-CSF CCL22 axis in homeostasis. FöFoLe Abschlussseminar, Herrsching am Ammersee (Vortrag)

Röhrle N, Piseddu I, Knott MML, Layritz P, Perleberg C, Endres S and Anz D. (2019) The GM-CSF CCL22 axis. World Immune regulation Meeting (WIRM), Davos, Schweiz (Posterpräsentation)