

Aus der
Eigenständigen Forschungseinheit Translationale Molekulare Immunologie
Helmholtz-Zentrum München
Leitung: Prof. Dr. Ralph Mocikat

**UNTERSUCHUNG VON IFN- γ ⁺IL-10⁺ T-ZELLEN
IN EINEM MURINEN SPONTANTUMORMODELL**

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

vorgelegt von

Yanchun Ma

aus

Zhejiang

Jahr

2024

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Ralph Mocikat
Mitberichterstatter:	PD Dr. Andreas Moosmann PD Dr. Reinhard Obst Prof. Dr. Martin Dreyling
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	-
Dekan:	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung:	17.10.2024

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	3
2	EINLEITUNG	5
2.1	Das Immunsystem	5
2.1.1	Das angeborene Immunsystem	5
2.1.2	Das adaptive Immunsystem	6
2.1.2.1	T-Zellen	7
2.2	Tumorimmunologie	9
2.2.1	Das immunsuppressive Tumormikromilieu	9
2.2.2	Die Rolle von IL-10	11
2.3	Immuntherapien	12
2.4	Burkitt-Lymphom	13
2.5	Spontanes Lymphommodell	14
2.6	Aufgabenstellung	15
3	MATERIAL UND METHODEN	17
3.1	Material	17
3.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	17
3.1.2	Chemikalien und Reagenzien	18
3.1.3	Medien und Puffer	19
3.1.4	Kits	20
3.1.5	Antikörper	21
3.1.5.1	Antikörper für <i>In-vitro</i> - bzw. <i>In-vivo</i> -Versuche	21
3.1.5.2	Fluoreszenz-markierte Antikörper für durchflusszytometrische Analysen	21
3.1.6	Mäuse	22
3.1.7	Software	23
3.2	Methoden	24
3.2.1	Zelllinien und Zellkultur	24
3.2.2	Herstellung von Einzellzellsuspensionen aus Milz und Lymphknoten	24
3.2.3	Zellzahlbestimmung	24
3.2.4	Einfrieren und Auftauen von Zellen	25
3.2.5	Durchflusszytometrie	25
3.2.6	Zellseparation	26
3.2.6.1	EasySep™ Magnetseparation	26
3.2.6.2	BD FACSAria™ IIIu-Zellsortierung	27
3.2.7	Vakzinierung mit 291-Zellen	28

3.2.8	<i>In-vitro</i> -Versuche.....	29
3.2.8.1	T-Zell-Stimulation mit anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern.....	29
3.2.8.2	Markierung der Zellen mit Cell Proliferation Dye	30
3.2.8.3	<i>In-vitro</i> -Kokulturen.....	30
3.2.8.3.1	Kokultur von T-Effektorzellen mit Tumorzellen.....	30
3.2.8.3.2	Kokultur von IFN- γ^+ T-Zellen mit Tumorzellen	31
3.2.8.3.3	IL-10-Neutralisation <i>in vivo</i>	33
3.2.9	Statistik.....	33
4	ERGEBNISSE	34
4.1	Charakterisierung der intratumoralen IFN- γ^+ IL-10 $^+$ T-Effektorzellen.....	34
4.1.1	Quantitative Analyse der IFN- γ^+ IL-10 $^+$ T-Effektorzellen	34
4.1.2	Phänotypisierung der IFN- γ^+ IL-10 $^+$ T-Effektorzellen.....	35
4.2	Untersuchungen zum Mechanismus der Tr1-Induktion	37
4.2.1	Etablierung eines Systems zur Tr1-Induktion.....	37
4.2.1.1	Effekte nach Zugabe eines IL-10-neutralisierenden Antikörpers.....	38
4.2.2	Analyse der Konversion von Th1- zu Tr1-Zellen	39
4.3	Einfluss von anti-IL-10 auf die PD-1-Expression	42
4.4	Effekte einer anti-IL-10-Behandlung <i>in vivo</i>	43
5	DISKUSSION	46
5.1	Charakterisierung von IFN- γ /IL-10-koproduzierenden T-Zellen	46
5.2	Konversion von Th1- zu Tr1-Zellen im immunsuppressiven Tumormilieu.....	48
5.3	Möglicher Einsatz von anti-IL-10-Antikörpern in der Lymphomtherapie	49
5.4	Ausblick	51
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	52
7	LITERATURVERZEICHNIS	53
8	VERÖFFENTLICHUNGEN	63
8.1	Fachpublikation.....	63
8.2	Posterpräsentation.....	63
9	ANHANG	64

1 ZUSAMMENFASSUNG

Maligne Neoplasien gehören zu den häufigsten Todesursachen. Obwohl bereits viele Tumorthapeutika im Einsatz sind, bestehen aufgrund von therapierefraktären Tumorerkrankungen und Rezidiven weiterhin Bestrebungen nach Optimierung der Tumorthherapie. In den letzten Jahren gewann die Immuntherapie, bei der das Immunsystem bei der Bekämpfung von malignen Zellen tätig werden soll, zunehmend an Bedeutung. Für die Entwicklung von neuen Therapieansätzen in der Immuntherapie ist es zunächst wichtig, die Immunevasionsmechanismen aufzuklären, die von Tumorzellen angewendet werden, um einer Antitumor-Immunantwort zu entkommen. Das geschieht entweder durch transplantierbare oder Spontantumormodelle. Bei transplantierbaren Tumormodellen werden Tumorzellen in die Mäuse injiziert. Die hierbei ausgelöste Immunantwort entspricht eher der einer (Virus-) Infektion und gibt keinen realistischen Ablauf einer Antitumor-Immunantwort wieder. Um ein besseres Abbild einer „realen“ Tumorentstehung sowie der Interaktion von Immunsystem mit malignen Zellen zu erhalten, wurde in dieser Arbeit auf ein transgenes Spontantumormodell zurückgegriffen. Die Versuchsmäuse tragen das humane Protoonkogen MYC in sich, das unter Kontrolle eines B-Zell-spezifischen Igλ-Enhancers steht. Das führt zu einer unkontrollierten Expansion von B-Zellen und folglich zur Entstehung von B-Zell-Lymphomen in den Mäusen, die Ähnlichkeiten mit dem Burkitt-Lymphom aufweisen. Anhand dieses Spontantumormodells konnte bereits gezeigt werden, dass NK-Zellen im Laufe der Tumorprogression als Ausdruck der Erschöpfung nur eine geringe Menge IFN-γ sezernierten. Somit fehlte das IFN-γ, das unter anderem für die Aktivierung von DCs benötigt wird. Die DCs zeigten sich in ihrer Effektorfunktion eingeschränkt und die IL-12-Produktion war beeinträchtigt. Aufgrund der beeinträchtigten NK-Zellen und DCs, die für eine Th1-Polarisierung notwendig sind, wurde vermutet, dass eine Differenzierung von Th1-Zellen ausbleibt. Paradoxerweise wurde in den T-Zellen tumortragender λ-MYC-Mäusen eine erhöhte Expression von IFN-γ detektiert. Die T-Zellen waren trotzdem in ihrer Effektorfunktion eingeschränkt und befanden sich in einem Erschöpfungszustand. Dieser spiegelte sich auch in einer erhöhten Expression von PD-1 wider. Zudem kam es in den Tumormäusen zu einer Hochregulation von IL-10 in den T-Zellen. In den IL-10⁺ T-Zellen wurde die höchste Expression von PD-1 gesehen. Zudem wurde in λ-MYC Mäusen interessanterweise eine signifikant erhöhte Fraktion IFN-γ/IL-10-koproduzierender T-Zellen detektiert. Eine phänotypische Charakterisierung dieser T-Zellsubpopulation ergab eine erhöhte Expression der Transkriptionsfaktoren T-bet, Eomesodermin und Blimp-1. Die erhöhte T-bet- und Blimp-1-Expression in der IFN-γ⁺/IL-10⁺ T-Zell-Subpopulation deuteten auf Ähnlichkeiten dieser T-Zellgruppe mit den Th1-Zellen hin, da diese Transkriptionsfaktoren wichtig für die Produktion der Zytokine in Th1-Zellen sind. Dass es sich

in dieser T-Zellpopulation um T regulatory type 1 cells (Tr1-Zellen) handeln könnte, legte neben der IFN- γ /IL-10-Koproduktion auch die erhöhte Expression von Eomesodermin, eines Tr1-definierenden Transkriptionsfaktors, nahe. Es wurde daher vermutet, dass im Tumormilieu infolge einer zusätzlichen Hochregulierung von IL-10 aus Th1-Zellen Tr1-Zellen entstehen könnten. Dieser Konversionsvorgang wurde durch eine Kokultur von IFN- γ -produzierenden CD4⁺ Th1-Zellen *in vitro* mit Tumorzellen belegt. Nachdem CD4⁺IFN- γ ⁺ Th1-Zellen einem Tumormikromilieu ausgesetzt waren, begann ein Teil dieser Zellen sowohl IFN- γ als auch IL-10 zu exprimieren. Da in vorangegangenen Arbeiten in Seren und Zellüberständen kranker λ -MYC-Mäuse erhöhte Konzentrationen von IL-10 detektiert wurden, wurde eine IL-10-Neutralisation durchgeführt. *In vitro* führte dies zu einem Rückgang der Tr1-Zellen und der PD-1-Expression. Dieser Effekt konnte auch *in vivo* durch eine anti-IL-10-Therapie reproduziert werden.

In der vorliegenden Arbeit konnten IFN- γ /IL-10-koproduzierende T-Zellen als Tr1-Zellen näher charakterisiert werden. Auch wenn die Rolle von IL-10 im Hinblick auf Tumor-Immunregulation kontrovers diskutiert wird, konnte hier nachgewiesen werden, dass unter Einfluss von IL-10 im Tumormilieu die Konversion von Th1-Zellen zu immunsuppressiven Tr1-Zellen begünstigt und eine PD-1-Hochregulation veranlasst wird. Somit wurde gezeigt, dass IL-10 in B-Zell-Lymphomen eine tumorfördernde Funktion ausübt. IL-10 und Tr1-Zellen könnten daher als mögliche vielversprechende Angriffspunkte für die Immuntherapie dienen.

2 EINLEITUNG

2.1 Das Immunsystem

Für jedes Lebewesen ist ein funktionierendes Immunsystem unabdinglich, um sich selbst vor pathogenen Agenzien zu schützen. Die Relevanz des Immunsystems kommt meist erst bei einer Dysfunktion zum Vorschein, die sich in Form von schwerwiegenden Infektionen, Allergien sowie Autoimmun- und Tumorerkrankungen bemerkbar macht. Das Immunsystem wird hinsichtlich der Spezifität und Geschwindigkeit der Immunantwort in ein angeborenes und adaptives unterteilt. Damit Pathogene effektiv abgewehrt werden können, ist ein enges Zusammenspiel beider Systeme notwendig. (Parkin & Cohen, 2001)

2.1.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem ist evolutionsgeschichtlich der ältere Bestandteil, der beim Eindringen eines Pathogens unspezifisch und schnell agiert. Da das adaptive Immunsystem zeitverzögert reagiert, ist ein funktionierendes angeborenes Immunsystem umso wichtiger, als es diese Zeit überbrücken muss und den Erreger im Zaum hält, bis die adaptive Immunantwort vollständig einsetzt. Das angeborene System besteht aus zellulären Komponenten wie Makrophagen, Monozyten, Granulozyten, natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und dendritischen Zellen (DCs) sowie einem humoralen Teil wie dem Komplementsystem. Ferner werden auch anatomische und physikalische Barrieren wie Haut, Temperatur und pH-Wert als Teil des angeborenen Immunsystems gesehen. Werden diese Barrieren von einem körperfremden Eindringling als erste Hürde überwunden, werden neben dem Komplementsystem auch Makrophagen aktiv. Nach Phagozytose des extrazellulären Erregers durch die Makrophagen werden diese aktiviert. Sie sezernieren molekulare Botenstoffe (Zytokine) und lösen eine Entzündungsreaktion aus. Dies führt zu einer Rekrutierung weiterer Immunzellen, unter anderem Granulozyten und DCs, zur Unterstützung der Eliminierung der Erreger. Dabei ist es wichtig, zwischen Selbst und Fremd unterscheiden zu können. Dies geschieht durch das Erkennen von Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (PAMPs). Dabei handelt es sich um häufig vorkommende, konservierte und für Pathogene typische Strukturen, die von den Mustererkennungsrezeptoren, den Pattern Recognition Receptors (PRR), gebunden werden, die sich an der Oberfläche von Immunzellen wie Makrophagen oder DCs befinden. Bekannte Vertreter solcher PRR sind die Toll-like-Rezeptoren (TLR), die unter anderem Lipopolysaccharide an der

Oberfläche gramnegativer Bakterien und pathogene RNA und DNA erkennen. (Chaplin, 2010; Marshall et al., 2018; Nicholson, 2016; Parkin & Cohen, 2001)

Zur Unterscheidung von Fremd und Selbst tragen auch die MHC (Major Histocompatibility Complex)-Moleküle bei. Beim Menschen sind sie auch bekannt als Humane Leukozytenantigene (HLA). MHC sind auf körpereigenen Zellen vorhanden und führen zu einer Inhibierung der NK-Zellen. In virusinfizierten und entarteten Zellen kommt es oftmals zu einer Herunterregulation der MHC-Moleküle, was zur Folge hat, dass diese Zellen von NK-Zellen attackiert und durch Ausschüttung von Granzymen und Perforinen lysiert werden. Zudem sind NK-Zellen in der Lage, große Mengen an IFN- γ auszuschütten, was eine Aktivierung von Makrophagen und eine Förderung der Differenzierung von Th1-Zellen (Typ1-T-Helferzellen) zur Folge hat. (Jorgovanovic et al., 2020; Nicholson, 2016; Parkin & Cohen, 2001; Qin & Blankenstein, 2000)

2.1.2 Das adaptive Immunsystem

Das adaptive Immunsystem zeichnet sich durch seine hochspezifische Immunantwort und die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses aus. Die adaptive Immunantwort wird von B- und T-Lymphozyten vermittelt, die mit ihren Rezeptoren ein spezifisches Antigen erkennen und dadurch eine gezielte Immunreaktion gegen den Erreger hervorrufen können. Da die Rezeptoren antigenspezifisch sind, ist für einen ausreichenden Schutz eine Vielzahl von verschiedenen Rezeptoren notwendig. Diese Vielfalt von Rezeptoren ist nur durch die somatische Rekombination möglich. Die entstandenen Rezeptoren obliegen einer strengen Qualitätskontrolle, damit keine autoreaktiven Rezeptoren in der Peripherie gesunde körpereigene Zellen angreifen. (Vollmar et al., 2013; Murphy & Weaver 2017)

Während B-Zellen mit ihrem spezifischen B-Zell-Rezeptor (BCR) Antigene direkt erkennen und sich zu Antikörper-bildenden Plasmazellen differenzieren, unterliegen T-Zellen einer MHC-Restriktion. Dementsprechend können T-Zellen Antigene nur erkennen, wenn letztere als Peptidfragmente aufbereitet und gebunden an MHC-Molekülen an der Zelloberfläche präsentiert werden. Die Antigenfragmente intrazellulärer Pathogene werden über MHC-I präsentiert. Zytotoxische T-Zellen (CTL) erkennen die körperfremden Peptide, und die Zelle, die diese exprimiert, wird abgetötet. Um eine Tötung zu umgehen, kommt es in virusinfizierten und entarteten Zellen oftmals zu einer Herunterregulation von MHC-I-Molekülen. Allerdings macht sich die Zelle durch den Verlust der MHC-I selbst zur Zielzelle der NK-Zellen (s. Abschnitt 2.1.1).

MHC-II befindet sich auf Antigen-präsentierenden Zellen (APCs), zu denen Makrophagen, Monozyten, DCs und B-Zellen zählen. Erreger werden von APCs phagozytiert und ihre Antigenfragmente über MHC-II den T-Zellen präsentiert. Dieser MHC-Peptid-Komplex kann anschließend von einem T-Zell-Rezeptor (TCR) gebunden werden. Für eine adäquate T-Zell-Aktivierung ist eine alleinige Bindung des TCR am MHC-Molekül jedoch nicht ausreichend, da sie noch eine Stimulation durch Ko-Rezeptoren benötigt. Eine Kostimulation wird beispielsweise durch die Bindung von CD80/CD86 bzw. CD40 auf APCs an CD28 bzw. CD40L auf der T-Zelle gewährleistet. Ohne entsprechende Kostimulation kommt es zur Anergie oder Apoptose der T-Zelle. (Delves & Roitt, 2000; Yatim & Lakkis, 2015)

Nach Aktivierung kommt es zu einer klonalen Expansion der B- und T-Zellen, die mehrere Tage in Anspruch nimmt. Im Rahmen dieser Immunantwort kommt es zur Entstehung von antigenspezifischen Effektorzellen. Neben T-Zellen und B-Zellen, die an der Immunabwehr beteiligt sind und nach der erfolgreichen Bekämpfung des Erregers wieder absterben, werden auch Gedächtniszellen gebildet, die lange Zeit im Organismus verbleiben. Bei erneutem Eindringen des gleichen Pathogens und beim Wiedererkennen des gleichen spezifischen Antigens kommt es zu einer stärkeren Immunantwort mit einer schnelleren Proliferation der Immunzellen. (Nicholson, 2016; Yatim & Lakkis, 2015)

2.1.2.1 T-Zellen

Nach ihrer Reifung im Thymus zirkulieren naive T-Zellen zwischen Blut und sekundären Lymphorganen. Wird ein passendes Antigen gefunden und die naive T-Zelle aktiviert, wird sie zur T-Effektorzelle (Teff) und kann eine Immunantwort ausüben.

Teff können in zwei Hauptklassen unterteilt werden: CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen. CD8⁺ T-Zellen differenzieren sich zu CTL, die die Zielzelle direkt angreifen und sie durch Ausschüttung von Perforinen und Granzymen lysieren. CD4⁺ T-Zellen können im Gegensatz zu CTL Zielzellen nicht direkt attackieren, sondern durch Ausschüttung charakteristischer Zytokine Funktionen anderer Immunzellen beeinflussen, etwa die der B-Zellen, DCs oder Makrophagen. Abhängig vom umgebenden Zytokinmilieu wird entschieden, ob aus ruhenden CD4⁺ Th0-Zellen im Rahmen einer Antigen-Stimulation Th1-, Th2- oder Th17-Zellen entstehen. Die unterschiedlichen Th-Zelltypen unterscheiden sich in ihrem Zytokinprofil und Aufgabenbereich. (Murphy & Weaver 2017; Vollmar et al., 2013)

Durch den Einfluss der Zytokine IL-12 und IFN- γ wird die Differenzierung aus Th0-Zellen in Richtung Th1-Zellen gelenkt, die an der Abwehr von intrazellulären Pathogenen beteiligt sind. Charakteristisch für Th1-Zellen ist die Freisetzung der für sie typischen Zytokine wie IL-2, IFN- γ und TNF- α (Tumornekrosefaktor). IL-2 regt die Proliferation der T-Zellen an, die hohe Mengen an IFN- γ produzieren. IFN- γ aktiviert Makrophagen, die wiederum IL-12 sezernieren und so über eine positive Rückkopplung für eine Differenzierung weiterer Th1-Zellen und Hemmung der Entstehung von Th2-Zellen sorgen. (Jorgovanovic et al., 2020; Murphy & Weaver 2017; Vollmar et al. 2013)

IFN- γ wird eine Antitumorwirkung zugeschrieben. Zum einen hat es zusammen mit TNF- α durch seine zytotoxische Wirkung direkten Einfluss auf einige Tumorzellen (Fransen et al., 1986; Williamson et al., 1983). Zum anderen führt IFN- γ zu einer Hochregulation der MHC-Expression und dadurch zu einer verbesserten Erkennung sowie Zerstörung von Tumorzellen (Dighe et al., 1994). Zudem übt IFN- γ gemeinsam mit IL-12 einen antiangiogenen Effekt aus und hemmt somit das Tumorwachstum (Coughlin et al., 1998; Jorgovanovic et al., 2020).

Befindet sich im Zytokinmilieu eine hohe Konzentration an IL-4, wird die Polarisierung von Th2-Zellen begünstigt und die der Th1-Zellen unterdrückt. Th2-Zellen sind gekennzeichnet durch ihr Zytokinprofil IL-4, IL-5 und IL-13, die B-Zellen stark zur Differenzierung, Proliferation und zum Antikörperklassenwechsel anregen können. Diese ausgelöste humorale Immunantwort ist wichtig bei der Bekämpfung von extrazellulären Pathogenen. (Abbas et al., 1996; Bluestone, 1995; Murphy & Weaver, 2017; O'Garra, 1998; Vollmar et al., 2013)

Eine weitere Untergruppe der CD4⁺ Lymphozyten sind die regulatorischen T-Zellen (Treg), die Immunantworten unterdrücken, um physiologisch eine Gewebshomöostase sowie Selbsttoleranz zu gewährleisten und die Entstehung von Autoimmunität zu verhindern (Bettini & Vignali, 2009; Sakaguchi et al., 1995; Sakaguchi, 2004; Shevach, 2009). Tregs sind definiert als CD4⁺CD25⁺ Zellen, die den Transkriptionsfaktor Foxp3 (forkhead box protein) exprimieren, welcher essenziell für die Entwicklung und Funktion der Tregs ist (Fontenot et al., 2003; Hori et al., 2003). Durch Ausschüttung inhibitorischer Zytokine wie IL-10 und TGF- β (Transforming Growth Factor) entfalten Tregs nicht nur ihre immunsuppressive Wirkung, sondern können dadurch auch weitere Tregs induzieren (Chen et al., 2003; Liu et al., 2008; Seo et al., 2001; Zou, 2006).

Neben Foxp3⁺ Tregs ist noch eine andere Gruppe von CD4⁺ Zellen bekannt, die ebenfalls immunsuppressive Eigenschaften aufweisen – Tr1-Zellen (T regulatory type 1 cells). Diese Zellpopulation zeichnet sich durch ihr einzigartiges Zytokinmuster IL-10⁺TGF- β ⁺IFN- γ ⁺IL-2⁻IL-4⁻ und das Fehlen des Transkriptionsfaktors Foxp3 aus (Groux et al., 1997). Diese relativ neu entdeckte Zellpopulation wurde erstmals im Blut von Patienten detektiert, die keine Abstoßungsreaktion nach

einer Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen bei fehlender Übereinstimmung von HLA-Molekülen (HLA-Mismatch) zeigten (Roncarolo et al., 1988). Mittlerweile konnte nachgewiesen werden, dass Tr1-Zellen für eine langfristige Toleranz nach Transplantationen verantwortlich sind und Entzündungen bei Autoimmunerkrankungen eindämmen können (Bacchetta et al., 1994; Gagliani et al., 2013; Pot et al., 2011; Zhang et al., 2017). Allerdings ist über die Herkunft, die molekularen Mechanismen und den Stellenwert dieser Zelllinie noch immer sehr wenig bekannt.

2.2 Tumorimmunologie

Bereits im Jahr 1909 war Paul Ehrlich der Überzeugung, dass das Immunsystem im Stande sei, Tumorzellen zu identifizieren und zu eliminieren (Ehrlich, 1909). 50 Jahre später stellten Burnet und Thomas die Hypothese einer Tumorimmunüberwachung auf, die in der damaligen Zeit experimentell nicht belegt werden konnte (Burnet, 1970, 1971; Dunn et al., 2002). Dunn und Kollegen griffen später den Begriff der Tumorimmunüberwachung erneut auf und erweiterten ihn um das Konzept des „Immun-Editing“. Demzufolge kann die antitumorale Immunantwort in 3 unterschiedliche Phasen eingeteilt werden: Die Eliminierungsphase (Phase 1) beschreibt die Immunüberwachung durch das angeborene und adaptive Immunsystem. Wird ein Tumor in dieser Phase nicht erfolgreich beseitigt, geht es in die Gleichgewichtsphase (Phase 2) über. Hier werden Tumorzellen weiterhin eliminiert, jedoch entstehen durch den dauerhaften Selektionsdruck mutierte Zellen mit herabgesetzter Immunogenität, die einer effektiven antitumoralen Immunantwort entfliehen können. Die neu entstandenen mutierten Zellen können anschließend in der Evasionsphase (Phase 3) unkontrolliert proliferieren und sich als Tumorerkrankung klinisch manifestieren (Dunn et al., 2002, 2004).

2.2.1 Das immunsuppressive Tumormikromilieu

Damit entartete Tumorzellen nicht vom Immunsystem beseitigt werden, entwickeln sie eine Reihe an Evasionsmechanismen, mit denen sie einer effektiven antitumoralen Immunantwort entkommen können. Dabei spielen inhibitorische Signalwege eine wichtige Rolle. Physiologisch sind letztere für die Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz und Verhinderung einer Autoimmunität unabdinglich. Gleichzeitig sind es jene Mechanismen, die sich Tumorzellen zu Nutze machen, um einer Antitumorantwort zu entkommen.

Durch eine Herunterregulation von Tumor-assoziierten Antigenen (TAA) und MHC-I-Molekülen können entartete Tumorzellen von Immunzellen nicht erkannt werden (Dhatchinamoorthy et al., 2021; Schreiber et al., 2011). Eine erhöhte Konzentration an inhibierenden Zytokinen wie IL-10 und TGF- β , die von Tumorzellen sezerniert werden, fördern nicht nur das Tumorwachstum und die Angiogenese, sondern begünstigen auch die Entstehung und Invasion von Tregs (Landskron et al., 2014; Mills et al., 2016; Yamagiwa et al., 2001).

Tregs sind bekannt für ihre immunregulatorische Funktion. Auf ihnen ist eine erhöhte Expression von inhibitorischen Rezeptoren zu finden, die wesentliche immunsuppressive Funktionen übernehmen. Ein wichtiger Vertreter davon ist das CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Protein 4), das nicht nur auf den Tregs vorhanden, sondern generell vermehrt an der Oberfläche von aktivierten T-Zellen zu finden ist. CTLA-4 bindet mit einer hohen Affinität an CD80/CD86 und konkurriert somit mit der CD28-abhängigen Aktivierung der T-Zellen. Kommt es zu einer Bindung von CTLA-4, führt es zu einer ausbleibenden Kostimulation der T-Zellen. Außerdem sorgt CTLA-4 für eine Transendozytose von CD80/CD86 auf APCs und beseitigt diese von der Zelloberfläche. (Pardoll, 2012; Qureshi et al., 2011).

Weiters geraten intratumorale T-Zellen durch die permanente Antigenstimulation in einen erschöpften Zustand, der mit dem Verlust von Effektorfunktionen und der Proliferationsfähigkeit einhergeht. Hierbei kommt es zu einer erhöhten Expression von PD-1 (Programmed Cell Death Protein 1), einem Immunkontrollpunkt-Molekül. Dieser inhibitorische Rezeptor wird auch als gegenregulatorische Maßnahme im Rahmen der T-Zell-Aktivierung zur Eindämmung der Immunreaktion hochreguliert. Somit sind die hohe und permanente Expression von PD-1 und die (Ko-)Expression von anderen Erschöpfungsmarkern wie CTLA-4, LAG3, TIM-3 ein charakteristisches Merkmal von dysfunktionalen T-Zellen im Erschöpfungszustand. Anders als z.B. CTLA-4 befindet sich PD-1 nicht nur auf T-Zellen, sondern auch auf B- und NK-Zellen. Kommt es zu einer Interaktion von PD-1 mit dem passenden Liganden PD-L1 oder PD-L2, die auf APCs oder Tumorzellen exprimiert sind, werden die T-Zellaktivierung und Effektorfunktionen negativ beeinflusst (Barber et al., 2006; LaFleur et al., 2018; Schildberg et al., 2016).

2.2.2 Die Rolle von IL-10

IL-10 ist eines der wichtigsten antiinflammatorisch wirkenden Zytokine, das für eine Selbsttoleranz und Gewebshomöostase im Organismus sorgt. Im Gastrointestinaltrakt ist es ein wichtiger Immunregulator, denn eine abnormale, defiziente Funktion von IL-10 ist mit der Entstehung von Colitis assoziiert. (Ellinghaus et al., 2016; Engelhardt & Grimbacher, 2014; Glocker et al., 2011; Kühn et al., 1993; Moran et al., 2013)

Eine Reihe von Immunzellen ist im Stande, IL-10 zu sezernieren, dazu gehören unter anderem T-Zellen, DCs, B-Zellen, NK-Zellen und Makrophagen (Ouyang & O'Garra, 2019; Saraiva & O'Garra, 2010). IL-10 führt zu einer Hemmung der Zytokinausschüttung aus Makrophagen sowie DCs und zu einer verringerten Freisetzung von IFN- γ aus Th1-Zellen. Weiters kommt es durch den Einfluss von IL-10 zu einer Herunterregulation von MHC-II-Molekülen und damit zu einer eingeschränkten Antigenpräsentation. Folglich wird eine effiziente T-Zell-Immunantwort verhindert. (de Waal Malefyt et al., 1991; Fiorentino et al., 1991; Macatonia et al., 1993; Saraiva et al., 2020)

Zudem fördert IL-10 die Entstehung von Tregs und zählt zu einem der wichtigsten Zytokine, die von Tregs sezerniert werden (Chaudhry et al., 2011). Im Tumormikromilieu kann IL-10 teilweise auch aus den Tumorzellen stammen, die die immunsuppressive Wirkung des Zytokins für eine Immunevasion ausnutzen (Brenner, 2009; Dunn et al., 2004; Itakura et al., 2011; Naujoks et al., 2014; Riedel, 2013; Sawant et al., 2019). Es ist daher nachvollziehbar, dass in Krebspatienten IL-10-Expression mit einer schlechten Prognose einhergeht (Nemunaitis et al., 2001).

Gleichzeitig wird dem IL-10 auch eine tumorprotektive Wirkung zugeschrieben: Es führt in manchen Tumoren zu einer verstärkten T-Zellantwort, fördert eine vermehrte Ausschüttung von Granzymen und IFN- γ sowie eine Aktivierung und Expansion von intratumoralen CD8-Zellen (Emmerich et al., 2012; Groux et al., 1998; Naing et al., 2018). Zudem wird beschrieben, dass eine Überexpression von IL-10 einen Schutz vor Entstehung von Tumoren bietet (Berman et al., 1996; Groux et al., 1999).

Somit nimmt IL-10 im Immunsystem eine duale Rolle ein. Ob dieses pleiotrope Zytokin letztlich eine immunsuppressive oder tumorprotektive Funktion einnimmt, scheint abhängig von der Tumorentität zu sein. (Mocellin et al., 2003; Saraiva et al., 2020)

2.3 Immuntherapien

Im Jahr 2018 wurden in Deutschland ca. 489.000 Krebserkrankungen neu diagnostiziert. Bei steigender Lebenserwartung wird in den nächsten Jahren eine steigende Inzidenz erwartet. Mit knapp 230.000 deutschlandweit verzeichneten Todesfällen, die auf eine Tumorerkrankung zurückzuführen waren, gehören bösartige Neoplasien zu einer der häufigsten Todesursachen. (Erdmann et al., 2021; Statistisches Bundesamt (Destatis), 2022)

Je nach Tumorentität und Tumorstadium gehören die operative Entfernung sowie die Strahlen- und Chemotherapie bereits zu etablierten Therapien in der Klinik. Dennoch stoßen die therapeutischen Möglichkeiten immer wieder an ihre Grenzen. Dies hebt die Notwendigkeit hervor, die Tumorthherapie weiter zu optimieren und neuartige Therapien zu entwickeln. In den letzten Jahren bekam die Immuntherapie immer mehr Aufmerksamkeit und gilt als Hoffnungsträger der zukünftigen Tumorthherapie. Tumorzellen werden im Körper zwar von Immunzellen erkannt, jedoch besitzen entartete Zellen Mechanismen, einer effektiven Antitumor-Immunantwort zu entkommen. In der Tumorummunologie wird versucht, diese Mechanismen zu identifizieren. Erst nach Entschlüsseln der Immunevasionsstrategien können neue Immuntherapieansätze entwickelt werden, die das Immunsystem reaktivieren bzw. es bei der Bekämpfung von Tumorzellen unterstützen. Es sind bereits einige Immuntherapeutika auf dem Markt, die ein Bestandteil der leitliniengerechten Therapie sind oder zumindest im Rahmen von klinischen Studien verabreicht werden. Dabei wird von verschiedenen Bestandteilen des Immunsystems Gebrauch gemacht. Bei der Zytokintherapie werden die Eigenschaften von Zytokinen ausgenutzt: Zytokine sind Botenstoffe, die von Zellen sezerniert werden. Abhängig von der Art des Zytokins sind sie an der Entstehung und Progression von Tumoren, aber auch an der Bekämpfung von malignen Neoplasien beteiligt. Ein typisches Beispiel hierfür ist die IL-2-Therapie bei malignem Melanom sowie bei metastasiertem Nierenzellkarzinom (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe & Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF)., 2020).

Weiters haben sich monoklonale Antikörper wie Rituximab, Bevacizumab oder Trastuzumab bereits bei manchen malignen Neoplasien als Standardtherapien in der Klinik etabliert. Die Krebstherapie revolutioniert hat jedoch die Immunkontrollpunkt-Blockade. Die Kenntnis über die Relevanz der Immunkontrollpunkt-Moleküle CTLA-4 und PD-1 diente als Grundlage für die Entwicklung von monoklonalen Antikörpern wie Ipilimumab (anti-CTLA-4) und Nivolumab (anti-PD-1). Eine solche Therapie führt zu einer Reaktivierung von erschöpften T-Zellen, einer verbesserten T-Zell-Immunantwort und Hemmung von Tumorwachstum (Iwai et al., 2005; Walunas & Bluestone, 1998; Wang et al., 2022). Diese Immuntherapien sind z.B. bei der Behandlung des

Kolorektalkarzinoms, Urothelkarzinoms und Nierenzellkarzinoms zu finden (Boukouris et al., 2022; Motzer et al., 2018; Patel et al., 2020). Aufgrund des unterschiedlichen Einflusses von CTLA-4 und PD-1 auf die T-Zellfunktion konnte gezeigt werden, dass eine kombinierte Blockade von beiden inhibitorischen Molekülen eine synergistische Antitumorwirkung aufweist (Larkin et al., 2015).

Eine weitere Immuntherapie, die immer mehr Bedeutung gewinnt, ist der adoptive Zelltransfer. Hier werden aus dem Organismus gewonnene Immunzellen nach einer *Ex-vivo*-Modifizierung zurück in den Körper gebracht und sorgen für eine gezielte und verbesserte Immunantwort. Zu Vertretern dieser Therapien gehören beispielsweise DC-Vakzine oder CAR-T-Zelltherapien. Die erste dendritische Zelltherapie (Sipuleucel-T) wurde 2010 in den USA für die Behandlung von metastasiertem kastrationsresistentem Prostatakarzinom zugelassen (Kantoff et al., 2010). Bei der CAR-T-Zelltherapie werden aus dem Patienten T-Zellen isoliert und mit einem künstlichen T-Zellrezeptor, einem chimären Antigenrezeptor (CAR) versehen, das gegen das Tumorantigen gerichtet ist.

Auch wenn Immuntherapien eine vielversprechende Therapieoption von malignen Neoplasien darstellen, stellen sie weiterhin einige Herausforderungen, wie z.B. Therapie-assoziierte Toxizität, unzureichendes/ausbleibendes Ansprechen oder insuffiziente Infiltration des Tumors. Es besteht daher weiterhin Forschungsbedarf im Hinblick auf die Entschlüsselung von genauen Wirkmechanismen der einzelnen Immuntherapeutika, Identifikation von geeigneten Patientengruppen sowie Etablierung von neuen Behandlungskonzepten.

2.4 Burkitt-Lymphom

Lymphome sind maligne Neoplasien, bei denen es zu einer unkontrollierten und schnellen Proliferation von Zellen aus dem lymphatischen System kommt. Sie werden in Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) unterteilt. Die Unterscheidung erfolgt durch den mikroskopischen Nachweis von typischen Reed-Sternberg-Riesenzellen. Alle Lymphome, die solche Zellen nicht aufweisen, werden zu den NHL gezählt. Bei NHL handelt es sich um eine heterogene Gruppe, die zum Großteil aus der B-Zellreihe stammt. Die Therapieform und Prognose sind abhängig vom jeweiligen Malignitätsgrad. (Armitage et al., 2017; Poppema, 2005)

Das Burkitt-Lymphom, benannt nach seinem Erstbeschreiber Denis Burkitt (Burkitt, 1958), gehört zur Gruppe der hochmalignen NHL. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) unterteilt das Burkitt-Lymphom in die folgenden drei Subtypen: die endemische, sporadische und Immundefizienz-assoziierte Form (Swerdlow et al., 2016). Die Pathogenese basiert am häufigsten

auf einer Translokation des MYC-Gens auf Chromosom 8 in einen Immunglobulin-Locus auf Chromosom 14 (ar-Rushdi et al., 1983; Molyneux et al., 2012). Dadurch kommt es zu einer konstitutiven Aktivierung und Überexpression des MYC-Gens, das als Onkogen den Zellzyklus dysreguliert, die Zellproliferation und -differenzierung fördert und die Apoptose beeinträchtigt (Crombie & LaCasce, 2021; Schmitz et al., 2014). Am häufigsten tritt das Burkitt-Lymphom bei Kindern auf (Molyneux et al., 2012).

Aufgrund der Aggressivität des Tumors versterben die Patienten ohne Therapie sehr schnell, bei rechtzeitiger Einleitung einer adäquaten Therapie gilt das Burkitt-Lymphom unter den aggressiven Lymphomen jedoch gleichzeitig zu denjenigen mit der höchsten Heilungsrate (Dozzo et al., 2017). Bei der Behandlung des Burkitt-Lymphoms ist eine Hochdosispolychemotherapie Mittel der Wahl. Eine zusätzliche Ergänzung des Therapieschemas mit dem anti-CD20-Antikörper Rituximab führt zu einer Verbesserung der Heilungschancen (Hoelzer et al., 2014). Bei Therapieresistenz oder Rückfall nach erfolgter Chemotherapie sind die Therapiemöglichkeiten limitiert (Jacobson & LaCasce, 2014). Dies zeigt die Notwendigkeit für die Entwicklung weiterer Therapieoptionen.

2.5 Spontanes Lymphommodell

Um Ansätze neuer Therapien entwickeln zu können, ist es notwendig, Mechanismen bezüglich der Tumorgenese, -progression und -immunitierung aufzufindig zu machen und zu verstehen. Beispielsweise können hierfür transplantierbare Tumormodelle der Maus zum Einsatz kommen, bei denen große Mengen an Tumorzellen in das Versuchstier injiziert werden. Ein weitaus eleganterer Weg ist die Verwendung von transgenen Mäusen. Für die Untersuchung von B-Zelllymphomen kann das λ -MYC-Mausmodell herangezogen werden (Kovalchuk et al., 2000). Diese transgenen Mäuse exprimieren das humane MYC-Onkogen, welches sich unter Kontrolle des B-Zell-spezifischen Enhancers für die Ig λ -Kette befindet. Es kommt dadurch zu einer unkontrollierten Proliferation von B-Zellen. Folglich entwickeln die Mäuse zwischen dem 60. und 130. Lebensstag B-Zell-Lymphome, die dem Burkitt-Lymphom des Menschen ähneln. Im Gegensatz zu transplantierten Tumormodellen hat dieses murine Spontan-Tumormodell den Vorteil, einerseits die unterschiedlichen Stadien eines Lymphoms zu durchlaufen und andererseits ein „realistischeres“ und stärker immunsuppressives Tumormilieu zu besitzen. (Brenner et al., 2010)

2.6 Aufgabenstellung

Das Verständnis der Interaktion von Immunsystem und Tumorzellen ist eine essenzielle Grundlage für die Entwicklung von neuen Immuntherapien. Mithilfe des transgenen MYC-Spontantumormodells konnten bereits einige Immunevasionsmechanismen in B-Zell-Lymphomen identifiziert werden.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass intratumorale NK-Zellen trotz eines aktivierten Phänotyps anerg waren und keine Effektorfunktionen ausüben konnten. Dies spiegelte sich in der verminderten IFN- γ -Produktion der NK-Zellen wider. Mit fortschreitendem Krankheitsstadium verringerte sich die IFN- γ -Ausschüttung aus NK-Zellen. Dieser Erschöpfungszustand war nur im Tumorfrühstadium reversibel, im fortgeschrittenen Stadium waren die NK-Zellen nicht mehr zu reaktivieren. (Brenner et al., 2010)

Außerdem geht aus vorherigen Arbeiten hervor, dass es im MYC-Tumormilieu zu Alterationen der DCs kommt. In λ -MYC-Mäusen wiesen die DCs ein immunsuppressives Zytokinprofil mit erhöhter IL-10- und verminderter IL-12-Expression auf. (Naujoks et al., 2014)

Für eine effiziente Antitumorantwort werden antigenspezifische Th1-Zellen benötigt. Da für deren Aktivierung jedoch funktionstüchtige NK-Zellen und IL-12-produzierende DCs notwendig sind, wurde erwartet, dass eine Th1-Polarisierung im λ -MYC-Tumormilieu stark beeinträchtigt sein wird. Entgegen den Erwartungen zeigten CD4⁺ T-Effektorzellen jedoch eine erhöhte IFN- γ -Expression. Gleichzeitig kam es zu einer Hochregulation von IL-10. Hierbei zeigten sich auch IFN- γ /IL-10-koproduzierende CD4⁺ T-Zellen. Über die Herkunft dieser Zellsubpopulation war nichts bekannt.

Des Weiteren zeigten intratumorale T-Zellen zwar einen aktivierten Phänotyp, waren aber in ihrer Effektorfunktion beeinträchtigt. Offensichtlich wurden die T-Zellen durch eine dauerhafte Antigenstimulation in einen Erschöpfungszustand getrieben. Das erklärt auch die erhöhte Expression des inhibitorischen Rezeptors PD-1 auf den T-Zellen. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine hohe PD-1-Expression vor allem in den IL-10⁺CD4⁺ T-Zellen zu finden war. (Riedel, 2013)

In Blutseren und Überständen kranker λ -MYC-Mäusen wurde eine erhöhte Konzentration von IL-10 detektiert (Brenner, 2009). Hauptverantwortlich hierfür sind die malignen B-Zellen (Naujoks et al., 2014). In Kapitel 2.2.2 wurde bereits die duale Rolle des Zytokins IL-10 erläutert. Welche Rolle es in B-Zell-Lymphomen einnimmt, ist bisher allerdings noch unklar.

Es ergeben sich daher folgende Fragestellungen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit bearbeitet werden:

- Woher stammen die IFN- γ /IL-10-koexprimierenden T-Zellen? Handelt es sich hierbei um Tr1-Zellen (T regulatory type 1 cells), die durch Hochregulation von IL-10 aus Th1-Zellen stammen oder sind sie *de novo* aus Th0-Zellen entstanden?
- Falls es sich um Tr1-Zellen handeln sollte, wird deren Differenzierung durch das Zytokin IL-10 gefördert?
- Kann die Entstehung von Tr1-Zellen dann durch eine Neutralisierung von IL-10 beeinflusst werden?
- Wie wirkt sich eine IL-10-Neutralisationstherapie auf die PD-1-Expression auf den T-Zellen aus?

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1: Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät/Verbrauchsmaterial	Firma
<i>BD FACSAria™ Illu</i>	Becton Dickinson, Heidelberg
<i>BD LSR II Durchflusszytometer</i>	Becton Dickinson, Heidelberg
<i>Brutschrank Hera cell 240</i>	Heraeus, Waltham (USA)
<i>EasySep™ Magnet</i>	STEMCELL Technologies, Vancouver (Kanada)
Einmalpipetten (2 ml)	Corning, Corning (USA)
Einmalpipetten (5/10/25 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
ELISA-Platten (96 Kavitäten)	Invitrogen, Waltham (USA)
Filteraufsätze (0,22 µm)	Merck Millipore/Merck, Darmstadt
Gefrierschrank (- 20 °C)	Liebherr, Ochsenhausen
Gefrierschrank (- 80 °C)	Sanyo, Moriguchi (Japan)
Kühlschrank (4 °C)	Liebherr, Ochsenhausen
Kühlzentrifuge <i>Hettich™ ROTANTA 460R</i>	Hettich, Tuttlingen
Kryobox	Corning, Corning (USA)
Kryoröhrchen (1,8 ml)	Thermo Scientific™, Waltham (USA)
Lichtmikroskop <i>Leica DM750</i>	Leica Microsystems, Wetzlar
Mehrkanalpipetten	Eppendorf, Hamburg
Petrischalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipetten	Gilson, Middleton, USA
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Plattenzentrifuge <i>Labofuge™ 400</i>	Heraeus, Waltham (USA)
FACS-Röhrchen (1,3 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen

Röhrchen mit Zellfilterkappe (5 ml, Porengröße: 35 µm)	Falcon, Corning (USA)
Reaktionsgefäße (0,5/1,5/2 ml) <i>Eppendorf® Safe-Lock Tubes</i>	Eppendorf, Hamburg
Röntgenbestrahlungsanlage XSTRAHL RS225	Xstrahl, Ratingen
Spritzen (1/10/20 ml) <i>Omnifix® Luer Solo</i>	B. Braun, Melsungen
Sterilwerkbank	BDK, Sonnenbühl-Genkingen
Tischzentrifuge <i>Centrifuge 5424R</i>	Eppendorf, Hamburg
Vortexer <i>Vortex Genie 2</i>	Bachofer, Reutlingen
Wasseraufbereitungssystem <i>Milli-Q® Reference A+</i>	Merck Millipore/Merck, Darmstadt
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Zählkammer nach Neubauer	Neolab, Heidelberg
Zellsiebe (40 µm)	Falcon, Corning (USA)
Zellkulturplatten (96 Kavitäten, Rundboden)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen (15/50 ml)	Falcon, Corning (USA)

3.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie/Reagenz	Firma
<i>ArC™ Amine Reactive Compensation Bead Kit</i>	Invitrogen, Waltham (USA)
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Gibco, Waltham (USA)
Brefeldin A	Invitrogen, Waltham (USA)
<i>Cell Proliferation Dye eFluor® 450</i>	eBioscience, Waltham (USA)
<i>CpG Oligonukleotid 1668</i>	Metabion, Planegg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe
<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)</i>	Gibco, Waltham (USA)
Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz (EDTA)	Merck, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FKS)	Gibco, Waltham (USA)

<i>Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set</i>	eBioscience, Waltham (USA)
Heparin	Plattform Monoklonale Antikörper, Helmholtz-Zentrum München
Ionomycin	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Gibco, Waltham (USA)
<i>LIVE/DEAD® Fixable Blue Dead Cell Stain Kit</i>	Invitrogen, Waltham (USA)
MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100X)	Gibco, Waltham (USA)
Natriumazid (NaN ₃)	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat	Gibco, Waltham (USA)
<i>OneComp eBeads</i>	Invitrogen, Waltham (USA)
<i>Penicillin-Streptomycin</i>	Gibco, Waltham (USA)
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	Sigma-Aldrich, Darmstadt
<i>RPMI 1640 ohne L-Glutamin</i>	Gibco, Waltham (USA)
Trypanblau	Gibco, Waltham (USA)

3.1.3 Medien und Puffer

Tabelle 3: Verwendete Medien und Puffer

Medium/Puffer	Zusammensetzung
Basismedium	RPMI 1640 ohne L-Glutamin 5 % FKS (hitzeinaktiviert) 100 U/ml Penicillin-G-Natrium 100 µg/ml Dihydrostreptomycinsulfat 2 mM L-Glutamin 1 mM Natriumpyruvat 5 ml Nicht-essentielle Aminosäuren (100x) 50 µM β-Mercaptoethanol
T-Zell-Medium	Basismedium mit 10 % FKS (hitzeinaktiviert)
EasySep-Puffer	PBS 2 % FKS (hitzeinaktiviert)

Einfriermedium	90 % FKS (hitzeinaktiviert) 10 % DMSO
Erythrozyten-Lysepuffer (10x; pH 7,4)	8,25 g Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl) 1 g Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃) 37 mg Natrium-EDTA ad 100 ml H ₂ O
FACS-Puffer	PBS 2 % FKS (hitzeinaktiviert) 1 % Natriumazid (NaN ₃) 2 mM EDTA
FACS-Sorting-Puffer	PBS 2 % FKS (hitzeinaktiviert) 2 mM EDTA

3.1.4 Kits

Tabelle 4: Verwendete Kits

Kit	Firma
Cell Proliferation Dye eFluor™ 450	eBioscience, Waltham (USA)
<i>EasySep™ Mouse CD4⁺ T Cell Isolation Kit</i>	STEMCELL Technologies, Vancouver (Kanada)
<i>EasySep™ Mouse CD25 Regulatory T Cell Positive Selection Kit</i>	STEMCELL Technologies, Vancouver (Kanada)

3.1.5 Antikörper

3.1.5.1 Antikörper für *In-vitro*- bzw. *In-vivo*-Versuche

Tabelle 5: Antikörper für *In-vitro*- bzw. *In-vivo*-Versuche

Antigen	Klon	Isotyp	Firma
CD3	145-2C11	Armenischer Hamster	Plattform Monoklonale Antikörper, Helmholtz-Zentrum München
CD28	37N	Syrischer Hamster	Plattform Monoklonale Antikörper, Helmholtz-Zentrum München
IL-10	JES5-16E3	Ratte IgG2a, κ	BioLegend

3.1.5.2 Fluoreszenz-markierte Antikörper für durchflusszytometrische Analysen

Tabelle 6: Fluoreszenz-markierte Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antigen	Klon	Isotyp	Fluorochrom	Firma
Blimp-1	5E7	Ratte IgG2a, κ	PE	eBioscience
CD4	RM4-5	Ratte IgG2a	PerCP FITC	BD Pharmingen
CD8a	53-6.7	Ratte IgG2a	eFluor 450	eBioscience
CD19	1D3	Ratte IgG2a, κ	PE	eBioscience
PD-1 (CD279)	J43	Armenischer Hamster IgG	FITC	eBioscience
PD-1 (CD279)	RMP1-30	Ratte IgG2b, κ	APC, PE	eBioscience
Eomesodermin	Dan11mag	Ratte IgG2a, κ	APC	eBioscience
Foxp3	FJK-16s	Ratte IgG2a, κ	eFluor 450, APC PE	eBioscience
IFN-γ	XMG1.2	Ratte IgG1	FITC	eBioscience

IFN- γ	XMG1.2	Ratte IgG1, κ	APC	BioLegend
IL-10	JES5-16E3	Ratte IgG2b	PE	eBioscience
IL-10	JES5-16E3	Ratte IgG2b, κ	APC	eBioscience
T-bet	eBio4B10	Maus, IgG1	PerCP/Cyanine5.5	eBioscience

3.1.6 Mäuse

Alle Tierversuche wurden unter Einhaltung des Tierschutzgesetzes sowie nach Genehmigung durch die Regierung von Oberbayern durchgeführt. Die Versuchsmäuse wurden im Tierstall des Helmholtz-Zentrums München in Großhadern und Neuherberg unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen gehalten und hatten Zugang zu Nahrung sowie Wasser ad libitum. Das Geschlecht der Mäuse wurde bei der Durchführung der Experimente nicht beachtet, da es keinen Einfluss auf die Ergebnisse hatte.

Für die Untersuchung von B-Zell-Lymphomen diente das λ -MYC-Spontantumormodell. Als Versuchstiere wurden transgene C57BL/6-Mäuse herangezogen, die in ihrer Keimbahn das humane Protoonkogen MYC tragen, das unter Kontrolle eines Immunglobulin λ -Enhancers steht (Kovalchuk et al., 2000). Folglich kommt es zu einer erhöhten Expression von MYC in allen B-Zellen, sodass die Mäuse 60-130 Tage nach Geburt spontan B-Zell-Lymphome entwickeln. Der entstandene Tumor ähnelt dem humanen Burkitt-Lymphom und manifestiert sich klinisch wie beim Menschen häufig durch eine Splenomegalie und Lymphadenopathie. Sobald die Tiere klinisch auffällig wurden, wurden sie geopfert und die sekundären lymphatischen Organe wie Milz und ggf. Lymphknoten (LK) für die Experimente entnommen.

Als Kontrolle wurden nicht-transgene C57BL/6-Mäuse verwendet, die in dieser Arbeit als Wildtyp (wt) bezeichnet werden.

Für spezifische Fragestellungen der Arbeit wurden zudem GREAT-Mäuse (IFN- γ reporter with endogenous polyA tail) benutzt, die freundlicherweise von Prof. Dr. Dirk Baumjohann (Ludwig-Maximilians-Universität) zur Verfügung gestellt wurden. GREAT-Mäuse basieren ebenfalls auf einem C57BL/6-Hintergrund und besitzen hinter dem Stopcodon von IFN- γ ein IRES-YFP (yellow

fluorescence protein) Konstrukt (Reinhardt et al., 2015). Dies führt zur Translation von IFN- γ und YFP aus einer bicistronischen IFN- γ /IRES/YFP mRNA. So bieten GREAT-Mäuse den Vorteil, IFN- γ^+ Zellen anhand ihrer gelben Fluoreszenz mittels FACS von anderen Zellen separieren zu können, ohne die Zellen davor beispielsweise mit PMA/Ionomycin stimulieren und mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern färben zu müssen. Da die Tiere extern angeliefert wurden, wurden sie frühestens 2 Tage nach Ankunft für die Experimente verwendet, sodass sie sich an die neue Umgebung gewöhnen und sich vom Transportstress erholen konnten. Nach Tötung der Mäuse wurden die Milz und Lymphknoten entnommen und für die Experimente weiter aufbereitet.

3.1.7 Software

Tabelle 7: Verwendete Programme

Software	Firma
Adobe Illustrator CS5	Adobe Systems, San José (USA)
BioRender	BioRender, Toronto (Kanada)
BD FACSDiva™	Becton Dickinson, Heidelberg
FlowJo v10.6.2	Treestar Inc., Ashland (USA)
GraphPad Prism 5	Graphpad Software Inc., La Jolla (USA)
Mendeley	Elsevier, London (Großbritannien)
MS Office, Word 2016	Microsoft, Redmond (USA)

3.2 Methoden

3.2.1 Zelllinien und Zellkultur

Für die Durchführung einiger Experimente wurde die 291-Zelllinie, eine B-Zell-Lymphomlinie aus kranken λ -MYC-Mäusen, die im Labor R. Mocikat (Brenner et al., 2010) generiert wurde, verwendet. Die 291-Zellen wurden in Basismedium (5 % FKS) im Brutschrank bei 37 °C, 5% CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Je nach Proliferationsrate wurde die Zelllinie alle 2 Tage im Verhältnis 1:2 oder 1:10 gesplittet.

3.2.2 Herstellung von Einzellellsuspensionen aus Milz und Lymphknoten

Nach Tötung der Mäuse mittels CO₂ wurden Milz und - falls notwendig - auch die mandibulären, axillären sowie inguinalen Lymphknoten entnommen. Um eine Einzellellsuspension zu erhalten, wurden die Organe mit dem Stempel einer 10 ml Spritze durch ein Zellsieb mit einer Porengröße von 40 μ m in das Basismedium gedrückt. Danach wurden die Erythrozyten mittels Lysepuffer aus der Zellsuspension entfernt und die aufgereinigten Zellen nach mehreren Waschvorgängen in 35 ml PBS resuspendiert. Im Anschluss daran wurde die Zellzahl mithilfe der Zählkammer bestimmt.

3.2.3 Zellzahlbestimmung

Für die Zellzahlbestimmung wurde eine kleine Menge von der aufbereiteten Zellsuspension mit Trypanblau im Verhältnis 1:10 vermischt und in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Da der Farbstoff Trypanblau nur von toten Zellen aufgenommen wird, die im Mikroskop blau erscheinen, konnten diese von lebenden, ungefärbten Zellen unterschieden werden. Die Zellzahl wurde in den vier Großquadranten der Kammer bestimmt und daraus das arithmetische Mittel gebildet. Mithilfe des Kammerfaktors 10^4 und des Verdünnungsfaktors wurde die Anzahl der lebenden Zellen in der gesamten Zellsuspension durch die folgende Formel bestimmt:

$$\emptyset \text{ lebende Zellen pro Großquadrant} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

3.2.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren der Zellen wurde die Zellsuspension abzentrifugiert (5 min; 1200 rpm), der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in Einfrierlösung aufgenommen. Für je $1-5 \times 10^7$ Zellen wurden 1,8 ml Einfrierlösung verwendet, anschließend in die Kryoröhrchen überführt und im -80 °C Gefrierschrank aufbewahrt. Wenn die Zellen wieder benötigt wurden, mussten sie bei Raumtemperatur zügig mithilfe von 10 ml PBS verdünnt werden, da das in der Einfrierlösung enthaltene DMSO zytotoxisch wirkt. Nach der Zentrifugation der Zellsuspension wurde das Zellpellet im benötigten Medium resuspendiert und je nach Bedarf weiterverarbeitet.

3.2.5 Durchflusszytometrie

Mit der Durchflusszytometrie, auch bekannt als FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting), können Oberflächenantigene sowie intrazelluläre Zytokine detektiert und quantifiziert werden.

Für die Analyse von Oberflächenantigenen wurden pro Ansatz 2×10^6 Zellen mit Fluoreszenz-markierten monoklonalen Antikörpern (mAk) in 100 μl PBS für 20 min bei 4 °C inkubiert. Um später zwischen lebenden und toten Zellen differenzieren zu können, wurden die Zellen zusätzlich mit dem Lebend/Tot-Farbstoff *LIVE/DEAD® Fixable Blue* gefärbt.

Für die Detektion intrazellulärer Moleküle, wie IFN- γ oder IL-10, erfolgte zunächst im Brutschrank eine 4-stündige Stimulation der zu untersuchenden Zellen in T-Zell-Medium mit 1 $\mu\text{g/ml}$ PMA und 1 $\mu\text{g/ml}$ Ionomycin. Um eine Zytokinausschüttung aus den Zellen zu verhindern, erfolgte zudem die Zugabe von 3 $\mu\text{g/ml}$ Brefeldin A. Im Anschluss daran wurde zuerst die Oberflächenantigen-Färbung wie oben erläutert durchgeführt. Dann wurden die Zellen mit dem *Foxp3 Staining Buffer Set* fixiert. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellmembranen mit 1x *Permeabilization Buffer* durchlässig gemacht und anschließend Fluoreszenz-markierte mAk für die Färbung der intrazellulären Zytokine hinzugefügt. Nach erneuter Inkubation von 30 min bei Raumtemperatur wurde der überschüssige Farbstoff mit 1x *Permeabilization Buffer* ausgewaschen und die Zellen in 150 μl FACS-Puffer aufgenommen. Gleichzeitig wurde als Negativkontrolle entweder die zugehörige Isotyp-Färbung oder eine FMO-Kontrolle (Fluorescence Minus One) durchgeführt.

Die angefärbten Zellen wurden anschließend im *BD LSR II Flow Cytometer* analysiert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software *FlowJo*. Mithilfe der Gating-Strategie wurde auf die gewünschte Zellpopulation eingegrenzt und diese auf weitere Marker untersucht (Abb. 1).

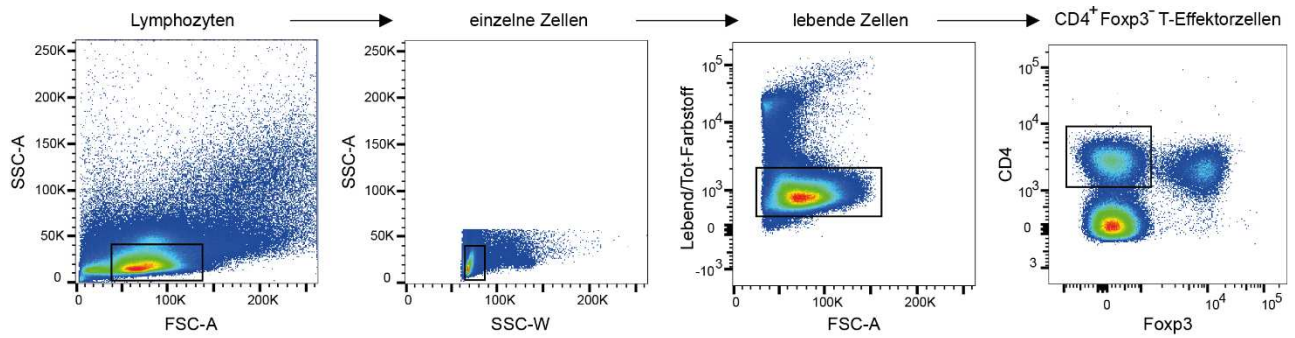


Abb. 1: Exemplarische Darstellung der Gating-Strategie für die FACS-Analyse der T-Effektorzellen aus einer wt-Milz. Nach Eingrenzung auf lebende Lymphozyten konnten die CD4⁺Foxp3⁻ T-Effektorzellen je nach Versuch weiter analysiert werden. Die Gates wurden jeweils anhand der wt-Zellen gesetzt und anschließend auf die Daten anderer Mäuse transferiert.

3.2.6 Zellseparation

3.2.6.1 EasySep™ Magnetseparation

Um CD4⁺CD25⁻ T-Zellen zu gewinnen, wurde eine magnetische Separation mit dem *EasySep™ Mouse CD4⁺ T Cell Isolation Kit* sowie dem *EasySep™ Mouse CD25⁺ Regulatory T Cell Positive Selection Kit* durchgeführt.

Zunächst wurde aus der Milz und den Lymphknoten einer Maus eine Einzelzellsuspension aufbereitet und die CD4⁺ T-Zellen wurden durch eine Negativselektion von den restlichen Zellen getrennt. Im Anschluss daran wurden mittels einer Positivselektion zusätzlich die CD25⁻ T-Zellen vom Rest separiert, sodass zum Schluss CD4⁺CD25⁻ T-Zellen gewonnen wurden.

Die einzelnen Schritte dieser magnetischen Separation wurden nach Protokoll des Herstellers ausgeführt. Im FACS konnte stets eine Reinheit von > 92% festgestellt werden (Abb. 2).

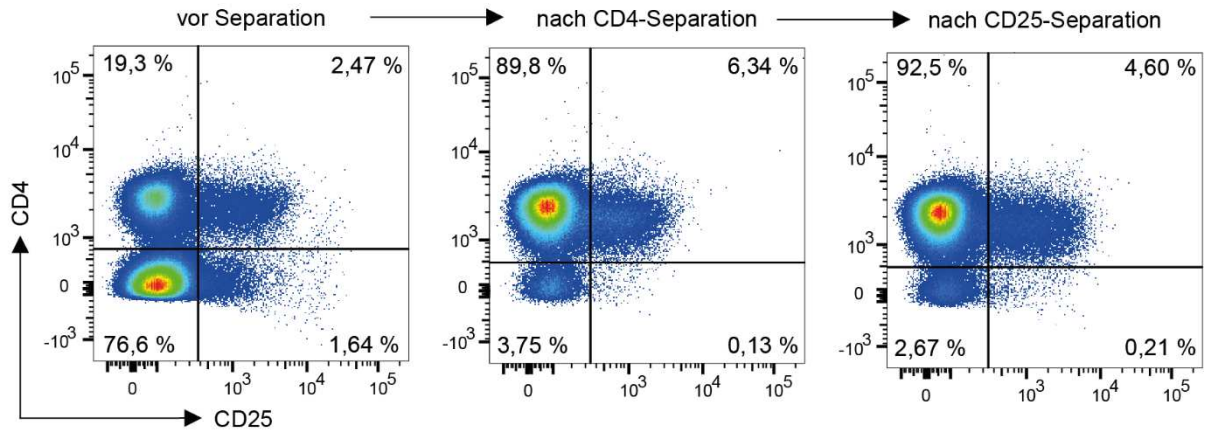


Abb. 2: Reinheit der CD4⁺CD25⁻ T-Zellen nach der magnetischen Separation. Der Anteil der CD4⁺ T-Zellen lag vor der Separation bei nur 23 % und stieg durch die Negativselektion der CD4⁺ T-Zellen auf > 96 %. Zur Isolierung von CD4⁺CD25⁻ Zellen wurde anschließend eine CD25-Positivselektion durchgeführt. Am Ende betrug die Reinheit nach der Separation in der Regel > 92 %.

3.2.6.2 BD FACSAria™ Illu-Zellsortierung

CD4⁺IFN- γ ⁺ Zellen aus GREAT-Mäusen wurden in enger Kooperation mit Dr. Thomas Hofer mit dem BD FACSAria™ Illu über die Detektion von YFP isoliert. Reanalysen unmittelbar nach der Sortierung zeigten stets eine Reinheit von > 98% (Abb. 3).

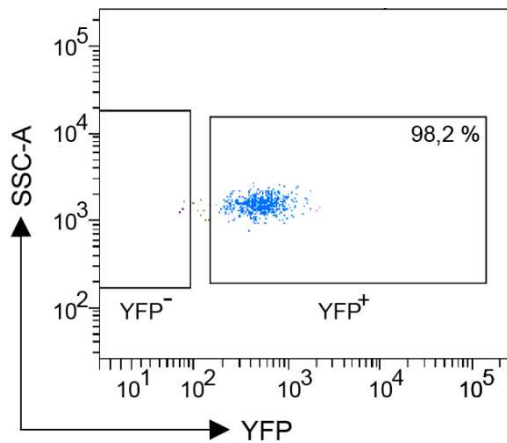


Abb. 3: Reinheit der CD4⁺IFN- γ ⁺ T-Zellen nach der FACS-Sortierung.

3.2.7 Vakzinierung mit 291-Zellen

Um tumorspezifische und potenziell tumorprotektive T-Zellen zu generieren, die später in *In-vitro*-Kokulturen die Tumorzellen wiedererkennen, wurde eine *In-vivo*-Immunisierung mit 291-Zellen und CpG durchgeführt (Egeter et al., 2000). Hierzu erhielten die Mäuse im Abstand von 14 Tagen intraperitoneal (i.p.) eine Injektion von jeweils 1×10^5 291-Zellen und 10 nM CpG Oligonukleotid 1668, einem TLR-9-Agonist. Am Tag der Applikation wurden 291-Zellen aus dem Basismedium entnommen, in PBS resuspendiert und mit 100 Gray bestrahlt, damit sie nach der Injektion in der Maus nicht mehr weiter proliferieren konnten. 7 Tage nach der zweiten Injektion (Tag 21) wurden die Mäuse abgetötet und Milz sowie Lymphknoten entnommen (Abb. 4A).

Um zu zeigen, dass durch eine Immunisierung der Anteil IFN- γ -produzierender Th1-Zellen erhöht werden kann, wurde 7 Tage nach der zweiten Injektion Blut aus GREAT-Mäusen durchflusszytometrisch analysiert. In den CD4⁺ T-Zellen konnte nach der Immunisierung eine erhöhte YFP-Expression festgestellt werden (Abb. 4B). Anhand der YFP-Expression konnten Rückschlüsse auf die IFN- γ -Expression gezogen werden.

Zum Ausschluss einer Hochregulation von IL-10 als gegenregulatorische Maßnahme infolge der Immunisierung wurden im Rahmen von Vorversuchen wt-Mäuse nach zweimaliger Vakzinierung mit 291-Zellen gemäß Injektionsschema (Abb. 4C) getötet. Die anschließende durchflusszytometrische Analyse der Splenozyten ergab, dass es in CD4⁺Foxp3⁻ Teff nach der Immunisierung zu keiner erhöhten IL-10-Expression kommt.

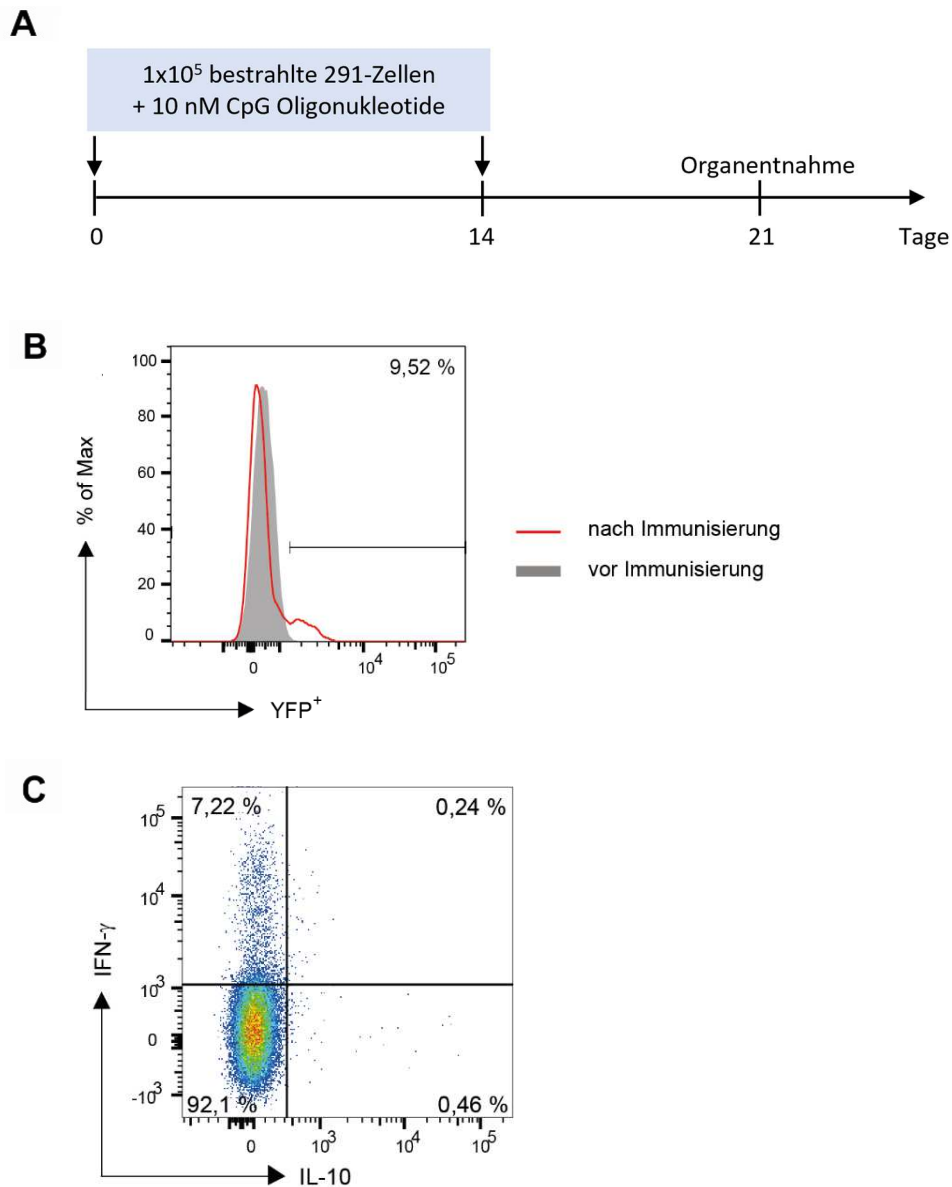


Abb. 4: A) Schematische Darstellung der Immunisierung. B) Repräsentative Histogrammdarstellung der YFP-/IFN- γ -Expression in CD4⁺ Zellen einer GREAT-Maus nach erfolgter Immunisierung. Als Negativkontrolle (grau) diente das Blut, das vor der Immunisierung gewonnen wurde. C) Beispielhafter FACS-Dotplot zur Darstellung einer ausbleibenden Hochregulation der IL-10-Expression in CD4⁺Foxp3⁻ Teff einer wt-Maus nach Immunisierung mit 291-Zellen. Der Versuch wurde insgesamt viermal durchgeführt.

3.2.8 *In-vitro*-Versuche

3.2.8.1 T-Zell-Stimulation mit anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern

In *In-vitro*-Versuchen wurden T-Zellen unter Verwendung von anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern stimuliert. Hierfür wurden am Tag zuvor die Böden einer 96-Well-Rundbodenplatte mit jeweils 2 μ g/ml anti-CD3/anti-CD28-Antikörpern in 50 μ l PBS bedeckt und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Danach wurde nach Absaugen des Antikörper-Gemisches jede Kavität mit 200 µl PBS und anschließend mit 200 µl T-Zell-Medium gewaschen.

3.2.8.2 Markierung der Zellen mit Cell Proliferation Dye

Im Rahmen von *In-vitro*-Versuchen wurden T-Zellen mit wt- oder λ-MYC-Splenozyten koinkubiert und nach 2 Tagen durchflusszytometrisch analysiert (s. Abschnitt 3.2.8.3). Um T-Zellen von anderen Zellen im Zellgemisch zu unterscheiden, wurden zuvor je nach Versuch entweder T-Zellen oder wt-/λ-MYC-Splenozyten mit Cell Proliferation Dye (CPD) markiert. Dazu wurde die Zellsuspension mit 20 µM CPD-Färbelösung pro 20×10^6 zu färbende Zellen bei Raumtemperatur im Dunkeln für 20 min inkubiert. Im Anschluss wurde der Färbevorgang durch Zugabe der vierfachen Menge kalten T-Zell-Mediums und anschließender Inkubation von fünf Minuten auf Eis gestoppt. Danach wurden die Zellen dreimal mit T-Zell-Medium gewaschen und in den Kavitäten ausplattiert.

Wurden T-Zellen mit CPD gefärbt, konnte deren Proliferation in Kokultur nach zweitägiger Stimulation mit anti-CD3/anti-CD28 durchflusszytometrisch erfasst werden. Die Proliferation wurde anhand des CPD-Verlustes bestimmt, da eine Zellteilung zu einer Halbierung der CPD-Fluoreszenzintensität führt.

3.2.8.3 *In-vitro*-Kokulturen

3.2.8.3.1 Kokultur von T-Effektorzellen mit Tumorzellen

Es sollte *in vitro* untersucht werden, ob der Anteil IFN-γ/IL-10-koproduzierender sowie PD-1-exprimierender T-Zellen im λ-MYC-Lymphommilieu ansteigt. Hierfür wurde am Vortag mit anti-CD3/anti-CD28-Antikörpern eine 96-Well-Rundbodenplatte beschichtet. Am Versuchstag wurden pro Kavität der 96-Well-Platte 1×10^5 magnetisch sortierte CD4⁺Foxp3⁻ T-Zellen, die aus Milzen und Lymphknoten immunisierter Mäuse stammten, entweder mit 1×10^6 wt- oder λ-MYC-Splenozytensuspension in 200 µl T-Zell-Medium im Brutschrank bei 37 °C kokultiviert. Damit CD4⁺Foxp3⁻ T-Zellen in der Kokultur wiederaufgefunden werden konnten, wurden sie zuvor mit CPD markiert (s. Abschnitt 3.2.8.2). Nach zwei Tagen wurden die Zellen geerntet und im FACS auf IFN-γ-, IL-10- sowie PD-1-Expression untersucht.

Zur Untersuchung der Rolle von IL-10 für die (Ko-)Expression von IFN-γ/IL-10 und PD-1 wurde der *In-vitro*-Versuch unter Zugabe von anti-IL-10-mAk (0,1 µg/ml) wiederholt.

3.2.8.3.2 Kokultur von IFN- γ ⁺ T-Zellen mit Tumorzellen

Um zu zeigen, dass in λ -MYC-Mäusen detektierte IFN- γ /IL-10-koproduzierende Teff einst IFN- γ ⁺ Th1-Zellen waren und im Tumormilieu zu Tr1-Zellen konvertierten, wurden GREAT-Mäuse herangezogen, aus denen anhand der YFP-Expression IFN- γ ⁺ Th1-Zellen isoliert wurden. Hierzu wurden GREAT-Mäuse zuvor mit bestrahlten 291-Zellen immunisiert und die Milzen sowie Lymphknoten für die weitere Aufbereitung entnommen. Um CD4⁺ IFN- γ -produzierende T-Zellen zu erhalten, wurden zunächst aus der Zellsuspension mittels magnetischer Separation CD4⁺ T-Zellen angereichert, die im Anschluss mit Lebend/Tot-Farbstoff versehen wurden. Anschließend wurden mittels FACS über Detektion von YFP IFN- γ ⁺CD4⁺ Zellen isoliert und entweder mit wt- oder λ -MYC-Splenozyten koinkubiert. Um im weiteren Verlauf die zwei Zellpopulationen in der Kokultur differenzieren zu können, mussten die wt- bzw. λ -MYC-Splenozyten zuvor mit CPD markiert werden. Eine wie im Abschnitt 3.2.8.2 durchgeführte CPD-Markierung der sortierten T-Zellen war in diesem Fall wegen der geringen Zellzahl nach der FACS-Sortierung nicht möglich, da die zytotoxische Wirkung von CPD und die vielen Waschgänge zu einem enormen Zellverlust (ca. 50 %) führten. Es musste jedoch zunächst anhand von Vorversuchen gezeigt werden, dass in Kokultur gehaltene T-Zellen und CD19⁺ B-Zellen in der wt-/ λ -MYC-Splenozytensuspension wegen ihrer Proliferation und damit verbundener Verdünnung des CPD-Farbstoffs nicht fälschlicherweise in die CPD-negative Th1-Zellfraktion geraten. Um dies auszuschließen, wurden in eine Kavität einer 96-Well-Platte allein 1×10^6 wt-/ λ -MYC-Splenozyten pipettiert, während in einer anderen Kavität 1×10^6 wt-/ λ -MYC-Splenozyten zusammen mit 1×10^5 magnetisch separierten CD4⁺ Zellen einer immunisierten wt-Maus koinkubiert wurden. Alle Zellen wurden mit anti-CD3/anti-CD28-Antikörpern stimuliert. Nach zweitägiger Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen geerntet und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass CPD-markierte wt-Splenozyten durch die T-Zell-Stimulation und λ -MYC-Splenozyten durch den hohen Anteil der CD19⁺ B-Zellen eine hohe Proliferation zeigten. Allerdings gelangten beide Populationen kaum in die potenzielle CPD-negative Zellfraktion. Zudem war in der Kokultur stets eine klare Trennung zwischen CPD⁺ Splenozyten und CPD⁻CD4⁺ Zellen möglich. Außerdem wurde sichergestellt, dass in der CPD⁻ Zellfraktion keine CD19⁺ B-Zellen zu detektieren waren, sondern hauptsächlich der Kokultur zugesetzte CD4⁺ Zellen (Abb. 5).

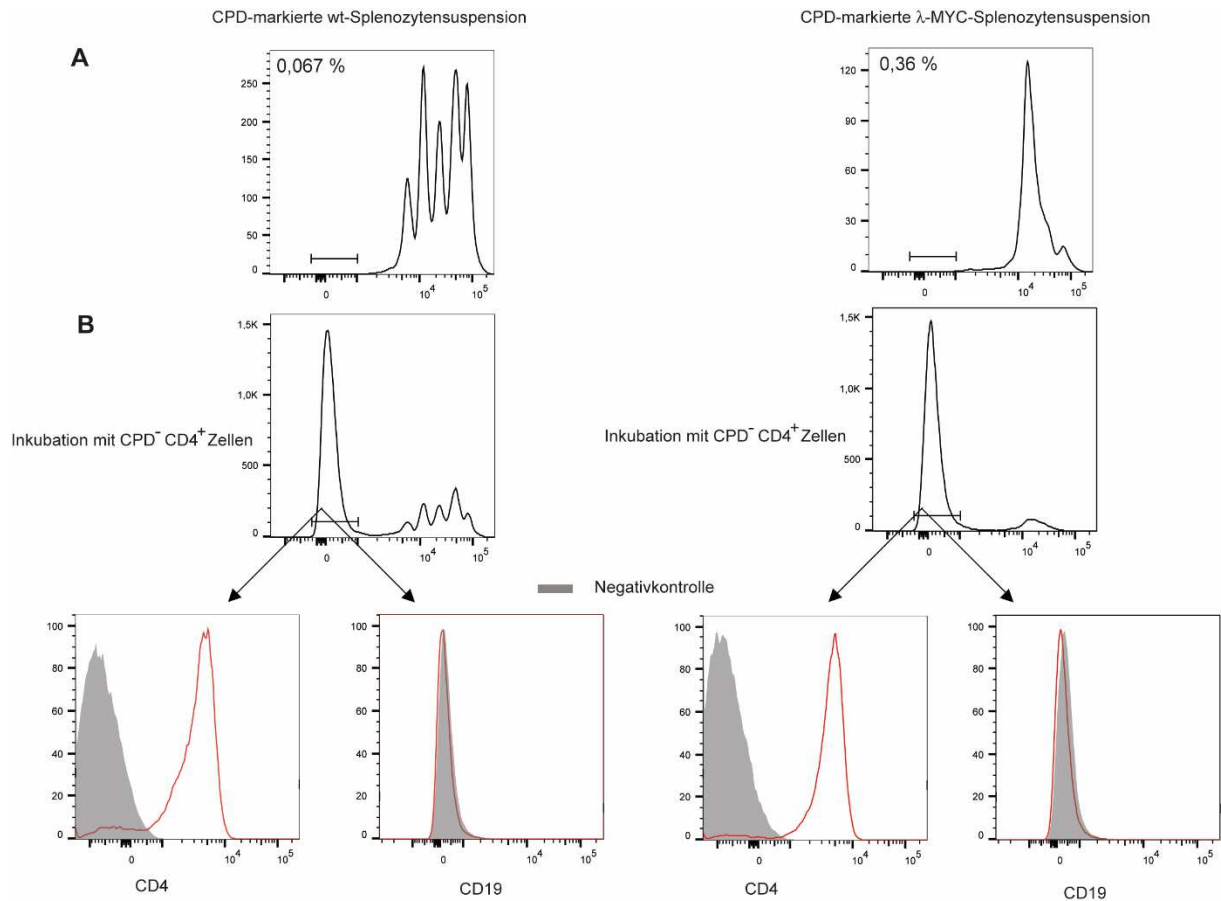


Abb. 5: Durchflussmetrische Untersuchung von CPD⁺ wt- und λ-MYC-Splenozyten. A) Darstellung der Proliferation von CPD-markierten wt- oder λ-MYC-Splenozyten. Keine Detektion von Zellen im CPD⁻ Bereich. B) FACS-Analyse von Zellgemischen aus CPD⁺ wt- oder λ-MYC-Splenozyten und CPD⁻ CD4⁺ Zellen mit Veranschaulichung einer klaren Differenzierung zwischen CPD⁺ und CPD⁻ Fraktion. CD19⁺ B-Zellen konnten in der CPD⁻ CD4⁺ Zellpopulation nicht nachgewiesen werden.

Nach Sicherstellung einer unbedenklichen CPD-Färbung von wt- und λ-MYC-Splenozyten konnten die gefärbten Zellen für den *In-vitro*-Versuch verwendet werden. Für die Kokultur kamen in jede Vertiefung einer mit anti-CD3/anti-CD28-Antikörpern beschichteten 96-Well-Rundbodenplatte jeweils $0,7 \times 10^5$ CD4⁺IFN- γ ⁺ T-Zellen und entweder 1×10^6 CPD⁺ wt- oder λ-MYC-Splenozyten in 200 μ l T-Zell-Medium. Nach zweitägiger Koinkubation im Brutschrank bei 37 °C wurden die Zellen geerntet und die Koexpression von IFN- γ und IL-10 in den T-Zellen wurde durchflusszytometrisch ermittelt. Um auch hier den Effekt einer IL-10-Neutralisation auf die IFN- γ /IL-10-Koexpression zu untersuchen, wurden die Versuche ebenfalls mit anti-IL-10-mAk (0,1 μ g/ml) durchgeführt.

3.2.8.3.3 IL-10-Neutralisation *in vivo*

Um zu untersuchen, welche Auswirkungen eine *In-vivo*-Neutralisation von IL-10 auf die Teff hat, wurden in der Versuchsgruppe klinisch inapparenten λ -MYC-Mäusen jeweils am 55., 65., 75. und 85. Lebenstag 100 μ g anti-IL-10-mAk i.p. injiziert (Abb. 6). Als Kontrollgruppe dienten unbehandelte λ -MYC-Mäuse. Sobald ein Tier erste klinische Symptome der Tumorerkrankung zeigte, wurde es abgetötet. Im Anschluss wurde die Milz entnommen und durchflusszytometrisch auf PD-1-, IFN- γ - und IL-10-Expression untersucht.

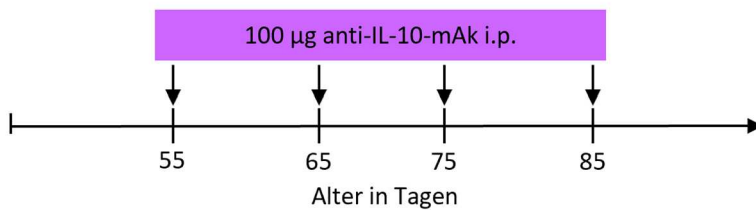


Abb. 6: Schematische Darstellung der IL-10-Neutralisationstherapie.

3.2.9 Statistik

Statistische Analysen der erhobenen Daten wurden mithilfe der Software *GraphPad Prism 5* durchgeführt. Zur Berechnung des p-Wertes wurde unter Annahme einer Normalverteilung der Daten der zweiseitige Student's t-Test zum Vergleich zweier Gruppen verwendet. Im Falle einer Abweichung der Varianz beider Gruppen wurde dies durch eine Welch-Korrektur angepasst. Für den Vergleich mehrerer Gruppen diente die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA). Alle Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Statistische Signifikanz wurde mit einem (*; $p \leq 0,05$) oder zwei (**; $p \leq 0,01$) Sternchen gekennzeichnet. Waren die Unterschiede nicht signifikant, wurde nicht gesondert markiert.

4 ERGEBNISSE

Mithilfe des λ -MYC-Spontantumormodells, bei dem eine Überexpression des Protoonkogens MYC zur Entstehung von B-Zell-Lymphomen führt, hatten frühere Arbeiten der Arbeitsgruppe gezeigt, dass NK-Zellen und DCs in λ -MYC-Mäusen trotz ihrer phänotypisch starken Aktivierung in ihrer Funktion eingeschränkt und nicht mehr im Stande waren, eine adäquate Tumorabwehr einzuleiten (Brenner et al., 2010; Naujoks et al., 2014). Da NK-Zellen und DCs die Th1-Differenzierung antreiben, wurde vermutet, dass in λ -MYC-Mäusen die Th1-Differenzierung sowie die Th1-Immunantwort ausbleiben.

Entgegen den Erwartungen exprimierten tumorinfiltrierende $CD4^+Foxp3^-$ T-Zellen jedoch hohe Mengen an IFN- γ , die während der Tumorprogression sogar weiter anstiegen. Neben IFN- γ wurde in $CD4^+Foxp3^-$ T-Zellen auch eine hohe Menge von IL-10 detektiert, das sich hauptsächlich im IFN- γ^+ Kompartiment befand (Ma et al., 2021; Riedel, 2013). Da über die Herkunft und Rolle dieser T-Zell-Subpopulation, die für IFN- γ und IL-10 doppelt positiv war, nichts bekannt war, wurde sie im Folgenden genauer analysiert.

4.1 Charakterisierung der intratumoralen IFN- γ^+ IL-10 $^+$ T-Effektorzellen

4.1.1 Quantitative Analyse der IFN- γ^+ IL-10 $^+$ T-Effektorzellen

Zuerst wurde untersucht, in welchem Ausmaß die IFN- γ /IL-10-koproduzierenden T-Lymphozyten in kranken Tumormäusen zunehmen. Hierzu wurden Milzen aus kranken λ -MYC-Mäusen sowie aus wt-Mäusen durchflusszytometrisch auf ihre IFN- γ /IL-10-Koexpression analysiert. Für die Untersuchung erfolgte zunächst eine Stimulation der Zellen mit PMA und Ionomycin. Durch gleichzeitige Zugabe von Brefeldin A wurde die Zytokinausschüttung aus den Zellen verhindert. Im Anschluss konnten die Zellen nach entsprechender Färbung der Oberflächenantigene und der intrazellulären Zytokine mithilfe von FACS analysiert werden.

Die durchflusszytometrische Untersuchung zeigte, dass die IFN- γ /IL-10-Koexpression in kranken Tumormäusen im Vergleich zu wt-Mäusen stets erhöht war. In Abbildung 7A ist beispielhaft ein FACS-Dotplot zur Veranschaulichung der IFN- γ /IL-10-Koexpression in der $CD4^+Foxp3^-$ Zellpopulation zu sehen. Im rechten oberen Quadranten wird der erhöhte Anteil IFN- γ /IL-10 doppelt-positiver Teff in kranken Tumormäusen im Gegensatz zu wt-Mäusen deutlich. Die Gesamtauswertung der Daten in Abbildung 7B zeigt eine signifikant erhöhte IFN- γ /IL-10-Koexpression in tumorinfiltrierenden Teff.

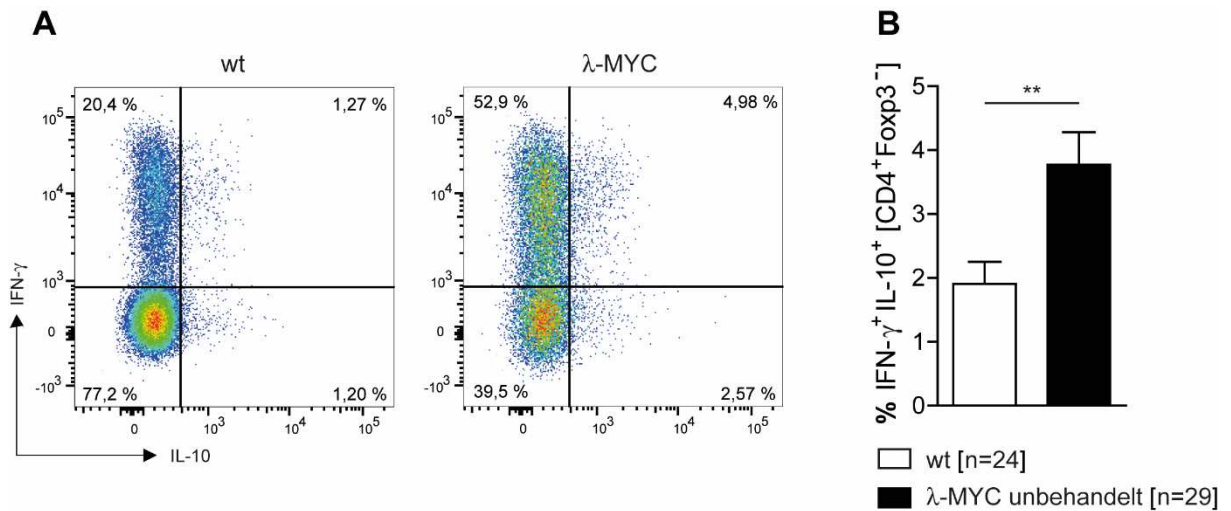


Abb. 7: A) Repräsentativer FACS-Dotplot zur Veranschaulichung der erhöhten Koexpression von IFN- γ und IL-10 in CD4⁺Foxp3⁻ Teff aus einer λ -MYC-Milz im Vergleich zu einer wt-Milz. B) Quantitative Analyse der IFN- γ /IL-10-koproduzierenden CD4⁺Foxp3⁻ Teff.

Da in λ -MYC-Tumoren über diese T-Zellsubpopulation nichts bekannt war, stellte sich die Frage, woher sie stammten. Wurden diese IFN- γ /IL-10-koproduzierenden Zellen *de novo* aus Th0-Zellen induziert oder stammten sie aus Th1-Zellen, die zusätzlich die IL-10-Expression hochregulierten und somit zu Tr1-Zellen konvertierten?

4.1.2 Phänotypisierung der IFN- γ ⁺IL-10⁺ T-Effektorzellen

Zur Untersuchung der Herkunft der IFN- γ ⁺IL-10⁺ T-Zell-Subpopulation erfolgte im nächsten Schritt daher eine phänotypische Charakterisierung dieser Zellen. Für die Th1-Differenzierung ist T-bet der wichtigste Transkriptionsfaktor, da dieser die Expression von IFN- γ , einem typischen Th1-Zytokin, fördert. Zudem wird nicht nur die Entstehung von Th1-Zellen gefördert, sondern auch die Entstehung von anderen T-Zelllinien unterdrückt. Ein Fehlen von T-bet hat eine inadäquate IFN- γ -Produktion zur Folge. (Lazarevic et al., 2013; Szabo et al., 2002; Thieu et al., 2008) Das ausgeschüttete IFN- γ wirkt autokrin und verstärkt die Expression von T-bet. Des Weiteren kann die Expression von T-bet auch unter Einfluss von IL-12 oder durch andere Faktoren induziert werden (Mullen et al., 2001; Yang et al., 2007).

IFN- γ ⁺IL-10⁺ Teff wurden daher zunächst auf die T-bet-Expression untersucht. Die durchflusszytometrische Analyse der Milzzellen kranker λ -MYC-Mäusen zeigte eine erhöhte T-bet-Expression nicht nur (wie erwartet) im IFN- γ ⁺IL-10⁻, sondern auch im IFN- γ ⁺IL-10⁺

Kompartiment (Abb. 8). Dieses Ergebnis deutete auf eine enge Verwandtschaft der IFN- γ ⁺IL-10⁺ T-Zell-Subpopulation mit den Th1-Zellen hin.

Des Weiteren wurde die T-Zell-Subpopulation noch auf die Expression der Transkriptionsfaktoren Eomesodermin und Blimp-1 (*B lymphocyte induced maturation protein-1*) untersucht, die nicht nur eine wichtige Rolle für die Induktion von IL-10 in Teff spielen (Gruarin et al., 2019; Neumann et al., 2014), sondern auch als wichtige Transkriptionsfaktoren für die Tr1-Differenzierung beschrieben wurden (Gruarin et al., 2019; Zhang et al., 2017). In der FACS-Analyse der Milzzellen kranker λ -MYC-Mäusen fiel auf, dass die Expression von Eomesodermin sowie Blimp-1 in IFN- γ -/IL-10-koproduzierenden Teff ebenfalls erhöht war (Abb. 8).

Diese Ergebnisse führten zu der Hypothese, dass es sich bei IFN- γ /IL-10-koproduzierenden CD4⁺Foxp3⁻ T-Zellen ursprünglich um Th1-Zellen handelte, die im Tumormilieu zusätzlich die IL-10-Expression hochregulierten und zu so genannten Tr1-Zellen differenzierten.

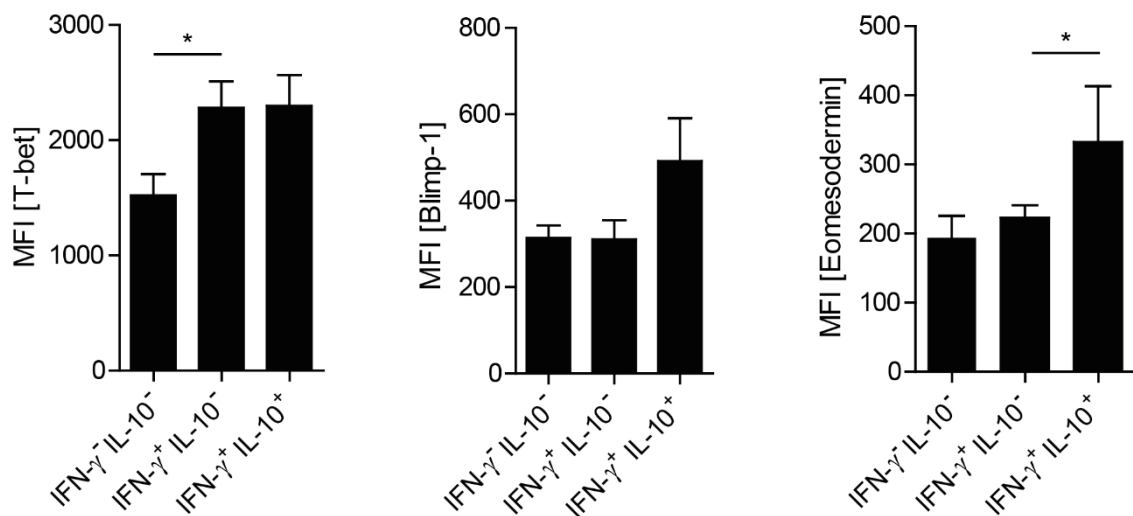


Abb. 8: Expression von Transkriptionsfaktoren T-bet, Blimp-1 und Eomesodermin in den IFN- γ ⁻IL-10⁻, IFN- γ ⁺IL-10⁻ und IFN- γ ⁺IL-10⁺ Fraktionen der intratumoralen CD4⁺Foxp3⁻ Teff, gezeigt in MFIs (mittlere Fluoreszenzintensität). Es wurden jeweils 8-13 λ -MYC-Mäuse untersucht.

4.2 Untersuchungen zum Mechanismus der Tr1-Induktion

Nachdem gezeigt worden war, dass IFN- γ ⁺IL-10⁺ Zellen höchstwahrscheinlich aus Th1-Zellen stammen, stellte sich die Frage, ob diese Umwandlung *in vitro* nachgewiesen werden kann. Hierfür sollte zunächst ein System etabliert werden, das es ermöglicht, IFN- γ /IL-10-koproduzierende Teff im immunsuppressiven Tumormilieu *in vitro* zu induzieren.

4.2.1 Etablierung eines Systems zur Tr1-Induktion

Um zu untersuchen, ob die *in vivo* beobachteten Veränderungen der Teff *in vitro* reproduziert werden können, wurden tumorspezifische T-Zellen einem immunsuppressiven Tumormilieu ausgesetzt, indem separierte Teff mit λ -MYC-Splenozyten koinkubiert wurden. Als Negativkontrolle erfolgte eine Koinkubation von T-Zellen mit wt-Splenozyten.

Für die Generierung von tumorspezifischen und potenziell tumorprotektiven T-Zellen wurden wt-Mäuse zwei Mal mit bestrahlten 291-Zellen, einer B-Zell-Lymphomzelllinie (generiert aus kranken λ -MYC-Mäusen), und dem Adjuvans CpG-Oligonukleotid 1668 immunisiert (s. Abschnitt 3.2.7). Hierbei stimuliert das CpG-Oligonukleotid 1668 als ein TLR-9-Agonist DCs, NK-Zellen und Makrophagen, die durch ihre Aktivierung die Th1-Immunantwort und die damit verbundene Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine, unter anderem IFN- γ , verstärken (Karapetyan et al., 2020; Kayraklioglu et al., 2021; Klinman, 2006). Durch eine derartige Immunisierung konnte nachweislich eine erhöhte IFN- γ -Expression in CD4⁺ Zellen detektiert werden. Zudem konnte im Rahmen von Vorversuchen gezeigt werden, dass eine Vakzinierung keinen Einfluss auf die IL-10-Expression nimmt, sodass die Zellen der immunisierten Mäuse für diesen Versuch geeignet sind (s. Abschnitt 3.2.7).

Nach der zweifachen Immunisierung der wt-Mäuse gemäß dem Injektionsschema (Abb. 4A) wurden sekundäre lymphatische Organe wie Milz und Lymphknoten entnommen und in Einzelzellsuspension aufbereitet. Danach erfolgte mittels magnetischer Separation eine Anreicherung von CD4⁺Foxp3⁻ Teff (s. Abschnitt 3.2.6.1). Damit die Teff in der Kokultur wieder detektiert werden konnten, wurden sie im Anschluss mit Cell Proliferation Dye (CPD) markiert. Um den Effekt des Lymphommilieus auf die IFN- γ -produzierenden Th1-Zellen zu untersuchen, wurden CPD⁺CD4⁺Foxp3⁻ Teff mit aus λ -MYC stammenden Milzzellen koinkubiert und mit anti-CD3/anti-CD28-Antikörpern stimuliert. Als Vergleich wurde in einer anderen Kavität eine Kokultur mit wt-Splenozyten angesetzt. Nach zweitägiger Inkubation im Brutschrank wurden die

Zellen geerntet und im FACS auf ihre IFN- γ - sowie IL-10-Expression untersucht. Damit in der Auswertung nur die Teff berücksichtigt werden, wurden dabei nur die CPD⁺ Zellen eingegrenzt. Hierbei fiel auf, dass die Teff sowohl in der IFN- γ IL-10⁺ als auch in der IFN- γ ⁺IL-10⁺ Fraktion im Vergleich zur Koinkubation mit wt-Splenozyten erhöht waren (Abb. 9B). Es konnte somit gezeigt werden, dass IFN- γ /IL-10-koexprimierende Zellen durch eine *In-vitro*- λ -MYC-Tumorexposition erfolgreich induziert werden konnten.

4.2.1.1 Effekte nach Zugabe eines IL-10-neutralisierenden Antikörpers

Es konnte *in vitro* die Entstehung von IFN- γ ⁺IL-10⁺ Teff im immunsuppressiven Tumormilieu verfolgt werden. Als Nächstes sollte nun untersucht werden, welche Faktoren die Veränderungen der Zytokinexpression vorantrieben.

Dem Zytokin IL-10 werden kontroverse Effekte zugeschrieben, die je nach Tumorentität die Tumorabwehr oder die tumorale Immunevasion begünstigen können (Mocellin et al., 2003; Saraiva et al., 2020). Im λ -MYC-Tumor scheint IL-10 eine tumorfördernde Funktion auszuüben. In kranken λ -MYC-Mäusen zeigten sich in Seren und Tumorüberständen erhöhte IL-10-Konzentrationen, intratumorale DCs hatten durch eine vermehrte IL-10-Produktion einen verringerten IL-12/IL-10-Quotienten, und es konnte ein erhöhter Anteil an intratumoralen Tregs mit hoher IL-10-Expression detektiert werden (Brenner, 2009; Naujoks et al., 2014; Riedel, 2013). IL-10 wurde zudem als treibendes Zytokin für die Differenzierung und Funktion der Tr1-Zellen beschrieben (Brockmann et al., 2017; Groux et al., 1997), weshalb ein Fehlen von IL-10 einen negativen Effekt auf die Entwicklung und die suppressive Aktivität dieser Zellen haben könnte.

Aufgrund des Stellenwerts von IL-10 im λ -MYC-Lymphommilieu sowie für die Tr1-Zellen wurde der oben beschriebene Versuch unter Zugabe von neutralisierenden anti-IL-10-mAk wiederholt. In der anschließenden FACS-Analyse zeigte sich ein signifikanter Rückgang der IFN- γ IL-10⁺ sowie IFN- γ ⁺IL-10⁺ Teff bei Koinkubation mit λ -MYC-Splenozyten im Vergleich zum Versuch ohne Zugabe von anti-IL-10-mAk (Abb. 9B). Daraus kann der Schluss gezogen werden, dass IL-10 für die Entstehung von Tr1-Zellen notwendig ist.

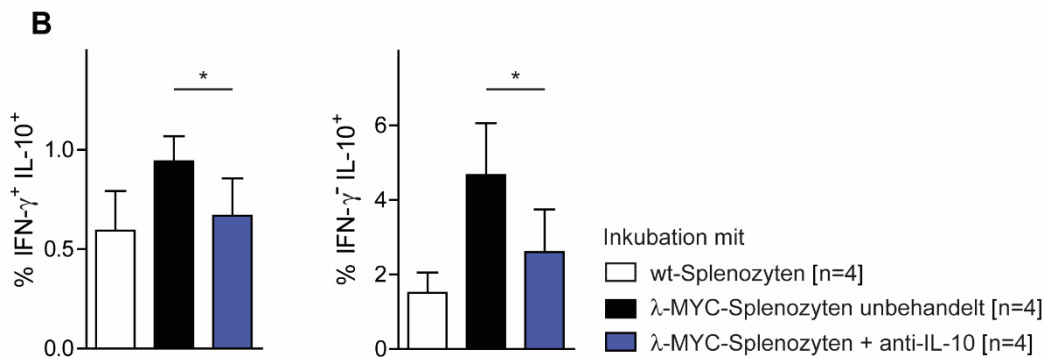
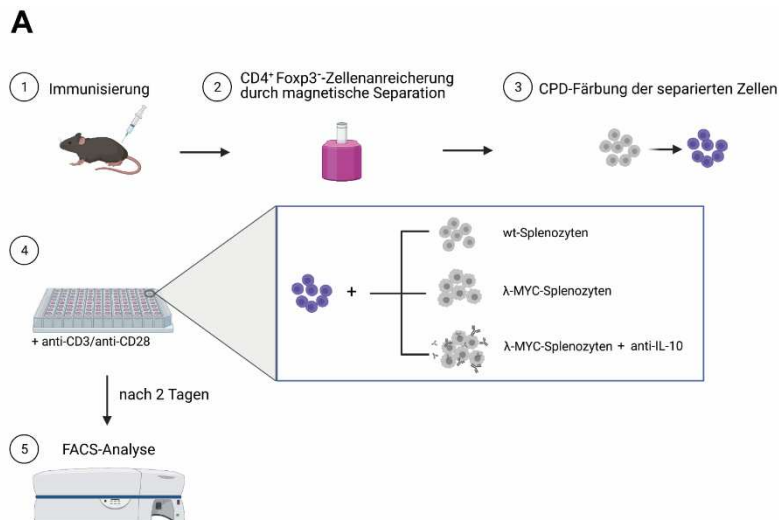


Abb. 9: Koinkubation von Teff mit wt- oder λ-MYC-Splenozyten. A) Versuchsaufbau B) Erhöhter Anteil der IFN-γ⁺IL-10⁺ sowie IFN-γ⁻IL-10⁺ Fraktion in den durch Immunisierung generierten Th1-Zellen nach Koinkubation mit λ-MYC-Splenozyten im Vergleich zur Inkubation mit wt-Splenozyten. Verminderung des Effekts bei Zugabe von anti-IL-10-mAk in die Kokultur.

4.2.2 Analyse der Konversion von Th1- zu Tr1-Zellen

Nachdem im vorherigen Abschnitt ein System etabliert werden konnte, mit dem *in vitro* die Entstehung IFN-γ/IL-10-koexprimierender Teff im immunsuppressiven λ-MYC-Tumormilieu verfolgt werden kann, sollte im nächsten Schritt gezeigt werden, dass die IFN-γ/IL-10-kopositiven Zellen einst IFN-γ⁺ Th1-Zellen waren und unter Einfluss von IL-10 zusätzlich die IL-10-Expression hochregulierten und so zur Entstehung IFN-γ/IL-10-kopositiver Tr1-Zellen führten. Hierzu wurde auf GREAT (IFN-γ reporter with endogenous polyA tail) Mäuse zurückgegriffen. Diese Tiere besitzen ein bicistronisches IFN-γ/IRES/YFP-Transgen, das zur Expression von IFN-γ zusammen mit dem

fluoreszierenden Protein YFP führt. Dies ermöglicht eine Isolierung von IFN- γ ⁺ Th1-Zellen über eine YFP-Detektion ohne vorherige Stimulation mit PMA/Ionomycin und intrazelluläre Färbung.

Der Versuchsaufbau ähnelt dem im Abschnitt 4.2.1. Die Mäuse erhielten zuvor eine Immunisierung mit bestrahlten 291-Lymphomzellen und CpG-Oligonukleotid 1668 im Abstand von 14 Tagen, bevor die Milz und die Lymphknoten für die weitere Verarbeitung entnommen wurden. Nach Aufbereitung der Einzelzellsuspension erfolgte zunächst eine Anreicherung von CD4⁺ Zellen mittels Magnetseparation und Markierung mit dem Lebend/Tot-Farbstoff. So konnten im Anschluss mithilfe von FACS über die Detektion von YFP lebende CD4⁺IFN- γ ⁺ Th1-Zellen isoliert werden. Die Ausbeute der gewünschten Zellpopulation lag bei 2 % des Zellgemisches, und die Zellen zeigten nach der FACS-Sortierung eine Reinheit von > 98 % (s. Abschnitt 3.2.6.2). Im nächsten Schritt erfolgte die Zusammenstellung der Kokultur aus CD4⁺IFN- γ ⁺ Th1-Zellen und λ -MYC- oder wt-Splenozyten. Um auch hier Aufschluss über den möglichen Einfluss von IL-10 auf die Tr1-Konversion zu erhalten, wurden in einer Kavität der Kokultur neutralisierende anti-IL-10-mAk zugesetzt.

Damit die sortierten Zellen im Abschnitt 4.2.1 in der Kokultur wieder gefunden werden konnten, wurden sie zuvor mit CPD markiert. Eine Markierung der sortierten Zellen mit CPD war nun aufgrund der geringen Ausbeute der Th1-Zellen nach der Sortierung keine Option, da es während des Zellmarkierungsprozesses mit CPD wegen der zytotoxischen Wirkung des Farbstoffs und der multiplen Waschgänge in der Regel zu einem Zellverlust von ca. 50 % kommt. Aus diesem Grund musste der Versuchsaufbau modifiziert werden: Anstelle von sortierten Th1-Zellen wurden wt-/ λ -MYC-Splenozyten mit CPD markiert, damit sie später in der FACS-Analyse von den Th1-Zellen unterschieden werden können. Im Rahmen von Vorversuchen konnte zuvor sichergestellt werden, dass T-Zellen und CD19⁺ B-Zellen in der wt-/ λ -MYC-Splenozytensuspension während der Koinkubation aufgrund ihrer Proliferation und dem damit verbundenen Verlust der Fluoreszenzintensität des CPD-Farbstoffs nicht fälschlicherweise in die CPD-negative Th1-Zellfraktion geraten (s. Abschnitt 3.2.8.3.2). Es konnten daher ohne Bedenken Kokulturen aus sortierten IFN- γ ⁺CD4⁺ T-Zellen und CPD⁺ Milzzellen aus λ -MYC- oder wt-Mäusen zusammengestellt und mit anti-CD3/anti-CD28-Antikörpern stimuliert werden. Nach zweitägiger Koinkubation wurden die Zellen geerntet und durchflusszytometrisch untersucht. Die Auswertung erfolgte durch Eingrenzung auf CPD⁺CD4⁺ Zellen und die Analyse derer IFN- γ - sowie IL-10-(Ko-)Expression. Sowohl bei der Koinkubation mit wt- als auch λ -MYC-Splenozyten blieb die IFN- γ -Expression in Th1-Zellen relativ unverändert. Die IL-10-Expression in Th1-Zellen hingegen wurde in Rahmen der Koinkubation induziert, wobei der Anteil in λ -MYC-Kokultur weitaus höher war als in Kokultur mit

wt-Zellen. Interessanterweise war in beiden Fällen die IL-10-Expression hauptsächlich in der IFN- γ ⁺ Fraktion zu sehen (Abb. 10B). Durch Zugabe von anti-IL-10-mAk in das λ -MYC-Tumormilieu ging die IL-10-Expression in Th1-Zellen auf einen ähnlichen Wert wie nach der Inkubation mit wt-Splenozyten zurück (Abb. 10C).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Tr1-Zellen im Tumormilieu aus IFN- γ -produzierenden Th1-Zellen durch die Induktion von IL-10 entstehen. Zudem ist für diese Konversion präexistierendes IL-10 notwendig, da sich eine Neutralisierung dieses Zytokins negativ auf die Entstehung von Tr1-Zellen auswirkte.

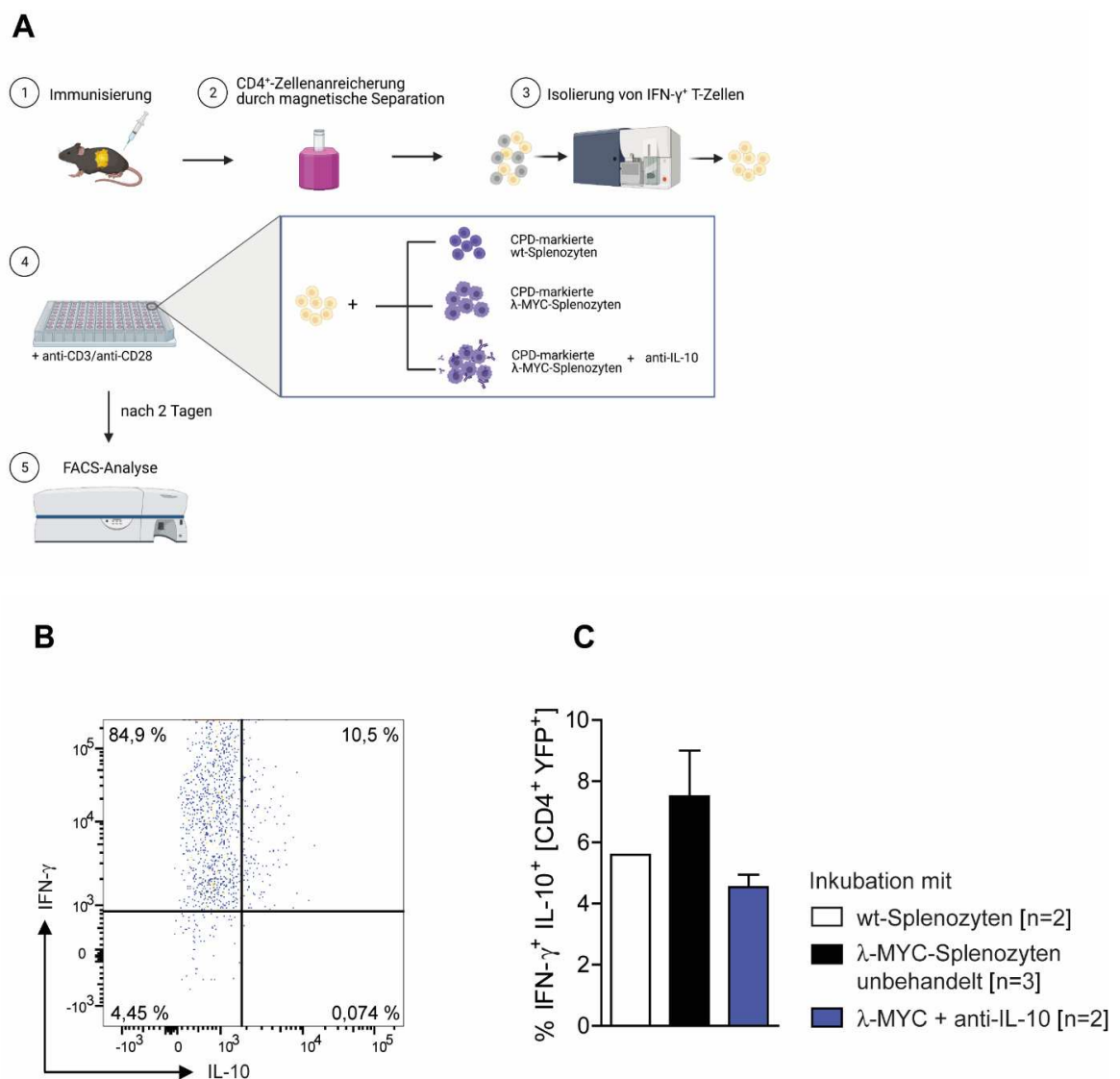


Abb. 10: Kokultur von IFN- γ ⁺ Th1-Zellen mit wt- oder λ -MYC-Splenozyten. A) Versuchsaufbau. B) Exemplarisches FACS-Bild zur Veranschaulichung der hohen IL-10- (Ko-)Expression in CD4⁺IFN- γ ⁺ Th1-Zellen nach Inkubation mit λ -MYC-Splenozyten. C) Anteil von IFN- γ ⁺/IL-10⁺ Teff nach Koinkubation mit wt- und λ -MYC-Splenozyten sowie nach Zusatz von anti-IL-10-mAk.

4.3 Einfluss von anti-IL-10 auf die PD-1-Expression

Im Tumormilieu geraten T-Zellen durch die chronische Aktivierung von T-Zellrezeptoren in einen Erschöpfungszustand. Dieser ist durch die hohe Expression verschiedenster Erschöpfungsmarker gekennzeichnet, unter anderem durch eine Hochregulierung von PD-1. Riedel (2013) konnte zum einen zeigen, dass der Anteil PD-1-positiver Teff in kranken λ -MYC-Mäusen im Vergleich zu wt-Mäusen signifikant erhöht war und zum anderen, dass die IL-10-Expression mit der von PD-1 *in vivo* korrelierte. Abgesehen von einer Zunahme verschiedenster inhibierender Rezeptoren wie PD-1 zeichnet sich eine Erschöpfung der T-Zellen auch durch ein reduziertes Proliferationsvermögen aus (Duraiswamy et al., 2013; Jiang et al., 2015; Xia et al., 2019). Daher stand die Frage im Raum, ob diese beobachteten Veränderungen durch eine IL-10-Neutralisierung rückgängig gemacht werden können.

Hierfür wurden die Experimente mit dem gleichen Versuchsaufbau wie im Abschnitt 4.2.1 (Abb. 9A) durchgeführt. Nach zweitägiger Inkubation mit λ -MYC-Splenozyten wurden die Proliferation der CD4⁺Foxp3⁻ Teff anhand der Verdünnung des CPD-Farbstoffs und die Expression von PD-1 durchflusszytometrisch analysiert. Auf der Oberfläche der Teff, die einem Tumormilieu ausgesetzt waren, konnte im Gegensatz zur Kokultur mit wt-Splenozyten (wie erwartet) deutlich mehr PD-1 detektiert werden. Durch Zugabe von neutralisierenden anti-IL-10-mAk in die Kokultur kam es zu einem Rückgang der PD-1-Expression (Abb. 11A und Abb. 11B). Dies könnte ein Hinweis sein, dass IL-10 an der Hochregulation von PD-1 mitbeteiligt ist. Die Proliferation der Teff aus der Kokultur mit λ -MYC-Splenozyten war geringer als die aus der Vergleichskokultur mit wt-Zellen. Unter Zugabe von anti-IL-10-mAk kam es jedoch nicht zu einer relevanten Besserung der Proliferation (Abb. 11C).

A

Inkubation mit

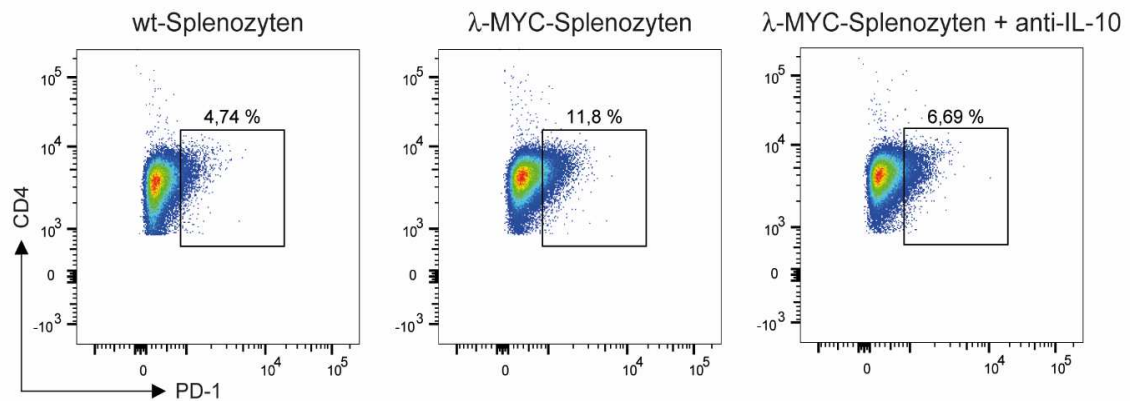
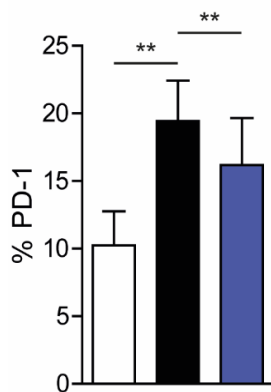
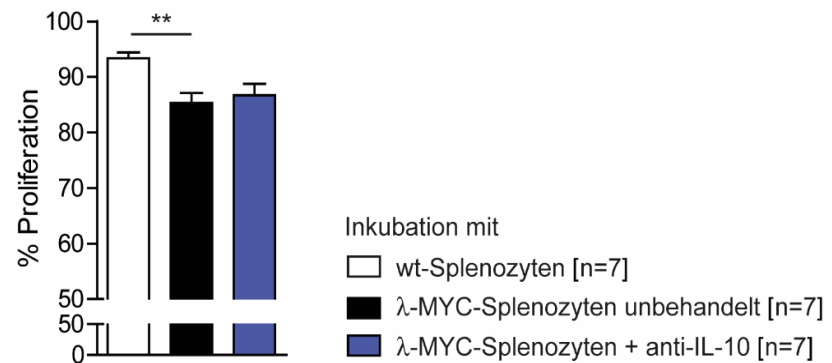
**B****C**

Abb. 11: A) Beispielhafte FACS-Bilder zur Veranschaulichung der PD-1-Expression auf $CD4^+Foxp3^-$ Teff nach Koinkubation mit wt- oder λ -MYC-Splenocyten und nach Zusatz von anti-IL-10-mAk. B) Quantifizierung der PD-1-Expression der $CD4^+Foxp3^-$ Teff C) Quantifizierung der Proliferation der $CD4^+Foxp3^-$ Teff nach Koinkubation mit wt- oder λ -MYC-Splenocyten und nach Zusatz von anti-IL-10-mAk.

4.4 Effekte einer anti-IL-10-Behandlung *in vivo*

Die bisher angeführten Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine effektive Th1-Antwort im λ -MYC-Tumormodell durch IL-10 verhindert wird und dass eine Neutralisation von IL-10 die Antitumorantwort fördern könnte. Um das zu überprüfen, wurde ein anti-IL-10-Therapieversuch *in vivo* durchgeführt. Klinisch inapparenten λ -MYC-Mäusen wurden am 55., 65., 75. sowie 85. Tag nach der Geburt jeweils 100 μ g anti-IL-10-mAk i.p. injiziert. Verglichen mit unbehandelten Tumormäusen (Kontrollgruppe) führte eine anti-IL-10-Behandlung zu einer signifikanten Überlebensverlängerung der λ -MYC-Tiere (Bauer, 2022; Ma et al., 2021). Um zu untersuchen,

welche Auswirkungen eine IL-10-Neutralisationstherapie auf den Phänotyp der T-Zellen in λ -MYC-Mäusen hatte, wurden behandelten Tieren zum Zeitpunkt einer klinisch apparenten Krankheitserscheinung Milzen entnommen und mittels FACS untersucht. Im Einklang mit den *In-vitro*-Ergebnissen zeigten intratumorale Tef aus behandelten Mäusen im Gegensatz zur unbehandelten Kontrollgruppe eine Abnahme der PD-1- und IL-10-Expression sowie einen Rückgang IFN- γ /IL-10-koexprimierender Tr1-Zellen (Abb. 12).

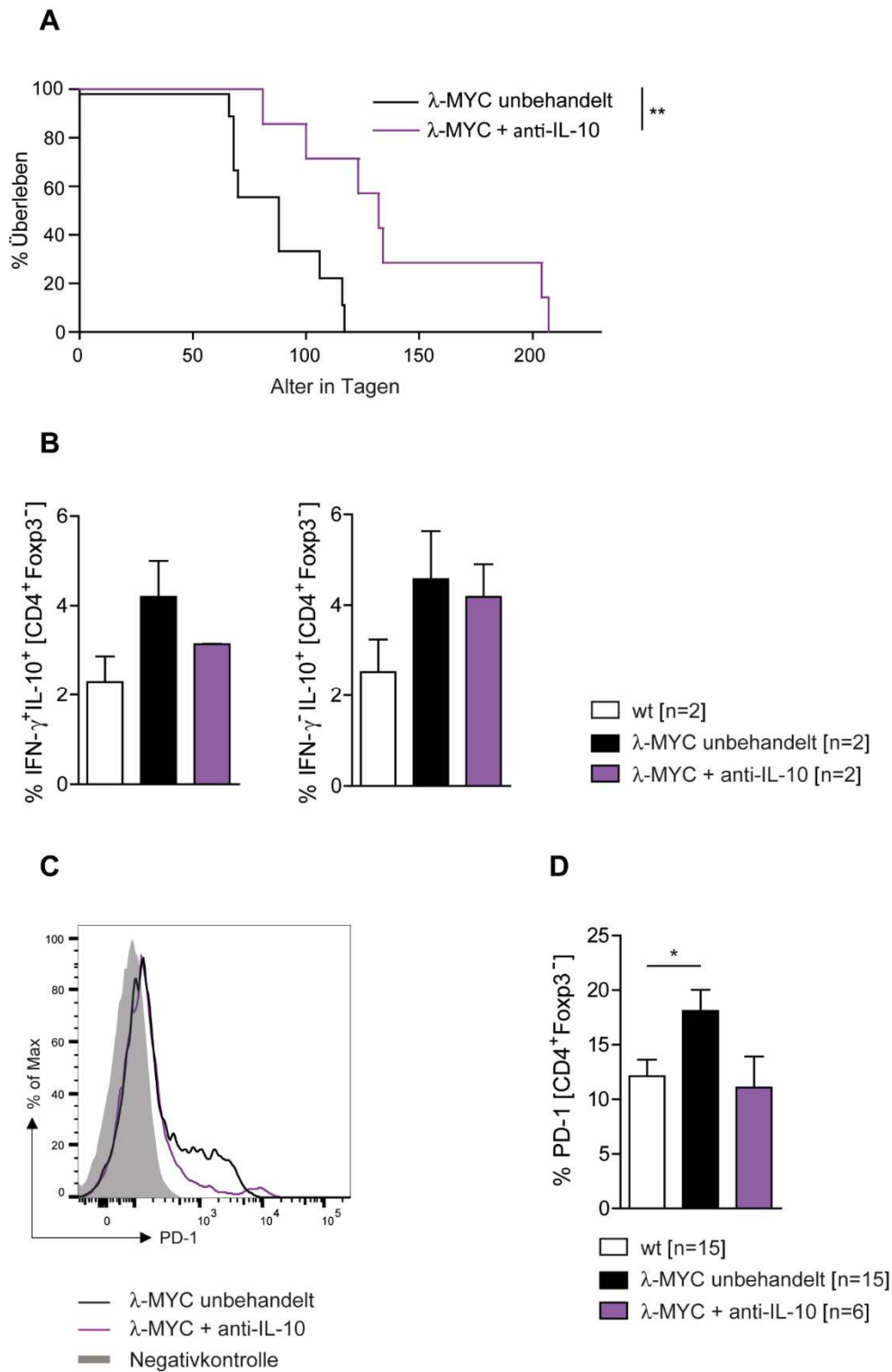


Abb. 12: Effekte einer *In-vivo*-anti-IL-10-Therapie. A) Signifikant verbessertes Überleben der λ -MYC-Mäuse nach einer anti-IL-10-Therapie (lila) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (schwarz), dargestellt im Kaplan-Meier-Diagramm (Abb. aus Ma et al. (2021)) B) Gegenüberstellung der $\text{IFN-}\gamma^+\text{IL-10}^+$ und $\text{IFN-}\gamma^-\text{IL-10}^+$ Fraktion der $\text{CD4}^+\text{Foxp3}^-$ Teff aus wt- und λ -MYC-Mäusen mit und ohne anti-IL-10-Therapie. C) Repräsentatives Histogramm zur Veranschaulichung der verminderten PD-1-Expression in einer λ -MYC-Maus nach anti-IL-10-Behandlung (lila) im Vergleich zu einer unbehandelten λ -MYC-Maus (schwarz). Die graue Fläche stellt die Negativkontrolle (FMO) dar. D) Anteil PD-1-positiver $\text{CD4}^+\text{Foxp3}^-$ Teff, zusammengefasst aus allen analysierten Daten.

5 DISKUSSION

Die von Tumorzellen benutzten Immunevasionsstrategien hindern das Immunsystem daran, eine effektive antitumorale Immunantwort zu entwickeln. Um die Vorgänge einer Immunreaktion und die Auswirkungen auf die Immunzellen aufzudecken, wurde in der vorliegenden Arbeit das endogene λ -MYC-Lymphommodell herangezogen (Kovalchuk et al., 2000). Im Gegensatz zu transplantierten Tumormodellen, bei denen die ausgelöste Immunantwort eher der nach einer (Virus-) Infektion ähnelt, bietet das λ -MYC-Lymphommodell ein besseres Abbild der Tumorgenese und Interaktion der entarteten Zellen mit dem Immunsystem (Brenner et al., 2010; Mocikat et al., 2003). Die transgenen Mäuse dieses Tumormodells durchlaufen einzelne Krankheitsstadien und geben somit die klinische Situation genauer wieder. In vorangegangenen Arbeiten konnten anhand dieses Lymphommodells bereits einige Immunevasionsmechanismen identifiziert werden. Im Laufe der Tumorprogression zeigten sich NK-Zellen in ihrer IFN- γ -Produktion eingeschränkt (Brenner et al., 2010), in DCs wurde ein Ungleichgewicht der Zytokinproduktion zugunsten von IL-10 detektiert (Naujoks et al., 2014), eine erhöhte Expression von koinhibitorischen Rezeptoren wie CTLA-4 und PD-1 auf Immunzellen wurde nachgewiesen und die immunregulatorische Rolle von Foxp3⁺ Tregs wurde dargestellt (Ahmetlić, 2018; Riedel, 2013). Trotz progressiver Einschränkung der Effektorfunktionen der NK-Zellen und DCs, die essenziell für eine Th1-Polarisierung sind, ergab eine Analyse von intratumoralen T-Zellen wider Erwarten eine erhöhte Expression von IFN- γ . Zudem zeigte sich eine T-Zellsubpopulation, die IFN- γ und IL-10 koproduzierte. Da über diese T-Zellsubpopulation bisher nichts bekannt war, wurde diese im Rahmen dieser Arbeit genauer untersucht.

5.1 Charakterisierung von IFN- γ /IL-10-koproduzierenden T-Zellen

Obwohl es sehr erstaunlich ist, dass IFN- γ in T-Zellen trotz eingeschränkter Effektorfunktion der NK-Zellen und DCs weiterhin in großen Mengen exprimiert wird, könnte dieses Phänomen dadurch erklärt werden, dass T-Zellen im frühen Krankheitsstadium von NK-Zellen aktiviert wurden. In der Anfangsphase der Tumorerkrankung kommt es nämlich zu einer starken Aktivierung der NK-Zellen und zu einer vermehrten Sekretion von IFN- γ , die im Spätstadium nicht mehr beobachtet werden konnte (Brenner et al., 2010). Eine weitere Möglichkeit einer Th1-Differenzierung besteht in der TCR-Stimulation. Ahmetlić et al. (2019) konnten Lymphom-assoziierte Antigene im λ -MYC-Tumor identifizieren, die mittels TCR erkannt wurden und zu einer Proliferation der Tregs und Teff führten. Die permanente intratumorale Stimulation führt aber auch zu einer Erschöpfung, denn

intratumorale T-Zellen konnten keine immunüberwachende Funktion ausüben (Riedel, 2013). Die simultane Hochregulation von PD-1 und IL-10 auf T-Zellen spiegeln den Erschöpfungszustand wider.

Die phänotypische Charakterisierung der intratumoralen CD4⁺Foxp3⁻ Teff zeigte nicht nur eine erhöhte Expression von T-bet in IFN- γ ⁺ Teff, sondern auch eine fast identisch hohe Expression in IFN- γ /IL-10-koproduzierenden Teff. T-bet ist bekannt als wichtigster Transkriptionsfaktor für die Differenzierung von Th1-Zellen, da es an dem IFN- γ -Promotor bindet und somit verantwortlich für die Produktion von IFN- γ , einem charakteristischen Th1-Zytokin, ist (Szabo et al., 2000). Obwohl in der Vergangenheit angenommen wurde, dass T-bet Th1-spezifisch vorkommt, konnte dies in zahlreichen Untersuchungen mittlerweile widerlegt werden. Eine T-bet-Expression wurde unter anderem auch in NKs, DCs und CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen und spielt für die Entwicklung und Funktion dieser Zellen eine wichtige Rolle (Lazarevic et al., 2013). Durch seine Relevanz im angeborenen und adaptiven Immunsystem scheint T-bet eine viel größere Bedeutung zu haben als ursprünglich vermutet. Nichtsdestoweniger bleibt T-bet ein bedeutender Transkriptionsfaktor für die Th1-Polarisierung. Es war daher nicht überraschend, dass IFN- γ ⁺ Teff eine erhöhte T-bet-Expression aufwiesen. Eine erhöhte Expression dieses Transkriptionsfaktors in IFN- γ /IL-10-koproduzierenden Teff ließ die unmittelbare Verwandtschaft dieser Zellen mit Th1-Zellen vermuten (s. Abschnitt 4.1.2). Zudem wurde eine vermehrte Expression von T-bet infolge einer TCR-Stimulation beobachtet (Szabo et al., 2000), was gegebenenfalls auch zum Teil die hohe Expression von T-bet in IFN- γ /IL-10-koproduzierenden T-Zellen erklären könnte.

Weitere untersuchte Transkriptionsfaktoren waren Blimp-1 und Eomesodermin. Blimp-1 ist hauptverantwortlich für die IL-10-Produktion in Th1-Zellen (Neumann et al., 2014). Weiters wurde beschrieben, dass Eomesodermin zusammen mit Blimp-1 bei der IL-10-Expression in Tr1-Zellen involviert ist (Zhang et al., 2017). Einige Untersuchungen hatten gezeigt, dass Eomesodermin als Tr1-Zelllinie-definierender Transkriptionsfaktor dienen könnte. In Eomesodermin-defizienten CD4⁺ T-Zellen konnte eine Reduktion der Tr1-Zellen festgestellt werden. Durch die Bindung an den IL-10- und IFN- γ -Promotor sorgt Eomesodermin für die Aktivierung der Expression beider Zytokine. Außerdem unterdrückt Eomesodermin die Differenzierung anderer T-Zelllinien (Gruarin et al., 2019; Roessner et al., 2021; Zhang et al., 2017). Im λ -MYC-Modell konnte in der IFN- γ /IL-10-koproduzierenden T-Zellpopulation eine erhöhte Expression von Blimp-1 und Eomesodermin nachgewiesen werden (s. Abschnitt 4.1.2). Somit passt die untersuchte IFN- γ /IL-10-koproduzierende T-Zellpopulation phänotypisch zu Tr1-Zellen, zumal auch T-bet zusammen mit Eomesodermin Einfluss auf die IFN- γ -Expression in Tr1-Zellen hat. Bei Tr1-Zellen handelt es sich um eine sehr heterogene Zelllinie, die auf molekularer Ebene nur rudimentär untersucht worden ist. Gemäß der Standarddefinition werden mit Tr1-Zellen alle CD4⁺ Zellen

bezeichnet, die im Stande sind, IL-10 zu produzieren, und immunsuppressive Eigenschaften aufweisen. Der Begriff wird jedoch nicht einheitlich verwendet, andere Autoren beschrieben diese Zellen beispielsweise auch als IL-10-produzierende Th1-Zellen (Jankovic et al., 2007).

5.2 Konversion von Th1- zu Tr1-Zellen im immunsuppressiven Tumormilieu

Es ist bekannt, dass Th1-Zellen die IL-10-Produktion hochfahren können. Jankovic et al. (2007) konnten zeigen, dass IFN- γ /IL-10-koproduzierende T-Zellen im Rahmen einer Protozoeninfektion aus Th1-Zellen entstehen. Auch hier zeigte die untersuchte T-Zellsubpopulation einen T-bet⁺ Phänotyp und deutete somit auf Th1-Zellen hin. Die Zellen wurden jedoch als IL-10-produzierende Th1-Zellen bezeichnet.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein *In-vitro*-System etabliert, in dem die Hochregulation von PD-1 und die Induktion von IFN- γ /IL-10-koproduzierenden Teff im Tumormilieu verfolgt werden konnten (s. Abschnitt 4.2.1). Der endgültige Beweis für eine Entstehung von Tr1-Zellen aus Th1-Zellen wurde geliefert, nachdem gezeigt werden konnte, dass reine IFN- γ -produzierende Th1-Zellen im λ -MYC-Lymphommilieu die Expression von IL-10 hochregulierten und zu IFN- γ /IL-10-koproduzierenden T-Zellen wurden. Dieser Vorgang kann als gegenregulatorische Maßnahme einer Th1-Immunantwort gesehen werden, die mit einer Hochregulation von IL-10 und PD-1 einhergeht (O'Garra & Vieira, 2007).

In Zusammenschau der phänotypischen Charakterisierung und der Ergebnisse aus den *In-vitro*-Versuchen kann bei der IFN- γ /IL-10-koproduzierenden T-Zellpopulation von Tr1-Zellen ausgegangen werden, einer Zellpopulation, die aufgrund ihrer immunregulatorischen Eigenschaften immer mehr Aufmerksamkeit erhält. Tr1-Zelltherapien kommen bereits in einigen klinischen Studien bei Behandlung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und Graft-versus-Host-Erkrankungen (GvHD) nach Transplantationen zum Einsatz (Bacchetta et al., 2014; Desreumaux et al., 2012; Mfarrej et al., 2017).

Aufgrund ihrer immunsuppressiven Eigenschaften spielen Tr1-Zellen auch im Hinblick auf die Immunevasion eine besondere Rolle, da sie nicht nur unkontrollierte, sondern auch antitumorale Immunreaktionen unterdrücken können. Im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom und Kolorektalkarzinom korrelierten Eomesodermin⁺ Tr1-Zellen invers mit dem Überleben der Patienten. In Melanom-Patienten konnte die Anzahl der intratumoralen Tr1-Zellen zur Vorhersage

des Therapieansprechens einer Checkpoint-Inhibitor-Therapie mit anti-PD-1 herangezogen werden. Der genaue Mechanismus dahinter ist derzeit jedoch noch unklar. (Bonnal et al., 2021)

Im Gegensatz dazu wurde ebenfalls von einer immunüberwachenden Rolle der Tr1-Zellen in chronisch-lymphatischen Leukämien (CLL) berichtet (Roessner et al., 2021). So scheinen Tr1-Zellen - genau wie IL-10 - je nach Tumorentität eine tumorfördernde oder -protektive Funktion einzunehmen. Da in Anbetracht aller bereits beschriebenen Mechanismen im λ -MYC-Tumormodell IL-10 eine tumorfördernde Funktion einnimmt und IL-10 ein Hauptzytokin von Tr1-Zellen ist, liegt die Vermutung nahe, dass Tr1-Zellen in λ -MYC-Tumoren zur Tumorimmunesvasion beitragen. Im λ -MYC-Tumor konnte gezeigt werden, dass in kranken Tumormäusen signifikant mehr IFN- γ /IL-10-kopositive Tr1-Zellen vorhanden waren (s. Abschnitt 4.1.1). Eine IL-10-Neutralisationstherapie führte zum Rückgang dieser T-Zellpopulation. Es ist daher denkbar, dass eine solche Immuntherapie die immunsuppressive Wirkung von Tr1-Zellen eindämmen könnte.

Auch wenn IL-10 ein charakteristisches Zytokin der Tr1-Zellen ist, sind widersprüchliche Aussagen im Hinblick auf den Stellenwert von IL-10 in der Tr1-Zelldifferenzierung in der Literatur zu finden. Während manche Autoren der Meinung sind, dass IL-10 die Entstehung von Tr1-Zellen fördere (Brockmann et al., 2017; Groux et al., 1997; Levings et al., 2005), gehen andere davon aus, dass das Zytokin TGF- β dafür verantwortlich sei (Maynard et al., 2007). TGF- β ist ein Zytokin, dessen Dysregulation in der Tumorimmunologie von besonderer Bedeutung ist: Während TGF- β im Frühstadium eine immunüberwachende Funktion ausübt, fördert es im Spätstadium die Tumorprogression und Metastasenbildung (Akhurst & Derynck, 2001). Welchen Stellenwert TGF- β im λ -MYC-Modell hat, ist derzeit unklar. In früheren Arbeiten wurde in Seren tumortragender λ -MYC-Mäuse und intrazellulär in Tregs im Vergleich zu wt-Mäusen weniger TGF- β festgestellt (Brenner, 2009). Es konnte jedoch in intratumoralen DCs kranker λ -MYC-Mäuse vermehrt TGF- β detektiert werden, was sicherlich einen wesentlichen Beitrag zur Immunsuppression leistet (Naujoks, 2011).

5.3 Möglicher Einsatz von anti-IL-10-Antikörpern in der Lymphomtherapie

IL-10 wurde initial als ein immunsuppressives Th2-Zytokin beschrieben, das eine Th1-Immunantwort inhibiert (Fiorentino et al., 1989). Heute weiß man, dass eine Vielzahl an Immunzellen zur IL-10-Sekretion fähig sind (Ouyang & O'Garra, 2019; Saraiva & O'Garra, 2010). Aufgrund seiner antiinflammatorischen Eigenschaften trägt das Zytokin entscheidend zur Selbsttoleranz und Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase bei. Bezüglich der Funktion von

IL-10 in malignen Neoplasien gibt es widersprüchliche Befunde. Es scheint, dass IL-10 je nach Tumorentität entweder eine tumorfördernde oder eine tumorprotektive Rolle ausübt. (Mocellin et al., 2003; Saraiva et al., 2020)

Im λ -MYC-Tumoren kommt es im Laufe der Tumorprogression zu einer Zunahme von IL-10: In den Tumorüberständen und Seren kranker tumortragender λ -MYC-Mäuse hatte sich eine erhöhte IL-10-Konzentration gezeigt (Brenner, 2009), in intratumoralen Tregs war eine vermehrte Produktion von IL-10 zu finden (Riedel, 2013) und auch die DCs zeigten ein verändertes Zytokinprofil zugunsten von IL-10 (Naujoks, 2011). Intratumorale T-Zellen befanden sich in einem Erschöpfungszustand, der sich unter anderem in einer erhöhten PD-1-Expression widerspiegelte. Eine Korrelation zwischen PD-1- und IL-10-Expression in T-Zellen wurde ebenfalls festgestellt (Riedel, 2013). Alle Beobachtungen deuten auf einen tumorfördernden Effekt von IL-10 im λ -MYC-Lymphommodell hin. Ein weiterer Hinweis hierfür wurde geliefert, nachdem *in vitro* gezeigt werden konnte, dass IL-10 in der Differenzierung von Th1-Zellen zu Tr1-Zellen involviert war und die PD-1-Expression auf T-Zellen förderte (s. Abschnitt 4.2.2 und 4.3). Der letztliche Beweis für die wesentliche Rolle von IL-10 in der Tumorevasion im λ -MYC-Tumor konnte durch eine anti-IL-10-Neutralisationstherapie geliefert werden. Nach einer anti-IL-10-Behandlung zeigten λ -MYC-Mäuse einen signifikanten Überlebensvorteil gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe (Ma et al., 2021). Der Rückgang der Tr1-Zellen sowie der PD-1-Expression auf Teff, der bereits *in vitro* beobachtet wurde, konnte auch im Rahmen einer IL-10-Neutralisationstherapie *in vivo* reproduziert werden. Zudem profitierten einige Immunzellen, die an der antitumoralen Immunantwort beteiligt sind, von einer solchen Therapie: CD8⁺ T-Zellen sowie CD4⁺Foxp3⁻ Teff zeigten eine verbesserte Proliferation; bei NK-Zellen konnte eine Expansion mit erhöhter IFN- γ -Expression detektiert werden. (Bauer, 2022; Ma et al., 2021)

Positive Effekte einer IL-10-Blockade konnten bereits in anderen Tumorentitäten wie Ovarialkarzinomen oder CLL gezeigt werden. Im murinen Modell dieser Tumoren konnte im Gegensatz zum λ -MYC-Tumor durch eine alleinige anti-IL-10-Neutralisationstherapie kein (ausreichender) therapeutischer Effekt erzielt werden. Ein verbessertes Therapieansprechen mit einem Überlebensvorteil konnte erst mit einer zusätzlichen PD-1-Blockade erreicht werden. (Lamichhane et al., 2017; Rivas et al., 2021)

Die Tatsache, dass λ -MYC-Mäuse infolge einer Monotherapie mit anti-IL-10-mAk ein signifikant verlängertes Überleben zeigten, deutet auf das therapeutische Potenzial einer IL-10-Blockade in B-Zelllymphomen hin. Für B-Zellen ist IL-10 ein wichtiges Zytokin für das Überleben sowie für die Proliferation und die Differenzierung zu Plasmazellen (Levy & Brouet, 1994; Rousset et al., 1992).

Es ist daher wenig überraschend, dass auf CD19⁺ B-Zellen der λ-MYC-Mäuse an allen Tumormanifestationsorten (Milz, Lymphknoten, Thymus und Blut) IL-10-Rezeptoren zu finden waren und eine *In-vitro*-Neutralisation von IL-10 zur Abnahme des Anteils lebender B-Zellen führte. (Bauer, 2022)

Der Einsatz von anti-IL-10-mAk hat nicht nur positiven Einfluss auf die Immunzellen, sondern übt auch eine direkte Wirkung auf die Tumorzellen aus, was die hohe Wirksamkeit dieser Therapie im Vergleich zu anderen Tumorentitäten erklären könnte.

5.4 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte im λ-MYC-Lymphommodell eine phänotypische Charakterisierung sowie eine Untersuchung zur Entstehung der Tr1-Zellen. Da in einigen Tumorentitäten eine Korrelation zwischen Eomesodermin-positiven Tr1-Zellen und Tumorprogression festgestellt wurde (Bonnal et al., 2021), kann diese T-Zellpopulation in der Immuntherapie von besonderem Interesse sein. Es konnte gezeigt werden, dass präexistentes IL-10 für die Konversion von Th1- zu Tr1-Zellen notwendig ist und die Hochregulation von PD-1 auf T-Zellen fördert. Eine IL-10-Neutralisationstherapie führte zum Rückgang von IFN- γ ⁺IL-10⁺ sowie PD-1⁺ T-Zellen und weist auf das Potenzial vom Einsatz einer anti-IL-10-Therapie bei Lymphomen hin.

Dennoch bedarf es weiterer Forschung zur Beantwortung einiger offenstehender Fragen:

- Ist eine Tr1-Konversion neben IL-10 auch auf Zellkontakte angewiesen? Hierfür kann der Versuch vom Abschnitt 4.4.2 beispielsweise in einem Doppelkammersystem, das eine Zell-Zell-Interaktion verhindert, wiederholt werden.
- Wie würde sich ein IL-10-Knockout in λ-MYC-Mäusen auf die Entstehung von Tr1-Zellen auswirken?
- Im Gegensatz zu λ-MYC-Tumoren konnte in manchen Tumorentitäten ein verbessertes Überleben erst durch eine Kombinationstherapie von anti-IL-10 mit anti-PD-1 erreicht werden. Kann der Überlebensvorteil einer IL-10-Neutralisationstherapie bei Lymphomen durch eine Kombination mit dem Immuncheckpoint-Inhibitor anti-PD-1 verstärkt werden?
- Über die Effektivität und die Auswirkungen auf etliche Immunzellen infolge einer kombinierten Immunblockadetherapie mit anti-PD-1/anti-CTLA-4 ist schon Einiges bekannt (s. Ahmetlić et al., 2021; Bauer et al., 2021; Scheuerpflug et al., 2021). Welchen Effekt hat eine solche Immuntherapie jedoch auf die Tr1-Zellen?

6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

APCs	Antigen-präsentierende Zellen
BCR	B-Zell-Rezeptor
Blimp-1	<i>B lymphocyte induced maturation protein-1</i>
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAR	chimärer Antigenrezeptor
CD	Cluster of Differentiation
CPD	Cell Proliferation Dye
CTL	Zytotoxische T-Zellen
CTLA-4	Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Protein 4
DCs	Dendritische Zellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FKS	Fetales Kälberserum
FMO	Fluorescence Minus One
Foxp3	forkhead box protein
GREAT	IFN- γ reporter with endogenous polyA tail
GvHD	Graft-versus-Host Erkrankungen
HLA	Humane Leukozytenantigene
i.p.	intraperitoneal
IFN- γ	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IL-10	Interleukin-10
LAG3	lymphocyte-activation gene 3
LK	Lymphknoten
mAk	monoklonalen Antikörper
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Major Histocompatibility Complex
NHL	Non-Hodgkin-Lymphome
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PAMPs	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBS	Phosphate Buffered Saline
PD-1	Programmed Cell Death Protein 1
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PRR	Pattern Recognition Receptor
TAA	Tumor-assoziierte Antigene
TCR	T-Zell-Rezeptor
Teff	T-Effektorzelle
TGF	Transforming Growth Factor
Th	T-Helferzelle
TIM-3	T-cell immunglobulin and mucin-domain containing
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
Tr1	T regulatory type 1 cells
Treg	regulatorische T-Zellen
wt	Wildtyp
YFP	yellow fluorescence protein
z.B.	zum Beispiel

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Abbas, A. K., Murphy, K. M., & Sher, A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, *383*(6603), 787–793.
- Ahmetlić, F. (2018). Mechanismen der Tumorthherapie mit Immunkontrollpunkt-Inhibitoren: Rolle von T-Zell-Aktivierung und zellulärer Seneszenz. *Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München*.
- Ahmetlić, F., Fauser, J., Riedel, T., Bauer, V., Flessner, C., Hömberg, N., Hennel, R., Brenner, E., Lauber, K., Röcken, M., & Mocikat, R. (2021). Therapy of lymphoma by immune checkpoint inhibitors: the role of T cells, NK cells and cytokine-induced tumor senescence. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, *9*(1).
- Akhurst, R. J., & Derynck, R. (2001). TGF-beta signaling in cancer-a double-edged sword. *Trends in Cell Biology*, *11*(11), S44-51.
- ar-Rushdi, A., Nishikura, K., Erikson, J., Watt, R., Rovera, G., & Croce, C. M. (1983). Differential expression of the translocated and the untranslocated c-myc oncogene in Burkitt lymphoma. *Science (New York, N.Y.)*, *222*(4622), 390–393.
- Armitage, J. O., Gascoyne, R. D., Lunning, M. A., & Cavalli, F. (2017). Non-Hodgkin lymphoma. *Lancet (London, England)*, *390*(10091), 298–310.
- Bacchetta, R., Bigler, M., Touraine, J. L., Parkman, R., Tovo, P. A., Abrams, J., de Waal Malefyt, R., de Vries, J. E., & Roncarolo, M. G. (1994). High levels of interleukin 10 production in vivo are associated with tolerance in SCID patients transplanted with HLA mismatched hematopoietic stem cells. *The Journal of Experimental Medicine*, *179*(2), 493–502.
- Bacchetta, R., Lucarelli, B., Sartirana, C., Gregori, S., Lupo Stanghellini, M. T., Miqueu, P., Tomiuk, S., Hernandez-Fuentes, M., Gianolini, M. E., Greco, R., Bernardi, M., Zappone, E., Rossini, S., Janssen, U., Ambrosi, A., Salomoni, M., Peccatori, J., Ciceri, F., & Roncarolo, M.-G. (2014). Immunological Outcome in Haploidentical-HSC Transplanted Patients Treated with IL-10-Anergized Donor T Cells. *Frontiers in Immunology*, *5*, 16.
- Barber, D. L., Wherry, E. J., Masopust, D., Zhu, B., Allison, J. P., Sharpe, A. H., Freeman, G. J., & Ahmed, R. (2006). Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature*, *439*(7077), 682–687.
- Bauer, V., Ahmetlić, F., Hömberg, N., Geishauser, A., Röcken, M., & Mocikat, R. (2021). Immune checkpoint blockade impairs immunosuppressive mechanisms of regulatory T cells in B-cell lymphoma. *Translational Oncology*, *14*(9), 101170.
- Bauer, V. M. (2022). Immunevasion in einem endogenen B-Zell-Lymphommodell: Die Rolle regulatorischer T-Zellen und Möglichkeiten der therapeutischen Modulation. *Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München*.
- Berman, R. M., Suzuki, T., Tahara, H., Robbins, P. D., Narula, S. K., & Lotze, M. T. (1996). Systemic administration of cellular IL-10 induces an effective, specific, and long-lived immune response against established tumors in mice. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *157*(1), 231–238.
- Bettini, M., & Vignali, D. A. A. (2009). Regulatory T cells and inhibitory cytokines in autoimmunity. *Current Opinion in Immunology*, *21*(6), 612–618.
- Bluestone, J. A. (1995). New perspectives of CD28-B7-mediated T cell costimulation. *Immunity*, *2*(6), 555–559.

- Bonnal, R. J. P., Rossetti, G., Lugli, E., De Simone, M., Gruarin, P., Brummelman, J., Druifuca, L., Passaro, M., Bason, R., Gervasoni, F., Della Chiara, G., D’Oria, C., Martinovic, M., Curti, S., Ranzani, V., Cordiglieri, C., Alvisi, G., Mazza, E. M. C., Oliveto, S., ... Pagani, M. (2021). Clonally expanded EOMES(+) Tr1-like cells in primary and metastatic tumors are associated with disease progression. *Nature Immunology*, *22*(6), 735–745.
- Boukouris, A. E., Theochari, M., Stefanou, D., Papalambros, A., Felekouras, E., Gogas, H., & Ziogas, D. C. (2022). Latest evidence on immune checkpoint inhibitors in metastatic colorectal cancer: A 2022 update. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, *173*, 103663.
- Brenner, C. D. (2009). Untersuchungen zur Bedeutung von Natürlichen Killerzellen und T-Zellen in einem murinen Spontan-Tumormodell. *Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München*.
- Brenner, C. D., King, S., Przewoznik, M., Wolters, I., Adam, C., Bornkamm, G. W., Busch, D. H., Röcken, M., & Mocikat, R. (2010a). Requirements for control of B-cell lymphoma by NK cells. *European Journal of Immunology*, *40*(2), 494–504.
- Brockmann, L., Gagliani, N., Steglich, B., Giannou, A. D., Kempski, J., Pelczar, P., Geffken, M., Mfarrej, B., Huber, F., Herkel, J., Wan, Y. Y., Esplugues, E., Battaglia, M., Krebs, C. F., Flavell, R. A., & Huber, S. (2017). IL-10 Receptor Signaling Is Essential for TR1 Cell Function In Vivo. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *198*(3), 1130–1141.
- Burkitt, D. (1958). A sarcoma involving the jaws in African children. *The British Journal of Surgery*, *46*(197), 218–223.
- Burnet, F. M. (1970). The concept of immunological surveillance. *Progress in Experimental Tumor Research*, *13*, 1–27.
- Burnet, F. M. (1971). Immunological surveillance in neoplasia. *Transplantation Reviews*, *7*, 3–25.
- Chaplin, D. D. (2010). Overview of the immune response. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *125*(2 Suppl 2), S3-23.
- Chaudhry, A., Samstein, R. M., Treuting, P., Liang, Y., Pils, M. C., Heinrich, J.-M., Jack, R. S., Wunderlich, F. T., Brünig, J. C., Müller, W., & Rudensky, A. Y. (2011). Interleukin-10 signaling in regulatory T cells is required for suppression of Th17 cell-mediated inflammation. *Immunity*, *34*(4), 566–578.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.-J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., & Wahl, S. M. (2003). Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *The Journal of Experimental Medicine*, *198*(12), 1875–1886.
- Coughlin, C. M., Salhany, K. E., Gee, M. S., LaTemple, D. C., Kotenko, S., Ma, X., Gri, G., Wysocka, M., Kim, J. E., Liu, L., Liao, F., Farber, J. M., Pestka, S., Trinchieri, G., & Lee, W. M. (1998). Tumor cell responses to IFN-gamma affect tumorigenicity and response to IL-12 therapy and antiangiogenesis. *Immunity*, *9*(1), 25–34.
- Crombie, J., & LaCasce, A. (2021). The treatment of Burkitt lymphoma in adults. *Blood*, *137*(6), 743–750.
- de Waal Malefyt, R., Haanen, J., Spits, H., Roncarolo, M. G., te Velde, A., Figdor, C., Johnson, K., Kastelein, R., Yssel, H., & de Vries, J. E. (1991). Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *The Journal of Experimental Medicine*, *174*(4), 915–924.

- Delves, P. J., & Roitt, I. M. (2000). The immune system. First of two parts. *The New England Journal of Medicine*, 343(1), 37–49.
- Desreumaux, P., Foussat, A., Allez, M., Beaugerie, L., Hébuterne, X., Bouhnik, Y., Nachury, M., Brun, V., Bastian, H., Belmonte, N., Ticchioni, M., Duchange, A., Morel-Mandrino, P., Neveu, V., Clerget-Chossat, N., Forte, M., & Colombel, J.-F. (2012). Safety and efficacy of antigen-specific regulatory T-cell therapy for patients with refractory Crohn's disease. *Gastroenterology*, 143(5), 1207-1217.
- Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, & Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). (2020). Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms, Langversion 3.3, 2020. <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/melanom/> (Zugriff am 14.02.2023)
- Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, & Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). (2020). Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Nierenzellkarzinoms, Langversion 2.0, 2020. <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/nierenzellkarzinom/> (Zugriff am 14.02.2023)
- Dhatchinamoorthy, K., Colbert, J. D., & Rock, K. L. (2021). Cancer Immune Evasion Through Loss of MHC Class I Antigen Presentation. *Frontiers in Immunology*, 12, 636568.
- Dighe, A. S., Richards, E., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (1994). Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity*, 1(6), 447–456.
- Dozzo, M., Carobolante, F., Donisi, P. M., Scattolin, A., Maino, E., Sancetta, R., Viero, P., & Bassan, R. (2017). Burkitt lymphoma in adolescents and young adults: management challenges. *Adolescent Health, Medicine and Therapeutics*, 8, 11–29.
- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology*, 3(11), 991–998.
- Dunn, G. P., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2004). The three Es of cancer immunoediting. *Annual Review of Immunology*, 22, 329–360.
- Dunn, G. P., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2004). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*, 21(2), 137–148.
- Duraiswamy, J., Kaluza, K. M., Freeman, G. J., & Coukos, G. (2013). Dual blockade of PD-1 and CTLA-4 combined with tumor vaccine effectively restores T-cell rejection function in tumors. *Cancer Research*, 73(12), 3591–3603.
- Egeter, O., Mocikat, R., Ghoreschi, K., Dieckmann, A., & Röcken, M. (2000). Eradication of Disseminated Lymphomas with CpG-DNA activated T helper type 1 cells from nontransgenic Mice. *Cancer Research* 60(6), 1515–1520.
- Ehrlich, P. (1909) Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde*, 5, 273-290.
- Ellinghaus, D., Jostins, L., Spain, S. L., Cortes, A., Bethune, J., Han, B., Park, Y. R., Raychaudhuri, S., Pouget, J. G., Hübenal, M., Folseraas, T., Wang, Y., Esko, T., Metspalu, A., Westra, H. J., Franke, L., Pers, T. H., Weersma, R. K., Collip, V., ... Franke, A. (2016). Analysis of five chronic inflammatory diseases identifies 27 new associations and highlights disease-specific patterns at shared loci. *Nature Genetics*, 48(5), 510–518.

- Emmerich, J., Mumm, J. B., Chan, I. H., LaFace, D., Truong, H., McClanahan, T., Gorman, D. M., & Oft, M. (2012). IL-10 directly activates and expands tumor-resident CD8⁺ T cells without De Novo infiltration from secondary lymphoid organs. *Cancer Research*, *72*(14), 3570–3581.
- Engelhardt, K. R., & Grimbacher, B. (2014). IL-10 in humans: lessons from the gut, IL-10/IL-10 receptor deficiencies, and IL-10 polymorphisms. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, *380*, 1–18.
- Erdmann, F., Spix, C., Katalinic, A., Christ, M., Folkerts, J., Hansmann, J., Kranzhöfer, K., Kunz, B., Manegold, K., Penzkofer, A., Tremel, K., Vollmer, G., Weg-Remers, S., Barnes, B., Buttman-Schweiger, N., Dahm, S., Fiebig, J., Franke, M., Gurung-Schönfeld, I., ... Wienecke, A. (2021). *Krebs in Deutschland für 2017/2018* (Issue 13).
- Fiorentino, D. F., Bond, M. W., & Mosmann, T. R. (1989). Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *The Journal of Experimental Medicine*, *170*(6), 2081–2095.
- Fiorentino, D. F., Zlotnik, A., Mosmann, T. R., Howard, M., & O'Garra, A. (1991). IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *147*(11), 3815–3822.
- Fiorentino, D. F., Zlotnik, A., Vieira, P., Mosmann, T. R., Howard, M., Moore, K. W., & O'Garra, A. (1991). IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *146*(10), 3444–3451.
- Fontenot, J. D., Gavin, M. A., & Rudensky, A. Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nature Immunology*, *4*(4), 330–336.
- Fransen, L., Van der Heyden, J., Ruyschaert, R., & Fiers, W. (1986). Recombinant tumor necrosis factor: its effect and its synergism with interferon-gamma on a variety of normal and transformed human cell lines. *European Journal of Cancer & Clinical Oncology*, *22*(4), 419–426.
- Gagliani, N., Jofra, T., Valle, A., Stabilini, A., Morsiani, C., Gregori, S., Deng, S., Rothstein, D. M., Atkinson, M., Kamanaka, M., Flavell, R. A., Roncarolo, M. G., & Battaglia, M. (2013). Transplant tolerance to pancreatic islets is initiated in the graft and sustained in the spleen. *American Journal of Transplantation : Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, *13*(8), 1963–1975.
- Glocker, E.-O., Kotlarz, D., Klein, C., Shah, N., & Grimbacher, B. (2011). IL-10 and IL-10 receptor defects in humans. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1246*, 102–107.
- Groux, H., Bigler, M., de Vries, J. E., & Roncarolo, M. G. (1998). Inhibitory and stimulatory effects of IL-10 on human CD8⁺ T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *160*(7), 3188–3193.
- Groux, H., Cottrez, F., Rouleau, M., Mauze, S., Antonenko, S., Hurst, S., McNeil, T., Bigler, M., Roncarolo, M. G., & Coffman, R. L. (1999). A transgenic model to analyze the immunoregulatory role of IL-10 secreted by antigen-presenting cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *162*(3), 1723–1729.
- Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J. E., & Roncarolo, M. G. (1997). A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*, *389*(6652), 737–742.

- Gruarin, P., Maglie, S., De Simone, M., Häringer, B., Vasco, C., Ranzani, V., Bosotti, R., Noddings, J. S., Larghi, P., Facciotti, F., Sarnicola, M. L., Martinovic, M., Crosti, M., Moro, M., Rossi, R. L., Bernardo, M. E., Caprioli, F., Locatelli, F., Rossetti, G., ... Geginat, J. (2019). Eomesodermin controls a unique differentiation program in human IL-10 and IFN- γ coproducing regulatory T cells. *European Journal of Immunology*, *49*(1), 96–111.
- Hoelzer, D., Walewski, J., Döhner, H., Viardot, A., Hiddemann, W., Spiekermann, K., Serve, H., Dührsen, U., Hüttmann, A., Thiel, E., Dengler, J., Kneba, M., Schaich, M., Schmidt-Wolf, I. G. H., Beck, J., Hertenstein, B., Reichle, A., Domanska-Czyz, K., Fietkau, R., ... Gökbuget, N. (2014). Improved outcome of adult Burkitt lymphoma/leukemia with rituximab and chemotherapy: report of a large prospective multicenter trial. *Blood*, *124*(26), 3870–3879.
- Hori, S., Nomura, T., & Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science (New York, N.Y.)*, *299*(5609), 1057–1061.
- Itakura, E., Huang, R.-R., Wen, D.-R., Paul, E., Wünsch, P. H., & Cochran, A. J. (2011). IL-10 expression by primary tumor cells correlates with melanoma progression from radial to vertical growth phase and development of metastatic competence. *Modern Pathology : An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, *24*(6), 801–809.
- Iwai, Y., Terawaki, S., & Honjo, T. (2005). PD-1 blockade inhibits hematogenous spread of poorly immunogenic tumor cells by enhanced recruitment of effector T cells. *International Immunology*, *17*(2), 133–144.
- Jacobson, C., & LaCasce, A. (2014). How I treat Burkitt lymphoma in adults. *Blood*, *124*(19), 2913–2920.
- Jankovic, D., Kullberg, M. C., Feng, C. G., Goldszmid, R. S., Collazo, C. M., Wilson, M., Wynn, T. A., Kamanaka, M., Flavell, R. A., & Sher, A. (2007). Conventional T-bet(+)Foxp3(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. *The Journal of Experimental Medicine*, *204*(2), 273–283.
- Jiang, Y., Li, Y., & Zhu, B. (2015). T-cell exhaustion in the tumor microenvironment. *Cell death & disease*, *6*(6), e1792.
- Jorgovanovic, D., Song, M., Wang, L., & Zhang, Y. (2020). Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: a review. *Biomarker Research*, *8*, 49.
- Kantoff, P. W., Higano, C. S., Shore, N. D., Berger, E. R., Small, E. J., Penson, D. F., Redfern, C. H., Ferrari, A. C., Dreicer, R., Sims, R. B., Xu, Y., Frohlich, M. W., & Schellhammer, P. F. (2010). Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *The New England Journal of Medicine*, *363*(5), 411–422.
- Karapetyan, L., Luke, J. J., & Davar, D. (2020). Toll-Like Receptor 9 Agonists in Cancer. *OncoTargets and Therapy*, *13*, 10039–10060.
- Kayraklioglu, N., Horuluoglu, B., & Klinman, D. M. (2021). CpG Oligonucleotides as Vaccine Adjuvants. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *2197*, 51–85.
- Klinman, D. M. (2006). Adjuvant activity of CpG oligodeoxynucleotides. *International Reviews of Immunology*, *25*(3–4), 135–154.
- Kovalchuk, A. L., Qi, C. F., Torrey, T. A., Taddesse-Heath, L., Feigenbaum, L., Park, S. S., Gerbitz, A., Klobeck, G., Hoertnagel, K., Polack, A., Bornkamm, G. W., Janz, S., & Morse, H. C. (2000). Burkitt lymphoma in the mouse. *Journal of Experimental Medicine*, *192*(8), 1183–1190.

- Kühn, R., Löhler, I., Rennick, D., Rajewsky, K., & Moiler, W. (1993). Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*, 75(2), 263–274.
- LaFleur, M. W., Muroyama, Y., Drake, C. G., & Sharpe, A. H. (2018). Inhibitors of the PD-1 Pathway in Tumor Therapy. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 200(2), 375–383.
- Lamichhane, P., Karyampudi, L., Shreeder, B., Krempsi, J., Bahr, D., Daum, J., Kalli, K. R., Goode, E. L., Block, M. S., Cannon, M. J., & Knutson, K. L. (2017). IL10 Release upon PD-1 Blockade Sustains Immunosuppression in Ovarian Cancer. *Cancer Research*, 77(23), 6667–6678.
- Landskron, G., De la Fuente, M., Thuwajit, P., Thuwajit, C., & Hermoso, M. A. (2014). Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *Journal of Immunology Research*, 2014, 149185.
- Larkin, J., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., Grob, J. J., Cowey, C. L., Lao, C. D., Schadendorf, D., Dummer, R., Smylie, M., Rutkowski, P., Ferrucci, P. F., Hill, A., Wagstaff, J., Carlino, M. S., Haanen, J. B., Maio, M., Marquez-Rodas, I., McArthur, G. A., Ascierto, P. A., ... Wolchok, J. D. (2015). Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *The New England Journal of Medicine*, 373(1), 23–34.
- Lazarevic, V., Glimcher, L. H., & Lord, G. M. (2013). T-bet: a bridge between innate and adaptive immunity. *Nature Reviews. Immunology*, 13(11), 777–789.
- Levings, M. K., Gregori, S., Tresoldi, E., Cazzaniga, S., Bonini, C., & Roncarolo, M. G. (2005). Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25⁺CD4⁺ Tr cells. *Blood*, 105(3), 1162–1169.
- Levy, Y., & Brouet, J. C. (1994). Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal center B cells by induction of the bcl-2 protein. *The Journal of Clinical Investigation*, 93(1), 424–428.
- Liu, Y., Zhang, P., Li, J., Kulkarni, A. B., Perruche, S., & Chen, W. (2008). A critical function for TGF-beta signaling in the development of natural CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. *Nature Immunology*, 9(6), 632–640.
- Ma, Y., Bauer, V., Riedel, T., Ahmetlić, F., Hömberg, N., Hofer, T. P., Röcken, M., & Mocikat, R. (2021). Interleukin-10 counteracts T-helper type 1 responses in B-cell lymphoma and is a target for tumor immunotherapy. *Cancer Letters*, 503, 110–116.
- Macatonia, S. E., Doherty, T. M., Knight, S. C., & O'Garra, A. (1993). Differential effect of IL-10 on dendritic cell-induced T cell proliferation and IFN-gamma production. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 150(9), 3755–3765.
- Marshall, J. S., Warrington, R., Watson, W., & Kim, H. L. (2018). An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma and Clinical Immunology*, 14(s2), 1–10.
- Maynard, C. L., Harrington, L. E., Janowski, K. M., Oliver, J. R., Zindl, C. L., Rudensky, A. Y., & Weaver, C. T. (2007). Regulatory T cells expressing interleukin 10 develop from Foxp3⁺ and Foxp3⁻ precursor cells in the absence of interleukin 10. *Nature Immunology*, 8(9), 931–941.
- Mfarrej, B., Tresoldi, E., Stabilini, A., Paganelli, A., Caldara, R., Secchi, A., & Battaglia, M. (2017). Generation of donor-specific Tr1 cells to be used after kidney transplantation and definition of the timing of their in vivo infusion in the presence of immunosuppression. *Journal of Translational Medicine*, 15(1), 40.
- Mills, C. D., Lenz, L. L., & Harris, R. A. (2016). A Breakthrough: Macrophage-Directed Cancer Immunotherapy. *Cancer Research*, 76(3), 513–516.

- Mocellin, S., Panelli, M. C., Wang, E., Nagorsen, D., & Marincola, F. M. (2003). The dual role of IL-10. *Trends in Immunology*, 24(1), 36–43.
- Mocikat, R., Braumüller, H., Gummy, A., Egeter, O., Ziegler, H., Reusch, U., Bubeck, A., Louis, J., Mailhammer, R., Riethmüller, G., Koszinowski, U. & Röcken, M. (2003). Natural killer cells activated by MHC class I (low) targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses. *Immunity*, 19(4), 561-569.
- Molyneux, E. M., Rochford, R., Griffin, B., Newton, R., Jackson, G., Menon, G., Harrison, C. J., Israels, T., & Bailey, S. (2012). Burkitt's lymphoma. *Lancet (London, England)*, 379(9822), 1234–1244.
- Moran, C. J., Walters, T. D., Guo, C.-H., Kugathasan, S., Klein, C., Turner, D., Wolters, V. M., Bandsma, R. H., Mouzaki, M., Zachos, M., Langer, J. C., Cutz, E., Benseler, S. M., Roifman, C. M., Silverberg, M. S., Griffiths, A. M., Snapper, S. B., & Muise, A. M. (2013). IL-10R polymorphisms are associated with very-early-onset ulcerative colitis. *Inflammatory Bowel Diseases*, 19(1), 115–123.
- Motzer, R. J., Tannir, N. M., McDermott, D. F., Arén Frontera, O., Melichar, B., Choueiri, T. K., Plimack, E. R., Barthélémy, P., Porta, C., George, S., Powles, T., Donskov, F., Neiman, V., Kollmannsberger, C. K., Salman, P., Gurney, H., Hawkins, R., Ravaud, A., Grimm, M.-O., ... Escudier, B. (2018). Nivolumab plus Ipilimumab versus Sunitinib in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *The New England Journal of Medicine*, 378(14), 1277–1290.
- Mullen, A. C., High, F. A., Hutchins, A. S., Lee, H. W., Villarino, A. V, Livingston, D. M., Kung, A. L., Cereb, N., Yao, T. P., Yang, S. Y., & Reiner, S. L. (2001). Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science (New York, N.Y.)*, 292(5523), 1907–1910.
- Murphy, K., Weaver, C., (2017). Janeway's Immunobiology. 9th ed. New York: Garland Science/Taylor & Francis Group
- Naing, A., Infante, J. R., Papadopoulos, K. P., Chan, I. H., Shen, C., Ratti, N. P., Rojo, B., Autio, K. A., Wong, D. J., Patel, M. R., Ott, P. A., Falchook, G. S., Pant, S., Hung, A., Pekarek, K. L., Wu, V., Adamow, M., McCauley, S., Mumm, J. B., ... Oft, M. (2018). PEGylated IL-10 (Pegilodecakin) Induces Systemic Immune Activation, CD8⁺ T Cell Invigoration and Polyclonal T Cell Expansion in Cancer Patients. *Cancer Cell*, 34(5), 775-791.e3.
- Naujoks, M. (2011). Untersuchungen zur Funktion von dendritischen Zellen in einem Spontan-Tumormodell. *Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München*.
- Naujoks, M., Weiß, J., Riedel, T., Hömberg, N., Przewoznik, M., Noessner, E., Röcken, M., & Mocikat, R. (2014). Alterations of costimulatory molecules and instructive cytokines expressed by dendritic cells in the microenvironment of an endogenous mouse lymphoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 63(5), 491–499.
- Nemunaitis, J., Fong, T., Shabe, P., Martineau, D., & Ando, D. (2001). Comparison of serum interleukin-10 (IL-10) levels between normal volunteers and patients with advanced melanoma. *Cancer Investigation*, 19(3), 239–247.
- Neumann, C., Heinrich, F., Neumann, K., Junghans, V., Mashreghi, M. F., Ahlers, J., Janke, M., Rudolph, C., Mockel-Tenbrinck, N., Kühl, A. A., Heimesaat, M. M., Esser, C., Im, S. H., Radbruch, A., Rutz, S., & Scheffold, A. (2014). Role of blimp-1 in programming th effector cells into IL-10 producers. *Journal of Experimental Medicine*, 211(9), 1807–1819.
- Nicholson, L. B. (2016). The immune system. *Essays in Biochemistry*, 60(3), 275–301.

- O'Garra, A. (1998). Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity*, 8(3), 275–283.
- O'Garra, A., & Vieira, P. (2007). T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nature Reviews. Immunology*, 7(6), 425–428.
- Ouyang, W., & O'Garra, A. (2019). IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation. *Immunity*, 50(4), 871–891.
- Pardoll, D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews. Cancer*, 12(4), 252–264.
- Parkin, J., & Cohen, B. (2001). An overview of the immune system. *Lancet (London, England)*, 357(9270), 1777–1789.
- Patel, V. G., Oh, W. K., & Galsky, M. D. (2020). Treatment of muscle-invasive and advanced bladder cancer in 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 70(5), 404–423.
- Poppema, S. (2005). Immunobiology and pathophysiology of Hodgkin lymphomas. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 231–238.
- Pot, C., Apetoh, L., & Kuchroo, V. K. (2011). Type 1 regulatory T cells (Tr1) in autoimmunity. *Seminars in Immunology*, 23(3), 202–208.
- Qin, Z., & Blankenstein, T. (2000). CD4⁺ T cell-mediated tumor rejection involves inhibition of angiogenesis that is dependent on IFN gamma receptor expression by nonhematopoietic cells. *Immunity*, 12(6), 677–686.
- Qureshi, O. S., Zheng, Y., Nakamura, K., Attridge, K., Manzotti, C., Schmidt, E. M., Baker, J., Jeffery, L. E., Kaur, S., Briggs, Z., Hou, T. Z., Futter, C. E., Anderson, G., Walker, L. S. K., & Sansom, D. M. (2011). Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science (New York, N.Y.)*, 332(6029), 600–603.
- Reinhardt, R. L., Liang, H.-E., Bao, K., Price, A. E., Mohrs, M., Kelly, B. L., & Locksley, R. M. (2015). A novel model for IFN- γ -mediated autoinflammatory syndromes. *The Journal of Immunology*, 194(5), 2358–2368.
- Riedel, T. (2013). Intratumorale T-Zellen in einem Spontanlymphommodell der Maus: aktivierende und supprimierende Mechanismen. *Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München*.
- Rivas, J. R., Liu, Y., Alhakeem, S. S., Eckenrode, J. M., Marti, F., Collard, J. P., Zhang, Y., Shaaban, K. A., Muthusamy, N., Hildebrandt, G. C., Fleischman, R. A., Chen, L., Thorson, J. S., Leggas, M., & Bondada, S. (2021). Interleukin-10 suppression enhances T-cell antitumor immunity and responses to checkpoint blockade in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 35(11), 3188–3200.
- Roessner, P. M., Llaó Cid, L., Lupar, E., Roider, T., Bordas, M., Schiffers, C., Arseni, L., Gaupel, A.-C., Kilpert, F., Krötschel, M., Arnold, S. J., Sellner, L., Colomer, D., Stilgenbauer, S., Dietrich, S., Lichter, P., Izcue, A., & Seiffert, M. (2021). EOMES and IL-10 regulate antitumor activity of T regulatory type 1 CD4⁽⁺⁾ T cells in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 35(8), 2311–2324.
- Roncarolo, M. G., Yssel, H., Touraine, J. L., Betuel, H., De Vries, J. E., & Spits, H. (1988). Autoreactive T cell clones specific for class I and class II HLA antigens isolated from a human chimera. *The Journal of Experimental Medicine*, 167(5), 1523–1534.

- Rousset, F., Garcia, E., Defrance, T., Péronne, C., Vezzio, N., Hsu, D. H., Kastelein, R., Moore, K. W., & Banchereau, J. (1992). Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*(5), 1890–1893.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., & Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *155*(3), 1151–1164.
- Sakaguchi, Shimon. (2004). Naturally arising CD4⁺ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annual Review of Immunology*, *22*, 531–562.
- Saraiva, M., & O’Garra, A. (2010). The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature reviews. Immunology*, *10*(3), 170–181.
- Saraiva, M., Vieira, P., & O’Garra, A. (2020). Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *Journal of Experimental Medicine*, *217*(1).
- Sawant, D. V., Yano, H., Chikina, M., Zhang, Q., Liao, M., Liu, C., Callahan, D. J., Sun, Z., Sun, T., Tabib, T., Pennathur, A., Corry, D. B., Luketich, J. D., Lafyatis, R., Chen, W., Poholek, A. C., Bruno, T. C., Workman, C. J., & Vignali, D. A. A. (2019). Adaptive plasticity of IL-10⁺ and IL-35⁺ Treg cells cooperatively promotes tumor T cell exhaustion. *Nature Immunology*, *20*(6), 724–735.
- Scheuerpflug, A., Ahmetlić, F., Bauer, V., Riedel, T., Röcken, M., & Mocikat, R. (2021). The role of dendritic cells for therapy of B-cell lymphoma with immune checkpoint inhibitors. *Cancer Immunology, Immunotherapy : CII*, *70*(5), 1343–1350.
- Schildberg, F. A., Klein, S. R., Freeman, G. J., & Sharpe, A. H. (2016). Coinhibitory Pathways in the B7-CD28 Ligand-Receptor Family. *Immunity*, *44*(5), 955–972.
- Schmitz, R., Ceribelli, M., Pittaluga, S., Wright, G., & Staudt, L. M. (2014). Oncogenic mechanisms in Burkitt lymphoma. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *4*(2).
- Schreiber, R. D., Old, L. J., & Smyth, M. J. (2011). Cancer immunoediting: integrating immunity’s roles in cancer suppression and promotion. *Science (New York, N.Y.)*, *331*(6024), 1565–1570.
- Seo, N., Hayakawa, S., Takigawa, M., & Tokura, Y. (2001). Interleukin-10 expressed at early tumour sites induces subsequent generation of CD4⁽⁺⁾ T-regulatory cells and systemic collapse of antitumour immunity. *Immunology*, *103*(4), 449–457.
- Shevach, E. M. (2009). Mechanisms of foxp3⁺ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity*, *30*(5), 636–645.
- Statistisches Bundesamt (Destatis) (2022). Gestorbene: Deutschland, Jahre, Todesursachen, Geschlecht.
<https://www.genesis.destatis.de/genesis/online?sequenz=tabelleErgebnis&selectionname=23211-0002> (Zugriff am 10.02.2023)
- Swerdlow, S. H., Campo, E., Pileri, S. A., Harris, N. L., Stein, H., Siebert, R., Advani, R., Ghielmini, M., Salles, G. A., Zelenetz, A. D., & Jaffe, E. S. (2016). The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*, *127*(20), 2375–2390.
- Szabo, S J, Kim, S. T., Costa, G. L., Zhang, X., Fathman, C. G., & Glimcher, L. H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*, *100*(6), 655–669.

- Szabo, S J, Sullivan, B. M., Stemmann, C., Satoskar, A. R., Sleckman, B. P., & Glimcher, L. H. (2002). Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells. *Science (New York, N.Y.)*, 295(5553), 338–342.
- Thieu, V. T., Yu, Q., Chang, H. C., Yeh, N., Nguyen, E. T., Sehra, S., & Kaplan, M. H. (2008). Signal transducer and activator of transcription 4 is required for the transcription factor T-bet to promote T helper 1 cell-fate determination. *Immunity*, 29(5), 679–690.
- Vollmar, A., Zündorf, I., Dingermann, T. (2013). Immunologie – Grundlagen und Wirkstoffe. 2. Auflage. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart
- Walunas, T. L., & Bluestone, J. A. (1998). CTLA-4 regulates tolerance induction and T cell differentiation in vivo. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 160(8), 3855–3860.
- Wang, D.-R., Wu, X.-L., & Sun, Y.-L. (2022). Therapeutic targets and biomarkers of tumor immunotherapy: response versus non-response. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 331.
- Williamson, B. D., Carswell, E. A., Rubin, B. Y., Prendergast, J. S., & Old, L. J. (1983). Human tumor necrosis factor produced by human B-cell lines: synergistic cytotoxic interaction with human interferon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(17), 5397–5401.
- Xia, A., Zhang, Y., Xu, J., Yin, T., & Lu, X.-J. (2019). T Cell Dysfunction in Cancer Immunity and Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 10, 1719.
- Yamagiwa, S., Gray, J. D., Hashimoto, S., & Horwitz, D. A. (2001). A role for TGF-beta in the generation and expansion of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells from human peripheral blood. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 166(12), 7282–7289.
- Yang, Y., Ochando, J. C., Bromberg, J. S., & Ding, Y. (2007). Identification of a distant T-bet enhancer responsive to IL-12/Stat4 and IFN-gamma/Stat1 signals. *Blood*, 110(7), 2494–2500.
- Yatim, K. M., & Lakkis, F. G. (2015). A brief journey through the immune system. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology : CJASN*, 10(7), 1274–1281.
- Zhang, P., Lee, J. S., Gartlan, K. H., Schuster, I. S., Comerford, I., Varelias, A., Ullah, M. A., Vuckovic, S., Koyama, M., Kuns, R. D., Locke, K. R., Beckett, K. J., Olver, S. D., Samson, L. D., de Oca, M. M., Rivera, F. de L., Clouston, A. D., Belz, G. T., Blazar, B. R., ... Hill, G. R. (2017). Eomesodermin promotes the development of type 1 regulatory T (TR1) cells. *Science Immunology*, 2(10).
- Zou, W. (2006). Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, 6(4), 295–307.

8 VERÖFFENTLICHUNGEN

Teile der Dissertation wurden veröffentlicht

8.1 Fachpublikation

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

*geteilte Erstautorenschaft

8.2 Posterpräsentation

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

9 ANHANG

DANKSAGUNG

Zuerst möchte ich mich ganz besonders bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Ralph Mocikat für die exzellente Betreuung und die großzügige Unterstützung bedanken. Er hatte für mich bei Problemen und Fragen immer ein offenes Ohr und stand mir stets mit Ratschlägen und neuen Ideen zur Seite. Ich habe in der Zeit sehr viel dazu gelernt und bin dafür sehr dankbar.

Ein Dankeschön geht natürlich auch an meine ArbeitskollegInnen Albert, Nadine und Vera für die angenehme Arbeitsatmosphäre, fachliche Diskussionen und generell die schöne Zeit, in der viele wunderbare Erinnerungen entstanden sind. Außerdem danke ich dem ganzen Tierstall-Team, vor allem Michael und Franzi, für die gute Zusammenarbeit. Zudem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dirk Baumjohann für die Bereitstellung der GREAT-Mäuse bedanken. Auch möchte ich der AG Nößner meinen Dank für den fachlichen Austausch und die Mitbenutzung der Dongles aussprechen und mich gerne insbesondere bei Tom für die Durchführung der FACS-Sortierung bedanken.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie und bei meinen Freunden bedanken, die mich all die Jahre immer unterstützten und an mich glaubten.



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN



Eidesstattliche Versicherung

Ma, Yanchun

Name, Vorname

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

UNTERSUCHUNG VON IFN- γ ⁺IL-10⁺ T-ZELLEN IN EINEM MURINEN SPONTANTUMORMODELL

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

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

München, den 17.10.2024

Ort, Datum

Yanchun Ma

Unterschrift