

Aus der
Abteilung für Thoraxchirurgie
Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Dr. Rudolf A. Hatz, FACS

Einfluss von CD25+ regulatorischen T-Zellen auf die therapeutische Effektivität tumorspezifischer T-Zellen nach LRAST (Lymphodepletion, Rekonstitution und aktiv-spezifischer Tumorthherapie) in einem murinen Melanom-Modell

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

vorgelegt von

Julia Regina Kovács

aus

Bad Neustadt an der Saale

Jahr

2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Hauke Winter
Prof. Dr. Iris Helfrich
Prof. Dr. Elfriede Nößner

Mitberichterstatter:

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Natasja van den Engel

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 09.11.2023

Meinem Onkel Alex, dem ‚Steinprofessor‘

Inhaltsverzeichnis

1	Kurzzusammenfassung.....	6
2	Einleitung.....	8
2.1	Das maligne Melanom und Tumorimmunologie.....	8
2.2	T-Zellen und regulatorische T-Zellen (Treg)	9
2.3	Weitere relevante Immunzellpopulationen	10
2.3.1	Myeloide Suppressorzellen (MDSC)	10
2.3.2	Natürliche Killerzellen (NK).....	11
2.4	Tumorvakzine und Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF)	11
2.5	Lymphodepletion, Rekonstitution und aktiv-spezifische Tumorthherapie (LRAST)	13
2.6	CD25-Antikörper und Depletion von CD25+ Zellen.....	15
3	Material und Methoden	17
3.1	Zellkultur.....	17
3.1.1	Bedingungen für die Zellkultur	17
3.1.2	Verwendete Zelllinien und Zellkultur	20
3.1.3	Auftauen und Einfrieren von Zellen	22
3.2	Verwendete Mausstämme	23
3.3	Injektionen von Zellen und Antikörpern	23
3.4	Messung des Tumorwachstums.....	24
3.5	Blut- und Organentnahme.....	25
3.6	Isolation von murinen Milzzellen	25
3.7	Isolation von murinen Lymphknotenzellen.....	26
3.8	Lyse von Blut.....	26
3.9	Durchflusszytometrie (FACS).....	26
3.9.1	Extrazelluläre Färbung.....	29
3.9.2	Intrazelluläre Färbung	29
3.9.3	Nachweis von Treg und aktivierten T-Zellen nach PC61-Gabe	30
3.10	Zytokin-Release-Assay (CRA)	30
3.11	IFN γ ELISA	32
3.12	GM-CSF ELISA	33
3.13	Statistik	33
4	Ergebnisse.....	34
4.1	Untersuchung der Effektivität der Rekonstitution	34
4.2	Depletion der CD25+ T-Zellen durch den monoklonalen Antikörper PC61	36

4.3	Zusammensetzung des Rekonstitutionsproduktes	39
4.4	Durchflusszytometrische Zellcharakterisierung nach LRAST	40
4.5	GM-CSF Sekretion der D5G6 Zellen.....	50
4.6	Tumorspezifische IFN γ -Produktion in Lymphknoten mit LRAST und CD25-Depletion	52
4.7	Einfluss der Depletion der CD25+ T-Zellen auf das Tumorwachstum in vivo	57
5	Diskussion.....	61
5.1	Lymphodepletion, Rekonstitution und aktiv-spezifische Tumorthherapie.....	61
5.2	Einfluss des Rekonstitutionsproduktes	64
5.3	Einfluss von PC61 auf die Frequenz von Treg und Bedeutung des Zeitpunkts der Depletion 66	
5.4	Klinische Umsetzbarkeit	68
6	Zusammenfassung.....	70
7	Abkürzungsverzeichnis	72
8	Abbildungsverzeichnis.....	75
9	Tabellenverzeichnis	76
10	Literaturverzeichnis.....	77
11	Danksagungen	82
12	Affidavit	83
13	Publikationsliste	84

1 Kurzzusammenfassung

Tumorspezifische T-Zellen können nach *Lymphodepletion* durch Gabe von Cyclophosphamid, *Rekonstitution* mit syngenem Milzzellen und *aktiv-spezifischer Tumorstimmung* mit mGM-CSF produzierenden bestrahlten Melanomzellen (LRAST) in Vakzin-drainierenden Lymphknoten *in vivo* induziert werden [1].

Durch aktiv-spezifische Immunisierung aktivierte tumor-spezifische T-Zellen verlängern das Überleben von Versuchstieren mit etablierten pulmonalen Melanom Micrometastasen. Der therapeutische Effekt tumorspezifischer T-Zellen wird möglicherweise durch die Induktion von regulatorischen CD25⁺ Foxp3⁺ T-Zellen (Treg) vermindert. Treg regulieren die Homeostase des Immunsystems durch aktive Hemmung der Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen und verhindern so die Entstehung von Autoimmunkrankheiten. Sie supprimieren tumor-spezifische Effektor-T-Zellen und können im Rahmen von Tumorerkrankungen ein Wachstum des Tumors begünstigen. Im Rahmen dieser Arbeit soll die Bedeutung von CD25⁺ Zellen für die Induktion von tumorspezifischen T-Zellen im Rahmen von LRAST am Mausmodell untersucht werden.

Ziele dieser Arbeit waren herauszufinden, ob:

vermehrt CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Zellen (Treg) nach LRAST in Blut, Milz und Tumor von Mäusen mit etabliertem D5-Tumor nachgewiesen werden können;

CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Zellen (Treg) durch den autologen T-Zelltransfer zur Immunrekonstitution nach Immundepletion vom Spender zum Empfänger übertragen werden?

CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Zellen (Treg) durch Einsatz eines anti-CD25 monoklonalen Antikörper PC61 depletiert werden und ob dies einen positiven Einfluss auf die Induktion und Wirkung von tumorspezifischen T-Zellen hat?

CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Zellen (Treg) einen Einfluss auf die Induktion tumorspezifischer T-Zellen haben?

Mittels Durchflusszytometrie konnte nach i.p. Gabe des Depletionsantikörpers PC61 eine signifikant verminderte Anzahl CD25⁺ Foxp3⁺ Zellen im Blut der behandelten Empfängertiere nachgewiesen werden. Nach zweimaliger Injektion konnten CD25⁺ Foxp3⁺ Zellen fast vollständig depletiert werden (s. Kap. 4.2).

Durch eine in vivo Depletion der CD25⁺ T-Zellen vor aktiv-spezifischer Tumorstimulation konnte das Tumorstadium subcutan wachsender Tumore verlangsamt werden. Auch konnte die IFN γ -Produktion tumor-spezifischer T-Zellen aus Tumorstimulation-drainierenden Lymphknoten nach Depletion CD25⁺ Zellen durch s.c. Applikation des CD25-Antikörpers vor Tumorstimulation gesteigert werden. In Bezug auf die Depletion der Spendermäuse für die Rekonstitution zeigte sich die höchste IFN γ -Sekretion nach Gabe von Isotyp-Antikörpern. Nach Depletion der CD25⁺ Zellen in den Spendermäusen führte zu einer deutlich erniedrigten tumor-spezifischen IFN γ -Produktion in den Tumorstimulation-drainierenden Lymphknoten.

Nach Depletion der CD25⁺ Zellen durch Gabe des CD25-Depletionsantikörpers PC61 im Empfänger bzw. der tumortragenden Maus lässt sich eine zu erwartend niedrigere Anzahl CD25⁺ Zellen im Blut der Tiere nachweisen. Zudem kommt es zu einer Steigerung der Induktion tumor-spezifischer T-Zellen in Tumorstimulation-drainierenden Lymphknoten, was sich durch die gesteigerte tumorspezifische IFN γ -Sekretion der T-Zellen nachweisen lässt. Zudem kam es zu einer Verlangsamung des Wachstums s.c. injizierter Tumore.

Die Depletion der CD25⁺ Zellen im Milzzellspender vor adoptivem Milzzelltransfer bringt keinen Nutzen für die Entwicklung einer tumorspezifischen T-Zell-Antwort. Ursächlich könnte die Depletion von ebenfalls CD25⁺ Effektor-T-Zellen (Teff) sein, was zu einer geringeren IFN γ -Produktion und somit geringeren Anti-Tumor-Effektivität führt.

Um vor allem bei der Therapie von menschlichen Malignomen erfolgreich zu sein wird wohl auch weiterhin ein multimodales Konzept benötigt, in dem jedoch die Immuntherapie das wohl größte Potenzial zur Weiterentwicklung hat.

2 Einleitung

2.1 Das maligne Melanom und Tumorimmunologie

Für das Jahr 2016 wurden vom Zentrum für Krebsregisterdaten ca. 23.000 Neuerkrankungen in Deutschland für Hautkrebs erfasst [2]. Im Jahr 2016 betrug die Zahl der Sterbefälle beim Malignen Melanom fast 3000 [2]. Die Einteilung des malignen Melanoms erfolgt nach der TNM-Klassifikation. Diese berücksichtigt die Tumordicke, die Anzahl der befallenen Lymphknoten sowie die Fernmetastasierung. Zur klinischen Unterscheidung der verschiedenen Stadien wird die UICC-Klassifikation (aktuell Version 8, 2016) verwendet. In frühen Stadien ohne Vorliegen von Fernmetastasen kann eine chirurgische Therapie kurativ sein. In fortgeschrittenen Stadien muss eine chirurgische Therapie mit einer Systemtherapie kombiniert werden.

Ursächlich für eine Entartung sind Gen-Mutationen in den Zellen. Es kommen dafür Spontanmutationen oder durch äußere Einflüsse ausgelöste Mutationen in Frage. Im Falle des Melanoms ist beispielsweise eine hohe UV-Exposition als Risikofaktor bekannt [3]. Insbesondere Menschen mit einem hellen Hauttyp haben ein erhöhtes Risiko für die Entstehung von Melanomen [4].

Das maligne Melanom gilt als ein immunogener Tumor. Durch die Expression von tumor-assoziierten und tumorspezifischen Antigenen auf der Oberfläche der Tumorzellen ergeben sich mögliche Angriffspunkte für die Entwicklung tumorspezifischer T-Zellen. Ziel der Immuntherapie ist es, eine effektive Anti-Tumor-Antwort zu generieren.

Als erste therapeutisch wirksame Immuntherapie bei Patienten mit einem Melanom wurde hochdosiertes Interleukin-2 (IL-2) zugelassen [5]. IL-2 spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung und Stimulation von T-Zellen und Natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen). Durch die IL-2 Stimulation sind diese Zellen in der Lage zytolytische Eigenschaften zu entwickeln und somit Tumorzellen zu zerstören [6].

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl therapeutisch wirksamer Immuntherapien für die Behandlung von Patienten mit einem malignen Melanom entwickelt.

2.2 T-Zellen und regulatorische T-Zellen (Treg)

T-Zellen spielen im Rahmen der Immunantwort bei vielen Erkrankungen eine wichtige Rolle. Vorläuferzellen aus dem Knochenmark gelangen zur Reifung und Selektion in den Thymus. Im Anschluss daran wandern die T-Zellen in die Peripherie aus. Es entwickeln sich CD4+ T-Helferzellen, die je nach Zytokinstimulation zu spezifischen Subtypen differenzieren. CD4+ T-Zellen sind unter anderem an der Aktivierung zytotoxischer CD8+ T-Zellen beteiligt, die im Rahmen von Infektionen oder bei beschädigten Körperzellen Apoptose auslösen. Aus der CD8+ Zellpopulation entwickeln sich zytotoxische CD8+ Zellen und Gedächtniszellen. CD8+ Gedächtniszellen sind Zellen, die nach Antigenkontakt persistieren und so ein immunologisches ‚Gedächtnis‘ bilden [7]. CD8+ Gedächtniszellen die im peripheren Gewebe zu finden sind werden als Effektor-Gedächtniszellen (effector memory T cell) bezeichnet, im Gegensatz zu den in den zentralen lymphoiden Organen angesiedelten Zellen, die als zentrale Gedächtniszellen (central memory T cell) bezeichnet werden [8, 9]. Die Unterscheidung der verschiedenen Subpopulationen kann mit Hilfe der Oberflächenmarker CD44 und CD62L erfolgen. Beide Populationen weisen eine starke CD44-Positivität auf (CD44^{hi}), Effektor-Gedächtniszellen exprimieren im Gegensatz zu zentralen Gedächtniszellen kein CD62L (Phänotyp Effektor-Gedächtniszelle CD3+CD8+CD44^{hi}CD62L-, Phänotyp zentrale Gedächtniszelle CD3+CD8+CD44^{hi}CD62L+) [10, 11].

Treg sind eine Subgruppe der CD4+ T-Zellen und stellen ca. 5% dieser Population dar [12]. Treg regulieren die Homeostase des Immunsystems durch aktive Hemmung der Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen und verhindern so die Entstehung von Autoimmunerkrankheiten. Sie supprimieren tumor-spezifische Effektor-T-Zellen und können im Rahmen von Tumorerkrankungen ein Wachstum des Tumors begünstigen. CD25 gilt als ein charakteristischer Oberflächenmarker regulatorischer T Zellen (Treg) [13]. CD25 entspricht der α -Kette des IL-2 Rezeptors und wird von ruhenden CD4+-T-Zellen in der Regel nicht exprimiert. Nach Aktivierung der CD4+ T-Zellen kommt es zu der Expression von CD25 [14]. Treg exprimieren deutlich mehr CD25 als aktivierte CD4+ T-Zellen. Das Ausmaß der Expression

kann durchflusszytometrisch quantitativ bestimmt werden. Treg werden als CD4+CD25+^{high} charakterisiert, aktivierte CD4+ T-Zellen als CD4+CD25+^{low} [13].

Die Rolle der Treg in der Tumorummunologie ist nicht abschließend geklärt und unterscheidet sich auch in den verschiedenen Tumorentitäten [15]. In Ovarialkarzinomen konnte nachgewiesen werden, dass eine erhöhte Anzahl an Treg durch Unterdrückung der Produktion von IL-2 und IFN γ zu einem schlechteren Überleben führt [16]. In Patienten mit kolorektalen Karzinomen konnte gezeigt werden, dass T-Zellen mit geringer Foxp3-Expression zu einer deutlich verbesserten Prognose führen [17].

Durch ihre immunmodulatorischen Eigenschaften spielen Treg auch in der Transplantationsimmunologie eine wichtige Rolle. In präklinischen Studien konnte nach Knochenmarks- bzw. Stammzelltransplantation durch den adoptiven Transfer von Treg eine Graft-versus-host-Erkrankung gehemmt werden [18, 19]. Auch nach Transplantation von Inselzellen konnte durch den Transfer von Treg eine Organabstoßung verzögert und eine Transplantatvaskulopathie verhindert werden [20, 21].

2.3 Weitere relevante Immunzellpopulationen

2.3.1 Myeloide Suppressorzellen (MDSC)

MDSC (*myeloid-derived suppressor cells*) stellen eine heterogene Gruppe immunsuppressiver Zellen dar. Sie stammen aus dem Knochenmark und sind nicht ausgereifte myeloide Vorläuferzellen [22]. Ein Zusammenhang zwischen MDSC und Tumorwachstum wurde bereits in den 70er Jahren erstmalig berichtet, in den 80er und 90er Jahren wurden spezifische Untersuchungen zu den Wirkweisen der MDSC durchgeführt [23].

Die suppressive Wirkung der Zellen beruht auf der Interaktion mit andere Immunzellen. Unter anderem sind MDSC in der Lage T- Zellen und NK-Zellen funktionell zu hemmen. Außerdem können sie die Apoptose von CD8+ T-Zellen auslösen [24]. Zudem kann durch Expression von CD40 auf MDSC eine Treg-Expansion induziert werden [25].

Der Phänotyp diese Zellgruppe ist in Mäusen durch die Expression der Oberflächenmoleküle Gr-1 und CD11b charakterisiert [26]. Gr-1 besteht aus 2 verschiedenen Epitopen, Ly6G und Ly6C. Durch Verwendung von Antikörpern für diese spezifischen Epitope ist eine weitere

Differenzierung der MDSC in monozytäre (CD11b+Ly6G-Ly6C^{hi}) und polymorphonukleäre (CD11b+Ly6G+Ly6C+) MDSC möglich [27].

2.3.2 Natürliche Killerzellen (NK)

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) entwickeln sich in Knochenmark von Mäusen. Sie sind in der Lage, Tumorzellen durch Ausschüttung von Granzym B und Perforin direkt zu lysieren [28]. Außerdem können sie verschiedene inflammatorische Zytokine (z.B. TNF- α , IFN- γ) produzieren und so zur direkten Zerstörung von Tumorzellen beitragen [29].

Zur Identifikation von NK-Zellen wurde von uns der Oberflächenmarker NK 1.1 verwendet. Um die funktionellen Eigenschaften mitzubestimmen wurde Granzym B intrazellulär gemessen [30].

2.4 Tumorvakzine und Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF)

Der Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor hat eine Vielzahl an Effekten auf verschiedene Zellen des Immunsystems (s. Abb. 1) [31]. Humanes GM-CSF konnte erstmals 1985 am Sloan-Kettering-Institut hergestellt werden [32].

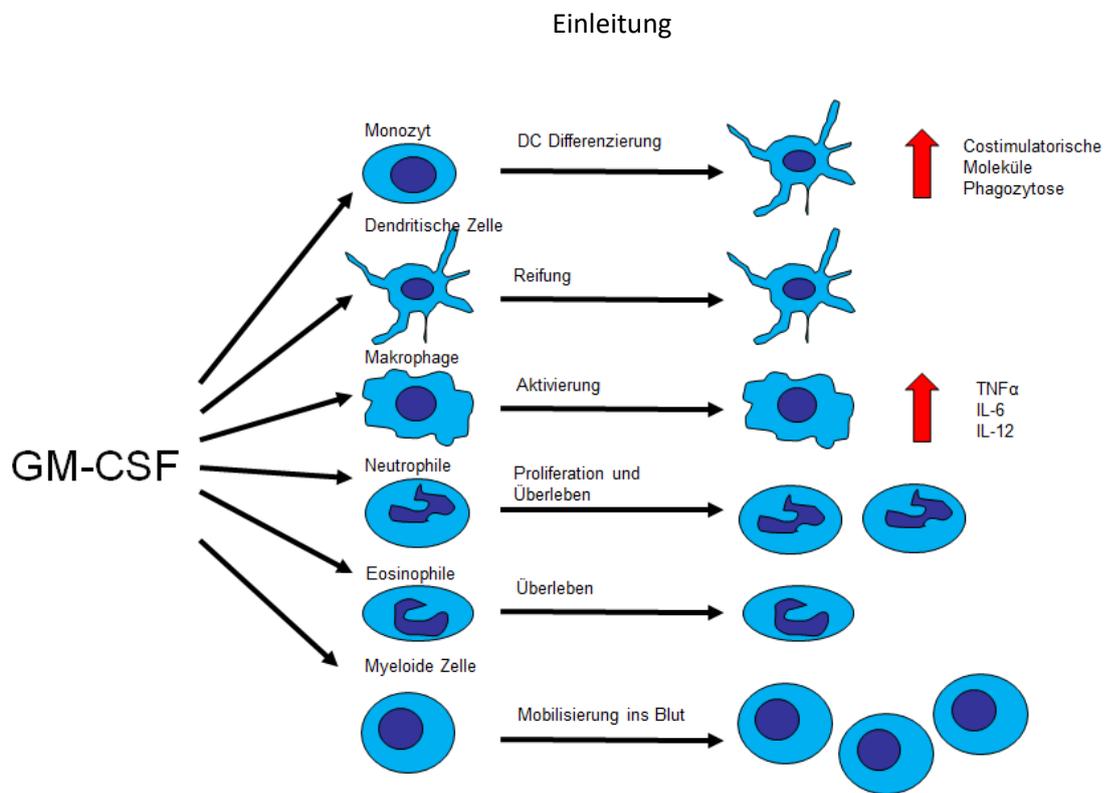


Abbildung 1: Effekte von GM-CSF, adaptiert nach Kaufman et al [31]

Das Ziel einer erfolgreichen Vakzine besteht darin, dem Immunsystem ein spezifisches Antigen zur Verfügung zu stellen. Dieses Antigen wird durch Antigen-präsentierende Zellen aufgenommen, in Lymphknoten transportiert und dort CD8+ T-Zellen präsentiert. Nachdem Antigen-spezifische T-Zellen das Antigen in Zusammenhang mit co-stimulatorischen Molekülen erkennt, kommt es zu einer klonalen Vermehrung dieser T-Zellen. Dieses Prinzip hat sich bereits Edward Jenner bei der Entwicklung der Pocken-Vakzine zu Nutze gemacht [33].

Um Vakzinen effektiver zu machen, werden Adjuvanzen verwendet. Adjuvanzen führen zu einer Stimulation des Immunsystems. Im von uns verwendeten Modell wird GM-CSF als Adjuvans verwendet, da es die Immunogenität der Vakzine deutlich erhöhen kann (s. Abb. 1). Auch verschiedene Zytokine wie IL-2, IL-12 oder IL-4 wurden erfolgreich in Tumorzvakzinen verwendet, um deren Effektivität zu verbessern [34]. Bakterielle Komponenten wie Lipopolysaccharid (LPS) aus Gram-negativen Bakterien oder Monophosphoryl Lipid A (MPL) aus Salmonellen werden ebenfalls eingesetzt, da bakterielle Komponenten besonders effektiv zytotoxischen T-Zellen aktivieren [35].

In Versuchen an Mäusen konnten durch eine Behandlung mit GM-CSF sezernierenden Melanomzellen eine erhöhte Anzahl an Eosinophilen, Monozyten, Makrophagen und

Lymphozyten in den tumor-drainierenden Lymphknoten induziert werden. Als Folge konnte eine gesteigerte Induktion von tumorspezifischen T-Zellen beobachtet werden [36].

2.5 Lymphodepletion, Rekonstitution und aktiv-spezifische Tumorthherapie (LRAST)

Mackall et al konnten zeigen dass nach Lymphodepletion und nachfolgender Rekonstitution ein Milieu geschaffen wurde, in dem vermehrt Antigen-spezifische T-Zellen induziert werden [37]. Wang et al. konnten dieses im Rahmen der Induktion tumor-spezifischer T-Zellen für die Behandlung des malignen Melanoms im Tiermodell erfolgreich umsetzen [38]. Aufbauend auf diesen Beobachtungen und den Arbeiten der Arbeitsgruppe von B. Fox et al. des Earle A. Childs Research Institutes in Portland OR, USA wollten wir die Bedeutung von Treg im Rahmen dieses Vakzinierungs-Schema untersuchen.

Das dieser Arbeit zugrunde liegende Therapieschema zur Induktion Tumor-spezifischer T-Zellen setzt sich aus *Lymphodepletion*, *T-Zell Rekonstitution* und *aktiv-spezifischer Immuntherapie* zusammen. Die Lymphodepletion wird durch intraperitoneale Gabe von Cyclophosphamid hervorgerufen. Alternativ kann auch eine Lymphodepletion durch Bestrahlung induziert werden [1, 39, 40]. Durch Lymphodepletion wird eine Expansion von Lymphozyten hervorgerufen, die sogenannte homeostatische Proliferation oder Lymphopenie-induzierten Proliferation. Während dieser Phase sind die T-Zellen besonders empfindlich für eine Antigenstimulation. Durch Verabreichen eines spezifischen Antigens in dieser Phase kann eine vermehrte Expansion von antigenspezifischen T-Zellen erreicht werden [37, 41]. Die Verbesserung der therapeutischen Aktivität durch Kombination von Lymphodepletion und Rekonstitution kombiniert mit aktiver Immuntherapie konnte bereits in präklinischen Versuchen gezeigt werden [41-43].

In einer Studie von Bracci et al. [44] konnte gezeigt werden, dass die Lymphodepletion mittels Injektion von Cyclophosphamid (100mg/kgKG) zu einer unspezifischen Proliferation von adoptiv-transferierten Zellen führte. Sowohl Milzzellen von mit Tumor vakzinierten Mäusen als auch Milzzellen von naiven Mäusen proliferierten nach Lymphodepletion. Interessanterweise fand sich auch eine Proliferation Tumor-spezifischer T-Zellen nach Lymphodepletion und Tumor-spezifischer Vakzinierung. Außerdem wurde durch die

Vakzinierung das „Homing“ von B- und T-Zellen sowohl im Lymphknoten als auch im Tumor verbessert und die Frequenz der tumorspezifischen, $\text{IFN}\gamma$ -produzierenden T-Zellen durch die Gabe von Cyclophosphamid gesteigert [44].

Die Immunzellrekonstitution wurde durch den Transfer von Milzzellen aus Spendermäusen durchgeführt. Durch adoptiven Transfer von naiven T-Zellen und tumorspezifischen Effektor-T-Zellen konnte eine verbesserte Anti-Tumor-Antwort und eine Hemmung des Tumorwachstums in einem MCA-induzierten Fibrosarkom-Modell sowie in einem Melanom- und Colonkarzinom-Modell gezeigt werden [45, 46].

Die aktiv-spezifische Tumorummunisierung erfolgte in unserem murinen Melanom-Modell durch eine Vakzinierung mit bestrahlten D5G6-Zellen, einem GM-CSF transfizierten Klon einer D5-Melanom-Zelllinie.

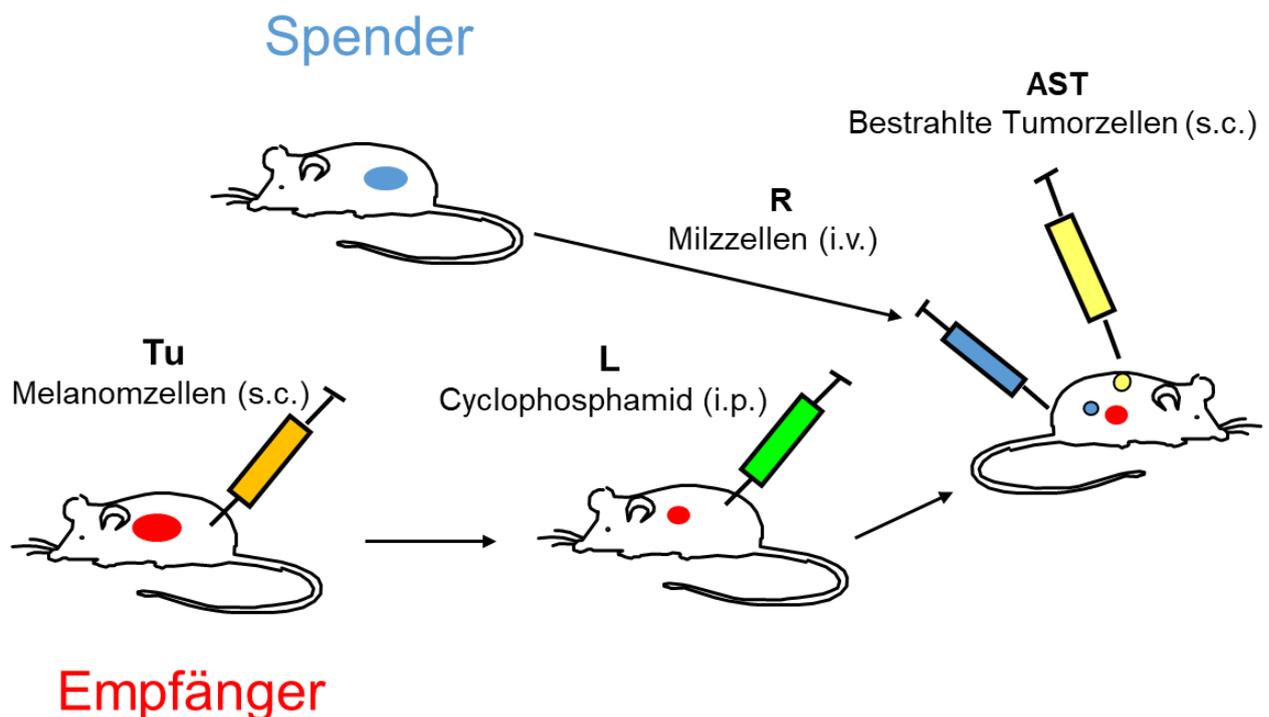


Abbildung 2: LRAST Therapieschema. Die Tumoringokulation mit D5G6-Zellen die s.c. injiziert wurden erfolgte 3 Tage (Tu, d -3) vor der Lymphodepletion mit Cyclophosphamid, welches i.p. injiziert wurde (L, d0). Einen Tag später erfolgte dann die Immunzellrekonstitution durch i.v. Gabe von Spendermilzzellen sowie die aktiv-spezifische Tumorummunisierung durch s.c. Gabe von bestrahlten D5G6-Zellen (R + AST, d1), [47].

In einem murinen Magenkarzinom-Tumormodell (mGC8) konnte durch LRAST eine langanhaltende tumorspezifische Immunantwort nachgewiesen werden. Auch nach

wiederholter s.c. Tumor-Gabe kam es nicht zum Auswachsen des Tumors in den aktiv immunisierten Mäusen, was für die Induktion einer tumorspezifischen Immunität spricht. Zudem konnte die tumor-spezifische IFN- γ Sekretion von T-Zellen aus Tumorzell-drainierenden Lymphknoten verbessert und das Wachstum von etablierten soliden subkutanen Tumoren verlangsamt werden [1]. Treg sind in der Lage, antigenspezifische T-Zell Funktionen zu unterdrücken [48] [12]. Sie wurden erstmalig von Gershon et al. in den frühen 1970er Jahren beschrieben und „suppressive T-Zellen“ genannt [49, 50]. Viele murine Treg sind durch die intrazelluläre Expression von Foxp3, dem Transkriptionsfaktor forkhead box p3' charakterisiert [51]. Im Menschen kann Foxp3 alleine nicht zur Differenzierung zwischen Treg und T-Zellen verwendet werden, da es auch auf Effektor-T-Zellen exprimiert wird [52]. Zu den Suppressormechanismen von Treg zählt die kompetitive Aufnahme von Interleukin-2 (IL-2) [53]. Aktivierte humane Treg exprimieren Granzyme A und können über einen Perforin-abhängigen Signalweg T-Zellen und antigen-präsentierende Zellen (APC) abtöten [54]. Murine Treg nutzen hingegen einen Perforin-unabhängigen Mechanismus, der auf der Ausschüttung von Granzyme B basiert [55]. Über einen CTLA-4 abhängigen Kontakt mit APCs sind Treg in der Lage die Expression von Indoleamin 2,3-Dioxygenase (IDO) in APCs zu induzieren [56]. Dieses Enzym baut die essentielle Aminosäure Tryptophan ab und supprimiert somit die Aktivierung von T-Zellen, was zu einer erhöhten Immuntoleranz im Tumormilieu führt [57]. Durch Induktion der Expression von B7-H4 in Monozyten, Makrophagen und myeloiden Dendritischen Zellen wird durch Treg die T-Zell-Antwort vermindert [58, 59].

2.6 CD25-Antikörper und Depletion von CD25+ Zellen

Durch die Beobachtungen in den verschiedenen murinen Tumor-Modellen wurde von der Food and Drug Administration (FDA, USA) der Einsatz von CD25-Antikörpern auch in klinischen Studien zugelassen. 1999 wurde durch die FDA erstmalig Denileukinfiditox (Ontak) als Medikament zugelassen. Ontak ist ein Fusionsprotein aus Diphtherietoxin und IL-2 [60]. Die Wirkweise beruht auf der Internalisierung des Proteins in CD25+ Zellen, wodurch die Proteinsynthese gehemmt und so die Apoptose ausgelöst wird [60]. In den Vereinigten Staaten war die Zulassung auf die Therapie von kutanen T-Zell-Lymphomen beschränkt. Aufgrund erheblicher Nebenwirkungen wurde die Anwendung von Ontak 2014 gestoppt.

Einleitung

Der monoklonale CD25-Antikörper Daclizumab führte in einer Studie mit Patienten mit metastasiertem Mammakarzinom zu einer Elimination der Treg im peripheren Blut und kombiniert mit einer Antigen-Vakzine zu einer verbesserten T-Zell-Antwort [61]. Der Antikörper erhielt initial die Zulassung für die Behandlung der Abstoßung nach Nierentransplantation und später zur Behandlung schubförmig auftretender multipler Sklerose, wurde 2018 aufgrund der schweren beobachteten Nebenwirkungen wieder vom Markt genommen [62].

3 Material und Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Bedingungen für die Zellkultur

Die Zellkultur wurde in einem S1-Labor in der Chirurgischen Forschung des Klinikums Großhadern durchgeführt. In jedem Quartal wurde ein Mykoplasmentest der verwendeten Zelllinien durchgeführt, um eine Verunreinigung auszuschließen.

Tabelle 1: Geräte

Bezeichnung	Hersteller	Anmerkung
Zentrifuge Rotina 48R	Hettich, Tuttlingen, D	
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg, D	
Minizentrifuge Sprout™	Heathrow Scientific, Vernon Hills, USA	
Sterilwerkbänke Hera Safe	Heraeus, Hanau, D	
Vortex K-550-GE	Bender & Hobein AG, Bruchsal, D	
Vortex VX100	Labnet, Edison, USA	
Gefrierschrank Hera freeze	Heraeus, Hanau, D	-80°C
Gefrierschrank Arctis	AEG, Nürnberg, D	-20°C
Gefrierschrank Öko Super	Liebherr, Biberach, D	-20°C
Kühlschrank Profi Line	Liebherr, Biberach, D	4°C
Eismaschine	KBS, Mainz, D	
Neubauer Zählkammer improved	Roth, Karlsruhe, D	

Material und Methoden

Bezeichnung	Hersteller	Anmerkung
Pipetten Reference	Eppendorf, Hamburg, D	
Transferpetten S	Brand, Wertheim, D	
Transferpette S-8	Brand, Wertheim, D	
Accu-jet pro Pipettierhilfe	Brand, Wertheim, D	
Multipette Plus	Eppendorf, Hamburg, D	
Dampfsterilisator Varioklav	HP Medizintechnik GmbH, Oberschleißheim, D	
Autoklav	Münchner Medizin Mechanik GmbH, Planegg, D	
Spülmaschine Professional G7883	Miele, Gütersloh, D	
Trockenschrank	Heraeus, Hanau, D	
Sterilgutverpackungsmaschine Typ480	Horst Wierick GmbH, Ratekau, D	
Mikroskop Laborlux S	Leitz (Leica Microsystems GmbH), Wetzlar, D	
Mikroskop ID03	Zeiss, Oberkochen, D	
Brutschrank 9040-0013	Binder, Tuttlingen, D	37°C, 5% CO2
Wasserbad Typ MB	Julabo, Seelbach, D	
FACS Calibur	BD, Franklin Lakes, USA	
FACS LSR II	BD, Franklin Lakes, USA	

Material und Methoden

Bezeichnung	Hersteller	Anmerkung
Stickstofftank GT55	Air Liquide Medical, Düsseldorf, D	
Stickstofftank Arpege 75	Air Liquide Medical, Düsseldorf, D	
Stickstofftank TR7	Air Liquide Medical, Düsseldorf, D	
Mr. Frosty freezing container	Thermo Scientific, Waltham, USA	
Digitaler Messschieber 150mm	HOLEX, München, D	
ELISA Reader Versa Max	Molecular Devices, San Jose, USA	

Tabelle 2: Kulturmedien und Puffer

Medium	Zusammensetzung
Complete Medium murin	500ml RPMI, 50ml FBS Biochrom, 10ml L-Gln, 10ml NEAA, 10ml Na-Pyr, 0,5ml β -Mercaptoethanol
DMEM Medium	500 ml DMEM, 50ml FBS, 10ml L-Gln, 5ml NEAA, 5ml Na-Pyr
Complete Medium Gold	500ml RPMI, 50ml FBS Gold, 10ml L-Gln, 10ml NEAA, 10ml Na-Pyr, 0,5ml β -Mercaptoethanol
IL2-Medium	500ml RPMI, 50ml FBS Biochrom, 10ml L-Gln, 10ml NEAA, 10ml Na-Pyr, 0,5ml β -Mercaptoethanol + 10U/ml IL-2
FACS Puffer	Für 1l: 5g BSA, 2ml 10% NaN_3 , 1l PBS
Ery-Lyse Puffer	Ammoniumchlorid 8,3g/l, Potassiumbicarbonat 1g/l, EDTA 0,0372 g/l in 1l Millipore H_2O lösen

Medium	Zusammensetzung
Transfer-Medium für Milzen	PBS mit 1% FBS
FACS Working solution	Verhältnis Fixierungs/Permeabilisierungs Konzentrat zu Fixierungs/Permeabilisierungs Verdünnung: 1:3 (Set von eBiosciences)
Permeabilisierungs Puffer	Permeabilisierungs Puffer (10X) mit Millipore H2O auf einfache Konzentration herunterverdünnen
Karbonatpuffer	0,84g NaHCO ₃ , 0,356g Na ₂ CO ₃ , 100ml H ₂ O Millipore, 0,1M, pH 9,5
Blockierungslösung	2% BSA in PBS (für 50ml: 1g BSA in 50ml 1x PBS lösen)
Verdünnungslösung	1% BSA in PBS (Blockierungslösung 1:1 mit PBS verdünnen)
ELISA Waschpuffer	0,05% Tween-20 in PBS (für 1l: 1000ml PBS, 2,5ml 20% Tween-20), pH 7,4

3.1.2 Verwendete Zelllinien und Zellkultur

Als Tumormodell wurde das murine Melanom D5 verwendet. Diese Zelllinie ist ein gering immunogener Subklon des B16BL6-Melanoms [63]. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Kompletmedium (CM). Die Zellen wurden bei Konfluenz >90% im Verhältnis 1:6 (alle 48h) oder 1:12 (alle 72h) gesplittet. Dafür wurde das Kulturmedium aus den Zellkulturflaschen abgesaugt, der Zellrasen mit DPBS gespült und anschließend das Spülmedium verworfen. Zum Ablösen der Zellen wurde Trypsin verwendet und nach 5min die Trypsinisierung mit Medium unterbrochen, um eine Schädigung der Zellmembranen zu vermeiden. In Langzeitversuchen, in denen das Tumorwachstum untersucht wurde, erfolgte eine s.c. Injektion von 1×10^6 D5 Tumor-Zellen in weißem (phenol-freiem) HBSS in die Flanke der Versuchstiere. Für die Induktion tumor-spezifischer T-Zellen aus Tumor-Vakzin drainierenden Lymphknoten (TVDLN)

und für die Messung der tumor-spezifischen Interferon- γ -Sekretion wurden 5×10^4 Zellen s.c. an beiden Axillen und Flanken injiziert.

Für die Tumorstoffe wurden bestrahlte D5G6-Zellen verwendet. Es handelt sich um einen stabil transfizierten Klon des D5-Melanoms, der 450 ng GM-CSF / 10^6 Tumorzellen in 24 Stunden produziert [64].

Die Kultivierung der Tumorzellen und das Splitting erfolgten wie unter 3.1.1 beschrieben. Die GM-CSF-Sekretion der Zellen wurde aus 1ml Zellüberstand in einem ELISA gemessen (s. Ergebnisse).

Die murine Magenkarzinomzelllinie mGC8 wurde in unserem Labor als Tumormodell mit dem LRAST Therapieansatz charakterisiert und etabliert [1]. Sie dient in der vorliegenden Arbeit als syngene Kontrollzelllinie für Zytokin-Release-Assays und ELISAs. Die Zellen wurden in murinem CM mit FBS Gold kultiviert. Nach 3-4 Tagen erfolgte ein Wechsel des Mediums. In Abhängigkeit der Konfluenz der Tumorzellen am Boden der Zellkulturflaschen wurden die Tumorzellen zwischen dem 7. und 8. Tag mit Trypsin abgelöst und gesplittet.

Das syngene Methylcholanthren-induzierte Fibrosarkom MCA310 und das syngene Lungenkarzinom LLC1 wurden als Kontrollzelllinien im Rahmen der Zytokin-Release-Assays und den ELISAs zur Stimulation der Freisetzung von IFN γ verwendet. MCA310 wurde in murinem CM kultiviert und entweder 1:6 (alle 48h) oder 1:12 (alle 72h) gesplittet. Das für die LLC1-Zelllinie verwendete Medium war DMEM. Das Splitting erfolgte im Verhältnis 1:4 alle 2 oder im Verhältnis 1:8 alle 3 Tage.

Alle verwendeten Zelllinien wurden vor in-vivo- oder in-vitro-Versuchen mindestens zweimalig gesplittet.

Tabelle 3: Zelllinien

Zelllinie	Tumortyp	Kulturmedium	Referenz
D5	Melanom	CM murin	Hu et al [63]
D5G6	Melanom, GMCSF transfiziert	CM murin	Arca et al [64]
MCA310	Fibrosarkom	CM murin	Winter et al [65]
LLC1	Lungankarzinom	DMEM	Bertram et al [66]
mGC8	Magenkarzinom	CM murin Gold	Nockel et al [67]

3.1.3 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Die Tumorzelllinien wurden mehrere Stunden vor ihrer Verwendung aus dem Stickstofftank in einen -80°C Gefrierschrank überführt. Das Auftauen erfolgte im 37°C warmen Wasserbad, die Zellen wurden anschließend in Kulturmedium suspendiert (s. Tabelle 2) und bei 400 x g für 5 min bei 20°C zentrifugiert. Die Zellpellets wurden anschließend in T75 oder T175 Zellkulturflaschen in Kulturmedium (12ml bzw. 25ml resp.) resuspendiert.

Das Auftauen eingefrorener Milz- und Lymphknotenzellen wurde analog zu den Tumorzellen durchgeführt. Der einzige Unterschied war, dass die Zellen nach dem Auftauen im Wasserbad in FBS aufgenommen und anschließend zentrifugiert wurden.

Tumor-, Lymphknoten- und Milzzellen wurden nach demselben Protokoll eingefroren. Die Zellen wurden nach Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer Zählkammer zentrifugiert und in Einfriermedium (90% FBS, 10% DMSO) resuspendiert. Anschließend wurde je 1ml Zellsuspension in Kryotubes überführt und zur schonenden Konservierung in Mr. Frosty™ Gefrierbehältern bei -80°C eingefroren. Der Transfer in flüssigen Stickstoff erfolgte frühestens 24 Stunden später.

3.2 Verwendete Mausstämme

Die Versuche wurden an C57BL/6 Wildtyp Mäusen durchgeführt (Charles River, Sulzfeld, D). Die verwendeten Mäuse waren weiblich und mindestens 1 Woche vor Versuchsbeginn geliefert worden, das Alter der Tiere bei Versuchsbeginn betrug 8-12 Wochen. Die Leukozyten des verwendeten Mausstammes exprimieren CD45.2. Um die für die Rekonstitution verwendeten Milzzellen von den Zellen des Empfängertiers unterscheiden zu können, wurden gesunde C57BL/6-Ly5.1 (Charles River, Italien) als Milzzellspender verwendet. Alle Zellen dieses congenen Mausstammes exprimieren CD45.1, sodass Spender- und Empfängerzellen durchflusszytometrisch voneinander unterschieden werden können.

Die Mäuse wurden gemäß der FELASA Kriterien im Walter-Brendel-Zentrum, München gehalten. Die Fütterung der Tiere erfolgte ad libitum, pro Käfig wurden maximal 5 Tiere aufbewahrt. Die Genehmigung des Tierversuchsvorhabens erging gemäß §8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes durch die Regierung von Oberbayern (Az. 55.2-1-54-2532-184-12).

Tabelle 4: Versuchstiere

Tierstamm	Geschlecht	Alter	Firma
C57BL/6	Weiblich	7 Wochen	Charles River, Sulzfeld, Deutschland
Ly5.1 (B6.SJL-Ptprc ^a Pepc ^b /BoyCrl)	Weiblich	4 Wochen	Charles River, Calco, Italien

3.3 Injektionen von Zellen und Antikörpern

Die **Tumorzellen** ($1 \times 10^6 / 50 \mu\text{l}$) wurden subkutan (s.c.) mit einer sterilen Einmalkanüle (27G) injiziert. Die Injektionsstellen wurden 2 Tage vor der Injektion rasiert, um das Wachstum der Tumoren besser beurteilen zu können.

Die für die **Vakzine** verwendeten Tumorzellen wurden mit Hilfe von Trypsin aus den Zellkulturflaschen geerntet, 3 Mal in PBS gewaschen und unmittelbar nach der Zellzählung mit 10000 Rad bestrahlt, um ein Wachstum und eine Metastasierung der Zellen zu verhindern.

Die s.c. Injektion erfolgte an zuvor rasierten Injektionsstellen in einem Volumen von 50µl/Injektion.

Cyclophosphamid (200mg/kg) sowie der Depletionsantikörper PC61 (250µg/Injektion) bzw. der Isotyp-Antikörper (260µg/Injektion) wurden intraperitoneal (i.p.) injiziert. Dazu wurden die Mäuse mit einer Hand fixiert und die Kanüle (30G) im 30°-Winkel ins Abdomen unter Vermeidung der Zitzen eingeführt. Vor Injektion wurde durch Aspiration sichergestellt, dass die Kanülenspitze nicht in einem Blutgefäß, dem Darm oder der Blase liegt.

Die Rekonstitution der Mäuse mit Milzzellsuspension (2×10^7 Zellen/100µl) wurde intravenös (i.v.) durchgeführt (30G Kanüle). Dazu wurden die Schwänze der Mäuse unter Schonung der Schwanzspitze in ca. 45° warmes Wasser gehalten, um eine Vasodilatation der Schwanzvenen hervorzurufen. Direkt danach wurden die Mäuse in eine Halterung gesetzt, um die Injektion zu erleichtern.

Tabelle 5: In-vivo Antikörper

Epitop	Klon	Firma
Anti-CD25	PC61	Bioceros, Utrecht, Niederlande
Anti-βGal	GL113	Bioceros, Utrecht, Niederlande

3.4 Messung des Tumorwachstums

Die Messung des Tumorgrößenwachstums erfolgte alle 2-3 Tage. Hierfür wurde mit einer Schublehre die Länge und die Breite des Tumors bestimmt und durch Multiplikation beider Messwerte die Tumorgröße in mm² berechnet.

3.5 Blut- und Organentnahme

Die Blutentnahme an der lebenden Maus wurde an der Schwanzspitze durchgeführt. Durch Abschneiden eines kleinen Teils der Schwanzspitze mit einer sterilen Schere wurde eine kapilläre Blutung erzeugt. Das Blut wurde in Na-Heparin Einmalkapillaren aufgefangen und dann in einem 2ml Eppendorf-Tube ins Labor transportiert.

Die Organentnahme erfolgte nach Tötung der Versuchstiere. Dazu wurden die Mäuse unter Isofluran-Narkose mittels zervikaler Dislokation getötet. Nach Eröffnung des Thorax erfolgte eine Blutentnahme durch Herzpunktion mit einer 1ml Spritze mit 30µl Heparin. Anschließend wurden die inguinalen und axillären Lymphknoten sowie der Milz entnommen. Die Organe wurden auf Eis ins Labor transportiert (Lymphknoten in HBSS rot, Milz in PBS/1% FBS).

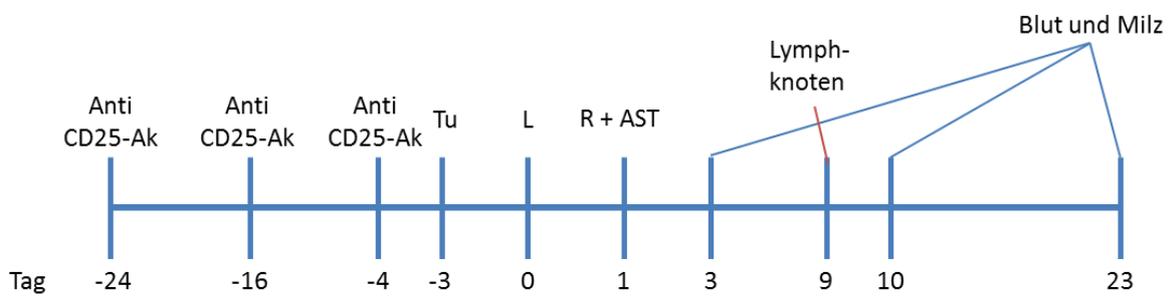


Abbildung 3: zeitlicher Ablauf der Injektionen und Organentnahme

3.6 Isolation von murinen Milzzellen

Die Milzen wurden aus dem PBS/1% FBS in Petrischalen überführt und in der Sterilwerkbank mit sterilem Besteck in kleine Stücke geschnitten. Im Anschluss daran erfolgte die weitere Zerkleinerung der Gewebestücke mit Hilfe von 2 Kanülen. Die Gewebestücke wurden anschließend mit dem stumpfen Ende einer 5ml-Spritze zerdrückt, in PBS/1% FBS aufgenommen und über eine 100µm Nylonmembran in ein 50ml Falcon Tube gefiltert. Danach wurde die Petrischale erneut mit PBS/1% FBS nachgespült und die verbliebenen Gewebestücke mit dem stumpfen Ende der Spritze durch die Nylonmembran gedrückt und mit PBS/1% FBS gespült. Anschließend erfolgte die Zentrifugation der Zellen (5 min, 450g, 20°C). Die Zellen wurden 2x in HBSS (weiß) gewaschen und zwischen den Waschsritten gezählt (1:10 in Trypanblau). Die für die Rekonstitution verwendeten Milzzellen wurden in HBSS (weiß) resuspendiert (2×10^7 Zellen/100µl HBSS weiß), die Milzzellen der Mäuse mit

etablierten Tumoren wurden in einem speziellen Einfriermedium (*Freezing Medium*) resuspendiert und eingefroren.

3.7 Isolation von murinen Lymphknotenzellen

Die Isolation von T-Zellen aus isolierten Lymphknoten erfolgte analog zu der Isolation von Zellen aus der Milz (s. 3.6).

Zum Spülen der aus den Lymphknoten gewonnenen Zellen wurde HBSS rot und zum Waschen CM mit Zusatz von Gentamicin (50 µg/ml) verwendet. Die Zählung erfolgte durch 1:2 Verdünnung in Trypanblau mit einer Neubauer-Zählkammer.

3.8 Lyse von Blut

Vor durchflusszytometrischer Messung der Lymphozyten wurden Erythrozyten lysiert um Störungen der Messung durch Erythrozyten zu verhindern. Dazu wurden 10ml ein Erythrolyse-Puffer/ml Blut hinzugegeben. Anschließend folgte eine 4-5-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Die Probengefäße wurden während der Inkubation geschüttelt. Die Lyse wurde mit 20ml PBS abgestoppt und die Zellen bei 400xg für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Anschließend erfolgte eine Resuspendierung des Zellpellets in FACS-Puffer um die Zellzählung durchzuführen.

3.9 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie (FACS – *Fluorescence activated Cell Sorting*) ist ein etabliertes Verfahren, das die genaue Charakterisierung von Zellen ermöglicht. Sie erlaubt die Einteilung der Zellen nach Größe, Granularität, Vitalität und anhand verschiedener Oberflächenmoleküle die mithilfe spezifischer Antikörper gelabelt werden.

Die zu analysierenden Zellen werden in Suspension gebracht und in Probenröhrchen pipettiert. Im Rahmen der FACS-Untersuchung wird jede Zelle analysiert und an einem oder mehreren Laserstrahlen vorbeigeführt. Durch die so entstehende Streuung des Laserlichts können Aussagen über die Eigenschaften der Zelle getroffen werden.

Die gemessene Vorwärtsstreuung der Zellen (Forward Scatter- FSC) gibt Aufschluss über die Größe der Zelle, die Seitwärtsstreuung (Sideward Scatter – SSC) gibt die Granularität bzw. das Verhältnis zwischen Zellkern und Plasma an.

Durch Färben der Zellen mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Antikörpern können zusätzlich Oberflächenmoleküle, intrazelluläre Proteine sowie Proteine im Zellkern angefärbt und nachgewiesen werden.

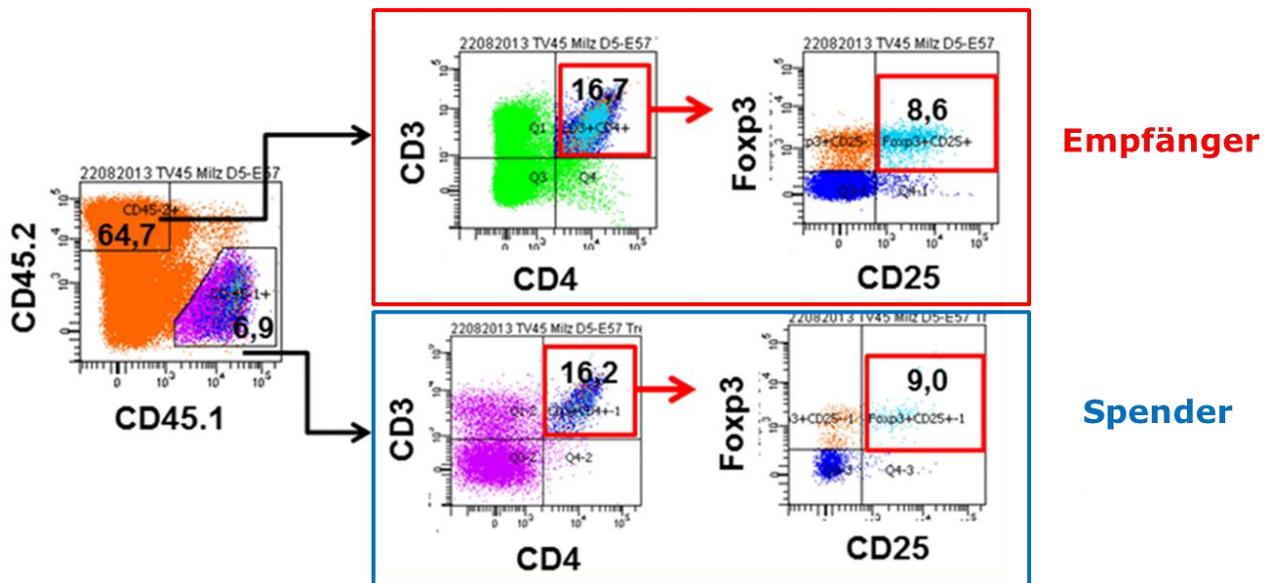


Abbildung 4: Darstellung der Gating-Strategie am Beispiel der Treg mit Trennung von Spender- (CD45.1+) und Empfänger-Zellen (CD45.2+)

Die Messungen wurden an zwei verschiedenen Durchflusszytometern durchgeführt. Das BD FACS Calibur kann FSC, SSC sowie 4 verschiedene Antikörper nachweisen. Das BD LSR II erlaubt die Unterscheidung von bis zu 8 Antikörpern. Zur Analyse der Daten wurden die Software BD FACSDiva und BD CellQuest Pro verwendet.

Tabelle 6: Antikörper für die Durchflusszytometrie

Epitop	Klon	Fluoreszenz	Firma
CD45.2	104	FITC	BioLegend, San Diego, USA
CD8a	53-6.7	FITC	BD, Franklin Lakes, USA
CD4	GK1.5	FITC	BD, Franklin Lakes, USA
CD25	PC61	PE	BioLegend, San Diego, USA
CD25	7D4	PE	BD, Franklin Lakes, USA
NK-1.1	PK136	PE	BioLegend, San Diego, USA
CD11b	M1/70	PE	BD, Franklin Lakes, USA
CD62L	MEL-14	PE	BioLegend, San Diego, USA
CD11c	HL3	PE	BD, Franklin Lakes, USA
Ly6-G	1A8	PE	BioLegend, San Diego, USA
CD3	145-2C11	PE	Pharmingen/BD
CD4	L3T4, GK1.5	PE	BD, Franklin Lakes, USA
CD11b	M1/70	PE/Cy7	BioLegend, San Diego, USA
CD4	GK1.5	PE/Cy7	BioLegend, San Diego, USA
CD8a	53.6.7	PE/Cy7	BioLegend, San Diego, USA
CD45.1	A20	APC	BioLegend, San Diego, USA
CD44	IM7	APC	BioLegend, San Diego, USA
Ly-6C	HK1.4	APC	BioLegend, San Diego, USA
CD8a	53-6.7	APC	BioLegend, San Diego, USA
Foxp3	FJK-16s	APC	eBioscience (Thermo Fisher Scientific), Waltham, USA
CD3ε	145-2C11	APC7Cy7	BioLegend, San Diego, USA
Ly-6G/Ly-6C (Gr-1)	RB6-8C5	APC7Cy7	BioLegend, San Diego, USA
Ly-6G	1A8	APC7Cy7	BioLegend, San Diego, USA
CD45.1	A20	PerCP/Cy5.5	BioLegend, San Diego, USA

Epitop	Klon	Fluoreszenz	Firma
Granzyme B	GB11	Alexa Fluor® 647	BioLegend, San Diego, USA
CD8a	53-6.7	Pacific Blue™	BioLegend, San Diego, USA
CD45R/B220	RA3-6B2	Pacific Blue™	BioLegend, San Diego, USA
I-A/I-E	M5/114.15.2	Pacific Blue™	BioLegend, San Diego, USA
Fixable viability kit		Zombie Yellow™	BioLegend, San Diego, USA
BD CompBeads			BD, Franklin Lakes, USA

3.9.1 Extrazelluläre Färbung

Nach Bestimmung der Zellzahl wurde die Zellsuspensionen bei 400xg für 5 min bei 20° C zentrifugiert und die Zellpellets in Kulturmedium resuspendiert. Anschließend folgte ein Waschschrift mit FACS-Puffer und eine 20 min Inkubation bei Raumtemperatur mit Fc-Block Antikörper (0,5µg/10⁶ Zellen). Nach Aliquotieren der geblockten Zellen folgte ein erneuter Waschschrift mit FACS-Puffer (1500rpm, 8 min, 20°C). Die Antikörper zur Oberflächenfärbung wurden hinzu pipettiert, die Zellen in Suspension gebracht und für 30 min bei 4°C inkubiert. Durch erneutes Waschen mit FACS-Puffer wurde verhindert, dass ungebundene Antikörper die Messungen verfälschen. Die Zellen wurden vor der Messung in 200-400µl FACS-Puffer resuspendiert und analysiert oder zusätzlich intrazellulär angefärbt (siehe 3.9.2)

3.9.2 Intrazelluläre Färbung

Um die Färbung von intrazellulären Proteinen zu ermöglichen wurden die Zellen mit „Working Solution“ (2ml pro Probe, Inkubation für 30-60 min bei 4°C) gewaschen um zu verhindern, dass sich die extrazellulären Antikörper wieder lösen. Anschließend folgten 2 Waschschriffe mit einem speziellen Permeabilisierung-Puffer (1900rpm, 8mn, 10°C) der das Eindringen von

Antikörpern in die Zellen ermöglicht. Auch die Fluoreszenzantikörper für die intrazelluläre Färbung werden 30 min bei 4°C inkubiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit Permeabilisierung-Puffer (1900rpm, 8min, 10°C) wurden die Zellen in FACS-Puffer resuspendiert und analysiert.

3.9.3 Nachweis von Treg und aktivierten T-Zellen nach PC61-Gabe

Um die Anzahl der Teff und der Treg nach Depletion zu bestimmen wurde für die Durchflusszytometrie ein Fluoreszenzantikörper verwendet, der an ein anderes Epitop von CD25 bindet als der Depletionsantikörper PC61. Durch die Therapie mit PC61 wird die Bindung von IL-2 an den Rezeptor verhindert [68]. Der CD25-Antikörper 7D4 verhindert diese Bindung nicht [69]. Zum durchflusszytometrischen Nachweis von CD25+ Zellen wurde nach Depletion mit PC61 ein 7D4- Antikörper verwendet.

3.10 Zytokin-Release-Assay (CRA)

9 Tage nach Vakzinierung (s. 3.3) wurden die Tumorkvakzin-drainierenden Lymphknoten (TVDLN) entnommen und in HBSS auf Eis ins Labor transportiert. Dort erfolgte die Zellisolation (s. 3.7) und nach Zählung die Resuspension in CM mit Gentamicin. Nach Verteilen von 4×10^6 Zellen/Well auf eine 24 Well-Platte wurden die Zellen polyklonal mit anti-CD3 kultiviert (50µl/Well, 2C11) und 2 Tage bei 37°C, 5%CO₂ inkubiert.

Nach 2 Tagen wurden 1ml Überstand pro Well für die Zytokinanalyse abgenommen und bei -20°C eingefroren. Die Zellen wurden anschließend zweimal in HBSS rot gewaschen und in der Neubauer Zählkammer gezählt.

Zur Stimulation der Zellen erfolgte die Kultivierung in CM mit 60 IU/ml IL-2. $0,2 \times 10^6$ Zellen/ml wurden in 6-Well-Platten ausgesät und für 3-4 Tage bei 37°C, 5%CO₂ inkubiert.

Nach 3-4 Tagen wurden die Zellen geerntet und für den Zytokin-Release-Assay verwendet.

Die für den Assay benötigten Tumor- und Kontrollzelllinien wurden vor Verwendung in Kultur genommen und 2x passagiert.

Zur Vorbereitung der Platten wurden die Wells mit 10µg/ml anti-CD3 beschichtet und abgedeckt bei 37°C und 5%CO₂ über Nacht inkubiert. Das zur Beschichtung der Wells

Material und Methoden

verwendete Volumen von anti-CD3 war bei 96-Well Platten 100µl/Well, bei 48-Well Platten 250µl/Well und bei 24-Well Platten 500µl/Well.

Am Tag des Assays wurden die T-Zellen zweimal in CM gewaschen und in IL-2-freiem Medium für 4 Stunden inkubiert. Die Tumorzellen wurden geerntet und in CM mit Gentamicin gewaschen und anschließend auf die Wells mit CM+Gentamicin und 10 U/ml IL-2 verteilt (s. Tabelle x).

Die T-Zellen wurden zweimal in CM mit Zusatz von Gentamicin gewaschen und in CM+Gentamicin und 10 U/ml IL-2 auf die Wells verteilt (s. Tabelle 7).

Als Positivkontrolle dienten mit anti-CD3 beschichtete Wells, die zuvor 3-mal mit HBSS rot gewaschen und anschließend bis zum jeweiligen Zielvolumen mit CM mit Zusatz von Gentamicin und 10 U/ml IL-2 aufgefüllt wurden.

Tabelle 7: Zellzahlen und Medium-Volumina für CRA

96-well Platte	Zellen/Well	Zellen/ml Medium	Endvolumen/Well
T-Zellen	0.2×10^6	2×10^6	100µl
Tumor Zellen	4×10^4	0.4×10^6	100µl

48-Well Platte	Zellen/Well	Zellen/ml Medium	Endvolumen/Well
T-Zellen	1×10^6	2×10^6	500µl
Tumor Zellen	0.2×10^6	0.4×10^6	500µl

24-Well Platte	Zellen/Well	Zellen/ml Medium	Endvolumen/Well
T-Zellen	4×10^6	4×10^6	1 ml
Tumor Zellen	0.8×10^6	0.8×10^6	1 ml

Die Platten wurden für 18 Stunden bei 37°C, 5%CO₂ inkubiert. Nach 18 Stunden wurden die Überstände ohne Mitnahme der Zellen abgenommen und in einem Eppendorf-Gefäß 10 min bei 1700 x g und 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Eppendorf-Röhrchen überführt und bei -40°C bis zur Durchführung des ELISA gelagert.

3.11 IFN γ ELISA

Der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) ist ein etabliertes Verfahren, um beispielsweise Proteine durch Antikörper-vermittelte Farbreaktion nachzuweisen. In den hier durchgeführten Versuchen wurde IFN γ quantitativ gemessen, um eine tumorspezifische Aktivierung von T-Zellen aus Tumorkvakzine-drainierenden Lymphknoten nachzuweisen.

Dazu wurden 96-Well Platten mit einem primären, in Karbonatpuffer verdünntem anti-IFN γ -Antikörper beschichtet und bei 4°C über Nacht inkubiert. Die im CRA gewonnenen Proben wurden auf Eis aufgetaut. Nach 5 Waschschritten mit Waschpuffer wurden die Wells mit je 200 μ l Blockierungslösung geblockt und 1 Stunde bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend folgten 5 weitere Waschschriffe der Platte. Proben, bei denen eine hohe IFN γ Produktion zu erwarten war, wurden in mehreren Verdünnungen auf die Platten aufgetragen. Zur quantitativen Bestimmung der Konzentration von IFN γ wurde eine IFN γ -Verdünnungsreihe mit Konzentrationen zwischen 2000 und 31 pg IFN γ /ml auf den Platten aufgetragen. Die Proben bzw. der Standard wurden für 2 Stunden bei RT inkubiert.

Nach Inkubation wurden die Proben verworfen und ein biotinylierter Detektionsantikörper (Endkonzentration: 1 μ g/ml) und Streptavidin-HRP in die Wells pipettiert und erneut für eine Stunde bei RT inkubiert.

Im Anschluss daran wurden 10 Waschschriffe durchgeführt und das Substrat zum Auslösen der Farbreaktion (100 μ l/Well) dazu pipettiert. Nach 30 Minuten erfolgte das Abstoppen der Reaktion mit 50 μ l H₂SO₄/Well. Die Platten wurden am ELISA-Reader Versa Max (Molecular Devices, USA) ausgelesen (450nm, Korrektur bei 570nm).

Zum Auswerten der Daten wurde die Software SoftmaxPro verwendet (Version 5.4.1)

3.12 GM-CSF ELISA

Analog zu dem unter 3.11 beschriebenen Verfahren zur Bestimmung von IFN γ wurde auch der ELISA zur Bestimmung der GM-CSF-Sekretion der bestrahlten D5G6 Zellen durchgeführt.

Um die Menge an GM-CSF aus den bestrahlten D5G6 Tumorzellen zu bestimmen wurden 60×10^6 Tumorzellen mit verschiedenen Strahlendosen bestrahlt (7500-15000 rad). Nach der Bestrahlung wurde erneut die Vitalität der Zellen überprüft und die Zellen mit Complete Medium in Kultur genommen. Die Überstände wurden nach 2, 3, 5 und 6 Tagen abgenommen, um die GM-CSF Produktion zu untersuchen.

Zur Bestimmung der Konzentration von GM-CSF wurde eine Verdünnungsreihe mit Konzentrationen zwischen 15,6 und 1000 ng/ml GM-CSF auf die Platten aufgetragen.

Auch für die Auswertung der GM-CSF Daten wurde die Software SoftmaxPro verwendet (Version 5.4.1)

3.13 Statistik

Die Ergebnisse der Versuche sind graphisch mit dem jeweiligen Mittelwert oder der Standardabweichung angegeben. Die Errechnungen der Mittelwerte, der Standardabweichungen sowie auch die graphische Darstellung erfolgte mit Microsoft Excel.

Zur Prüfung von Signifikanzen wurde der ungepaarte Student's t-Test verwendet, die verwendete Software war GraphPad. Als signifikant wurden p-Werte $<0,05$ gewertet. In den Abbildungen erfolgt teilweise auch die Angabe der Signifikanz mit dem Sternchen-Symbol (*), der Signifikanzwert ergibt sich daraus wie folgt: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Unbeschriftete Ergebnisse entsprechen einem nicht signifikanten Ergebnis.

Zur Berechnung der Überlebensdaten und deren Darstellung mittels Kaplan-Meier Kurven wurde die Software IBM SPSS 26 genutzt.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchung der Effektivität der Rekonstitution

Um zu untersuchen, ob durch die Lymphodepletion mit Cyclophosphamid eine Reduktion der Frequenz von Treg im Blut der Versuchstiere erreicht werden kann und ob die für die Rekonstitution verwendeten Milzzellen durchflusszytometrisch nach adoptivem Transfer von den Empfängerzellen diskriminiert werden können, wurde einer Maus 200µl Cyclophosphamid (20mg/ml) i.p. injiziert. Die Kontrollmaus wurde nicht lymphodepletiert. Am Folgetag erfolgte dann die Rekonstitution beider Mäuse mit je 20×10^6 Milzzellen i.v.

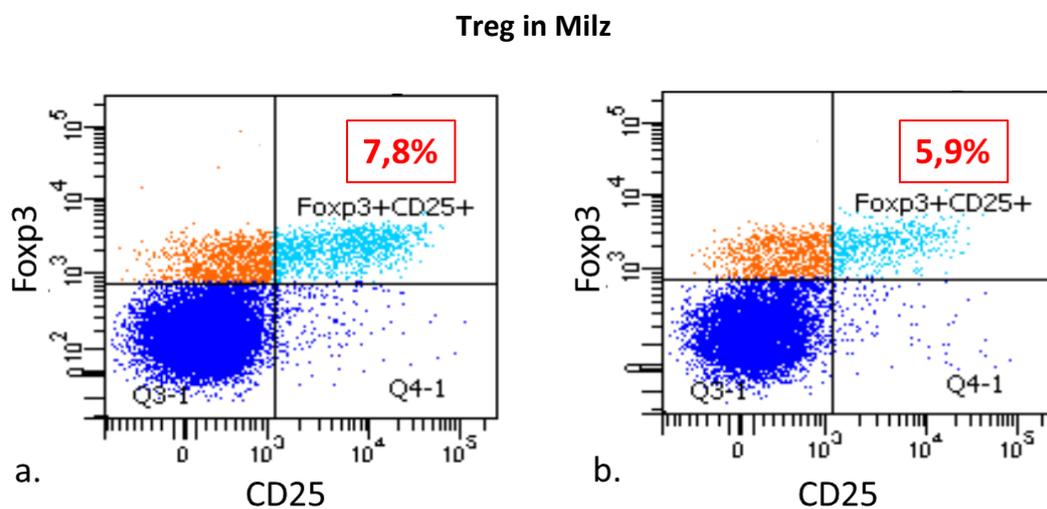


Abbildung 5: a. Nachweis der CD4+CD25+Foxp3+ Treg in der Milz der Versuchstiere ohne und b. mit vorheriger Lymphodepletion (die Angaben beziehen sich auf den Anteil der Treg aus CD3+CD4+ T-Zellen, n=1)

Die Organentnahme der Mäuse erfolgte 40 Stunden nach erfolgter Lymphodepletion. In den Milzzellen der lymphodepletierten Maus wurden weniger CD4+CD25+Foxp3+ Treg nachgewiesen (5,9% vs. 7,8% aus CD4+ Leukozyten). Aufgrund der geringen Zellzahl im lysierten Blut konnte keine Charakterisierung der Treg erfolgen. Da es sich bei CD4+CD25-Foxp3+ Zellen a.e. um Vorläuferzellen reifer Treg handelt wurden diese Zellen nicht als Treg gewertet [70].

Der prozentuale Anteil rekonstituierter T-Zellen wurde mit Hilfe von CD45.1 bestimmt. Die Empfängermäuse (C57BL/6) exprimieren auf ihren Leukozyten den Marker CD45.2,

Ergebnisse

wohingegen die Spendermäuse (C57BL/6-Ly5.1) CD45.1 exprimieren. Abb. 6 zeigt den Anteil der transferierten CD45.1+ Zellen im peripheren Blut ($0,71 \pm 0,76\%$) und in der Milz ($0,92 \pm 1,55\%$) des Empfängers einen Tag nach Zelltransfer.

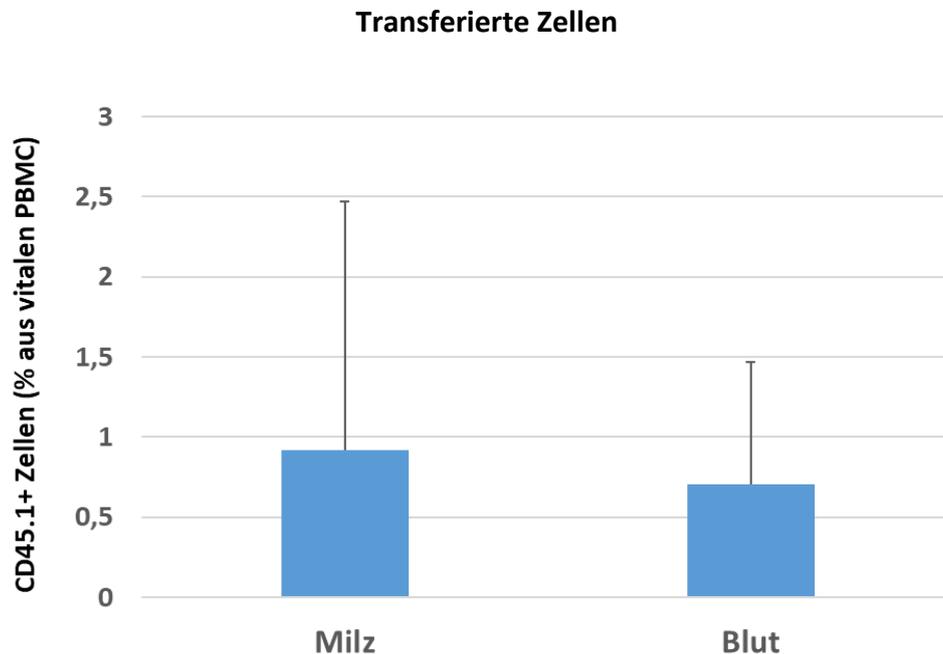


Abbildung 6: Prozentualer Anteil CD45.1+ Zellen in der Milz (n=12) und dem peripheren Blut (n=6) einen Tag nach Milzzell-Rekonstitution. Die prozentuale Angabe bezieht sich auf alle vitalen PBMC aus dem Blut und aus den Milzzellen.

Um den längerfristigen Verbleib transferierter Zellen zu untersuchen wurden in Versuchstieren mit etabliertem D5 Tumor s.c. am Tag 3, Tag 9 und Tag 22 nach Rekonstitution durchflusszytometrische Messungen der Milzzellen durchgeführt. Hierbei wurde mit Hilfe von Zombie Yellow™ differenziert, ob es sich um lebende oder tote Zellen handelt. Im Verlauf nahm der prozentuale Anteil an lebenden, transferierten CD45.1+ Zellen in der Milz von ca. 6% am Tag 3 auf ca. 10% am Tag 22 nach Rekonstitution zu.

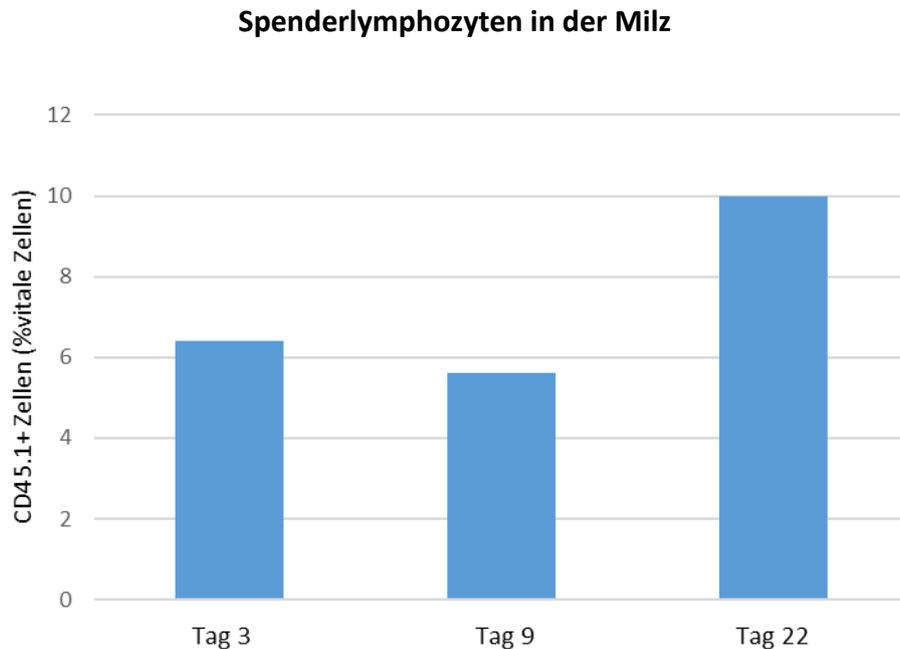


Abbildung 7: Prozentualer Anteil von CD45.1+ Zellen im Verhältnis zu vitalen PBMC in der Milz nach T-Zell- Rekonstitution (n = 1)

In Langzeitversuchen zum Tumorwachstum konnte auch an Tag 47 noch 2,93% (n=3) CD45.1+, vitaler Zellen bezogen auf alle gemessenen vitalen Splenozyten nachgewiesen werden.

4.2 Depletion der CD25+ T-Zellen durch den monoklonalen Antikörper PC61

Um einen möglichen Einfluss von Treg auf die Induktion tumorspezifischer T-Zellen in Tumorstimulierenden Lymphknoten zu untersuchen wurde den Versuchstieren 250µg des Antikörpers PC61 i.p. injiziert. Der Kontrollgruppe wurde 260µg des Isotyp Anti-βGal-Antikörper (Klon GL113) i.p. verabreicht.

Nach einmaliger i.p. Injektion betrug der prozentuale Anteil an CD45+CD4+CD25+Foxp3+ T-Zellen im Blut bezogen auf CD45+CD4+ Zellen 3,39% im Vergleich zu 8,97% in der Isotypkontrollgruppe. Somit konnte eine Reduktion aber keine komplette Depletion von Treg erzielt werden.

Ergebnisse

Um eine Verbesserung der Depletion zu erzielen erfolgte eine Woche nach der ersten Depletion eine erneute i.p. Injektion des PC61-Antikörpers bzw. des Isotyps. Eine Woche später zeigte sich eine signifikante Reduktion der CD4+CD25+Foxp3+ Zellen im peripheren Blut der Mäuse (s. Abb. 8). Eine nicht signifikante Reduktion der CD4+CD25+Foxp3+ Zellen war auch in der Milz von 7,7% auf 6,3% bezogen auf CD45+CD4+ Zellen nachweisbar, jedoch geringer als im peripheren Blut ausgeprägt.

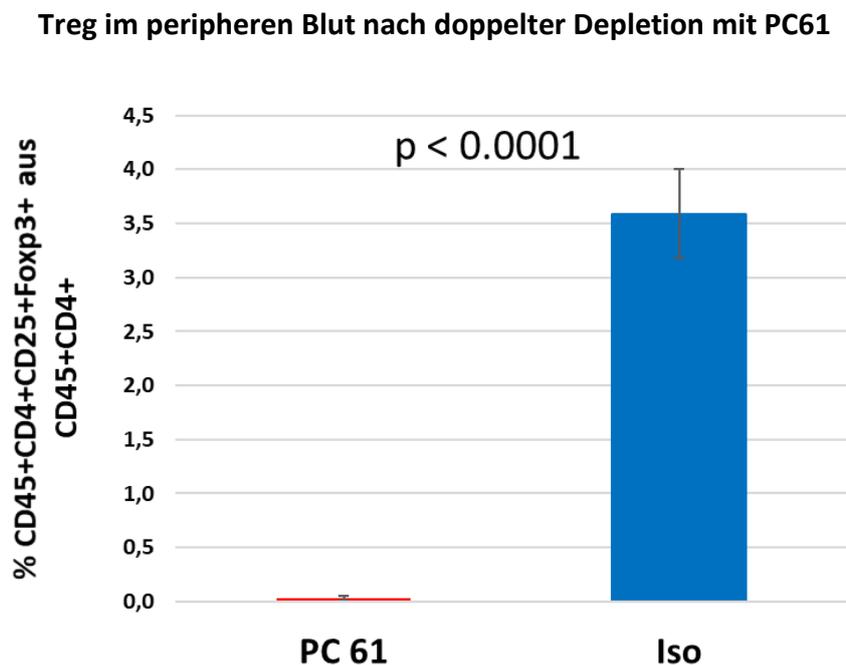


Abbildung 8: Prozentualer Anteil von CD45+CD4+CD25+Foxp3+ T-Zellen im peripheren Blut eine Woche nach der zweiten i.p. Injektion von PC61 (n= 3) oder des Kontrollantikörpers (Iso) (n=3)

Durch eine zweimalige Injektion des Depletionsantikörpers PC 61 konnte eine signifikante Reduktion der Treg im Blut induziert werden. Da jedoch die Reduktion der Treg in der Milz nicht signifikant war, erfolgte eine Depletion durch dreifache Injektion des PC 61 Antikörpers. Nach dreimaliger Injektion des Antikörpers 24, 16 und 4 Tage vor Tumordinokulation konnte eine signifikante Depletion der CD3+CD4+CD25+Foxp3+ T-Zellen auch in der Milz der Versuchstiere vor Zelltransfer in die Mäuse mit etablierten Tumoren nachgewiesen werden. Abb. 9 zeigt den Depletionserfolg in der Milz nach dreimaliger i.p. Applikation von PC61.

Treg in der Milz nach dreifacher Depletion mit PC61

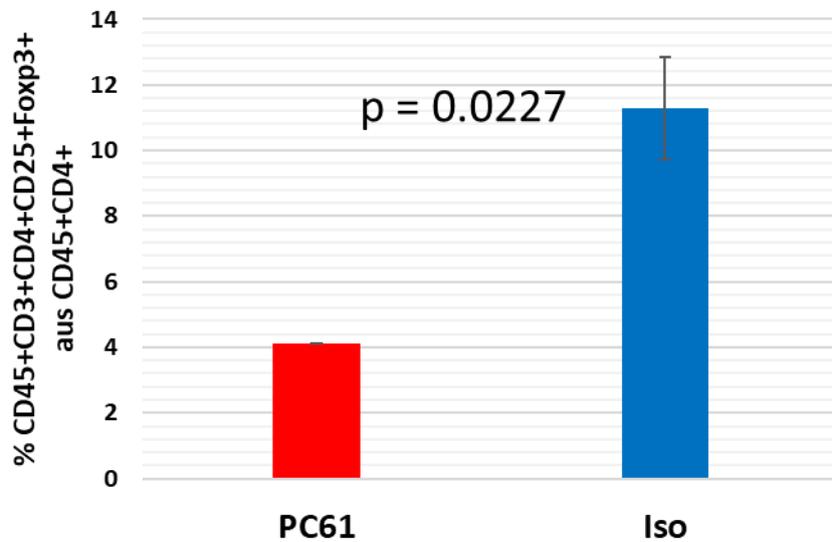


Abbildung 9: Prozentualer Anteil von CD45+CD4+CD25+Foxp3+ T-Zellen in der Milz nach dreimaliger Injektion von PC61 (n= 5) oder des Kontrollantikörpers (Iso) (n=5)

Bei den CD25-Foxp3+ Zellen fand sich nach Depletion verglichen mit der Kontrollantikörpergruppe kein signifikanter Unterschied auf die Frequenz der CD25-Foxp3+ Zellen. Die Messung aus dem peripheren Blut zum Zeitpunkt der Milzentnahme war aufgrund der eingeschränkten Zellzahl nicht verwertbar.

Da auch aktivierte T-Zellen CD25 exprimieren, wurde der prozentuale Anteil der CD3+CD4+CD25+Foxp3- Zellen nach i.p. Gabe des Depletionsantikörpers PC 61 untersucht. Es zeigte sich eine Reduktion des prozentualen Anteils dieser Zellen in den zur Rekonstitution verwendeten Milzzellen der Spendertiere nach Depletion im Vergleich zur Isotyp-Gruppe.

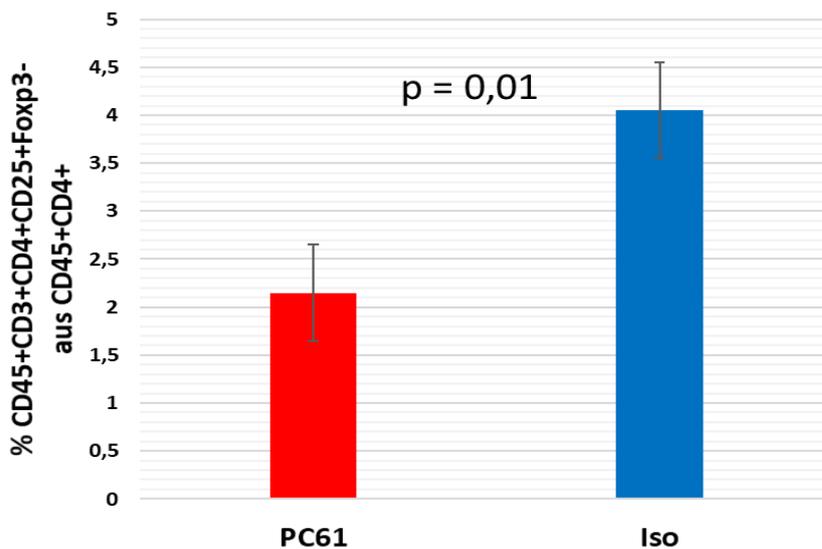
CD4+CD25+Foxp3- Zellen in der Milz nach dreifacher Depletion mit PC61

Abbildung 10: Prozentualer Anteil von CD45+CD4+CD25+Foxp3- Zellen in der Milz nach dreimaliger Injektion von PC61 (n= 5) oder des Kontrollantikörpers (Iso) (n=5).

4.3 Zusammensetzung des Rekonstitutionsproduktes

Da die Rekonstitution der Mäuse mit 3 Tage etablierten subcutanen Tumoren mit unselektierten Milzzellen gesunder Mäuse erfolgte, untersuchten wir die adoptiv übertragenen Zellen mittels Zombie Yellow™-Färbung auf ihre Vitalität und untersuchten die vorliegenden Zellpopulationen. Zombie Yellow ist eine Fluoreszenzfarbe, die nur an Zellen mit zerstörter Zellmembran haftet. Somit können Zellen mit intakter Zellmembran identifiziert und selektiert werden. Alle Zellen mit intakter Zellmembran wurden als lebend gewertet.

Von den übertragenen Zellen waren 75,91% ($\pm 11,35\%$) vital. Von den lebenden Zellen exprimierten 88,65% ($\pm 9,26\%$) CD45, einen Leukozytenmarker. Insgesamt wurden in den hier aufgeführten Versuchen 9 Mäuse für die Rekonstitution mit dem Depletionsantikörper PC61 und 8 Mäuse mit der Isotypkontrolle Anti- β Gal behandelt.

Von den Leukozyten der zuvor CD25-depletierten Mäusen waren 12,1% ($\pm 6,86\%$) CD8+ T-Zellen und 21,6% ($\pm 7,27\%$) CD4+ T-Zellen. Von den CD8+ T-Zellen wiesen 7,55% ($\pm 6,85\%$) phänotypisch einen „central memory“ (CD3+CD8+CD44^{hi}CD62L+) und 50,5% ($\pm 12,74\%$) einen „effector memory“ Typ (CD3+CD8+CD44^{hi}CD62L-) auf. Die Milzzellen der mit Isotyp behandelten Mäuse enthielten 11,15% ($\pm 4,09\%$) CD8+ T-Zellen. Hiervon waren 6,83%

($\pm 5,67\%$) central memory und $48,13\%$ ($\pm 14,44\%$) effector memory Zellen. Der Anteil der CD4+ T-Zellen betrug $9,40\%$ ($\pm 1,66\%$).

Durchschnittlich wurden mit den Milzzellen aus Mäusen, die den CD25-Depletionsantikörper PC61 i.p. erhielten, $8,30\%$ ($\pm 5,00\%$) und mit den Isotyp-behandelten Milzzellen $11,88\%$ ($\pm 1,18\%$) CD4+CD25+Foxp3+ Treg transferiert. Der prozentuale Anteil an CD4+CD25+ Foxp3- Zellen lag in der depletierten Gruppe bei $3,53\%$ ($\pm 2,17\%$) und in der Kontrollgruppe bei $5,45\%$ ($\pm 1,93\%$). Der Anteil von CD4+CD25-Foxp3+ Treg betrug nach Depletion mit dem Antikörper PC61 $7,75\%$ ($\pm 1,14\%$) und in der Kontrollgruppe $6,23\%$ ($\pm 0,70\%$).

Der Anteil an CD45+CD11b+Gr1b+ MDSC betrug in den CD25 depletierten Mäusen $4,03\%$ ($\pm 1,26\%$) der CD45+ Population und in der Kontrollgruppe $4,20\%$ ($\pm 1,97\%$). Der prozentuale Anteil der transferierten granulozytären MDSC betrug in den mit PC61 Antikörper behandelten Mäusen $9,75\%$ ($\pm 4,88\%$) bezogen auf die CD11b+CD11c- Zellen, in der Kontrollgruppe $8,38\%$ ($\pm 1,30\%$). Der prozentuale Anteil monozytärer MDSC lag bei $10,55\%$ ($\pm 1,58\%$) nach CD25-Depletion und bei $9,63\%$ ($\pm 1,06\%$) in der Kontrollgruppe der Mäuse, die mit Isotyp-Antikörper behandelt wurden.

Der prozentuale Anteil an NK Zellen in der Depletionsgruppe betrug $4,88\%$ ($\pm 2,80\%$) der Leukozyten. Hiervon waren $18,58\%$ ($\pm 4,88\%$) Granzym B+ bei fehlender Expression von MHC II. Die Isotypgruppe enthielt $5,30\%$ ($\pm 2,92\%$) NK-Zellen, hiervon waren $22,55\%$ ($\pm 7,59\%$) Granzym B+ und MHC II-.

4.4 Durchflusszytometrische Zellcharakterisierung nach LRAST

Zunächst wurde die Ausprägung der Lymphodepletion 48 Stunden nach i.p Gabe von Cyclophosphamid in der Milz von Versuchstieren untersucht. Abbildung 11 zeigt die Abnahme der Absolutzahl der Leukozyten 48 Stunden nach Lymphodepletion durch Gabe von $200\mu\text{l}$ Cyclophosphamid (20mg/ml) i.p. Nach Gabe von Cyclophosphamid fand sich eine deutliche Abnahme der Leukozyten in den Versuchstieren von $61,75 \times 10^6/\text{ml}$ auf $24,75 \times 10^6/\text{ml}$.

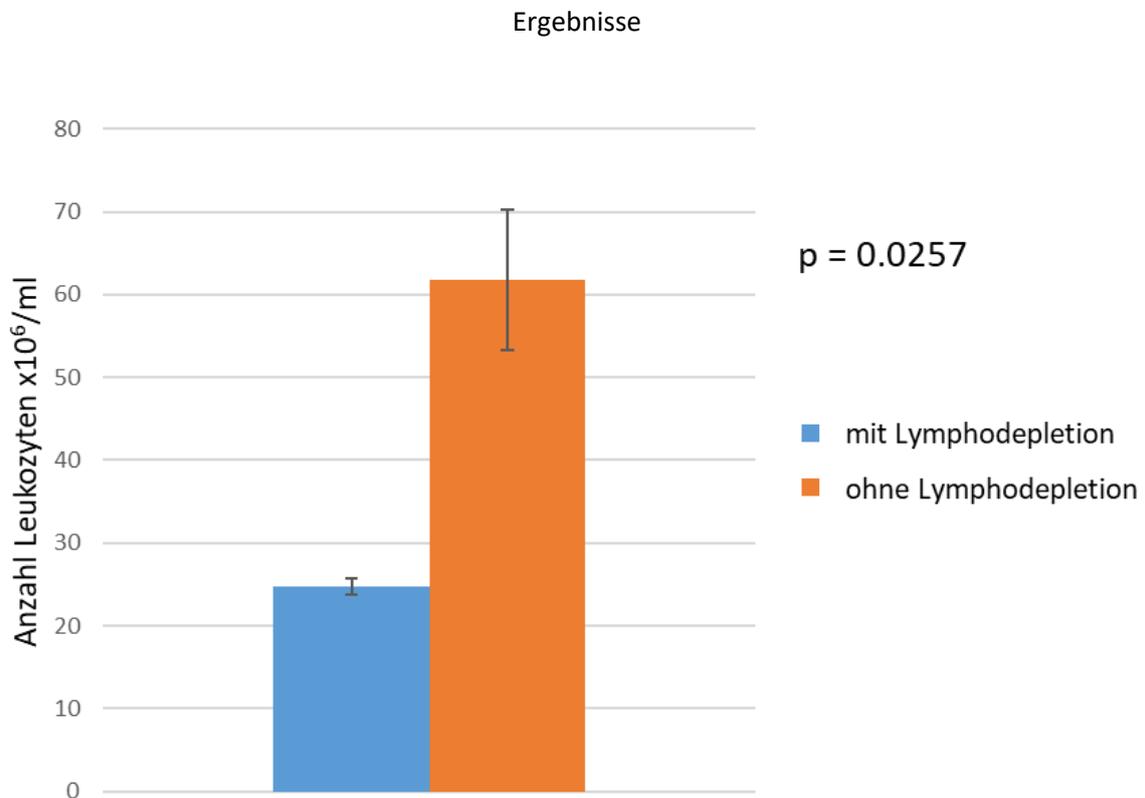


Abbildung 11: Nachweis der Lymphodepletion 48 Stunden nach Gabe von Cyclophosphamid i.p.. Die blaue Säule stellt die Absolutzahl der Leukozyten in der Milz eines Versuchstieres nach Gabe von 200µl Cyclophosphamid i.p. (20mg/ml) dar (n=2 +/- Stabw). Die orange Säule zeigt die Absolutzahl der Leukozyten in der Milz von Tieren, die kein Cyclophosphamid verabreicht bekommen haben (n=2 +/- Stabw). Die Zellzahlbestimmung erfolgte mittels Neubauer Zählkammer.

Um den Einfluss von LRAST ohne Verwendung des Depletionsantikörper PC61 auf die verschiedenen Zellpopulationen zu untersuchen wurden Tiere ohne und mit etablierten subkutanen Tumoren, die entweder lymphodepletiert oder nicht lymphodepletiert wurden, T-Zell-rekonstituiert und vakziniert wurden, miteinander verglichen. Die Lymphodepletion erfolgte 3 Tage nach Tumorinokulation. Einen Tag nach Lymphodepletion wurden die Mäuse mit 20×10^6 Milzzellen i.v. rekonstituiert und aktiv-spezifisch mit 9×10^6 D5G6 Zellen s.c. tumorvakziniert. Jeweils 3, 10 und 23 Tage nach Lymphodepletion wurden die Milzen der entsprechend behandelten Tiere entnommen und der prozentuale Anteil der Treg, T-Zellen, NK-Zellen und MDSC durchflusszytometrisch untersucht.

Ergebnisse

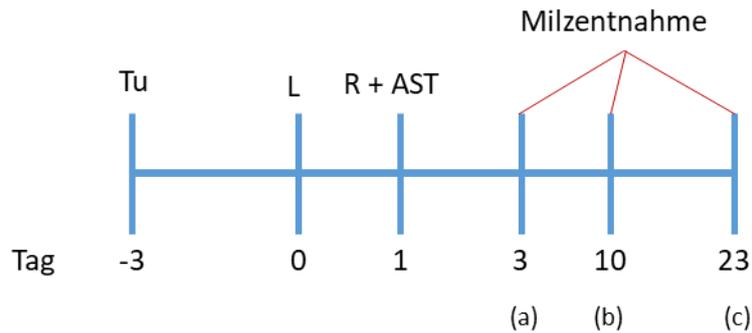


Abbildung 12: Versuchsaufbau zur Evaluation des Tumorwachstums nach LRAST bzw. Lymphodepletion im Langzeitverlauf (Gruppe a: Tötung der Tiere am Tag 3 nach Lymphodepletion, Gruppe b am Tag 10 nach Lymphodepletion und Gruppe c am Tag 23 nach Lymphodepletion)

In Mäusen mit 3 Tage etablierten, subkutanen D5-Tumoren fand sich nach LRAST ohne Verwendung des Depletionsantikörpers PC61 ein deutlicher, jedoch nicht signifikanter Anstieg des prozentualen Anteils von Treg in der Milz im Zeitverlauf. Eine Zunahme konnte sowohl in den CD45.2 T-Zellen der Empfänger als auch in den CD45.1 T-Zellen der Spender nachgewiesen werden (Abb. 13, blaue Balken). In den Mäusen mit etablierten subkutanen D5-Tumoren, die nicht lymphodepletiert wurden, konnte zwischen Tag 10 und Tag 23 eine nicht signifikante Zunahme der Treg festgestellt werden (Abb. 13, rote Balken). In den Tumor-naiven Mäusen lag der prozentuale Anteil sowohl der CD45.1- als auch der CD45.2- Treg nach LRAST am Tag 23 nicht signifikant unter dem am Tag 3 gemessenen Wert. Diese Gruppe tumor-naiver Mäuse wurde in Abbildung 13 nicht abgebildet, da es sich formal bei fehlendem Tumor um keine Therapiegruppe handelt. In den Folgeabbildungen ist diese Gruppe mit aufgeführt, um den Einfluss eines etablierten Tumors auf die verschiedenen Zellpopulationen darzustellen. Da die Messung mit jeweils nur einem Versuchstier pro Messzeitpunkt durchgeführt wurde sind keine Standardabweichungen angegeben.

Ergebnisse

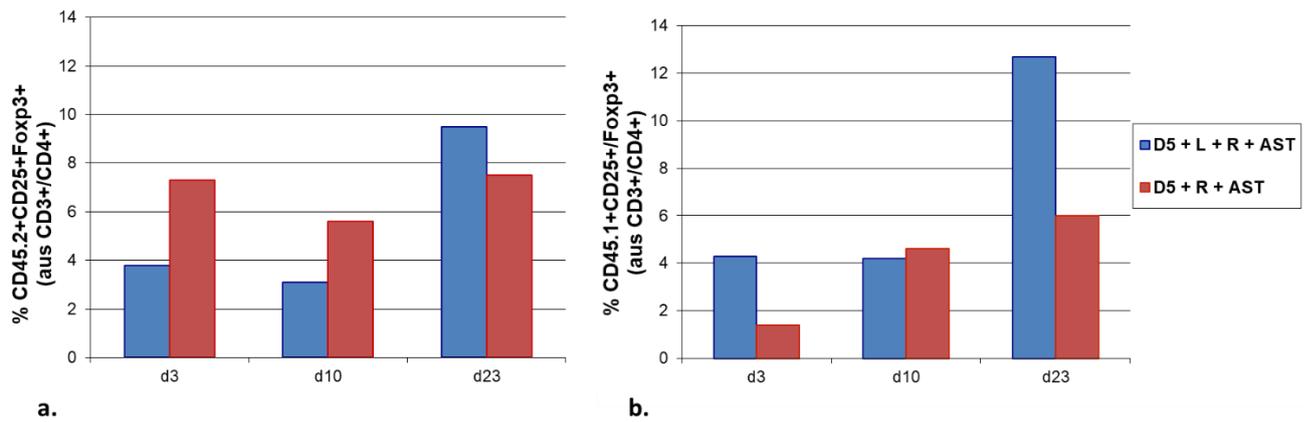


Abbildung 13: Darstellung der prozentualen Verteilung der Treg am Tag 3, Tag 10 und 23 nach Lymphodepletion. Die blauen Balken beschreiben den Verlauf nach Tumorgabe und LRAST. In rot ist der Verlauf nach Tumorgabe und Rekonstitution mit Vakzinierung dargestellt. a) Prozentuale Verteilung der CD25+Foxp3+ T-Zellen des Empfängers (CD45.2+), b) Prozentuale Verteilung der CD25+Foxp3+ T-Zellen des Spenders (CD45.1+), (n=1).

Am Tag 3 nach Lymphodepletion betrug der prozentuale Anteil der CD45.2+CD3+CD4+ T-Zellen der Empfängermäuse nach Tumordinokulation + LRAST 26,3%, am Tag 10 7,5%. Am Tag 23 war ein Anstieg auf 12,7% zu sehen. In der Gruppe der Versuchstiere mit 3 Tage etabliertem D5-Tumor bei denen keine Lymphodepletion erfolgte, lag der prozentuale Anteil der CD4+ Zellen am Tag 3 bei 13%, am Tag 10 bei 12,6% und am Tag 23 bei 9,1%. Bei den Versuchstieren, die keine Tumordinokulation erhielten und mit LRAST behandelt wurden, lag der prozentuale Anteil der CD4+ T-Zellen am Tag 3 bei 16%, am Tag 10 bei 8,5% und am Tag 23 bei 16,7%. (s. Abb. 14).

Ergebnisse

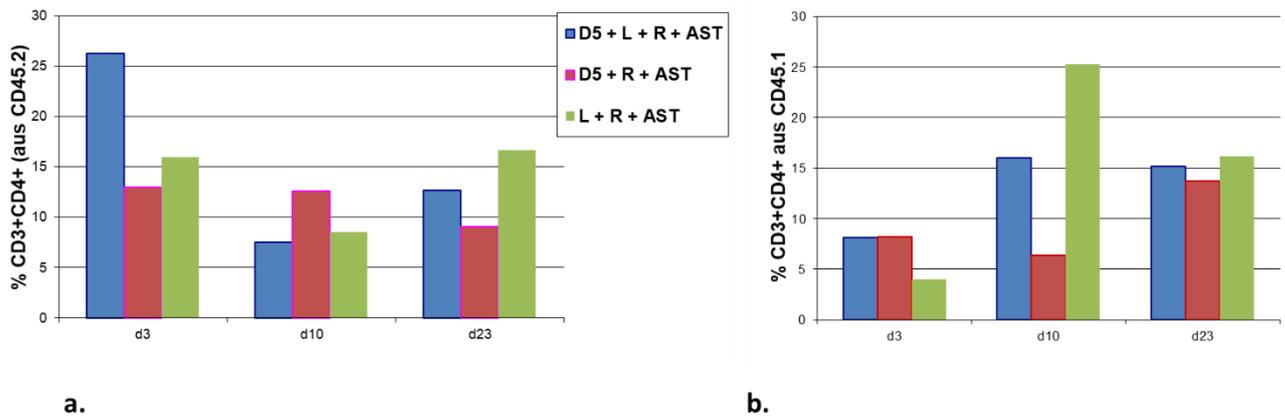


Abbildung 14: Darstellung der prozentualen Verteilung von CD3+CD4+ T-Zellen am Tag 3, Tag 10 und Tag 23 nach Lymphodepletion. Die blauen Balken beschreiben den Verlauf nach Tumorgabe und LRAST. In rot ist der Verlauf nach Tumorgabe, Rekonstitution und Vakzinierung dargestellt. In grün wird die prozentuale Verteilung der CD45+CD4+ T-Zellen nach LRAST ohne vorherige Tumorgabe dargestellt. a) Prozentuale Verteilung der CD3+CD4+ T-Zellen des Empfängers (CD45.2+), b) Prozentuale Verteilung der CD3+CD4+ T-Zellen des Spenders (CD45.1+), (n=1).

Die Veränderung des prozentualen Anteils war bei den CD3+ T-Zellen des Empfängertiers am stärksten ausgeprägt. Nach Tumoringokulation und LRAST betrug der prozentuale Anteil der CD45.2+ T-Zellen am Tag 3 42,5%, am Tag 10 8,5% und am Tag 23 16,9%. In der Gruppe der Versuchstiere mit etabliertem Tumor ohne Lymphodepletion betrug der prozentuale Anteil am Tag 3 17%, am Tag 10 17,7% und am Tag 23 15,2%. In den Tieren ohne etablierten Tumor wurden nach LRAST am Tag 3 27% CD3+ T-Zellen nachgewiesen, am Tag 10 9,4% und am Tag 23 27,7%.

Auch bei den rekonstituierten CD45.1+ CD3+ Spender-T-Zellen konnten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen nachgewiesen werden. In den Versuchstieren mit etabliertem Tumor betrug der prozentuale Anteil der CD3+ Zellen am Tag 3 17,7%, am Tag 10 35,8% und am Tag 23 22,6%. Bei den Versuchstieren, bei denen nach Tumoringokulation keine Lymphodepletion durchgeführt wurden, lag der prozentuale Anteil der CD45.1+ CD3+ T-Zellen am Tag 3 bei 12,3%, am Tag 10 bei 14,4% und am Tag 23 bei 23,1%. In den tumorfreen Tieren lag nach LRAST der prozentuale Anteil der CD3+ Zellen am Tag 3 bei 8,9%, am Tag 10 bei 33,7% und am Tag 23 bei 30,5% (s. Abb. 15).

Ergebnisse

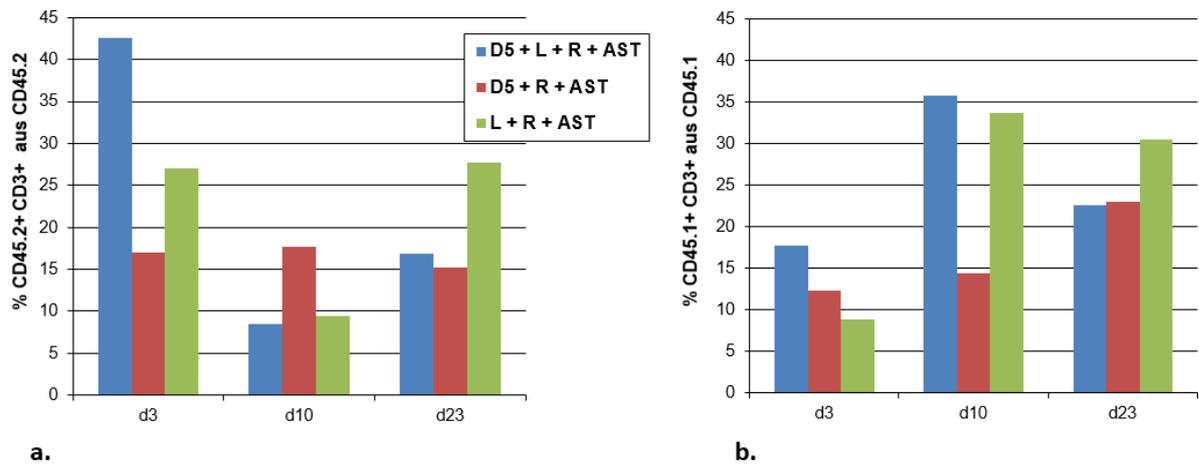


Abbildung 15: Darstellung der prozentualen Verteilung von CD3+ T-Zellen am Tag 3, Tag 10 und Tag 23 nach Lymphodepletion. Die blauen Balken beschreiben den Verlauf nach Tumorgabe und LRAST. In rot ist der Verlauf nach Tumorgabe, Rekonstitution und Vakzinierung dargestellt. In grün wird die prozentuale Verteilung der CD45+ nach LRAST ohne vorherige Tumorgabe dargestellt. a) Prozentuale Verteilung CD3+ T-Zellen des Empfängers (CD45.2+), b) Prozentuale Verteilung CD3+ T-Zellen des Spenders (CD45.1+), (n=1).

Tabelle 8: CD45CD3+ T-Zellen von CD45.2 Mäusen am Tag 3, Tag 10 und Tag 23 nach Lymphodepletion

Tag	CD45.2: D5 + L + R + AST	CD45.2: D5 + R + AST	CD45.2: L + R + AST
3	42,5	17	27
10	8,5	17,7	9,4
23	16,9	15,2	27,7

Es erfolgte zur weiteren Charakterisierung die durchflusszytometrische Differenzierung von T-Zellen nach Expression von CD45 und CD3, sowie CD4+ und CD8+. Zusätzlich wurde die CD62L- und CD44-Expression der CD8+ T-Zellen analysiert, um eine Unterteilung in central memory T-Zellen (CD62L+CD44+) und effector memory T-Zellen (CD62L-CD44+) zu ermöglichen. Der prozentuale Anteil der central memory T-Zellen betrug bei den Versuchstieren nach Tumoringokulation und LRAST am Tag 3 16,8% der CD8+ T-Zellen, am Tag 10 15,8% und am Tag 23 26,5%. Bei den Tieren mit etabliertem Tumor ohne Lymphodepletion lag der prozentuale Anteil der central memory CD8+ T-Zellen bezogen auf alle CD8+ T-Zellen am Tag 3 bei 9,4%, am Tag 10 bei 11,2% und am Tag 23 bei 13,8%. Bei den Tieren, die keine Tumoringokulation erhielten und mit LRAST behandelt wurden, konnten am Tag 3 15,8%, am Tag 10 18,4% und

Ergebnisse

am Tag 23 28,1% central memory T-Zellen bezogen auf die CD8+ T-Zellen nachgewiesen werden (s. Abb. 16). Aufgrund der geringen Zellzahl der CD45.1+ memory T-Zellen wurden diese hier nicht gesondert dargestellt.

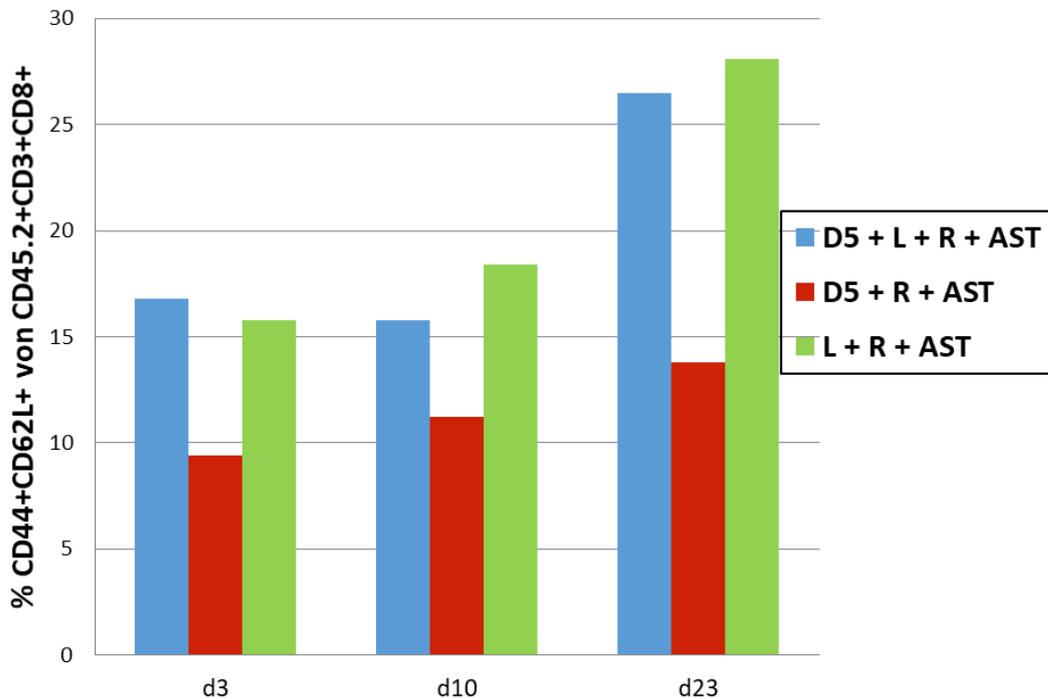


Abbildung 16: Darstellung der prozentualen Verteilung der CD 44+CD62L+ central memory T-Zellen bezogen auf die CD8+ T-Zellen der CD45.2+ Empfängermäuse am Tag 3, Tag 10 und Tag 23 nach Lymphodepletion. Die blauen Säulen beschreiben den Verlauf nach Tumorgabe und LRAST. In rot ist der Verlauf nach Tumorgabe und Rekonstitution mit Tumorstimulation dargestellt. In grün wird die prozentuale Verteilung nach LRAST ohne vorherige Tumorgabe bezogen auf die CD8+ T-Zellen dargestellt (n=1).

Natürliche Killer Zellen (NK-Zellen) wurden anhand der Expression von CD45 und NK1.1 differenziert. Ihre Effektor-Funktion wurde mit Hilfe des intrazellulären Nachweises von Granzym B bestimmt. Die prozentuale Veränderung der NK-Zellen nach LRAST war weniger stark ausgeprägt als die der T-Zellen. Nach Tumoringektion und LRAST betrug der Anteil der NK-Zellen in CD45.2+ Empfängermäusen bezogen auf alle CD45.2+ Zellen am Tag 3 1,9%, am Tag 10 1,4% und am Tag 23 0,9%. In der Versuchsgruppe mit etabliertem Tumor und ohne Lymphodepletion lag der prozentuale Anteil am Tag 3 bei 1,8%, am Tag 10 bei 1,4% und am Tag 23 bei 0,8%. Bei den tumorfreien Versuchstieren waren am Tag 3 3,2% NK-Zellen, am Tag 10 0,9% und am Tag 23 1,2% NK-Zellen nachweisbar. Der prozentuale Anteil der transferierten CD45.1+ NK-Zellen lag am Tag 3 in der Versuchsgruppe nach Tumoringektion und LRAST bei 1,4%. Am Tag 10 betrug ihr Anteil 0,8% und am Tag 23 0,5%. In der Gruppe der Versuchstiere

Ergebnisse

mit etabliertem Tumor ohne Lymphodepletion waren am Tag 3 2,8% NK-Zellen nachweisbar. Am Tag 10 lag der prozentuale Anteil bei 1,1% und am Tag 23 konnten keine NK Zellen nachgewiesen werden. In der Gruppe ohne Tumoringokulation betrug der Anteil nach LRAST am Tag 3 1,5%, am Tag 10 0,6% und am Tag 23 0,6%.

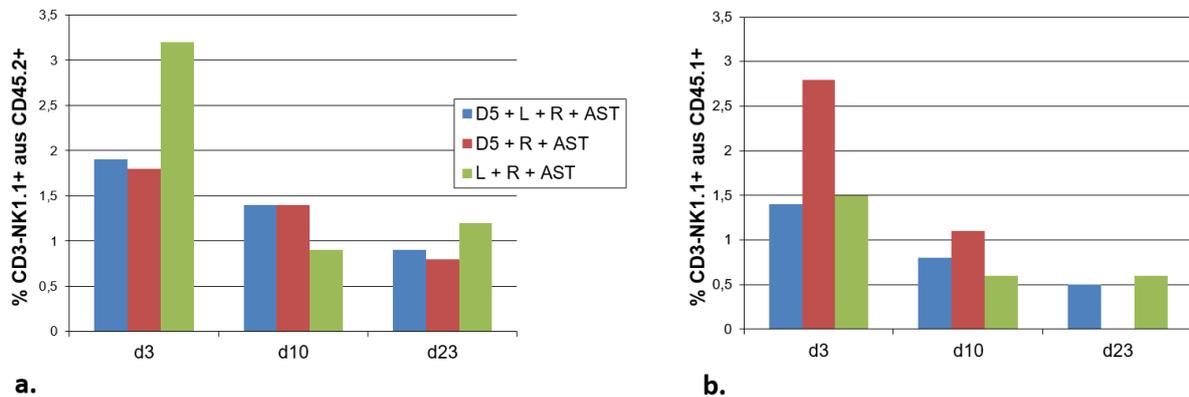


Abbildung 17: Darstellung der prozentualen Verteilung der CD3-NK1.1+ NK-Zellen am Tag 3, Tag 10 und Tag 23 nach Lymphodepletion. Die blauen Balken beschreiben den Verlauf nach Tumorgabe und LRAST. In rot ist der Verlauf nach Tumorgabe und Rekonstitution mit Vakzinierung dargestellt. In grün wird die prozentuale Verteilung der NK-Zellen nach LRAST ohne vorherige Tumorgabe dargestellt. a) stellt die prozentuale Verteilung der CD3-NK1.1+ NK-Zellen des Empfängers (CD45.2+) dar, b) stellt die prozentuale Verteilung der CD3-NK1.1+ NK-Zellen des Spenders (CD45.1+) dar (n=1).

Die Effektor-Eigenschaften der NK-Zellen wurden anhand der intrazellulären Granzym B Konzentration bestimmt. Um die NK-Zellen von zytotoxischen T-Zellen zu unterscheiden wurde in der Durchflusszytometrie der Phänotyp durch die Expression von CD3-NK1.1+CD8-GranzymB+ festgelegt. Tabelle 9 zeigt den Verlauf des prozentualen Anteils der CD8+GranzymB+ NK-Zellen der CD45.2+ Empfängerleukozyten. Aufgrund der geringen Zellzahl konnte bei den CD45.1+ NK-Zellen keine weitere Differenzierung bezüglich Granzym-B Expression durchgeführt werden.

Ergebnisse

Tabelle 9: prozentualer Anteil der CD8+ Granzym B+ NK-Zellen bezogen auf CD45.2+ Zellen am Tag 3, Tag 10 und Tag 23 nach Lymphodepletion

Tag	D5 + L + R + AST	D5 + R + AST	L + R + AST
3	1,4 %	0,9 %	0,5 %
10	0,5 %	0,4 %	0,2 %
23	0 %	0,5 %	0,4 %

Neben Treg hemmen auch MDSC eine Antigen-spezifische Immunantwort. Um im Rahmen der LRAST-Therapie ihren Einfluss zu analysieren, wurden durchflusszytometrisch myeloide Suppressorzellen (MDSC) bestimmt. Unterschieden wurden phänotypisch monozytäre (CD11b+Ly6G-Ly6C^{hi}) und polymorphonukleäre (CD11b+Ly6G+Ly6C+) MDSC.

Nach Tumorinokulation und LRAST lag der Anteil der CD45.2+ monozytären MDSC bezogen auf die Leukozytenzahl am Tag 3 bei 0,4%. Am Tag 10 zeigte sich ein Anstieg auf 7,5% und am Tag 23 ein Abfall des prozentualen Anteils der monozytären MDSC auf 2,4%. Bei den Versuchstieren, die nach Tumorinokulation keine Lymphodepletion erhielten, lag der prozentuale Anteil am Tag 3 bei 0,5%, am Tag 10 bei 0,8% und am Tag 23 bei 1,8%. In den Versuchstieren, die keine Tumorinokulation erhielten, fand sich nach Lymphodepletion ebenfalls ein Anstieg des Anteils der monozytären MDSC von 0,2% am Tag 3 zu 8,8% am Tag 10. Am Tag 23 zeigte sich ein Abfall des prozentualen Anteils auf 1,1%. Die Schwankungen der CD45.1+ monozytären MDSC waren im Verlauf weniger stark ausgeprägt. In der Gruppe nach Tumorinokulation und LRAST betrug der Anteil am Tag 3 0,2%, am Tag 10 0,4% und am Tag 23 0,3%. Auch in den Versuchstieren ohne Lymphodepletion fand sich nach Tumorinokulation nur ein geringer Anteil monozytärer MDSC (Tag 3: 0%, Tag 10: 0,2% und Tag 23: 0,1%). In den Tieren der Versuchsgruppe ohne Tumorinokulation zeigten sich am Tag 3 ein Anteil von 0,1% MDSC. Am Tag 10 zeigte sich ein Anteil von 0,9% und am Tag 23 ein prozentualer Anteil der MDSC von 0,2% (s. Abb. 18).

Ergebnisse

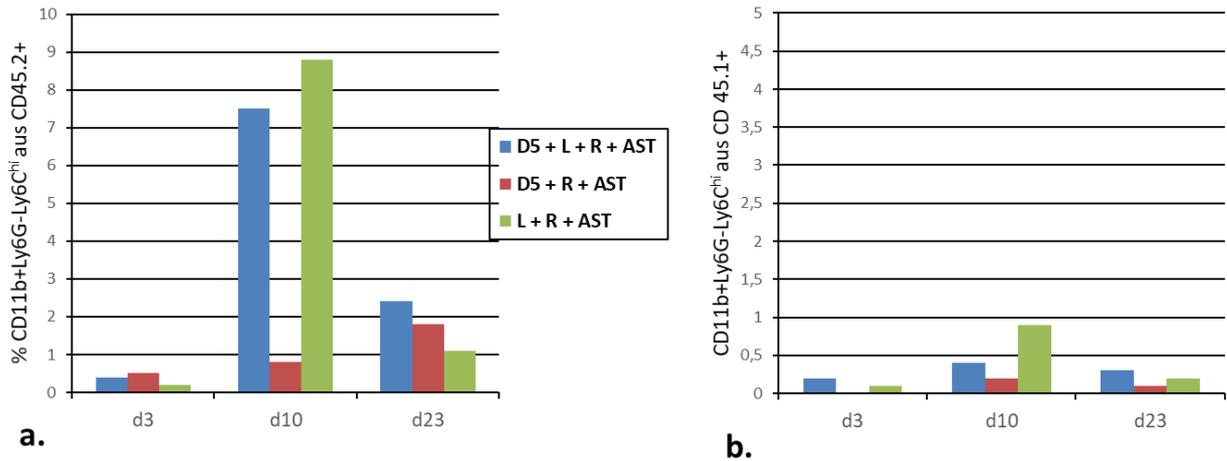


Abbildung 18: Darstellung der prozentualen Verteilung der CD11b+Ly6G-Ly6C^{hi} monozytären MDSC am Tag 3, Tag 10 und Tag 23 nach Lymphodepletion. Die blaue Säule beschreibt den Verlauf nach Tumorgabe und LRAST. In rot ist der Verlauf nach Tumorgabe und Rekonstitution mit Vakzinierung dargestellt. In grün wird die prozentuale Verteilung der MoMDSC nach LRAST ohne vorherige Tumorgabe dargestellt. a) beschreibt die prozentuale Verteilung der MoMDSC des Empfängers (CD45.2+), b) beschreibt die prozentuale Verteilung der MoMDSC des Spenders (CD45.1+), n=1.

Der prozentuale Anteil der polymorphonukleären MDSC entsprach dem der monozytären MDSC. Bei den CD45+ Mäusen lag der prozentuale Anteil MDSC nach Tumoringokulation und LRAST bezogen auf die Leukozyten bei 1,4%. Am Tag 10 zeigte sich ein Anstieg auf 27,8% und am Tag 23 ein erneuter Abfall des prozentualen Anteils auf 4,7%. Bei den Versuchstieren mit etabliertem subkutanem Tumor die keine Lymphodepletion erhielten lag der prozentuale Anteil der PMN-MDSC Anteil am Tag 3 bei 0,3%, am Tag 10 bei 1,2% und am Tag 23 bei 4,1%. Der prozentuale Anteil der PMN-MDSC in der Gruppe der Versuchstiere ohne etablierten Tumor nach LRAST betrug 0,6% am Tag 3. Am Tag 10 zeigte sich ein Anstieg auf 28,5% und am Tag 23 ein Abfall auf 2,8%. Die CD45.1+ PMN-MDSC waren aufgrund der geringen Zellzahl nicht auswertbar. In der Therapiegruppe nach Tumoringokulation und LRAST betrug der prozentuale Anteil am Tag 3 0,1%, am Tag 10 0,4% und am Tag 23 0,2% PMN-MDSC. Nach Tumoringokulation ohne Lymphodepletion betrug der prozentuale Anteil der PMN-MDSC am Tag 3 0%, am Tag 10 0,1% und war am Tag 23 erneut nicht mehr nachweisbar. In der Therapiegruppe nach LRAST ohne etablierten Tumor betrug der prozentuale Anteil der PMN MDSC am Tag 3 0%, am Tag 10 0,7% und am Tag 23 0,1% (s. Abb. 19).

Ergebnisse

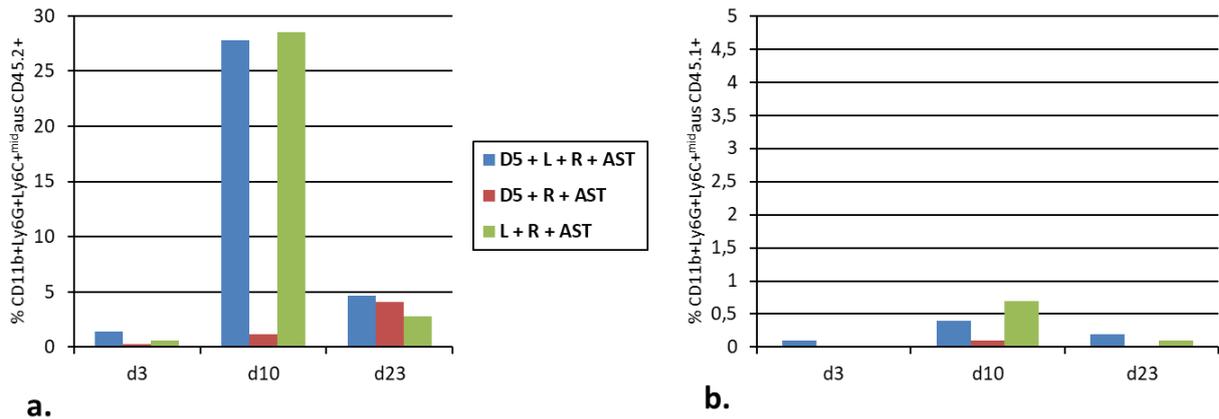


Abbildung 19: Darstellung der prozentualen Verteilung der CD11b+Ly6G+Ly6C+ polymorphonukleären MDSC bezogen auf die CD45.2+ Zellen am Tag 3, Tag 10 und Tag 23 nach Lymphodepletion. Die blauen Säulen beschreiben den Verlauf nach Tumorgabe und LRAST. In rot ist der Verlauf nach Tumorgabe und Rekonstitution mit Vakzinierung dargestellt. In grün wird die prozentuale Verteilung der polymorphonukleären MDSC nach LRAST ohne vorherige Tumorgabe dargestellt. a) Prozentuale Verteilung der CD11b+Ly6G+Ly6C+ polymorphonukleären MDSC des Empfängers (CD45.2+), b) Prozentuale Verteilung der CD11b+Ly6G+Ly6C+ polymorphonukleären MDSC des Spenders (CD45.1+), n=1.

4.5 GM-CSF Sekretion der D5G6 Zellen

Für die aktiv-spezifische Vakzinierung wird im Rahmen von LRAST ein Vakzin aus bestrahlten D5G6-Melanomzellen verwendet. Arca et al. konnten bei dieser Zelllinie eine Sekretion von 450 ng GM-CSF /10⁶ Zellen in 24 Stunden nachweisen. Um den Einfluss der Bestrahlung auf die GM-CSF Sekretion zu quantifizieren wurden die Zellen kultiviert und anschließend mit 4 verschiedenen Strahlendosen (7500, 11700, 12500 und 15000 Rad) bestrahlt (s. Abb. 20). Die Zellen wurden nach der Bestrahlung wieder in Kultur genommen und in den Überständen am Tag 2, 3, 5 und 6 die jeweilige GM-CSF Sekretion mittels ELISA gemessen. Bereits am Tag 2 zeigte sich in den nicht bestrahlten Zellen eine geringere GM-CSF-Sekretion im Überstand. Die Zellzahl lag bei 3,6 x 10⁶ Zellen pro Zellkulturflasche (Abb. 20).

Ergebnisse

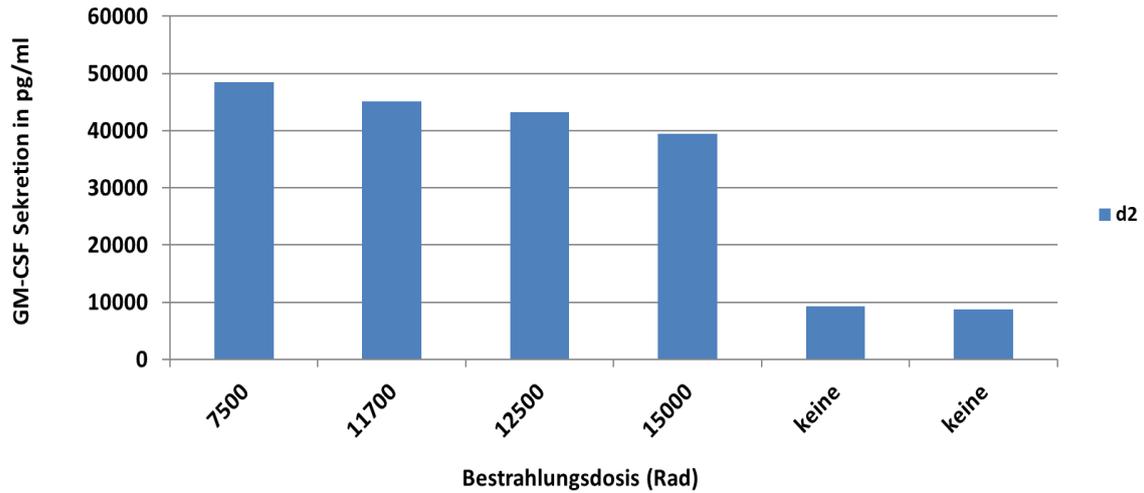


Abbildung 20: Einfluss der Strahlendosis auf die GM-CSF Sekretion am Tag 2 nach Bestrahlung von D5G6-Melanomzellen ($0,5 \times 10^6$ Zellen in 6ml Volumen)

Unabhängig von der Bestrahlung konnte die höchste GM-CSF Sekretion 5 Tage nach Bestrahlung gemessen werden und betrug nach Bestrahlung mit 7500 Rad $235 \text{ ng}/10^6$ Zellen/24h, nach Bestrahlung mit 15000 Rad betrug die GM-CSF Freisetzung $280 \text{ ng}/10^6$ Zellen/24h. Die GM-CSF Sekretion der inkubierten Zellen nahm zwischen dem 5. und 6. Tag wieder ab und betrug am Tag 6 bei den mit 7500 Rad bestrahlten Zellen $158 \text{ ng}/10^6$ Zellen/24h und $195 \text{ ng}/10^6$ Zellen/24h nach Bestrahlung mit 15000 Rad (Abb. 21).

Ergebnisse

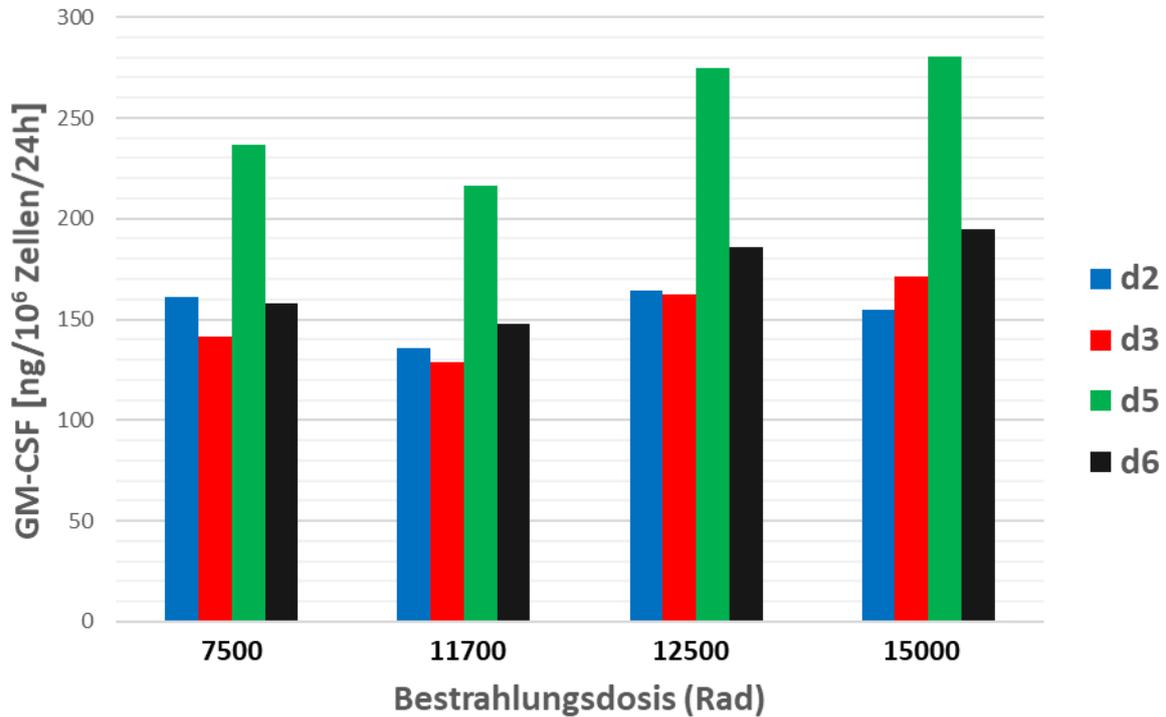


Abbildung 21: Einfluss der Strahlendosis auf die GM-CSF Sekretion von D5G6-Melanomzellen in Kultur am Tag 2 (blaue Säulen), 3 (rote Säulen), 5 (grüne Säulen) und 6 (schwarze Säulen) nach Bestrahlung mit 7500Gy, 11700Gy, 12500Gy bzw. 15000Gy.

4.6 Tumorspezifische IFN γ -Produktion in Lymphknoten mit LRAST und CD25-Depletion

Um zu prüfen, ob durch LRAST nach CD25-Depletion im Vergleich zu den mit Isotyp Antikörper behandelten Tieren mehr tumorspezifische T-Zellen in den Tumorzell-drainierenden Lymphknoten induziert werden, wurden T-Zellen aus den TVDLN wie unter 3.6 beschrieben geerntet und anschließend mit D5 Tumorzellen oder syngenen Kontroll-Tumorzellen stimuliert. Die tumorspezifische IFN γ -Sekretion wurde im Überstand mittels ELISA gemessen.

Die Tiere wurden dreimal mit dem Antikörper PC61 zur Depletion der CD25+ Zellen vorbehandelt.

Um zu unterscheiden, ob die CD25+ Treg der Empfängermaus oder die der Spendermaus einen Einfluss auf die Induktion tumorspezifischer T-Zellen in den Tumorzell-drainierenden Lymphknoten der geimpften Tiere haben, wurde differenziert zwischen der Depletion des a) Empfängers, b) des Spenders oder c) des Empfängers und des Spenders. In der ersten Versuchsgruppe erfolgte die Depletion der Treg der tumortragenden Maus mit dem

Ergebnisse

CD25 Antikörper PC61. Eine Rekonstitution erfolgte mit nicht depletierten Milzzellen (D+Tu+L+R+AST). In der zweiten Versuchsgruppe erhielten Mäuse mit etablierten subkutanen D5-Tumoren den Isotyp-Antikörper und wurden mit CD25 depletierten Milzzellen (Iso+Tu+L+RD+AST) rekonstituiert. In der dritten Versuchsgruppe erfolgte die Treg-Depletion der tumortragenden Maus und eine Rekonstitution mit depletierten Milzzellen (D+Tu+L+RD+AST). In der vierten Gruppe wurde sowohl die tumortragende Maus als auch die Spendermaus mit dem Isotyp-Antikörper GL113 behandelt (Iso+Tu+L+R+AST).

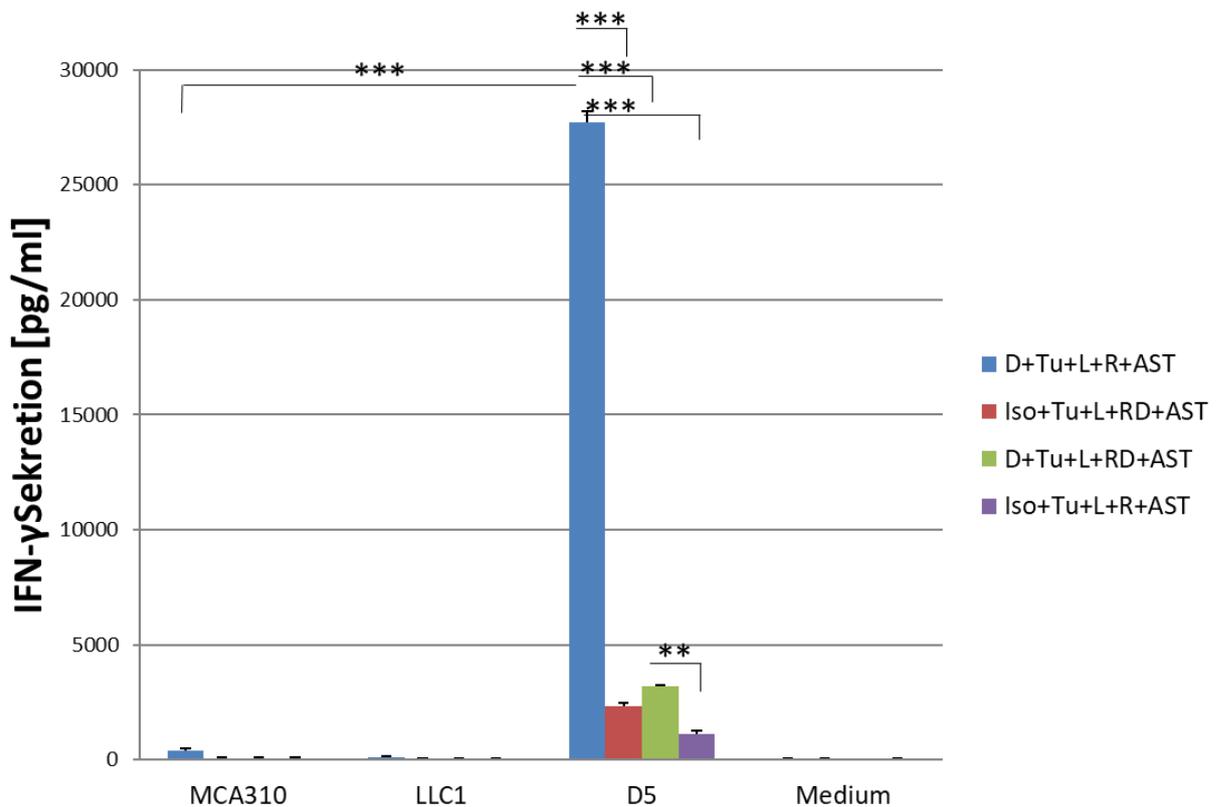


Abbildung 22: IFN γ -Sekretion tumorspezifischer T-Zellen aus TVDLN nach Stimulation mit MCA310, LLC1 oder D5-Zellen. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Die aus den Tumorstimulanz-drainierenden Lymphknoten isolierten T-Zellen wurden polyclonal mit α CD3 inkubiert und anschließend mit D5-Tumorzellen oder mit den Isotyp-Kontrolltumoren MCA310 oder LLC1 stimuliert. Für die Negativkontrolle wurden T-Zellen aus Tumorstimulanz-drainierenden Lymphknoten nur in Medium ohne Tumorzellen inkubiert.

Die höchste IFN γ -Sekretion fand sich in tumorspezifischen T-Zellen aus TVDLN von Tieren, die CD25-depletiert wurden (27725 ± 483 pg/ml). Dies war signifikant höher als bei den T-Zellen

Ergebnisse

der nicht CD25 depletierten Empfänger und Spendermäusen. Nach Depletion von CD25+ T-Zellen der Empfänger- und Spendermaus betrug die IFN γ -Sekretion 3179 ± 56 pg/ml. Diese war signifikant höher als bei Verwendung von T-Zellen aus TVDLN von Tieren, die nicht CD25 depletiert worden waren. Nach Depletion von CD25+ T-Zellen in den Spendertieren vor T-Zell-Rekonstitution fand sich eine tumorspezifische IFN γ -Sekretion 2317 ± 165 pg/ml. Die geringste tumorspezifische IFN γ -Sekretion fand sich in der Kontrollgruppe von Tieren, die nur mit dem Isotyp-Antikörper behandelt wurden und nicht CD25 depletiert worden waren (1104 ± 166 pg/ml).

Um zu untersuchen, ob nach einfacher CD25-Depletion weniger tumorspezifische T-Zellen aus TVDLN entstehen, wurde eine Versuchsgruppe von Tieren 1x am Tag -21, eine weitere Versuchsgruppe 2x am Tag -21 und am Tag -14 mit dem Anti-CD25-AK PC 61 behandelt. In beiden Versuchsgruppen wurde auch die für die Rekonstitution verwendete Maus mit dem Anti-CD25-Ak PC61 depletiert (einfache Depletion). Die Kontrollgruppe erhielt eine zweimalige Injektion des Isotyp-Antikörpers und erhielt T-Zellen von Tieren, die mit Isotyp-Ak behandelt worden waren (Tabelle 10).

Tabelle 10: Versuchsaufbau zur Bestimmung des Effektes von einmaliger bzw. doppelter CD25-Depletion auf die IFN-Sekretion von tumorspezifischen T-Zellen aus TVDLN, (n=2).

Gruppe	Tag -21	Tag -14	Tag -3	Tag 0	Tag 1
1	PC61		Tu	L	RD+AST
2	PC61	PC61	Tu	L	RD+AST
3	Iso	Iso	Tu	L	RIso+AST
4	Iso	Iso	Tu	L	RIso

Im Vergleich zur einmaligen CD25-Depletion mit PC61 (10223 ± 8591 pg/ml) zeigte sich eine gesteigerte IFN γ -Sekretion nach zweimaliger CD25-Depletion (13533 ± 13267 pg/ml). In der Kontroll-Gruppe konnte nach Vakzinierung im Vergleich eine tumorspezifische IFN γ -Sekretion von 7103 ± 3547 ng/ml in den tumorspezifischen T-Zellen aus TVDLN gemessen werden. Ohne Vakzinierung und mit Behandlung mit dem Isotyp Antikörper lag die tumorspezifische IFN γ -Sekretion bei 3548 ± 97 ng/ml.

Ergebnisse

Nach unspezifischer Stimulation der T-Zellen aus Tumorzell-drainierenden Lymphknoten mit den syngen Kontroll-Tumorzellen der Sarkomzelllinie MCA310 und der Lungenkarzinomzelllinie LLC1 sowie in der Negativ-Kontrolle mit Medium fand sich keine tumorspezifische IFN γ -Sekretion (s. Abb. 23).

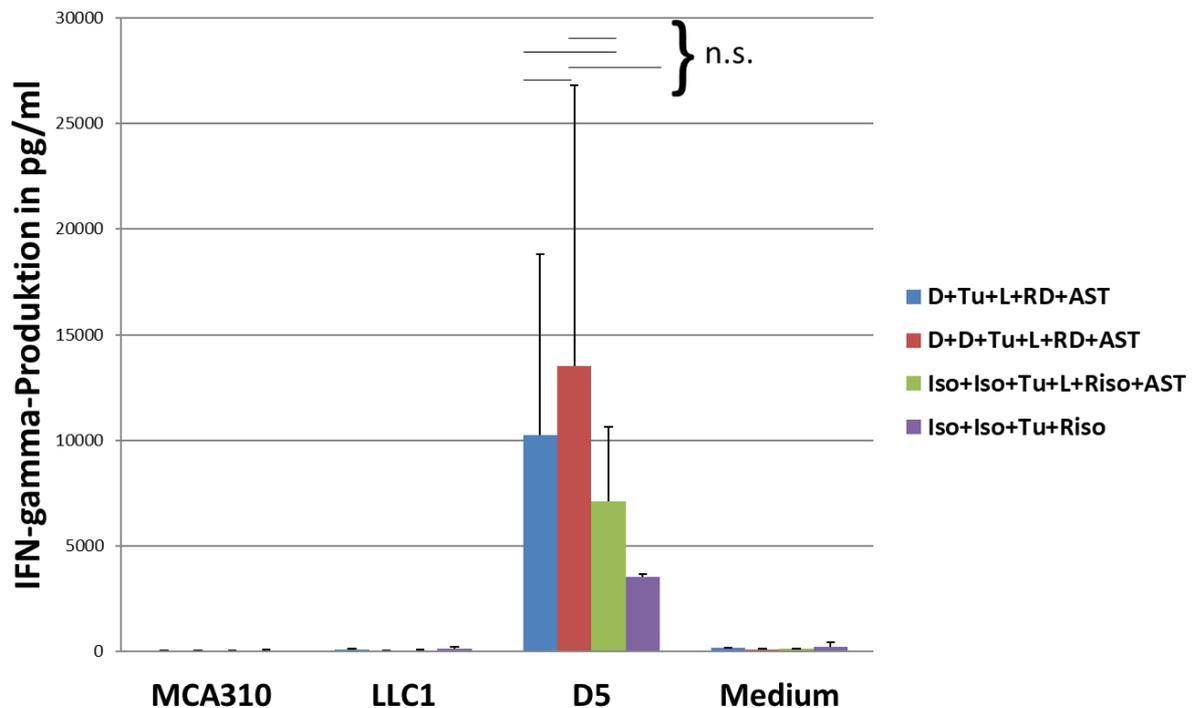


Abbildung 23: Zytokin release assay (CRA) zur Evaluation der einfachen und doppelten Treg-Depletion sowie Evaluation des Einflusses der Vakzine mit D5G6 auf die tumorspezifische IFN γ -Sekretion aus T-Zellen. Angabe der Werte mit Standardabweichung.

Die Gruppe mit Depletion nur zum Zeitpunkt der Tumordinokulation fehlt in diesem Versuchsaufbau, da die in Abbildung 22 dargestellten Ergebnisse zum Zeitpunkt der Durchführung des Versuches noch nicht final ausgewertet waren.

Um den therapeutisch besten Zeitpunkt für die Depletion der CD25+ Zellen zu ermitteln wurde eine zweite CD25-Depletion am Tag der Tumordinokulation durchgeführt. In der ersten Versuchsgruppe erfolgte die CD25-Depletion am Tag -10 sowie am Tag der Tumordinokulation. Die Rekonstitution erfolgte mit Milzzellen aus Mäusen, die mit dem Isotyp-Antikörper behandelt worden waren. In der zweiten Versuchsgruppe wurden die Tiere mit dem Isotyp-Antikörper behandelt und mit Milzzellen CD25 depletierter Mäuse rekonstituiert. In der dritten Versuchsgruppe wurden die CD25+ T-Zellen am Tag -10 sowie zum Zeitpunkt der

Ergebnisse

Tumordinokulation depletiert und die Tiere mit Zellen PC 61-Antikörper behandelte Tiere rekonstituiert. Die Kontrollgruppe wurde ausschließlich mit dem Isotyp-Antikörper behandelt (s. Tabelle 11).

Tabelle 11: Versuchsaufbau zur Evaluation des Zeitpunktes der Depletion mittels CRA, n=1

Gruppe	Tag -10	Tag -3	Tag 0	Tag 1
1	PC 61	Tu+PC61	L	R +AST
2	ISO	Tu+ISO	L	RD +AST
3	PC 61	Tu+PC61	L	RD +AST
4	ISO	Tu+ISO	L	R +AST

Die höchste tumorspezifische IFN γ -Sekretion tumorspezifischer T-Zellen aus TVDLN konnte in der Versuchsgruppe nach CD25-Depletion mit dem Antikörper PC61 10 Tage vor und am Tag der Tumordinokulation gemessen werden, die mit T-Zellen nicht CD25 depletierter Tiere rekonstituiert wurden (15832 ± 975 pg/ml). In der mit dem Isotyp-Antikörper behandelten Kontrollgruppe fand sich eine IFN γ -Sekretion von 11102 ± 192 pg/ml. Die geringste tumorspezifische IFN γ -Sekretion fand sich in T-Zellen aus TVDLN von Mäusen, die 10 Tage vor Tumordinokulation und am Tag der Tumordinokulation mit dem PC61-Antikörper CD25-depletiert worden waren und die mit CD25-depletierten Lymphozyten rekonstituiert worden waren (Abbildung 24).

Ergebnisse

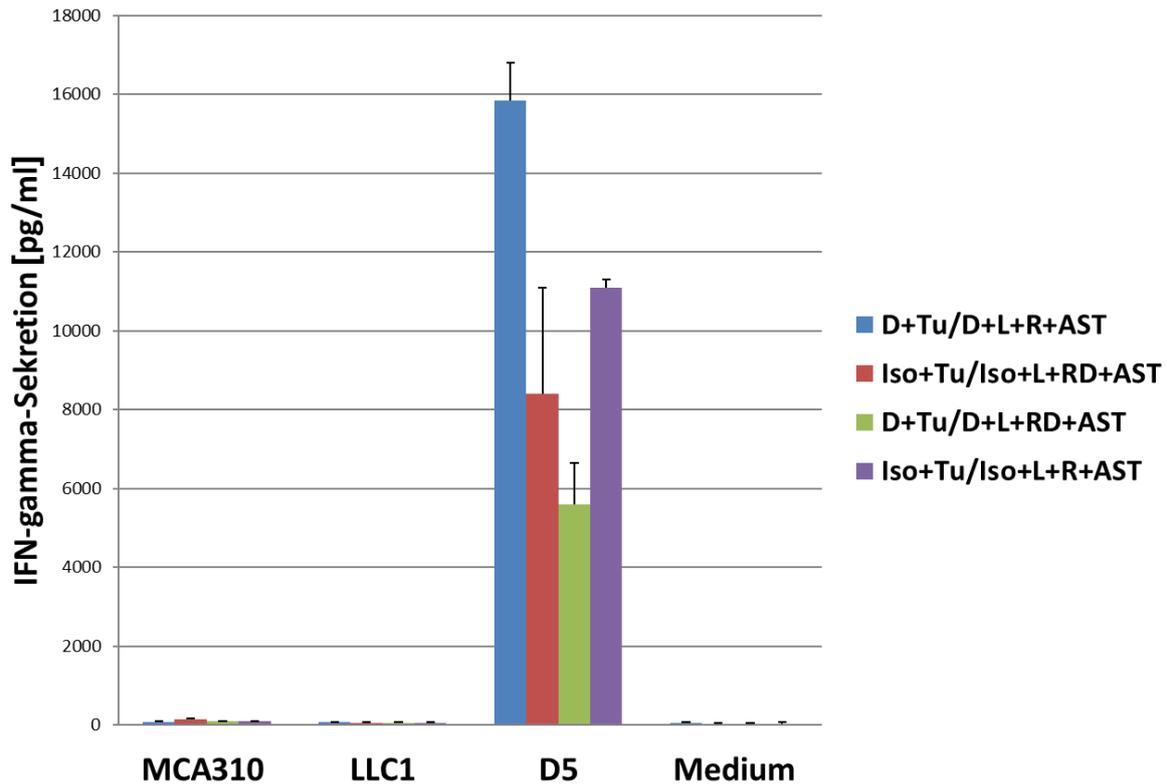


Abbildung 24: Evaluation des besten Depletionszeitpunktes von CD25+ Zellen mittels Zytokin release assay (CRA) und tumorspezifischer IFN-Sekretion.

Basierend auf den o.g. Zytokin release assays wurde die höchste IFN γ -Sekretion tumorspezifischer T-Zellen aus TVDLN von Versuchstieren gemessen, die den Antikörper PC61 erhielten und mit nicht depletierten Spendermilzzellen immunzellrekonstituiert worden waren.

4.7 Einfluss der Depletion der CD25+ T-Zellen auf das Tumorwachstum in vivo

Um einen möglichen Einfluss CD25+ T-Zellen auf das Tumorwachstum nach LRAST und aktivspezifischer Vakzinierung zu untersuchen, wurde das Tumorwachstum s.c. injizierter D5-Tumore im zeitlichen Verlauf durch Bestimmung des größten Tumordurchmessers untersucht. Das Tumorwachstum wurde in Tieren nach LRAST und Gabe des Isotyp-Antikörpers sowohl in der Spendermaus für Milzzellen, als auch in der tumortragenden Maus und in Tieren nach CD25-Depletion der Milzzellspender und in der tumortragenden Empfängermaus bestimmt.

Ergebnisse

In 3 von 5 Mäusen fand sich ein deutlich verzögertes Tumorstadium nach Depletion von CD25+ Zellen. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe, in der bereits nach 18 Tagen das Auswachsen des Tumors beobachtet wurde, war bei 3 von 5 Mäusen der mit PC61-Antikörper behandelten Tiere erst ab Tag 31 ein Tumorstadium zu beobachten.

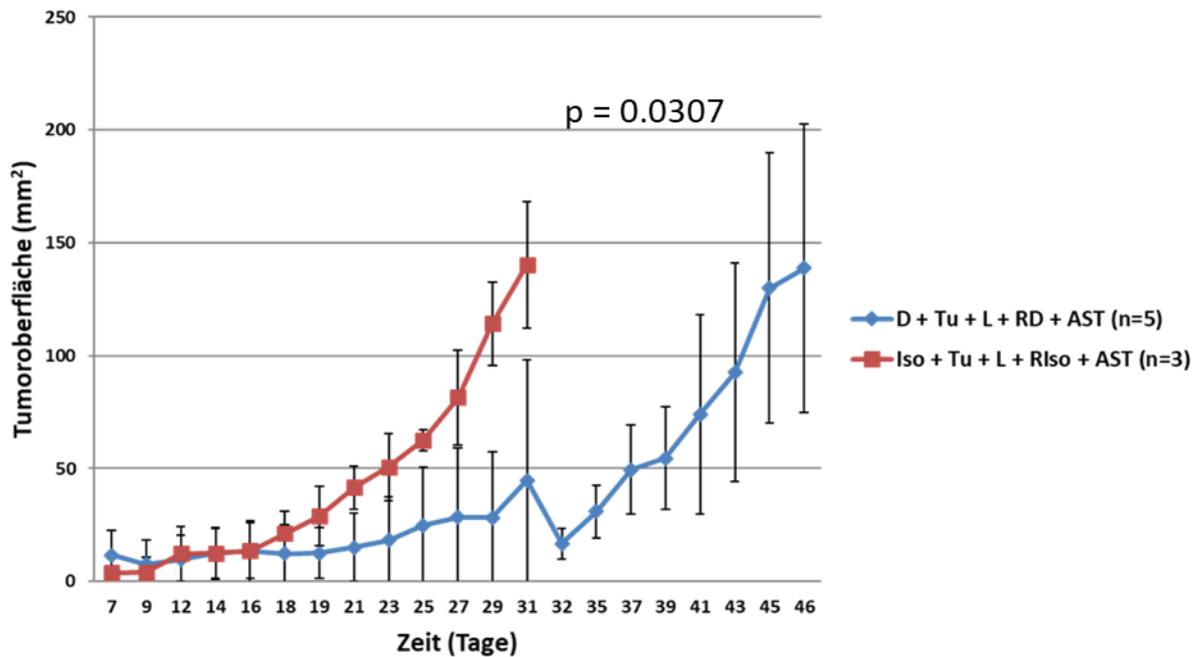


Abbildung 25: Vergleich des s.c. Tumorstadium in C57BL6 Mäusen von a) D5 Tumorzellen nach Lymphodepletion, Rekonstitution mit CD25 depletierten T-Zellen der Spendermäuse, aktiv-spezifischer Immuntherapie und anschließender Depletion CD25+ T-Zellen mit PC61 AK (blaue Kurve) und b) nach Lymphodepletion, Rekonstitution mit Isotyp-AK behandelten Spendermäusen, aktiv-spezifischer Immuntherapie und Gabe des Isotyp-Antikörpers (rote Kurve). (n=5, +/- Standardabweichung)

Die Depletion von CD25+ T-Zellen nach LRAST hatte einen Einfluss auf das Langzeit-Überleben der Tiere. Als Todeszeitpunkt wurde der Tag definiert, an dem die Tumoroberfläche eine Größe von 80mm² überschritt. Das Ergebnis ist in Abbildung 26 dargestellt.

Die Therapiekombination D + Tu + L + R + AST, bei der im Zytokin-Release Assay die höchste tumorspezifische IFN γ -Sekretion tumorspezifischer T-Zellen aus TVDLN vorlag (s. Abb. 22), wurde in diesem Versuch nicht verwendet, da zum Zeitpunkt des Versuches die Ergebnisse der Evaluation des besten Depletionszeitpunktes von CD25+ Zellen (Abb. 24) noch nicht vorlag.

Ergebnisse

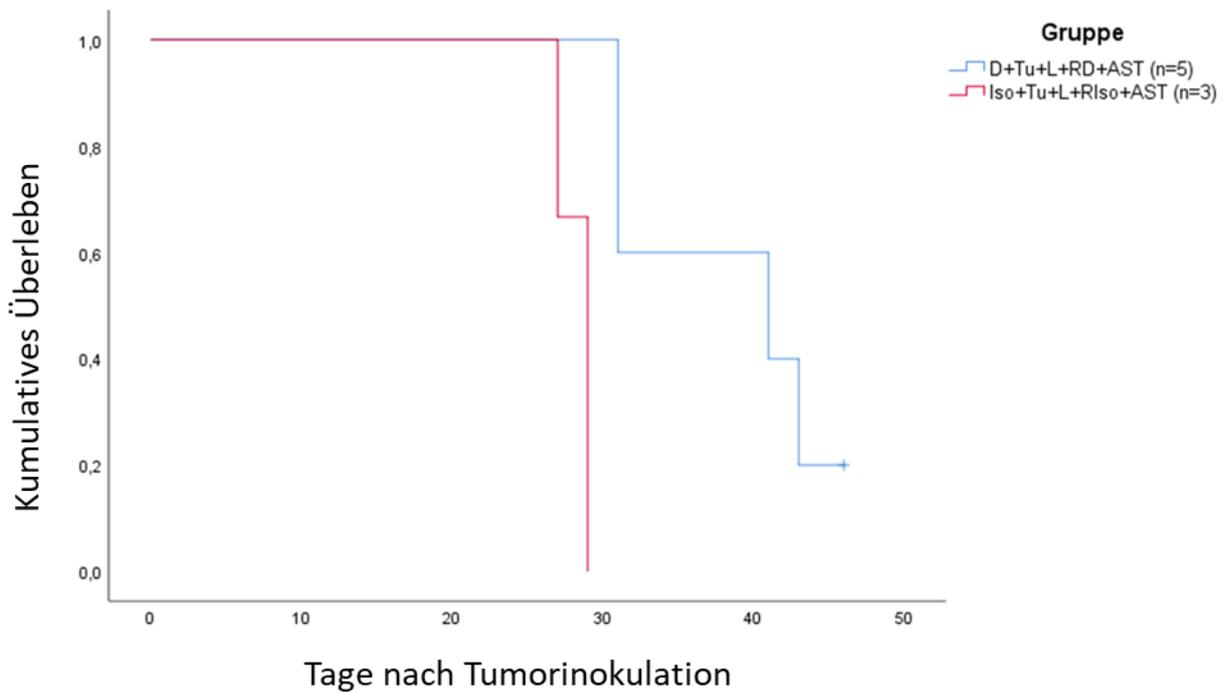


Abbildung 26: Kaplan-Meier-Kurve zum Überleben von C57BL6 Tieren nach Tumorinokulation. Vergleich des Überlebens nach a) Lymphodepletion, Rekonstitution mit CD25 depletierten T-Zellen der Spendermäuse und aktiv-spezifischer Immuntherapie sowie anschließender Depletion CD25+ T-Zellen mit PC61 AK der Empfängermause (blaue Kurve) und b) nach Lymphodepletion, Rekonstitution Isotyp-AK behandelten Spendermäusen, aktiv-spezifischer Immuntherapie und Gabe des Isotyp-Antikörpers (rote Kurve). (n=5, +/- Standardabweichung). (blaue Gruppe: n=5, rote Gruppe: n=3).

Um zu untersuchen, ob die Depletion CD25+ Zellen in den Spendern für die T-Zell-Rekonstitution einen Einfluss auf das Tumorwachstum hat, wurden Mäuse vor Tumorinokulation mit dem Depletionsantikörper PC61 behandelt. Nach Lymphodepletion erfolgte die Rekonstitution mit den Milzzellen der Mäuse, die mit dem PC61 Antikörper oder mit dem Isotyp Antikörper behandelt wurden. Die zu rekonstituierenden, tumortragenden Versuchstiere waren vor Tumorgabe und LRAST jeweils mit dem CD25-Antikörper PC61 behandelt worden. In der Kontrollgruppe wurde sowohl die tumortragende Maus als auch die für die Rekonstitution verwendete Maus mit dem Isotyp-Antikörper behandelt (s. Abb. 27).

Ergebnisse

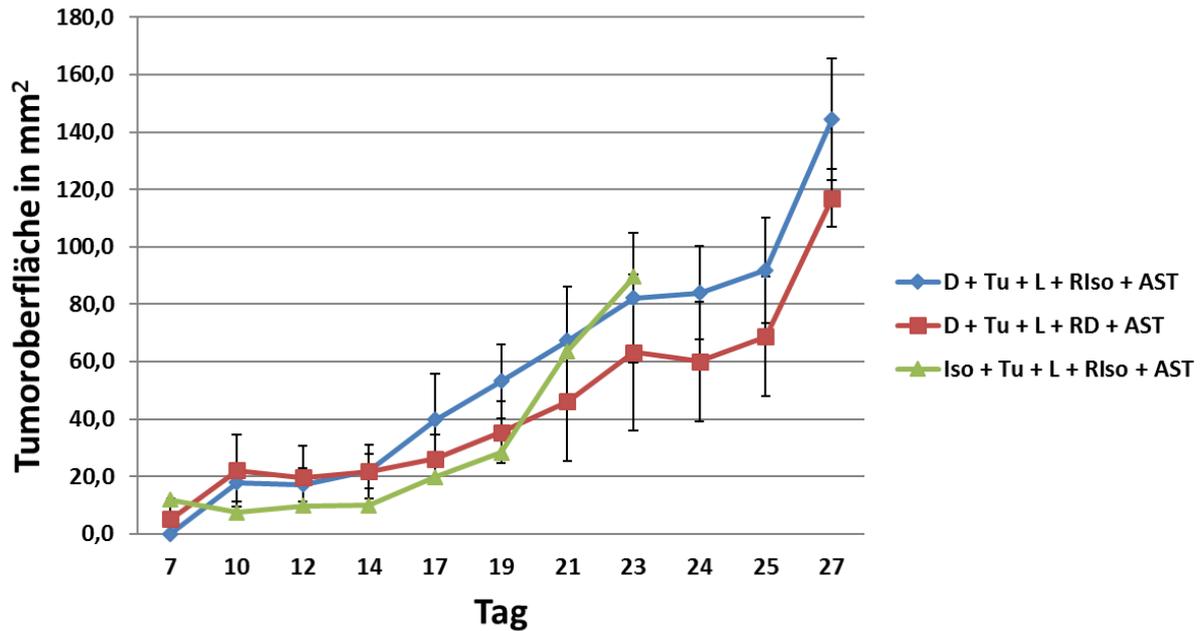


Abbildung 27: Tumorwachstum im Vergleich zwischen Depletion der tumortragenden Maus (blaue Linie, n=5), Depletion der tumortragenden Maus sowie der für die Rekonstitution verwendeten Maus (rote Linie, n=5) und Kontrollgruppe (n=1) mit Angabe der jeweiligen Standardabweichung

In der Gruppe der Versuchstiere, die mittels PC61 Antikörper behandelt und auch mit Milzzellen von mit PC61 behandelten Mäusen rekonstituiert worden waren, zeigte sich nach Tumorinokulation ein stetiges Tumorwachstum. Das Größenwachstum der Tumore in der Gruppe der mit dem PC61-Antikörper behandelten Mäusen, die mit Milzzellen aus mit Isotyp Antikörpern behandelten Tieren isoliert wurden, unterschied sich nicht signifikant. In beiden Versuchsgruppen war spätestens am Tag 27 nach Tumorinokulation die maximale Tumorgröße von 80mm² überschritten.

Die Depletion mit dem PC61-Antikörper war am effektivsten, wenn sowohl die Treg der tumortragenden Maus als auch die Treg der für die Rekonstitution verwendeten Maus depletiert werden. Der Unterschied zwischen der komplett depletierten Gruppe (hier in rot dargestellt) zu der Gruppe, in der nur die Tumortragende Maus depletiert wurde, war jedoch nicht signifikant.

Diskussion

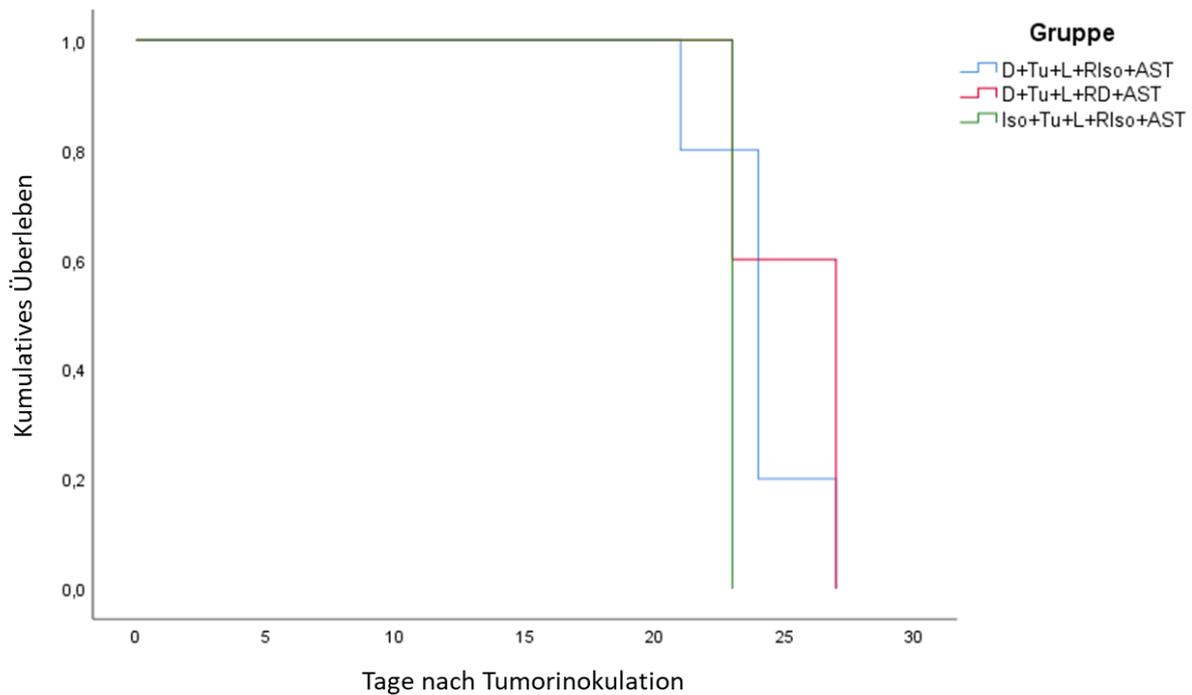


Abbildung 28: Kaplan-Meier-Überlebenskurve zur Evaluation des Einflusses der Depletion im Rekonstitutionsprodukt.

In keiner Maus konnte durch Behandlung mit PC61 Antikörpern und LRAST die Entstehung eines Tumors verhindert werden.

5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung von CD25+ Treg auf die Induktion tumorspezifischer T-Zellen in Tumorknoten und auf das subkutane Tumorstadium nach LRAST zu evaluieren.

5.1 Lymphodepletion, Rekonstitution und aktiv-spezifische Tumorthherapie

Die Effekte der Kombinationstherapie (LRAST) wurden unter anderem in einem murinen Magenkarzinom-Modell untersucht. Die Kombination von adoptivem Zelltransfer nach vorheriger Lymphodepletion wurde bereits beschrieben. Berendt et al postulierten, dass ein

adoptiver Zelltransfer in einem murinen Sarkom-Modell nur in immundepletierten tumortragenden Mäusen effektiv sei, da der anti-Tumor-Effekt sonst durch ‚suppressor T cells‘ (heute: Treg) unterdrückt würde [71]. Die durch Cyclophosphamid-Gabe hervorgerufene Reduktion der CD25+ Treg (s. 4.2.) vor T-Zell-Rekonstitution sollte eine T-Zell vermittelte Immunantwort gegen den Tumor verbessern.

Die Lymphodepletion in unseren Versuchen mit Cyclophosphamid wurde mit einer Konzentration von 200mg/kg durchgeführt. Diese Dosierung wurde bereits in mehreren Studien eingesetzt und führte zu einer erhöhten Proliferationsrate von tumorspezifischen T-Zellen und zu einer längeren Halbwertszeit antigen-spezifischer T-Zellen [72, 73]. Durch Kombination von LRAST mit aktiv-spezifischer Tumorstimmung konnte mit einer Dosis von 200mg/kg Cyclophosphamid in einem murinen Magenkarzinom-Tumormodell bei 80% der behandelten Mäuse ein Tumorwachstum verhindert werden [1]. Motoyoshi et al konnten zeigen, dass Cyclophosphamid in einer Dosierung von nur 20mg/kg einen selektiv hemmenden Effekt auf CD4+CD25+ T-Zellen hat. Diese Population schließt regulatorische T-Zellen aber auch aktivierte T-Zellen ein. Konventionelle CD4+ und CD8+ Zellen wurden in seinen Studien durch 20mg/kg Cyclophosphamid nicht beeinflusst, jedoch fand sich ein deutlicher Unterschied im prozentualen Verhältnis von CD25+CD4+ T-Zellen zur Gesamtpopulation aller CD4+ Zellen, was möglicherweise auf eine erhöhte Zahl von Treg oder von zytotoxischen T-Zellen hindeutet [74]. Die Dosierung von 200mg/kg führte in Motoyoshis Versuchen zu einer Reduktion des gesamten T-Zell Pools sowie zu einem direkt zytotoxischen Effekt auf die murinen Lebertumorzellen MH129 [74].

In den von uns durchgeführten Versuchen wurde der Effekt der Lymphodepletion auf Treg in einem murinen D5-Melanom-Tumormodell untersucht. Wie in Abb. 5 dargestellt, konnte durch alleinige Lymphodepletion mit Cyclophosphamid eine Reduktion von CD4+CD25+Foxp3+ T-Zellen bezogen auf den Gesamtpool aller CD4+ T-Zellen erreicht werden. Die Funktionalität der Treg wurde jedoch im Rahmen der Versuche nicht untersucht. In Folgeversuchen wäre wichtig, auch die Funktionalität der Treg, bspw. mittels Proliferationsassays zu überprüfen, da eine rein phänotypische Beschreibung keine abschließende Aussage zur Rolle der Treg bezogen auf das Tumorwachstum ermöglicht.

Durch Gabe von 200mg/kg Cyclophosphamid konnte eine Lymphodepletion bis zum Tag 10 nach Applikation von Cyclophosphamid nachgewiesen werden (s. Kapitel 4.4). Im Gegensatz

zu unseren Beobachtungen werden von Salem et al. eine Repopulation des T- und B-Zellpools in der Milz ab Tag 6 nach Lymphodepletion mit Cyclophosphamid beschrieben [75]. Ein Grund für die unterschiedlich schnell verlaufenden Repopulationen bzw. die von uns nachgewiesene länger andauernde Lymphopenie könnte durch Unterschiede im Applikationsweg erklärt werden. In unseren Versuchen wurde Cyclophosphamid intraperitoneal appliziert. Salem et al. verabreichten Cyclophosphamid subcutan. Auch die verwendete Dosierung des Cyclophosphamid in den von uns durchgeführten Versuchen lag höher und betrug je nach Gewicht des Versuchstiers 4-5mg/Maus. Salem et al. verwendeten unabhängig vom Gewicht des Versuchstieres eine fixierte Dosis von 4mg Cyclophosphamid/Maus. Wie in unseren Versuchen wurden ebenfalls C57BL/6 Mäuse als Versuchstiere verwendet [75]. Da keine durchflusszytometrische Charakterisierung der Immunzellen am Tag 6 nach Lymphodepletion in unseren Versuchen durchgeführt wurde, ist es möglich, dass die durch Cyclophosphamid induzierte Lymphopenie schon vor dem zehnten Tag vollständig erreicht war.

Durch Lymphodepletion mit Cyclophosphamid kommt es zwischen Tag 3 und 10 zu einer Abnahme der Frequenz der CD45.2+ Empfänger-T-Zellen (Abb. 15). Bis zum Tag 23 war wieder eine geringe Zunahme der CD45.2+ Empfänger-T-Zellen zu beobachten. Auch bei den Treg war zwischen Tag 3 und 10 eine Abnahme der Frequenz sowohl der CD45.2+ Empfänger als auch der CD45.1 Spender Treg zu sehen. Bis zum Tag 23 war auch bei den Empfänger- und Spender-Treg eine Zunahme zu beobachten (Abb. 13). Um die Frequenz zu senken wäre die erneute Gabe von Cyclophosphamid in geringer Dosis als mögliche Therapiestrategie zu diskutieren.

Die Rekonstitution erfolgte durch adoptiven Zelltransfer nach Lymphodepletion in den oben beschriebenen Versuchen mit unselektierten Milzzellen oder nach Gabe des CD25-Antikörpers PC61 zur Depletion von CD25+ T-Zellen. Bereits in den 1960er Jahren wurden Versuche zum adoptiven Zelltransfer in verschiedenen Therapiemodellen bei murinen Tumoren durchgeführt. Delorme et al. konnten durch adoptiven Transfer von Milzzellen in einem Sarkommodell bei Ratten ein verlangsamtes Tumorwachstum beobachten, insbesondere nachdem die Milzzellspender zuvor mit bestrahlten Sarkomzellen immunisiert worden waren [76]. Die für das LRAST-Modell verwendeten Milzzellen stammen von nicht-tumorvakzinieren Mäusen. Durch Milzzelltransfer von Mäusen nach Tumorvakzinierung könnte möglicherweise die therapeutische Effektivität potentiell verbessert werden.

Nach Lymphodepletion entweder durch Ganzkörperbestrahlung oder durch Chemotherapie und aktiv-spezifische Vakzinierung konnte die Wirksamkeit adoptiv transferierter Zellen gesteigert werden [77, 78]. Diese Kombination von Lymphodepletion, Tumorkvakzinierung und Zelltransfer entspricht auch dem in unseren Versuchen angewendeten Therapieschema. In den von uns zur aktiv-spezifischen Vakzinierung verwendeten D5G6 Melanomzellen, welche stabil mit GM-CSF transfiziert wurden, konnte 2 Tage nach Bestrahlung mit 7500rad bzw. 11700rad noch eine GM-CSF-Freisetzung von 161,2 ng/10⁶ Zellen bzw. 135,9 ng/10⁶ Zellen in 24h gemessen werden. Die von Arca et al. [64] gemessene GM-CSF-Konzentration von 450 ng GM-CSF /10⁶ in 24h wurde in unseren Versuchen nicht erreicht. Die höchste GM-CSF Freisetzung wurde in unseren Experimenten am Tag 5 unabhängig von der Höhe der verwendeten Strahlendosis nachgewiesen. Winter et al. konnten in D5G6-Tumorzellen eine durchschnittliche Sekretion von 200 ng GM-CSF /10⁶ Zellen in 24h nachweisen [79]. Der Nachweis der tumorspezifischen Freisetzung von IFN γ durch T-Zellen aus Tumorkvakzin-drainierenden Lymphknoten wird als Surrogat-Marker der potentiellen Anti-Tumor-Aktivität gewertet.

Anti-Tumor-Mechanismen wie zum Beispiel die Makrophagen-abhängige Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) sind möglicherweise für die therapeutische Wirksamkeit der LRAST-Therapie solider Tumore von Bedeutung.

5.2 Einfluss des Rekonstitutionsproduktes

Um zu differenzieren, ob die adoptiv transferierten Milzzellen selber in dem Empfänger zu tumorspezifischen Effektorzellen in den TVDLN aktiviert werden und das Tumorstwachstum hemmen, wurden in den Versuchen T-Zellen einer CD45.1+ Maus in CD45.2+ Empfängertiere adoptiv übertragen. Da die Milzzellen unselektiert waren, wurden neben CD 45.1+ T-Zellen auch CD45.1+ Treg in die tumortragende Maus transferiert. Da zu vermuten war, dass auch die transferierten Treg in den Empfängertieren proliferieren, musste im Rahmen der Versuche überprüft werden, ob diese Zellen nach Kontakt mit dem Tumor ebenfalls an der Modulation des immunsuppressiven Tumormilieus teilhaben und somit das Tumorstwachstum begünstigen können. Goldstein et al. waren in der Lage nach adoptivem T-Zell-Transfer durch selektive Depletion der Treg mittels der Oberflächenmarker CD44 und CD137 in einem murinen B-Zell-Lymphom-Modell ein Tumorstwachstum bzw. einen Tumorstprogress zu unterdrücken [80].

Somit muss davon ausgegangen werden, dass der von uns verwendete CD25 Antikörper PC61 nicht ausreichend selektiv Treg depletiert.

CD25 entspricht der α -Kette des IL-2 Rezeptors und erst die Aktivierung von CD4+ Zellen führt zur Expression von CD25 [14]. Auch wenn sich die Expression von CD25 zwischen aktivierten T-Zellen und Treg quantitativ unterscheidet [13], ist es möglich, dass durch Gabe des Antikörpers PC61 auch aktivierte T-Zellen depletiert werden und somit der erhoffte Effekt der Treg-Depletion abgeschwächt wird.

Andere mögliche Wege Treg zu eliminieren wurden u.a. von Zhang et al. vorgestellt. Sie modifizierten Mäuse genetisch durch Kopplung von Foxp3 mit dem Diphtherietoxinrezeptor (KC;Foxp3^{DTR} Mäuse), um eine Depletion von Treg durch Gabe von Diphtheritoxin zu ermöglichen [81]. In einem Pankreaskarzinommodell zeigte sich jedoch nach Depletion der Treg ein beschleunigtes Tumorstadium. Als Ursache wurde die depletionsbedingte Differenzierung von stromalen Fibroblasten zu immunsuppressiven Fibroblasten vermutet, die zu einer vermehrten Infiltration des Tumorgewebes durch myeloide Zellen führte [81]. Alternativ zur kompletten Depletion von Treg wäre eine Einschränkung ihrer immunmodulatorischen Funktionalität oder die Beeinflussung des prozentualen Verhältnisses von Treg bezogen auf die Gesamtanzahl von CD4+-T-Zellen, wie durch Cyclophosphamidgabe, mögliche Ansatzpunkte.

Rosenberg et al. isolierten 1986 tumorinfiltrierende Leukozyten (TIL) und konnten diese nach ex vivo Expansion mit IL-2 erfolgreich in tumortragende Mäuse zurückführen. In Kombination mit Lymphodepletion durch Cyclophosphamid konnten sie eine hohe therapeutische Effektivität erreichen. Durch zusätzliche i.p. Gabe von IL-2 konnten in 100% der Mäuse Lebermetastasen eines Colonkarzinom-Modells erfolgreich behandelt werden [82]. Der adoptive Transfer von tumorspezifischen T-Zellen erwies sich als therapeutisch hoch effektiv und war dem Transfer naiver, nicht selektierter T-Zellen überlegen.

Das hier verwendete LRAST-Schema könnte ggf. durch eine Behandlung der Milzzellspender mit der D5G6-Vakzine vor Milzentnahme oder durch Verwendung von Milzzellen aus tumortragenden Mäusen für den adoptiven Transfer eine bessere Anti-Tumorantwort generieren.

Tanaka et al. wiesen nach Transfer von selektierten, naiven T-Zellen in zuvor durch Bestrahlung lymphodepletierten Mäusen eine starke Hemmung des Tumorwachstums in einem murinen Fibrosarkom-Modell nach [83]. Insbesondere konnten sie zeigen, dass der Transfer von T-Zellen, die ex vivo mittels α CD3 polyclonal aktiviert und anschließend mit IL-2, IL-7 und IL-23 (CD4 und CD8-Zellen) stimuliert wurden nach dem Zelltransfer therapeutisch aktiver waren [83]. Damit demonstrierten sie, dass auch durch den Transfer von naiven T-Zellen nach deren Expansion die anti-Tumor-Antwort verbessert werden kann, ohne Treg zu depletieren.

Um die Rolle von adoptivem Treg-Transfer in Colorectalen murinen Tumoren zu untersuchen, transferierten Rao et al. Treg in T-Zell-defiziente Mäuse mit Colorectalen Tumoren im Frühstadium. Nach dem Transfer von Treg-Zellen beobachteten sie eine Zunahme der Anzahl und Größe intestinaler Tumoren. Als mögliche Erklärung wiesen sie eine signifikante Verminderung der Anzahl von NK-Zellen und deren Aktivität nach [84].

5.3 Einfluss von PC61 auf die Frequenz von Treg und Bedeutung des Zeitpunkts der Depletion

Durch die vermehrte Expression von CD25 an der Zelloberfläche der Treg kann dieser Oberflächenmarker als potentiellles Epitop für die Depletion von CD25+ Zellen genutzt werden. Neben Treg exprimieren jedoch auch aktivierte T-Zellen CD25, sodass ebenfalls diskutiert werden muss, ob eine mögliche Depletion dieser Zellen sich negativ auf die Anti-Tumorantwort auswirkt. Storni et al. konnten zeigen, dass sich die Expression von CD25 bei aktivierten T-Zellen in vitro und in vivo fundamental unterschieden. T-Zellen, die in vivo mittels eines Peptids geprimt wurden, exprimierten nur eine geringe Menge des CD25 Oberflächenantigens, wobei in vitro aktivierte T-Zellen eine deutlich höhere Expression von CD25 aufwiesen [91]. Somit kann vermutet werden, dass in vivo nur eine geringe Expression des CD25 Antigens vorkommt und hierdurch bedingt nur eine geringe Depletion aktivierter T-Zellen durch den PC61 Antikörper erfolgt.

Um die Rolle von Treg im Rahmen der Induktion Tumor-spezifischer T-Zellen nach LRAST zu bestimmen, wurden mittels spezifischer anti-CD25-Antikörper systemisch CD25+ Zellen in Mäusen depletiert. Shimizu et al. und Onizuka et al. konnten zeigen, dass nach der Gabe von anti-CD25-Antikörpern das Wachstum von verschiedenen Tumoren gehemmt wird [85, 86].

Auch in murinen Colorectalem Tumor-[87], Fibrosarkom-[88] und Melanom-Modellen [89] konnten nach der systemischen Gabe von anti-CD25-Antikörpern hemmende Effekte auf das Tumorwachstum und eine Verbesserung der anti-Tumor-Aktivität nachgewiesen werden. Auch durch die Depletion aller CD4⁺ Zellen im Tumor und somit auch von CD4⁺CD25⁺ Treg, konnte die Immunantwort gegen Tumore verbessert werden und eine Tumorabstoßung durch Veränderung des peritumoralen Cytokin-Milieus vermittelt werden [90].

Der Einfluss des monoklonalen CD25-Antikörpers PC61 auf Frequenz und Funktionalität von Treg wurde in verschiedenen Studien sowohl in vivo als auch in vitro untersucht [68, 91, 92]. Maes et al. konnten in einem murinen Glioblastom Tumormodell mit C57BL/6 Mäusen einen Überlebensvorteil der Tiere nach i.p. Injektion von 250µg PC61 3 Wochen vor Tumorinokulation nachweisen [91]. Durch Injektion des Antikörpers kam es zu einer durch den Rezeptor FcγRIII, der auf NK-Zellen und Makrophagen exprimiert wird, vermittelten Opsonierung und somit zu einer Reduktion der Treg [92]. Im Gegensatz zu dem PC61-Antikörper führt der CD25-Antikörper 7D4 nur zu einer Herunterregulation des CD25-Rezeptors der Treg, nicht aber zu dessen Depletion [93].

In der Literatur wurden unterschiedliche Ansätze zur Depletion von Treg verfolgt. Dabei wurde sowohl die Dosierung des Antikörpers als auch der Zeitpunkt und die Frequenz der Antikörper-Applikation variiert. Shimizu et al depletierten zweimalig (Tag 4 und 2 vor Tumorinokulation) [85], Onizuka et al depletierten nur einmalig am Tag -4 [86] und Maes et al depletierten einmalig mit 250µg des anti-CD25-Antikörpers PC61 i.p. drei Wochen vor Tumorinokulation [91]. In Vorversuchen wurde mit dieser Dosis bereits in verschiedenen Tumormodellen eine effektive Treg-Depletion erreicht ([86, 91]). Die Depletion wurde am Tage 24, 16 und 4 vor Tumorinokulation durchgeführt, um eine effektive Depletion zu erreichen und um auch nach Tumorinokulation noch einen anhaltenden Effekt zu haben.

Im Gegensatz zu Studien, die bereits nach einer Einmalgabe des PC61-Antikörpers eine durchflusszytometrisch nachgewiesene Reduktion der CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg erreichen konnten, zeigte sich bei uns keine signifikante Depletion der Treg in der Milz. Die Reduktion der CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg im Blut war jedoch signifikant. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die von uns gewählte Applikationsart des PC61-Antikörpers durch i.p.-Injektion. Andere Arbeitsgruppen applizierten den Antikörper intravenös in den Retrobulbär-Plexus der Mäuse

[86]. Bei der i.p. Injektion besteht die Möglichkeit, dass der Antikörper in die Blase oder in das Darmlumen injiziert wird, wodurch evtl. eine eingeschränkte Resorption bedingt wird.

Übereinstimmend zu anderen Publikationen zur PC61 Applikation [91, 92, 94] konnten auch wir einen anhaltenden Effekt der Depletion der Treg bestätigen. Bis 17 Tage nach Tumorinokulation (bzw. 21 Tage nach letzter Gabe des PC61-Antikörpers) konnte im peripheren Blut ein Unterschied im prozentualen Anteil der Treg im Vergleich zur Isotyp-Kontrollgruppe festgestellt werden. Stephens et al. konnten 3 Tage nach PC61 Gabe eine Depletion von >90% der CD4+CD25+ Zellen nachweisen. Erst ca. 5 Wochen nach Depletion war wieder der ursprüngliche prozentuale Anteil nachzuweisen. Die Injektion in diesen Versuchen erfolgte ebenfalls i.p., jedoch wurde pro Maus 1mg des Antikörpers PC61 injiziert, was der 4fachen Dosis im Vergleich zu unseren Versuchen entspricht [94]. Insgesamt konnte jedoch ein deutlicher Unterschied in der Effektivität zwischen Depletion der CD4+CD25+Foxp3+ Treg im peripheren Blut, in Lymphknoten und in der Milz beobachtet werden. Der Mechanismus der zu einer unterschiedlichen Depletion in den 3 Kompartimenten führt ist derzeit noch unklar [92]. Auch in den von uns durchgeführten Versuchen ließen sich die CD4+CD25+Foxp3+ Treg im peripheren Blut am effektivsten depletieren. Insgesamt konnten wir bei 11 von 13 Mäusen eine Reduktion der CD4+CD25+Foxp3+ Treg auf $\leq 0,05\%$ der CD4+ Zell-Population erreichen.

Der in unseren Versuchen nachgewiesene Unterschied des prozentualen Anteils der CD25-Foxp3+ Zellen von CD4+ nach PC61-Gabe Zellen wurde ebenfalls von Bertram et al. beschrieben [91]. In den Mäusen, die mit dem CD25 Antikörper PC61 behandelt wurden, waren in unseren Versuchen $7,75\% \pm 1,14\%$ CD25-Foxp3+ Zellen im Gegensatz zu $6,23\% \pm 0,70\%$ in den mit dem Isotyp behandelten Versuchstieren nachweisbar. Dies liegt möglicherweise daran, dass ein Anteil der Treg die Expression von CD25 herunterreguliert [95].

5.4 Klinische Umsetzbarkeit

Um die Versuche der klinischen Realität anzupassen, bei der Patienten erst dann vakziniert werden, wenn bereits ein Tumor ausgewachsen ist, wurden zunächst den Tieren Tumorzellen subkutan injiziert. Erst nach Etablierung von Mikrotumoren erfolgte die Lymphodepletion gefolgt von Milzzell-Rekonstitution und aktiv-spezifischer Tumorthherapie. Die Depletion mit

dem CD25 Antikörper PC61 erfolgte jedoch vor Tumorinokulation. Hierdurch konnte wie in Abb. 26 gezeigt in 60% der Mäuse ein deutlich verzögertes Tumorwachstum beobachtet werden. Fraglich ist jedoch, ob das LRAST Schema in Versuchstieren mit etablierten Melanomen mit Treg Depletion *nach* Tumorinokulation ebenfalls Erfolg zeigen würde. Onizuka et al. konnten zeigen, dass die Einmalgabe von PC61 in einem Myelom-Tumor-Modell eine Regression des Tumors nach Injektion von PC61 vor Tumorinokulation, am Tag der Tumorinokulation sowie einen Tag nach Tumorinokulation hervorrufen konnte [86]. Ab dem zweiten Tag nach Tumorinokulation konnte jedoch keine Tumorregression mehr beobachtet werden [86]. Somit ist zu hinterfragen ob eine Depletion der Treg bei etablierten Tumoren sinnvoll ist, insbesondere da durch CD25-Depletion auch schwere Nebenwirkungen zu erwarten sind (s. 2.6.).

Der adoptive Zelltransfer nach Lymphodepletion, der in den hier durchgeführten Untersuchungen mit unselektierten Milzzellen durchgeführt wurde, wird in modifizierter Weise bereits klinisch angewendet. Vor allem in bereits metastasierten Melanomen konnte so beachtliche Erfolge erzielt werden [96]. Rosenberg et al. konnten bei 20 von 93 Patienten (22%) mit metastasiertem Melanom nach Versagen von Vortherapien durch adoptiven TIL-Zell Transfer nach einer vorbereitenden, nicht myeloablativen Chemotherapie eine komplette Remission des Tumors erreichen [96]. Da hier nur unselektierte Milzzellen für die Immunzellrekonstitution verwendet wurden, wäre der Transfer von antigenspezifischen T-Zellen nach vorheriger Tumorstimmung eine denkbare Modifikation für das LRAST-Modell.

In präklinischen Modellen kann durch Kombinationstherapien die therapeutische Effektivität der Immuntherapien gesteigert werden [1, 97]. Auch in unseren Versuchen konnten wir zeigen, dass durch Lymphopenie Induktion (LRAST), Depletion von CD25+ Zellen in den Empfängertieren mit Hilfe des Antikörpers PC61 und anschließender Vakzinierung T-Zellen induziert werden, die tumorspezifisch IFN- γ sezernieren und das Tumorwachstum *in vivo* hemmen. Zu evaluieren bleibt jedoch weiterhin, inwieweit diese Therapieregimes im Menschen klinisch sicher anwendbar sind, und ob sich die in den murinen Modellen gezeigten Ergebnisse auch im Menschen bestätigen lassen.

Die Expression von CTLA4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4) auf murinen Treg stellt einen weiteren möglichen Angriffspunkt für eine immunmodulatorische Therapie dar. Read et al. konnten zeigen, dass die immunsuppressive Funktion von Treg *in vivo* von der

Signalübertragung über CTLA-4, sowie der Sekretion von Transforming Growth Factor β abhängt [98]. Suttmüller et al. konnten zeigen, dass durch eine Kombination des B16-GM-CSF-Tumorzellimpfstoffs, einer In-vivo-Depletion von CD25⁺ Zellen und einer CTLA-4-Blockade die maximale therapeutische Wirksamkeit erreicht werden konnte. In dieser Behandlungsgruppe konnte nach Injektion von $2,5 \times 10^3$ Tumorzellen in allen Mäusen und nach Injektion von 5×10^3 Tumorzellen noch in 6 von 9 Mäusen ein Wachstum der Tumore komplett verhindert werden. Auch die tumorspezifische IFN γ -Sekretion war in dieser Kombination am Stärksten. Dies weist auf einen synergistischen Effekt von CD25-Depletion und CTLA-4-Blockade hin [99]. Da im Rahmen unserer Versuche eine Tumorentstehung nicht zu verhindern war, wäre die Hinzunahme einer CTLA-4-Blockade eine weitere mögliche therapeutische Option.

6 Zusammenfassung

Wir konnten zeigen, dass durch die Kombinationstherapie mit LRAST und Depletion von CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg durch i.p. Applikation des PC61 Antikörper T-Zellen in den TVDLN generiert werden, die tumorspezifisch IFN- γ sezernieren und nach adoptivem, unselektiertem Milzzell-Transfer das Überleben von Versuchstieren mit etabliertem D5 Tumor verlängern.

Die für die Rekonstitution verwendeten Milzzellen konnten nach Zelltransfer in der Empfängermaus nachgewiesen und durchflusszytometrisch charakterisiert werden. Verschiedene Immunzellpopulationen (T-Zellen, Treg, MDSC und NK-Zellen) konnten nach Behandlung mit dem LRAST Schema identifiziert und in ihrem Verlauf beschrieben werden.

Die Depletion von CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg durch Injektion des CD25-Antikörpers PC61 konnte sowohl im peripheren Blut der Mäuse als auch in der Milz nachgewiesen werden. Zudem gelang ein Nachweis einer langanhaltenden Depletion von CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Zellen nach Tumordinokulation. Die tumorspezifische Sekretion von IFN γ von T-Zellen aus Tumordrainierenden Lymphknoten konnte nach LRAST durch Depletion der Treg mit dem CD25 Antikörper PC61 gegenüber Versuchstieren, die keine CD25 Depletion erhielten, gesteigert werden. Die Milzzellrekonstitution mit Zellen von Spendertieren, die nur mit dem Isotyp-

Antikörper behandelt wurden ergab die höchste IFN γ Sekretion. Diese Beobachtung legt eine gesteigerte Induktion tumorspezifischer T-Zellen in TVDLN nahe.

In Langzeitversuchen konnte ein längeres Überleben von Versuchstieren mit etablierten subkutanen Melanomen durch die Kombinationstherapie von LRAST mit anschließender Treg-Depletion gezeigt werden.

Wir konnten zeigen, dass vermehrt tumorspezifische T-Zellen aus Tumolvakzin-drainierenden Lymphknoten nach LRAST mittels Depletion von Treg durch Verwendung des CD25-Antikörpers bei den Empfängertieren induziert werden. Die ausgeprägteste Induktion tumorspezifischer T-Zellen fand sich bei den Versuchstieren, die Milzzellen von Spendern erhielten, bei denen keine CD25-Depletion durchgeführt worden war. Das Ausmaß der tumorspezifischen IFN γ Sekretion von T-Zellen aus TVDLN diente als Surrogatmarker für die Induktion tumorspezifischer T-Zellen. Auch wenn das Tumorwachstum subcutaner D5 Melanome durch die Kombinationstherapie von LRAST in Kombination mit der Depletion von CD25+ Zellen verlangsamt wurde, konnte es nicht aufgehalten werden. Kritisch ist anzumerken, dass die Therapiegruppe mit Versuchstieren, die vor Tumorinokulation mit dem anti-CD25 Antikörper behandelt, lymphodepletiert und dann eine Tumolvakzinierung und Milzzellrekonstitution von Spendern erhielten, die nur mittels Isotyp-Antikörper behandelt wurden (D + Tu + L + R + AST) nicht in Langzeitversuchen zum Tumorwachstum subcutaner D5 Melanome evaluiert wurde. Aufgrund der vermuteten unselektiven Depletion von CD25 mit dem Antikörper PC61 könnte möglicherweise die Verwendung genetisch modifizierter KC;Foxp3DTR Mäuse, die von Zhang et al. vorgestellt wurden, Klarheit verschaffen [81]. Auch die von Suttmüller et al. vorgestellte kombinierte in-vivo-Depletion von CD25+-T-Zellen zusammen mit einer CTLA-4-Blockade kann möglicherweise zu einer verbesserten Antitumorbehandlung in Kombination mit der LRAST Tumorthherapie führen [99]. Weitere Versuche, in denen die therapeutisch wirksamste zeitliche Abfolge und Frequenz der Applikation des anti-CD25 Antikörpers eruiert wird müssen folgen um Aufschluss über den besten Therapiealgorithmus in Kombination mit LRAST zu erhalten.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APC	'Allophycocyanin', Fluoreszenzfarbe
µl	Mikroliter
APC-Cy7	Tandemkonjugat aus APC und ' <i>cyanine dye</i> ' (Cy7), Fluoreszenzfarbe
BSA	' <i>Bovine Serum Albumin Fraction V</i> '
CD	' <i>Cluster of Differentiation</i> ', Oberflächenmerkmale verschiedener Zellen
CM	Complete Medium
CTLA-4	' <i>Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4</i> ', CD152
CRA	<i>Zytokin-Release Assay</i> (,cytokine release assay')
D	Depletion mit Anti-CD25 Antikörper PC61
D5	wgering immunogener Subklon der B16 Melanom-Tumorzelllinie
D5G6	transfizierter Klon des D5-Melanoms, der GM-CSF produziert
DC	Dendritische Zelle
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	' <i>Phosphate Buffered Saline</i> '
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	' <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> '
FACS	' <i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> ', Durchflusszytometrie
FBS	'Fetal Bovine Serum'
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
Foxp3	' <i>Forkhead box P3</i> ', Transkriptionsfaktor, typisch für regulatorische T-Zellen
FSC	'Forward Scatter'
gr.	Gramm
g	' <i>Gravity</i> ', Erdbeschleunigung

Abkürzungsverzeichnis

GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
HRP	' <i>Horseradish Peroxidase</i> ', Meerrettichperoxidase
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IFN γ	Interferon-gamma
L	Lymphodepletion mit Cyclophosphamid
LLC1	<i>Lewis Lung Carcinoma 1</i> , Lungenkarzinomzelllinie
LN	Lymphknoten
LRAST	Therapieschema (Lymphodepletion, Rekonstitution und aktiv-spezifische Tumorthherapie)
MCA 310	Methylcholanthren induzierte Sarkom-Zelllinie
mg	Milligramm
mGC8	Magenkarzinom-Zelllinie
MHC	' <i>Major Histocompatibility Complex</i> ', Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
μ l	Mikroliter
NEAA	' <i>Non Essential Amino Acids</i> ', nicht-essentielle Aminosäuren
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
PC61	Anti-CD25 Antikörper zur Depletion von regulatorischen T-Zellen
PE	Phycoerythrin'
PE-Cy7	Tandemkonjugat aus PE und <i>Cyanine (Cy7)</i>
Per-CP	Proteinkomplex aus dem Dinoflagellaten <i>Glenodinium</i> und Fluoreszenzfarbe
Per-CP-	
Cy5.5	Tandemkonjugat aus PerCP und ' <i>cyanine dye</i> ' und Fluoreszenzfarbe
pg	Pikogramm
R	Rekonstitution
RD	Rekonstitution mit Milzzellen aus mit PC61 behandelten Spendermäusen
RIsO	Rekonstitution mit Milzzellen aus mit Isotyp behandelten Spendermäusen
RPMI	' <i>Roswell Park Memorial Institute</i> ', Zellkulturmedium
s.c.	Subcutan

Abkürzungsverzeichnis

SSC	'Sideward Scatter'
Treg	Regulatorische T-Zelle
Tu	Tumor
TVDLN	Tumor-Vakzine drainierende(r) Lymphknoten

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Effekte von GM-CSF, adaptiert nach Kaufman et al [31]	12
Abbildung 2: LRAST Therapieschema [47].....	14
Abbildung 3: zeitlicher Ablauf der Injektionen und Organentnahme	25
Abbildung 4: Darstellung der Gating-Strategie Treg	27
Abbildung 5: a. Treg in der Milz ohne und b. mit vorheriger Lymphodepletion.....	34
Abbildung 6: CD45.1+ Zellen d1 nach Rekonstitution.....	35
Abbildung 7: CD45.1+ Zellen / PBMC in der Milz nach T-Zell- Rekonstitution.....	36
Abbildung 8: CD45+CD4+CD25+Foxp3+ T-Zellen nach doppelter Ak-Therapie	37
Abbildung 9: CD45+CD4+CD25+Foxp3+ T-Zellen nach dreifach Ak-Therapie.....	38
Abbildung 10: CD45+CD4+CD25+Foxp3- Zellen nach dreifach Ak-Therapie.....	39
Abbildung 11: Nachweis der Lymphodepletion	41
Abbildung 12: Langzeit-Tumorwachstum	42
Abbildung 13: Treg-Verlauf mit und ohne Tumor nach LRAST	43
Abbildung 14: CD4+ T-Zellen nach LRAST.....	44
Abbildung 15: CD3+ T-Zellen nach LRAST.....	45
Abbildung 16: CD 44+CD62L+ central memory T-Zellen nach LRAST.....	46
Abbildung 17: CD3-NK1.1+ NK-Zellen nach LRAST.....	47
Abbildung 18: CD11b+Ly6G-Ly6Chi monozytären MDSC nach LRAST	49
Abbildung 19: CD11b+Ly6G+Ly6C+ polymorphonukleäre MDSC nach LRAST	50
Abbildung 20: Strahlendosis und GM-CSF Sekretion von D5G6-Melanomzellen	51
Abbildung 21: Strahlendosis und GM-CSF Sekretion von D5G6-Melanomzellen im Verlauf.....	52
Abbildung 22: IFN γ -ELISA tumorspez. T-Zellen aus TVDLN	53
Abbildung 23: Zytokin release assay zur Evaluation der Treg-Depletion und IFN γ -Sekretion aus T-Zellen.	55
Abbildung 24: Evaluation des Depletionszeitpunktes mittels Zytokin release assay und tumorspezifischer IFN-Sekretion.....	57
Abbildung 25: Tumorwachstum nach LRAST und PC61 bzw. Isotyp-Antikörper-Gabe.....	58
Abbildung 26: Überleben nach LRAST und Treg Depletion.....	59
Abbildung 27: Tumorwachstum Depletion vs. Isotyp	60
Abbildung 28: Überleben nach Depletion des Rekonstitutionsprodukts.....	61

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte	17
Tabelle 2: Kulturmedien und Puffer	19
Tabelle 3: Zelllinien.....	22
Tabelle 4: Versuchstiere	23
Tabelle 5: In-vivo Antikörper	24
Tabelle 6: Antikörper für die Durchflusszytometrie.....	28
Tabelle 7: Zellzahlen und Medium-Volumina für CRA	31
Tabelle 8: T-Zellen von CD45.2 Mäusen am Tag 3, Tag 10 und Tag 23 nach Lymphodepletion	45
Tabelle 9: prozentualer Anteil der Granzym B+ NK-Zellen bezogen auf CD45.2+ Zellen am Tag 3, Tag 10 und Tag 23 nach Lymphodepletion	48
Tabelle 10: Versuchsaufbau zur Bestimmung des Effektes von einmaliger bzw. doppelter CD25-Depletion auf die IFN-Sekretion von tumorspezifischen T-Zellen aus TVDLN, n=2	54
Tabelle 11: Versuchsaufbau zur Evaluation des Zeitpunktes der Depletion mittels CRA, n=1	56

10 Literaturverzeichnis

1. van den Engel, N.K., et al., *Combination immunotherapy and active-specific tumor cell vaccination augments anti-cancer immunity in a mouse model of gastric cancer*. J Transl Med, 2011. **9**: p. 140.
2. Robert-Koch-Institut. Available from: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Melanom/melanom_node.html.
3. Armstrong, B.K. and A. Kricger, *The epidemiology of UV induced skin cancer*. J Photochem Photobiol B, 2001. **63**(1-3): p. 8-18.
4. Olsen, C.M., H.J. Carroll, and D.C. Whiteman, *Estimating the attributable fraction for cancer: A meta-analysis of nevi and melanoma*. Cancer Prev Res (Phila), 2010. **3**(2): p. 233-45.
5. Sznol, M., et al., *Review of interleukin-2 alone and interleukin-2/LAK clinical trials in metastatic malignant melanoma*. Cancer Treat Rev, 1989. **16 Suppl A**: p. 29-38.
6. Eklund, J.W. and T.M. Kuzel, *A review of recent findings involving interleukin-2-based cancer therapy*. Curr Opin Oncol, 2004. **16**(6): p. 542-6.
7. Martin, M.D. and V.P. Badovinac, *Defining Memory CD8 T Cell*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 2692.
8. Weninger, W., et al., *Migratory properties of naive, effector, and memory CD8(+) T cells*. J Exp Med, 2001. **194**(7): p. 953-66.
9. Masopust, D., et al., *Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue*. Science, 2001. **291**(5512): p. 2413-7.
10. Dutt, S., et al., *CD8+CD44(hi) but not CD4+CD44(hi) memory T cells mediate potent graft antilymphoma activity without GVHD*. Blood, 2011. **117**(11): p. 3230-9.
11. Gerberick, G.F., et al., *Selective modulation of T cell memory markers CD62L and CD44 on murine draining lymph node cells following allergen and irritant treatment*. Toxicol Appl Pharmacol, 1997. **146**(1): p. 1-10.
12. Nishikawa, H. and S. Sakaguchi, *Regulatory T cells in tumor immunity*. Int J Cancer, 2010. **127**(4): p. 759-67.
13. Strauss, L., C. Bergmann, and T.L. Whiteside, *Functional and phenotypic characteristics of CD4+CD25highFoxp3+ Treg clones obtained from peripheral blood of patients with cancer*. Int J Cancer, 2007. **121**(11): p. 2473-83.
14. Malek, T.R. and A.L. Bayer, *Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(9): p. 665-74.
15. Whiteside, T.L., *What are regulatory T cells (Treg) regulating in cancer and why?* Semin Cancer Biol, 2012. **22**(4): p. 327-34.
16. Curiel, T.J., et al., *Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival*. Nat Med, 2004. **10**(9): p. 942-9.
17. Saito, T., et al., *Two FOXP3(+)CD4(+) T cell subpopulations distinctly control the prognosis of colorectal cancers*. Nat Med, 2016. **22**(6): p. 679-84.
18. Edinger, M., et al., *CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation*. Nat Med, 2003. **9**(9): p. 1144-50.
19. Jones, S.C., G.F. Murphy, and R. Korngold, *Post-hematopoietic cell transplantation control of graft-versus-host disease by donor CD425 T cells to allow an effective graft-versus-leukemia response*. Biol Blood Marrow Transplant, 2003. **9**(4): p. 243-56.
20. Xiao, F., et al., *Ex vivo expanded human regulatory T cells delay islet allograft rejection via inhibiting islet-derived monocyte chemoattractant protein-1 production in CD34+ stem cells-reconstituted NOD-scid IL2rgammanull mice*. PLoS One, 2014. **9**(3): p. e90387.
21. Nadig, S.N., et al., *In vivo prevention of transplant arteriosclerosis by ex vivo-expanded human regulatory T cells*. Nat Med, 2010. **16**(7): p. 809-13.

22. Kusmartsev, S. and D.I. Gabrilovich, *Role of immature myeloid cells in mechanisms of immune evasion in cancer*. *Cancer Immunol Immunother*, 2006. **55**(3): p. 237-45.
23. Talmadge, J.E. and D.I. Gabrilovich, *History of myeloid-derived suppressor cells*. *Nat Rev Cancer*, 2013. **13**(10): p. 739-52.
24. Bronte, V., et al., *Apoptotic death of CD8+ T lymphocytes after immunization: induction of a suppressive population of Mac-1+/Gr-1+ cells*. *J Immunol*, 1998. **161**(10): p. 5313-20.
25. Pan, P.Y., et al., *Immune stimulatory receptor CD40 is required for T-cell suppression and T regulatory cell activation mediated by myeloid-derived suppressor cells in cancer*. *Cancer Res*, 2010. **70**(1): p. 99-108.
26. Youn, J.I., et al., *Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice*. *J Immunol*, 2008. **181**(8): p. 5791-802.
27. Movahedi, K., et al., *Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity*. *Blood*, 2008. **111**(8): p. 4233-44.
28. Stabile, H., et al., *Role of Distinct Natural Killer Cell Subsets in Anticancer Response*. *Front Immunol*, 2017. **8**: p. 293.
29. Freeman, B.E., et al., *Cytokine-Mediated Activation of NK Cells during Viral Infection*. *J Virol*, 2015. **89**(15): p. 7922-31.
30. Walzer, T., et al., *Identification, activation, and selective in vivo ablation of mouse NK cells via NKp46*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(9): p. 3384-9.
31. Kaufman, H.L., et al., *Current status of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the immunotherapy of melanoma*. *J Immunother Cancer*, 2014. **2**: p. 11.
32. Gasson, J.C., et al., *Purified human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: direct action on neutrophils*. *Science*, 1984. **226**(4680): p. 1339-42.
33. Jenner, E., *History of the Inoculation of the Cow-Pox: Further Observations on the Variolae Vaccinae, or Cow-Pox*. *Med Phys J*, 1799. **1**(4): p. 313-318.
34. Salgaller, M.L. and P.A. Lodge, *Use of cellular and cytokine adjuvants in the immunotherapy of cancer*. *J Surg Oncol*, 1998. **68**(2): p. 122-38.
35. Sieling, P.A., et al., *Toll-like receptor 2 ligands as adjuvants for human Th1 responses*. *J Immunol*, 2003. **170**(1): p. 194-200.
36. Dranoff, G., et al., *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*, 1993. **90**(8): p. 3539-43.
37. Mackall, C.L., et al., *Thymic-independent T cell regeneration occurs via antigen-driven expansion of peripheral T cells resulting in a repertoire that is limited in diversity and prone to skewing*. *J Immunol*, 1996. **156**(12): p. 4609-16.
38. Wang, L.X., et al., *CD122+CD8+ Treg suppress vaccine-induced antitumor immune responses in lymphodepleted mice*. *Eur J Immunol*, 2010. **40**(5): p. 1375-85.
39. Ruttinger, D., et al., *Adjuvant therapeutic vaccination in patients with non-small cell lung cancer made lymphopenic and reconstituted with autologous PBMC: first clinical experience and evidence of an immune response*. *J Transl Med*, 2007. **5**: p. 43.
40. Ma, J., et al., *Anti-tumor T cell response and protective immunity in mice that received sublethal irradiation and immune reconstitution*. *Eur J Immunol*, 2003. **33**(8): p. 2123-32.
41. Wang, L.X., et al., *Interleukin-7-dependent expansion and persistence of melanoma-specific T cells in lymphodepleted mice lead to tumor regression and editing*. *Cancer Res*, 2005. **65**(22): p. 10569-77.
42. Hu, H.M., et al., *Development of antitumor immune responses in reconstituted lymphopenic hosts*. *Cancer Res*, 2002. **62**(14): p. 3914-9.
43. Gattinoni, L., et al., *Removal of homeostatic cytokine sinks by lymphodepletion enhances the efficacy of adoptively transferred tumor-specific CD8+ T cells*. *J Exp Med*, 2005. **202**(7): p. 907-12.

44. Bracci, L., et al., *Cyclophosphamide enhances the antitumor efficacy of adoptively transferred immune cells through the induction of cytokine expression, B-cell and T-cell homeostatic proliferation, and specific tumor infiltration*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(2 Pt 1): p. 644-53.
45. Saida, Y., et al., *Critical Roles of Chemoresistant Effector and Regulatory T Cells in Antitumor Immunity after Lymphodepleting Chemotherapy*. J Immunol, 2015. **195**(2): p. 726-35.
46. Dummer, W., et al., *T cell homeostatic proliferation elicits effective antitumor autoimmunity*. J Clin Invest, 2002. **110**(2): p. 185-92.
47. Kovács, J., et al., *P53. Effect of lymphodepletion and tumour on host and reconstituted regulatory T-cells in a model of murine melanoma*. Journal for ImmunoTherapy of Cancer, 2014. **2**(2): p. P27.
48. Mougiakakos, D., et al., *Regulatory T cells in cancer*. Adv Cancer Res, 2010. **107**: p. 57-117.
49. Gershon, R.K. and K. Kondo, *Infectious immunological tolerance*. Immunology, 1971. **21**(6): p. 903-14.
50. Gershon, R.K. and K. Kondo, *Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes*. Immunology, 1970. **18**(5): p. 723-37.
51. Hori, S. and S. Sakaguchi, *Foxp3: a critical regulator of the development and function of regulatory T cells*. Microbes Infect, 2004. **6**(8): p. 745-51.
52. Allan, S.E., et al., *Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production*. Int Immunol, 2007. **19**(4): p. 345-54.
53. de la Rosa, M., et al., *Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function*. Eur J Immunol, 2004. **34**(9): p. 2480-8.
54. Grossman, W.J., et al., *Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death*. Immunity, 2004. **21**(4): p. 589-601.
55. Gondek, D.C., et al., *Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism*. J Immunol, 2005. **174**(4): p. 1783-6.
56. Fallarino, F., et al., *Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(12): p. 1206-12.
57. Mellor, A.L. and D.H. Munn, *IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(10): p. 762-74.
58. Sica, G.L., et al., *B7-H4, a molecule of the B7 family, negatively regulates T cell immunity*. Immunity, 2003. **18**(6): p. 849-61.
59. Prasad, D.V., et al., *B7S1, a novel B7 family member that negatively regulates T cell activation*. Immunity, 2003. **18**(6): p. 863-73.
60. Foss, F.M., *DAB(389)IL-2 (ONTAK): a novel fusion toxin therapy for lymphoma*. Clin Lymphoma, 2000. **1**(2): p. 110-6; discussion 117.
61. Rech, A.J. and R.H. Vonderheide, *Clinical use of anti-CD25 antibody daclizumab to enhance immune responses to tumor antigen vaccination by targeting regulatory T cells*. Ann N Y Acad Sci, 2009. **1174**: p. 99-106.
62. <https://www.ema.europa.eu/en/news/ema-review-zinbryta-confirms-medicines-risks-outweigh-its-benefits>.
63. Hu, H.M., W.J. Urban, and B.A. Fox, *Gene-modified tumor vaccine with therapeutic potential shifts tumor-specific T cell response from a type 2 to a type 1 cytokine profile*. J Immunol, 1998. **161**(6): p. 3033-41.
64. Arca, M.J., et al., *Therapeutic efficacy of T cells derived from lymph nodes draining a poorly immunogenic tumor transduced to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*. Cancer Gene Ther, 1996. **3**(1): p. 39-47.
65. Winter, H., et al., *Tumor regression after adoptive transfer of effector T cells is independent of perforin or Fas ligand (APO-1L/CD95L)*. J Immunol, 1999. **163**(8): p. 4462-72.
66. Bertram, J.S. and P. Janik, *Establishment of a cloned line of Lewis Lung Carcinoma cells adapted to cell culture*. Cancer Lett, 1980. **11**(1): p. 63-73.

67. Nockel, J., et al., *Characterization of gastric adenocarcinoma cell lines established from CEA424/SV40 T antigen-transgenic mice with or without a human CEA transgene*. BMC Cancer, 2006. **6**: p. 57.
68. Lowenthal, J.W., et al., *High and low affinity IL 2 receptors: analysis by IL 2 dissociation rate and reactivity with monoclonal anti-receptor antibody PC61*. J Immunol, 1985. **135**(6): p. 3988-94.
69. Ortega, G., et al., *The murine IL 2 receptor. I. Monoclonal antibodies that define distinct functional epitopes on activated T cells and react with activated B cells*. J Immunol, 1984. **133**(4): p. 1970-5.
70. Schuster, M., et al., *Generation of Foxp3(+)/CD25(-) Regulatory T-Cell Precursors Requires c-Rel and I kappa B(NS)*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 1583.
71. Berendt, M.J. and R.J. North, *T-cell-mediated suppression of anti-tumor immunity. An explanation for progressive growth of an immunogenic tumor*. J Exp Med, 1980. **151**(1): p. 69-80.
72. Koike, N., S. Pilon-Thomas, and J.J. Mule, *Nonmyeloablative chemotherapy followed by T-cell adoptive transfer and dendritic cell-based vaccination results in rejection of established melanoma*. J Immunother, 2008. **31**(4): p. 402-12.
73. Salem, M.L., et al., *Defining the ability of cyclophosphamide preconditioning to enhance the antigen-specific CD8+ T-cell response to peptide vaccination: creation of a beneficial host microenvironment involving type I IFNs and myeloid cells*. J Immunother, 2007. **30**(1): p. 40-53.
74. Motoyoshi, Y., et al., *Different mechanisms for anti-tumor effects of low- and high-dose cyclophosphamide*. Oncol Rep, 2006. **16**(1): p. 141-6.
75. Salem, M.L., et al., *Recovery from cyclophosphamide-induced lymphopenia results in expansion of immature dendritic cells which can mediate enhanced prime-boost vaccination antitumor responses in vivo when stimulated with the TLR3 agonist poly(I:C)*. J Immunol, 2009. **182**(4): p. 2030-40.
76. Delorme, E.J. and P. Alexander, *Treatment of Primary Fibrosarcoma in the Rat with Immune Lymphocytes*. Lancet, 1964. **2**(7351): p. 117-20.
77. Wrzesinski, C. and N.P. Restifo, *Less is more: lymphodepletion followed by hematopoietic stem cell transplant augments adoptive T-cell-based anti-tumor immunotherapy*. Curr Opin Immunol, 2005. **17**(2): p. 195-201.
78. Rosenberg, S.A., et al., *Cell transfer therapy for cancer: lessons from sequential treatments of a patient with metastatic melanoma*. J Immunother, 2003. **26**(5): p. 385-93.
79. Winter, H., et al., *Therapeutic T cells induce tumor-directed chemotaxis of innate immune cells through tumor-specific secretion of chemokines and stimulation of B16BL6 melanoma to secrete chemokines*. J Transl Med, 2007. **5**: p. 56.
80. Goldstein, M.J., et al., *Adoptive cell therapy for lymphoma with CD4 T cells depleted of CD137-expressing regulatory T cells*. Cancer Res, 2012. **72**(5): p. 1239-47.
81. Zhang, Y., et al., *Regulatory T-cell Depletion Alters the Tumor Microenvironment and Accelerates Pancreatic Carcinogenesis*. Cancer Discov, 2020. **10**(3): p. 422-439.
82. Rosenberg, S.A., P. Spiess, and R. Lafreniere, *A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes*. Science, 1986. **233**(4770): p. 1318-21.
83. Tanaka, T., et al., *Transfer of in vitro-expanded naive T cells after lymphodepletion enhances antitumor immunity through the induction of polyclonal antitumor effector T cells*. PLoS One, 2017. **12**(8): p. e0183976.
84. Janakiram, N.B., et al., *Adoptive transfer of regulatory T cells promotes intestinal tumorigenesis and is associated with decreased NK cells and IL-22 binding protein*. Mol Carcinog, 2015. **54**(10): p. 986-98.
85. Shimizu, J., S. Yamazaki, and S. Sakaguchi, *Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity*. J Immunol, 1999. **163**(10): p. 5211-8.

86. Onizuka, S., et al., *Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody*. *Cancer Res*, 1999. **59**(13): p. 3128-33.
87. Golgher, D., et al., *Depletion of CD25+ regulatory cells uncovers immune responses to shared murine tumor rejection antigens*. *Eur J Immunol*, 2002. **32**(11): p. 3267-75.
88. Tanaka, H., et al., *Depletion of CD4+ CD25+ regulatory cells augments the generation of specific immune T cells in tumor-draining lymph nodes*. *J Immunother*, 2002. **25**(3): p. 207-17.
89. Jones, E., et al., *Depletion of CD25+ regulatory cells results in suppression of melanoma growth and induction of autoreactivity in mice*. *Cancer Immun*, 2002. **2**: p. 1.
90. Yu, P., et al., *Intratumor depletion of CD4+ cells unmasks tumor immunogenicity leading to the rejection of late-stage tumors*. *J Exp Med*, 2005. **201**(5): p. 779-91.
91. Maes, W., et al., *Depletion of Regulatory T Cells in a Mouse Experimental Glioma Model through Anti-CD25 Treatment Results in the Infiltration of Non-Immunosuppressive Myeloid Cells in the Brain*. *Clin Dev Immunol*, 2013. **2013**: p. 952469.
92. Setiady, Y.Y., J.A. Coccia, and P.U. Park, *In vivo depletion of CD4+FOXP3+ Treg cells by the PC61 anti-CD25 monoclonal antibody is mediated by FcγRIII+ phagocytes*. *Eur J Immunol*, 2010. **40**(3): p. 780-6.
93. Zelenay, S. and J. Demengeot, *Comment on "Cutting edge: anti-CD25 monoclonal antibody injection results in the functional inactivation, not depletion, of CD4+CD25+ T regulatory cells"*. *J Immunol*, 2006. **177**(4): p. 2036-7; author reply 2037-8.
94. Stephens, L.A., D. Gray, and S.M. Anderton, *CD4+CD25+ regulatory T cells limit the risk of autoimmune disease arising from T cell receptor crossreactivity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(48): p. 17418-23.
95. Fontenot, J.D., et al., *Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3*. *Immunity*, 2005. **22**(3): p. 329-41.
96. Rosenberg, S.A., et al., *Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy*. *Clin Cancer Res*, 2011. **17**(13): p. 4550-7.
97. Rose, P., et al., *Anti-Gr-1 Antibody Provides Short-Term Depletion of MDSC in Lymphodepleted Mice with Active-Specific Melanoma Therapy*. *Vaccines (Basel)*, 2022. **10**(4).
98. Read, S., V. Malmstrom, and F. Powrie, *Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation*. *J Exp Med*, 2000. **192**(2): p. 295-302.
99. Suttmuller, R.P., et al., *Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25(+) regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses*. *J Exp Med*, 2001. **194**(6): p. 823-32.

11 Danksagungen

Das größte Dankeschön geht an Hauke Winter für die gute Betreuung und Motivation während der langen Versuchsphase und noch längeren Schreib-Phase. Danke auch für deine Geduld.

Vielen Dank auch an Natasja van den Engel für die Unterstützung bei der Planung der Arbeit sowie der Planung und Durchführung von Versuchen.

Auch Peter Rose, Mitstreiter im Labor, Danke für die Hilfe. Im Labor sind natürlich auch noch Micha Svihla, Nicki Strobl und Sev Gashi zu erwähnen, es war immer schön mit euch zusammen zu arbeiten.

Und nicht zuletzt Danke an meine Familie, die immer viel Geduld mit mir hat, mich ausnahmslos unterstützt und auf die ich immer zählen kann.

12 Affidavit



Eidesstattliche Versicherung

KOVÁCS, JULIA REGINA, geb. 04.07.1988

Name, Vorname

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

Einfluss von CD25+ regulatorischen T-Zellen auf die therapeutische Effektivität tumorspezifischer T-Zellen nach LRAST (Lymphodepletion, Rekonstitution und aktiv-spezifischer Tumortherapie) in einem murinen Melanom-Modell

.....

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, 21.11.2023

Julia Regina Kovács

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

13 Publikationsliste

03/2014: ITOC 1, Poster

Effect of lymphodepletion and tumour on host and reconstituted regulatory T-cells in a model of murine melanoma

Julia R. Kovács, Peter Rose, Louis Boon, Rudolf A. Hatz, Hauke Winter, Natasja K. van den Engel

2014: Munich Cancer Retreat DKTK, Abstract

Combining LRAST with anti-CD25 treatment improves anti-tumor response in murine melanoma

Julia R. Kovács, Peter Rose, Louis Boon, Rudolf A. Hatz, Hauke Winter, Natasja K. van den Engel

11/ 2014: SITC, Abstract und Poster

In vivo depletion of CD25+ cells prior to LRAST increases therapeutic efficacy in a murine melanoma model

Julia R. Kovács, Peter Rose, Louis Boon, Rudolf A. Hatz, Hauke Winter, Natasja K. van den Engel

03/2015: ITOC2 Poster

Combination of CTLA4-blockade, depletion of CD25+ cells and active-specific immunotherapy prolongs survival in murine melanoma

Kovács R. Julia, Rose Peter, Boon Louis, Hatz A. Rudolf, Winter Hauke, Van Den Engel K. Natasja

05/2015: DGCH Munich, Abstract

LRAST as a therapeutic treatment strategy requires more than just CD25 depletion

Natasja K. van den Engel, **Julia R. Kovács**, Peter Rose, Louis Boon, Rudolf A. Hatz, Hauke Winter

10/2017: Kongress der Deutschen Gesellschaft für Thoraxchirurgie, Vortrag

Verbesserung der therapeutischen Effektivität tumorspezifischer T-Zellen durch LRAST nach CD 25+-Depletion in einem murinen Melanom-Modell

Julia R. Kovács, **Forschungspreis der DGT 2017**

Vaccines 03/22, Research Article

Rose P, van den Engel NK, **Kovács JR**, Hatz RA, Boon L, Winter H.

Publikationsliste

Anti-Gr-1 Antibody Provides Short-Term Depletion of MDSC in Lymphodepleted Mice with Active-Specific Melanoma Therapy.

Vaccines (Basel). 2022 Apr 4;10(4):560. doi: 10.3390/vaccines10040560. PMID: 35455309; PMCID: PMC9032646.