

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplom-Biologin Sonja Schallenberg
aus Bremen

Tag der mündlichen Prüfung:

Untersuchungen zur *in vivo* Depletion von
regulatorischen T-Zellen und deren Einfluss auf die
Immuntherapie des B16 Melanoms

Gutachter: Prof. Dr. Volker Schirmmacher

PD Dr. Karsten Mahnke

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Abkürzungsverzeichnis | v |
| Zusammenfassung | ix |
| Abstract | xi |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Tumorimmunologie | 1 |
| 1.1.1 T-Zellen | 2 |
| 1.1.2 Regulatorische T-Zellen (Treg) | 5 |
| 1.1.3 Tumorantigene und „Escape“-Mechanismen | 7 |
| 1.2 Das maligne Melanom | 8 |
| 1.2.1 Klassische Behandlungsmethoden | 9 |
| 1.2.2 Neue Therapieansätze | 10 |
| 1.2.3 Treg in der Tumorimmunologie | 11 |
| 1.3 Zielsetzung | 15 |
| 2 Material | 17 |
| 2.1 Geräte und Zubehör | 17 |
| 2.2 Verbrauchsmaterial | 20 |
| 2.3 Antikörper und Chemikalien | 23 |
| 2.3.1 Antikörper | 23 |
| 2.3.2 Chemikalien | 25 |
| 2.4 Kits | 27 |
| 2.5 Puffer und Medien | 27 |
| 2.5.1 Puffer und Lösungen für Zellkultur | 27 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 2.5.2 | Puffer für Proteinanalytik | 29 |
| 2.5.3 | Zellkulturmedien | 31 |
| 2.6 | Versuchstiere | 33 |
| 3 | Methoden | 35 |
| 3.1 | Zellen und Kultivierungsbedingungen | 35 |
| 3.1.1 | Zelllinien | 35 |
| 3.1.2 | Einfrieren und Auftauen | 35 |
| 3.1.3 | Zellzahlbestimmung | 36 |
| 3.1.4 | Isolierung von Lymphozyten aus Lymphknoten und Milz | 36 |
| 3.1.5 | Isolierung von Lymphozyten aus Tumorgewebe | 37 |
| 3.1.6 | Anreicherung von CD4 ⁺ Zellen mittels magnetischer Zellsortierung (MACS) | 37 |
| 3.1.7 | Anreicherung von CD25 ⁺ Zellen aus CD4 ⁺ Zellen mittels MACS | 38 |
| 3.1.8 | Isolierung und Reifung dendritischer Zellen aus murinem Knochen- mark (BM-DC) | 39 |
| 3.2 | Beladung und Stimulierung von murinen BM-DC | 39 |
| 3.3 | Durchflusszytometrie (FACS) | 40 |
| 3.3.1 | Nachweis von Oberflächenmolekülen | 41 |
| 3.3.2 | Intrazelluläre <i>Forkhead-Box-P3</i> -Färbung | 41 |
| 3.3.3 | Intrazelluläre Zytokinfärbung | 42 |
| 3.4 | Carboxy-Fluorescein-Succinimidyl-Ester (CFSE)-Färbung | 42 |
| 3.4.1 | <i>In vitro</i> Proliferationstest | 43 |
| 3.4.2 | <i>In vivo</i> Proliferationstest | 44 |
| 3.5 | PKH26-Färbung | 44 |
| 3.6 | Proteinanalytik | 45 |
| 3.6.1 | Produktion von monoklonalen Antikörpern | 45 |
| 3.6.2 | Proteinaufreinigung mit Protein G-Säule | 45 |
| 3.6.3 | Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) | 46 |
| 3.6.4 | Coomassie-Färbung | 48 |
| 3.7 | Tumorexperimente | 48 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.7.1 | Tumoringokulation | 48 |
| 3.7.2 | <i>In vivo</i> Depletion von CD4 ⁺ CD25 ⁺ Zellen in tumortragenden Mäusen | 48 |
| 3.7.3 | Kombination der Depletion von CD4 ⁺ CD25 ⁺ Zellen und der Injektion von Tumorantigen-beladenen DC | 49 |
| 3.7.4 | <i>In vivo</i> Untersuchung des Migrationsverhaltens von CD4 ⁺ CD25 ⁻ und CD4 ⁺ CD25 ⁺ Zellen | 49 |
| 3.8 | Überprüfung des transgenen Status der OTII transgenen Mäuse | 50 |
| 4 | Ergebnisse | 51 |
| 4.1 | Untersuchung der Bindungs- und Depletionseigenschaften des CD25 mAk PC61 | 51 |
| 4.1.1 | <i>In vitro</i> Test auf Bindungseigenschaften | 51 |
| 4.1.2 | <i>In vivo</i> Test auf Funktionalität | 52 |
| 4.1.3 | Effekt der PC61 Applikation auf verschiedene Lymphozytenpopulationen | 55 |
| 4.2 | Treg-Depletion als additive Methode zur Behandlung des B16 Melanoms . . | 60 |
| 4.2.1 | Wirkung von PC61 Applikation auf das Wachstum des B16 Melanoms | 60 |
| 4.2.2 | Effektor T-Zellen in Lymphorganen von tumortragenden Mäusen . . . | 63 |
| 4.2.3 | Behandlungsversuche zur Therapie des B16 Melanoms | 64 |
| 4.3 | Lymphozyten im Tumoringfiltrat | 68 |
| 4.3.1 | Reaktivität von Antikörpern auf B16-Zellen | 68 |
| 4.3.2 | Charakterisierung von tumoringfiltrierenden Lymphozyten | 70 |
| 4.3.3 | Effektivität der Treg-Depletion in tumortragenden Mäusen | 73 |
| 4.4 | Untersuchung des Einflusses von PC61 auf die Funktion von T-Zellen | 79 |
| 4.4.1 | Einfluss von PC61 auf Proliferationsfähigkeit von CD4 ⁺ T-Zellen . . | 79 |
| 4.4.2 | Einfluss von PC61 auf Zytokinproduktion von CD4 ⁺ T-Zellen | 82 |
| 4.5 | Migrationsverhalten von CD4 ⁺ und CD4 ⁺ CD25 ⁺ Zellen in tumortragenden Mäusen | 84 |
| 5 | Diskussion | 87 |
| 5.1 | Treg-Depletion als therapeutische Maßnahme gegen das B16-Melanom | 87 |
| 5.2 | Infiltration des Tumors durch Lymphozyten | 93 |
| 5.2.1 | Effektivität der Treg-Depletion in tumortragenden Mäusen | 93 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 5.2.2 | Wirkung von PC61 mAk auf Effektor T-Zellen | 96 |
| 5.2.3 | Ursprung der tumorinfiltrierenden Treg | 97 |
| 5.3 | Immunsuppression durch andere Mechanismen | 99 |
| 5.4 | Schlussfolgerungen | 100 |
| 6 | Literaturverzeichnis | 103 |
| 7 | Danksagung | 119 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------|---|
| Abb. | Abbildung |
| APS | Ammoniumperoxydisulfat |
| APC | Allophycocyanin |
| BM-DC | <i>bone marrow-derived dendritic cells</i> |
| BSA | Bovines Serum Albumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| ca. | <i>circa</i> |
| CD | <i>Cluster of differentiation</i> |
| CFA | <i>Complete Freund's Adjuvants</i> |
| CFDA, SE | 5-(und -6)-Carboxy-fluorescein-Diacetate, succinimidyl ester |
| CFSE | Carboxy-Fluorescein-Succinimidyl-Ester |
| CTL | zytotoxische T-Lymphozyten |
| d | <i>dies</i> (Tag) |
| DC | <i>dendritic cell</i> (Dendritische Zelle) |
| DMEM | <i>Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| DTT | Dithiotreitol |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| <i>et al.</i> | <i>et alii</i> |
| FACS | <i>fluorescence activated cell sorter</i> |
| FITC | Fluorescein Isothiocyanat |
| FCS | <i>Fetal calf serum</i> (Fötales Kälberserum) |
| FSC | <i>forward scatter</i> |

| | |
|-------------------------------------|---|
| g | gravity (Erdbeschleunigung) |
| GM-CSF | granulocyte and monocyte-colony stimulating factor |
| gp100 | |
| H ₂ O _{bidest.} | doppelt destilliertes Wasser |
| HCl | Salzsäure |
| HEPES | 4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazin-Ethansulfonsäure |
| IFN | Interferon |
| IL | Interleukin |
| i.p. | intraperitoneal |
| i.v. | intravenös |
| kDa | Kilodalton |
| <i>Lnn.</i> | <i>Lymphonodus</i> |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| M | Molar |
| MACS | magnetic activated cell sorting |
| MAGE | melanoma associated antigen |
| mAk | monoklonaler Antikörper |
| MFI | mean fluorescence intensity (mittlere Fluoreszenzintensität) |
| MHC | Major Histokompatibility Complex (Hauptkompatibilitätskomplex) |
| min | Minuten |
| ml | Milliliter |
| mg | Milligramm |
| mm | Millimeter |
| μg | Mikrogramm |
| μl | Mikroliter |
| μm | Mikrometer |
| N | Normal |
| ng | Nanogramm |
| NK | Natürliche Killer |

| | |
|-----------|--|
| nm | Nanometer |
| OTII | OVA-transgener T-Zell-Rezeptor auf CD4 ⁺ Zellen |
| PBMC | <i>peripheral blood mononuclear cells</i> (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) |
| PBS | <i>phosphate buffered saline</i> |
| PE | Phycoerythrin |
| Pen/Strep | Penicillin/Streptomycin |
| PerCP | Peridinin-Chlorophyll-Protein Complex |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PKC | Proteinkinase C |
| pLN | periphere Lymphknoten |
| PMA | Phorbol-12-myristate-13-acetate |
| RPMI | <i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i> |
| s.c. | <i>subcutan</i> |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SSC | <i>sideward scatter</i> |
| TAA | Tumorassoziierte Antigene |
| TCR | T-Zell-Rezeptor |
| Teff | Effektor T Zellen |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin |
| Treg | regulatorische T-Zelle(n) |
| Tris | Tris-hydroxymethyl-amino-methan |
| TRP-2 | <i>tyrosinase-related protein 2</i> |
| v/v | <i>volume per volume</i> |
| w/v | <i>weight per volume</i> (Masse/Volumen) |
| z.B. | zum Beispiel |

Zusammenfassung

Natürlich vorkommende regulatorische T-Zellen (Treg) sind essentiell an der Suppression von Effektor T-Zellen (Teff) beteiligt und verhindern dadurch beispielsweise Autoimmunerkrankheiten. Außerdem wurde wiederholt beschrieben, dass Treg Immunreaktionen gegen verschiedene Tumore behindern. Diese Eigenschaft wurde dadurch deutlich, dass in Tiermodellen die Depletion von Treg vor der Tumordinokulation zu vermindertem Wachstum der Tumore führte.

In Melanom-Patienten ist diese präventive Behandlung nicht durchführbar, da der Tumor in diesen Fällen bereits etabliert ist. Aus diesem Grund sollte im murinen B16 Modell untersucht werden, ob es möglich ist existierende Melanome mittels einer Kombination aus Treg-Depletion und Teff-Stimulation zu behandeln.

Eine Depletion der Treg mittels Injektion des mAk PC61 vor der Tumordinokulation bewirkte die schon beschriebene Verminderung des Tumorwachstums. Im Gegensatz dazu hatte die Treg-Depletion zu späteren Zeitpunkten während der Tumorentwicklung (fünf oder zehn Tage nach der Tumordinokulation) ein beschleunigtes Wachstum zur Folge. Die Kombination von Treg-Depletion und therapeutischer Vakzinierung mit Tumorantigen-beladenen dendritischen Zellen (DC) bewirkte sogar ein sehr stark beschleunigtes Tumorwachstum.

Die präventive Anwendung von PC61 führte zu niedrigeren Anzahlen von tumorassoziierten Treg und gleichzeitig zu einem Anstieg der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in den Tumoren. Im Gegensatz dazu konnte bei therapeutischer Treg-Depletion kein Unterschied in der Infiltration der Tumore zwischen behandelten und nicht behandelten tumortragenden Mäusen festgestellt werden.

Da durch therapeutische Injektion von PC61 und DC das Tumorwachstum stark beschleunigt wurde, war anzunehmen, dass der mAk CD25⁺ Teff depletiert. Zur Überprüfung dieser Annahme wurden Mäusen CFSE-gefärbte OVA-spezifische TCR-transgene CD4⁺ T-Zellen inji-

ziert. Den Mäusen wurden OVA-beladene DC und gleichzeitig PC61 appliziert. Überraschender Weise waren weder die Anzahl der re-isolierten transgenen Zellen noch ihre Fähigkeit zu proliferieren und IL-2 zu produzieren in PC61-behandelten Mäusen reduziert sondern im Gegenteil erhöht.

Diese Daten zeigen, dass die Beschleunigung des Tumorwachstums durch therapeutische Anwendung der Treg-Depletion nicht auf einer Ko-Depletion von Teff beruht. Vielmehr scheint die Entwicklung einer Tumorabstoßung abhängig von der Infiltration der Tumore durch CD4⁺ und CD8⁺ Zellen zu sein. Nur eine präventive Treg-Depletion verändert das Infiltrationsmuster des Tumors dahingehend, dass weniger Treg dafür aber mehr CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen einwandern. In fortgeschrittenen Tumorstadien scheint der Tumor ein Milieu zu schaffen, durch das er den Übertritt von T-Zellen und auch mAk ins Tumorgewebe verhindert.

Abstract

Naturally occurring regulatory T cells (Treg) are essentially involved in the suppression of effector T cells (Teff) to prevent the onset of autoimmune diseases. Furthermore they have been described to impede immune responses against several tumors. Depletion of Treg before tumor challenge results in diminished tumor growth in several animal models.

However in melanoma-bearing patients this preventive treatment cannot be applied, as the tumor is already established. Therefore, it was investigated in the murine B16 model, if it is possible to treat existing melanomas combining the depletion of Treg with stimulation of effector T cells.

Depletion of Treg by injection of the mAb PC61 before tumor-challenge resulted in decreased tumor growth as has been described by others. In contrast, the depletion of Treg during tumor development (five or ten days after tumor-challenge) led to accelerated growth of the tumors. Combining Treg-depletion and therapeutic vaccination using tumorantigen-loaded dendritic cells (DC) resulted in an even faster tumor growth.

The preventive application of PC61 led to diminished numbers of tumorassociated Treg and at the same time to an increase of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the tumors. In contrast, in the therapeutic setting no difference in the infiltration of tumors occurred between the Treg depleted mice and non-treated tumor-bearing mice.

As the tumor growth was strongly enhanced after therapeutic injections of PC61 and DC, it could be assumed that the mAb depletes CD25⁺ Teff. To test this assumption, mice were injected with CFSE-labelled OVA-specific TCR-transgenic CD4⁺ T cells. The mice were then injected with OVA-loaded DC and at the same time with PC61. Surprisingly, neither the amount of recovered transgenic cells nor their ability to proliferate and produce IL-2 was not diminished but rather enhanced in PC61-treated mice.

These data show that the acceleration of the tumor growth after therapeutical Treg-depletion is not due to a co-depletion of Teff. It seems that the development of tumor rejection is dependent on the infiltration by CD4⁺ and CD8⁺ T cells. The preventive Treg-depletion results in diminished infiltration by Treg and enhanced infiltration of CD4⁺ and CD8⁺ T cells. During later stages of tumor development the tumor seems to create a milieu that disables the diapedesis of T cells and mAb into the tumor tissue.

1 Einleitung

Das Immunsystem setzt sich aus zwei Hauptkomponenten zusammen, der angeborenen Immunität und der adaptiven (oder erworbenen) Immunität. Zu den Zellen der angeborenen Immunität zählen Granulozyten, Makrophagen und das Komplementsystem. Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) werden ebenfalls der angeborenen Immunität zugeordnet, stellen aber ein Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunität dar.

Die adaptive Immunität wird von B- und T-Zellen vermittelt und zeichnet sich durch Spezifität, Diversität (VDJ-Rekombination), Gedächtnis, Selbstbeschränkung und die Fähigkeit zwischen Selbst und Fremd zu unterscheiden aus. Diese Fähigkeit der Unterscheidung bewirkt die sogenannte Selbst-Toleranz, die sich im gesunden Körper dadurch auszeichnet, dass Selbst-Antigene im allgemeinen keine Immunreaktionen auslösen.

Tumore nutzen diese Eigenschaft, um dem Immunsystem zu entgehen. Da Tumore aus ursprünglich normalen Körperzellen entstehen, werden sie nicht als Fremd erkannt und lösen somit keine Immunreaktion aus.

1.1 Tumorummunologie

Tumore entstehen durch das progressive Wachstum einer einzigen durch Anhäufung von Mutationen transformierten Zelle. Diese Mutationen können entweder spontan entstehen oder aber durch exogene Faktoren wie karzinogene Substanzen (Tabakrauch, bestimmte Chemikalien) oder Viren (Zervixkarzinom durch HPV, Hepatozelluläres Karzinom durch HBV) ausgelöst werden.

In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass durch Injektion von lethal bestrahlten Tumorzellen eine T-Zell abhängige Abstoßung der später injizierten Tumorzellen erreicht wird [1, 2]. Diese Tatsache zeigt, dass es möglich ist tumorspezifische Immunreaktionen auszulösen. Um wirksame Methoden zur Tumorthherapie entwickeln zu können ist es daher notwendig, die

Zusammenhänge zwischen Tumorentwicklung und Reaktionen des Immunsystems auf den Tumor zu untersuchen.

An einer Tumorabstoßung sind hauptsächlich T-Zellen beteiligt. Daher ist es notwendig T-Zell Reaktionen gegen Tumore zu charakterisieren um sie für Therapiezwecke modifizieren zu können.

1.1.1 T-Zellen

Die Vorläuferzellen der T-Zellen (Prä-T-Zellen) entstehen im Knochenmark und wandern zur weiteren Entwicklung in den Thymus. Dort reifen die Prä-T-Zellen zu T-Zellen heran, die mittels des T-Zell Rezeptors (TCR) Peptide (Antigene) erkennen können, die von körpereigenen Strukturen, den MHC-Molekülen (*Major histocompatibility complex*), präsentiert werden [3]. Im Kortex des Thymus findet zunächst die positive Selektion der T-Zellen statt. Dabei überleben nur T-Zellen, deren TCR die körpereigenen MHC-Moleküle erkennt. Die negative Selektion findet in der Medulla des Thymus statt. Die medullären Thymusepithelzellen (mTEC) präsentieren über MHC-Moleküle körpereigene Peptide (Autoantigene). T-Zellen deren TCR mit zu starker Avidität (Bindungsstärke) diese Autoantigene erkennt, werden deletiert [4, 5, 6].

Durch diese Selektion werden die meisten autoreaktiven T-Zellen entfernt, bevor sie in die peripheren Lymphorgane auswandern können. Diese Selektion von T-Zellen, die nicht auf Autoantigene reagieren, wird auch als zentrale Toleranz bezeichnet.

MHC Moleküle präsentieren Peptide und werden in Klasse I und II eingeteilt. MHC Klasse I wird von allen kernhaltigen Zellen exprimiert und präsentiert intrazelluläre Antigene, die durch Prozessierung durch das Proteasom entstehen. Die MHC Klasse I Moleküle werden spezifisch vom TCR der CD8⁺ T-Zellen erkannt.

MHC Klasse II wird auf professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APC), wie dendritischen Zellen (DC), Makrophagen oder B-Zellen, exprimiert und präsentiert Peptide von extrazellulären Antigenen, die von diesen Zellen aufgenommen und endosomal durch Proteasen prozessiert werden. Diese Moleküle werden vom TCR der CD4⁺ T-Zellen erkannt [9]. Um eine T-Zelle zu aktivieren werden zwei Signale benötigt. Das erste Signal wird über

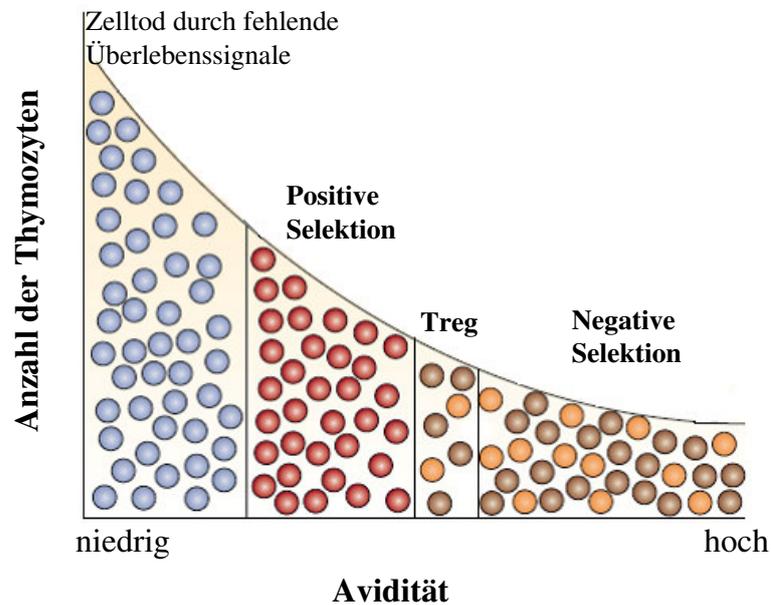


Abb. 1.1: Selektion des TCR Repertoires adaptiert nach Hogquist *et al.*, 2005 und Schwartz *et al.*, 2005 [7, 8].

Im Thymuskortex überleben nur T-Zellen, die Selbst-MHC mit einer gewissen Avidität erkennen. Diese positiv selektierten Zellen werden anschließend in der Medulla der negativen Selektion unterzogen. Dabei werden autoreaktive T-Zellen entweder deletiert oder werden zu Treg, wobei eine geringe Menge an T-Zellen überlebt, die potentiell Autoantigene erkennen können.

die spezifische Bindung des TCR an einen Peptid:MHC-Komplex vermittelt. Das zweite Signal wird durch die Bindung von kostimulatorischen Molekülen (CD28 auf T-Zellen; B7 auf APC) vermittelt. Dadurch kommt es zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die bewirken, dass die Zelle proliferiert und Zytokine produziert. Ohne dieses zweite Signal wird die T-Zelle anerg, kann also nicht mehr proliferieren oder Zytokine produzieren [10, 11, 12].

Nach der Interaktion mit einer aktivierten APC differenzieren $CD8^+$ T-Zellen zu zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL). Sobald sie ihren spezifischen Peptid:MHC Komplex erkennen setzen sie Perforine und Granzyme frei, die die Zielzelle durchlöchern und Apoptose auslösen. Außerdem exprimieren sie FasL (CD95L) auf ihrer Oberfläche, wodurch sie Fas (CD95) auf Zielzellen binden und somit ebenfalls Apoptose in diesen Zellen induzieren.

CD4⁺ T-Zellen differenzieren abhängig vom Zytokinprofil der APC entweder zu Th 1-, Th 2- oder Th 17-Zellen, wobei die von den jeweiligen Th-Zellen produzierten Zytokine hemmend auf die anderen Th-Zellen wirken.

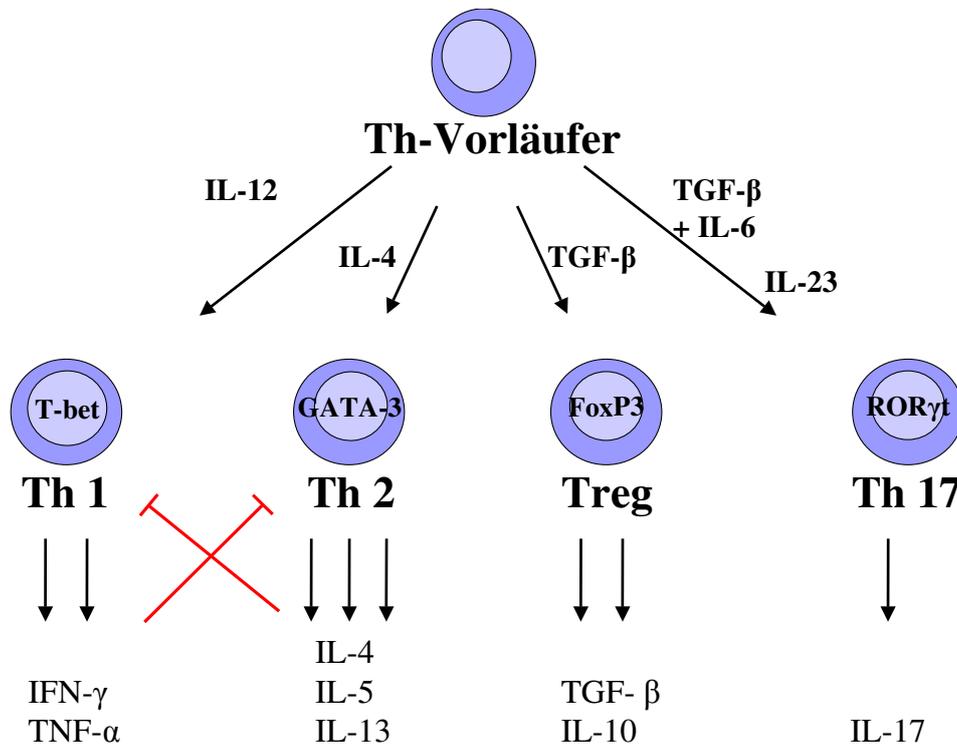


Abb. 1.2: Th-Zelllinien adaptiert nach Afzali *et al.*, 2007 [13]).

Th-Vorläuferzellen können abhängig vom Zytokinmilieu zu verschiedenen Th-Zellen differenzieren. Anwesenheit von IL-12 bewirkt die Polarisierung zur Th 1-Zelle, die durch Expression des Transkriptionsfaktors T-bet und Produktion der Zytokine TNF- α und IFN- γ charakterisiert sind. Dabei verhindert IFN- γ die Differenzierung von Th 2-Zellen. Durch IL-4 werden die Vorläuferzellen zu Th 2-Zellen, die den Transkriptionsfaktor GATA-3 exprimieren und IL-4, IL-5 und IL-13 produzieren. IL-4 verhindert außerdem die Differenzierung von Th 1-Zellen. Th-Vorläufer differenzieren in Anwesenheit von TGF- β zu FoxP3-exprimierenden Treg, die TGF- β und IL-10 produzieren können. Durch IL-23 oder durch die Kombination von TGF- β und IL-6, differenzieren die Vorläufer zu Th 17-Zellen, die IL-17 produzieren.

In Anwesenheit von IL-12 entstehen Th 1-Zellen, die unter anderem IFN- γ , TNF- α und GM-CSF produzieren und aktivierend auf Makrophagen wirken.

Th 2-Zellen entstehen in Anwesenheit von IL-4, produzieren IL-4, IL-5 und IL-13 und bewirken die Aktivierung von B-Zellen [14, 15, 16].

Die erst seit kurzem entdeckten Th 17-Zellen entstehen durch IL-23 oder die Kombination

von TGF- β und IL-6. Sie produzieren IL-17 und wurden im Zusammenhang mit Autoimmunreaktionen beschrieben [17, 18, 19].

CD4⁺ T-Zellen werden außerdem benötigt, um CD8⁺ T-Zellen zu aktivieren. Durch CD4⁺ T-Zellen können APC so aktiviert werden, dass sie verstärkt kostimulatorische Moleküle exprimieren, sogenannte „cross-presentation“ [20, 21].

Eine weitere Subpopulation der CD4⁺ T-Zellen stellen die regulatorischen T-Zellen dar. Sie sind in Lage aktivierte T-Zellen zu supprimieren.

1.1.2 Regulatorische T-Zellen (Treg)

Da während der Selektion von T-Zellen im Thymus nicht alle Autoantigene präsentiert werden können, überleben immer auch einige autoreaktive T-Zellen. Deshalb gibt es ebenfalls Mechanismen, die der peripheren Toleranz dienen. Einer dieser Mechanismen sind regulatorische T-Zellen (Treg), die in der Lage sind Effektor T-Zellen zu supprimieren.

Den ersten Hinweis auf die Existenz von T-Zellen mit suppressiver (regulatorischer) Funktion gaben Untersuchungen an Nagetieren, deren Thymus entfernt wurde.

Eine Thymektomie in neugeborenen Mäusen führte, wenn sie nicht später als am dritten Tag nach der Geburt durchgeführt wurde, zur Entwicklung von Autoimmunreaktionen gegen die Ovarien. Die Autoimmunreaktionen konnten durch Injektionen von syngenen CD4⁺ T-Zellen verhindert werden [22]. Durch diese Beobachtungen konnten die suppressiv wirkenden Zellen eindeutig der Population der CD4⁺ Zellen zugeordnet werden. Eine ähnliche Wirkung hatte eine Thymektomie und Röntgenbestrahlung bei adulten Ratten, bei denen nach dieser Behandlung Autoimmunreaktionen gegen die Schilddrüse beobachtet wurden [23].

Im Laufe der Zeit wurden natürliche regulatorische T-Zellen (Treg) phänotypisch und funktionell charakterisiert, wobei versucht wurde, einen spezifischen Oberflächenmarker für diese Subpopulation zu finden. In diesem Zusammenhang wurden viele Marker beschrieben, die auf Treg exprimiert werden, die allerdings auch auf aktivierten Effektor T-Zellen vorkommen (CD5 [24], CD45RB [25, 26], CD25 [27], CD62L [28], GITR [29, 30], CTLA-4, Neuropilin [31], OX-40[32]).

Mittlerweile dient die Kombination dieser Marker als relativ sicherer Nachweis für Treg. Besonders das CD25-Molekül wird häufig als Merkmal für Treg verwendet. Es wird von

ruhenden T-Zellen unter normalen Umständen nicht exprimiert, sondern erst nach ihrer Aktivierung heraufreguliert. Treg hingegen exprimieren auch in ruhendem Zustand CD25.

Ein weiterer wichtiger Marker, der zumindest in der Maus ausschließlich in Treg vorkommt, ist der Transkriptionsfaktor Forkheadbox P3 (FoxP3), dessen Gen auf dem X-Chromosom lokalisiert ist. Beim Menschen kann FoxP3 jedoch auch in konventionellen T-Zellen exprimiert werden, kommt hier also als spezifischer Marker für Treg nicht in Frage [33].

Eine Mutation im FoxP3-Gen wurde für Patienten mit IPEX (*immune dysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome*) und ebenfalls für *scurfy*-Mäuse beschrieben, die einen Knock-out für das FoxP3 Gen aufweisen. Männliche Nachkommen dieser Mäuse sterben spätestens einen Monat nach der Geburt, Weibchen entwickeln schwere Autoimmunerkrankungen [34, 35].

In naiven Mäusen beträgt der Anteil der Treg 5-10 % innerhalb der CD4⁺ T-Zellen und sie werden ebenso wie konventionelle CD4⁺ T-Zellen im Thymus selektiert [36, 37]. Außerdem können Treg in der Peripherie aus konventionellen T-Zellen durch TGF- β induziert werden [38, 39].

Funktionell lassen sich Treg von konventionellen T-Zellen dadurch unterscheiden, dass sie nach *in vitro* TCR-Stimulierung und Kostimulation nicht proliferieren und kein IL-2 produzieren, also anerg sind. Jedoch sind Treg nach ihrer Aktivierung über den TCR in der Lage die Proliferation konventioneller T-Zellen zu supprimieren. Diese Inhibierung ist antigenunabhängig [40, 41, 42].

Im gesunden Körper besteht eine Balance zwischen autoreaktiven Zellen und Treg. So soll eine Aktivierung von autoreaktiven T-Zellen verhindert werden. Durch das Fehlen von Treg können autoreaktive T- und B-Zellen nicht mehr supprimiert werden, was zur Ausbildung von Autoimmunität, wie im Falle von IPEX Patienten und *scurfy* Mäusen, führt. Umgekehrt trägt die Präsenz von Treg in Tumorpatienten oder tumortragenden Mäusen dazu bei, die ohnehin schwachen T-Zell Antworten gegen den Tumor zu inhibieren.

1.1.3 Tumorantigene und „Escape“-Mechanismen

Es sind verschiedene Tumorassoziierte Antigene (TAA) bekannt, die in sechs Antigenklassen eingeteilt werden (s. 1.1, wobei es sich bei den meisten TAA um körpereigene Antigene handelt. Die erste Klasse, die Keimzellen Antigene, wird nur während der Embryonalentwicklung und später in den männlichen Keimzellen exprimiert. Ein Beispiel dafür ist MAGE, das das erste identifizierte Tumorassoziierte Antigen war und von CTL erkannt wird [43, 44]. Eine weitere Antigenklasse stellen die Differenzierungs Antigene dar. Diese werden nur in bestimmten Geweben oder Zellen exprimiert.

Durch Punktmutationen oder Genumlagerungen bzw. fehlerhafte Modifikation nach der Translation sind die dritte bzw. vierte Klasse der TAA charakterisiert.

| Antigenklasse | Antigen | Tumor |
|---|---|-----------------------------------|
| I) Keimzellen Antigene (Cancer Testis) | MAGE | Melanom |
| II) Differenzierungs Antigene | Tyrosinase; TRP-1, -2; gp75 MART-1; Melan-A; gp100 | Melanom |
| III) mutierte Onkogene oder Tumorsuppressorgene | CDK 4; β -Catenin | Melanom |
| IV) Modifikationsfehler nach Translation | MUC-1 | Mammakarzinom |
| V) Überexpression von Selbst-Antigenen | HER2/neu | Mammakarzinom |
| VI) virale Antigene | EBNA-1 (EBV) E6+E7(HPV 16) | Burkitt-Lymphom Zervixkarzinom |

Tabelle 1.1: Tumorantigene

In einigen Tumorarten werden Selbst-Antigene überexprimiert. Diese werden der fünften TAA Klasse zugeordnet.

Die letzte Klasse der Tumorantigene bildet einen Kontrast zu den anderen Klassen, da es

sich hier nicht um körpereigene sondern um virale Antigene (onkovirale Proteine) handelt. Immunreaktionen gegen die tumorspezifischen Antigene finden allerdings *in vivo* nur äußerst selten statt. Einerseits ist dies vermutlich darauf zurückzuführen, dass es sich bei den oben genannten Antigenen oftmals um Selbst-Antigene handelt. Andererseits haben Tumore verschiedene Möglichkeiten, um der Überwachung durch das Immunsystem zu entgehen. Diese werden auch als „immune escape“-Mechanismen bezeichnet. Ein Mechanismus beruht beispielsweise auf einem gewissen Selektionsdruck auf den Tumor. Tumorzellen, die aufgrund ihrer Expression von bestimmten Tumorantigenen vom Immunsystem erkannt werden, werden von T-Zellen dezimiert. Durch das schnelle Tumorwachstum gibt es aber auch immer mutierte Zellen, die Antigenvarianten exprimieren und somit der T-Zell-Antwort entgehen und überleben.

Eine weitere Möglichkeit, der Überwachung durch das Immunsystem zu entgehen ist die Produktion von Zytokinen, die direkt hemmend auf T-Zellen wirken (TGF- β , IL-10). Diese Zytokine können entweder von den Tumorzellen selbst, oder durch tumorinfiltrierende Lymphozyten, wie Makrophagen oder DC, produziert werden [45, 46, 47]. Ein weiterer Escape-Mechanismus ist die Herunterregulierung von MHC-Molekülen und dadurch eine ungenügende Präsentation von Antigenen. Dies bewirkt, dass der Tumor eine reduzierte Immunogenität aufweist und nicht vom Immunsystem erkannt wird. Das maligne Melanom ist ein charakteristisches Beispiel für einen sehr schwach immunogenen Tumor.

1.2 Das maligne Melanom

Das maligne Melanom ist ein kutaner Tumor melanozytischen Ursprungs. In Europa macht das maligne Melanom etwa 1 bis 2 % aller malignen Tumore aus. Jedes Jahr kommt es zu ca. 18000 neu diagnostizierten Fällen und etwa 5000 Todesfällen europaweit.

Als Hauptrisikofaktor gilt die ungeschützte Exposition gegenüber Sonnenlicht (UV-A- und UV-B-Strahlung). Außerdem spielt der Hauttyp eine entscheidende Rolle für die Entwicklung des malignen Melanoms. Diese Feststellung geht mit der Beobachtung einher, dass 20 Mal mehr hellhäutige als dunkelhäutige Menschen am malignen Melanom erkranken [48].

Andererseits gibt es auch eine genetische Prädisposition zur Entwicklung des malignen Melanoms. Berichten zufolge kommt diese Erkrankung in einigen Familien gehäuft vor. Diese

Fälle machen ungefähr 5-10 % aller Fälle von malignem Melanom aus und gehen mit Schäden in bestimmten Genen, wie CDK4 (cyclin-dependent kinase 4) oder p16, deren Produkte am Zellzyklus beteiligt sind, einher [43].

Seit einigen Jahren nimmt die Inzidenz des malignen Melanoms zu, wobei aber die Mortalitätsrate ungefähr gleich bleibt, was auf eine frühere Erkennung des Tumors schließen lässt. Die Klassifizierung des malignen Melanoms in vier Stadien und neun Abstufungen dieser Stadien erfolgt anhand der TNM-Stadieneinteilung (T = Tumordicke, N = Lymphknotenbeteiligung, M = Fernmetastasierung).

Während des ersten Stadiums sind lediglich die Epidermis sowie der obere Teil der Dermis betroffen, während die Tumorgöße nicht mehr als 1,5 mm beträgt. Bei Entfernung des Tumors in diesem Stadium liegt die Überlebensrate für die folgenden fünf Jahre bei ca. 90 %. Beim Übergang in Stadium II hat der Tumor eine Größe zwischen 1,5 mm und 4 mm erreicht und sich über die Dermis in die Subkutis ausgebreitet. Die 5-jährige Überlebensrate variiert in diesem Stadium zwischen 78 % (Stadium IIA) und 45 % (Stadium IIC).

Im anschließenden Stadium III kommt es zur Invasion der regionalen Lymphknoten durch Tumorzellen und kann darüber hinaus zur Entwicklung von zusätzlichen Tumoren in unmittelbarer Umgebung des Ursprungstumors führen. Die Überlebensrate für die folgenden fünf Jahre variiert ebenfalls stark zwischen 69 % und 13 %.

Während des vierten Stadiums kommt es zur Metastasierung in weiter entfernte Organe wie Leber, Lunge, Knochen oder Gehirn. Dabei verschlechtert sich die Prognose bei Leber- und Hirnmetastasen erheblich; die 5-jährige Überlebensrate bei Diagnose dieses Stadiums beträgt nur noch zwischen 18 % und 9 % [49, 50].

Zur Zeit ist diese Art der Einteilung nach Tumorgöße und Ausbreitung die beste Möglichkeit eine Prognose für diese Tumorart zu erstellen.

1.2.1 Klassische Behandlungsmethoden

Die schlechte Prognose bezüglich der Überlebensrate kommt erst zustande, wenn der Tumor begonnen hat zu metastasieren. Die chirurgische Entfernung des Primärtumors ist die einzig effektive therapeutische Maßnahme beim malignen Melanom. Bei der Behandlung der Metastasen in späteren Tumorstadien zeigen Methoden wie Radiotherapie oder systemische

Chemotherapie wenig Erfolg. Die Radiotherapie wird hauptsächlich als palliative Therapie zur temporären Verminderung der Symptome bei lokalen inoperablen Metastasen eingesetzt [51, 52].

Das im Zusammenhang mit metastasierendem Melanom am häufigsten verwendete Chemotherapeutikum ist Dacarbazine (DTIC = 5-(3,3-Dimethyl-1-triazenyl)imidazole-4-carboxamide) [53]. Dieses ist ein Zytostatikum das zur Gruppe der Alkylantien gehört. Diese sind in der Lage DNA-Stränge zu vernetzen und dadurch die Replikation und somit die Zellteilung zu verhindern. Da Melanomzellen eine hohe Resistenz gegenüber Chemotherapeutika aufweisen liegt die Wirkung des DTIC auf metastasierende Melanomzellen bei nur 14-20 % und hält für lediglich vier bis sechs Monate an. Auch Kombinationstherapien, bei denen mit verschiedenen Chemotherapeutika gleichzeitig behandelt wurde, zeigten keine Steigerung der Überlebensrate.

Da DTIC hauptsächlich auf stark proliferierende Zellen wirkt, werden langsam wachsende maligne Zellen verschont. Diese langsam proliferierenden Zellen sind vermutlich verantwortlich für das Auftreten neuer Metastasen nach vermeintlich erfolgreicher Therapie [54].

Die einzige therapeutische Methode, die zu einem gewissen Grad die Überlebensrate der Patienten verbessert ist eine sogenannte „Biochemotherapie“ mit hochdosiertem Interferon- α (IFN- α) [55, 56, 57, 58].

1.2.2 Neue Therapieansätze

Bisher wurden Krebsmedikamente durch zufälliges „screening“ von Substanzen entwickelt, die allerdings größtenteils auch toxisch auf gesunde Körperzellen wirken. In letzter Zeit wird daher versucht zielgerichteter nach Medikamenten zu suchen. Beispielsweise werden Inhibitoren für Tyrosinkinase Rezeptoren oder Antikörper gegen Überlebensfaktoren des Tumors eingesetzt [59, 60]. Die so entwickelten Medikamente erzielten bereits bei Brust-, Lungen-, Nieren- und anderen Karzinomen gute therapeutische Wirkungen.

Wie Tab. 1.1 verdeutlicht, sind für das maligne Melanom verhältnismäßig viele Tumorantigene bekannt. Diese Gegebenheit ist die Grundlage für einen weiteren Therapieansatz, die sogenannte Immuntherapie. Dabei macht man sich zunutze, dass in Tumorpatienten kleine T-Zellpopulationen identifiziert werden konnten, die zwar von Melanomzellen exprimierte

Tumorantigene (1.1.3) spezifisch erkennen, aber nicht in der Lage zu sein scheinen, eine Abstoßungsreaktion gegen den Tumor hervorzurufen.

In klinischen Studien wurde daher versucht, diese T-Zellen zu stimulieren um eine effektive Abstoßung des Tumors zu erreichen. Zu diesem Zweck wurden Patienten mit metastasierendem Melanom autologe dendritische Zellen injiziert, die zuvor mit MAGE-Peptiden beladen worden waren. Dabei zeigte sich, dass es in einigen wenigen Patienten zu einer teilweisen Regression des Tumors kam [61, 62, 63, 64].

Diese viel versprechenden Studien können aus ethischen Gründen allerdings nur bedingt durchgeführt werden. Um also immuntherapeutische Ansätze weiterzuentwickeln und zu spezifizieren, ist es angebracht sich eines Tiermodells zu bedienen.

Besonders im Falle des malignen Melanoms gibt es wenige geeignete Tiermodelle. Das am häufigsten verwendete Modell ist das des murinen B16 Melanoms, das eine große Ähnlichkeit zum humanen Melanom aufweist. Es handelt sich hierbei um Tumorzellen, die klassische Melanomantigene (TRP-2, gp100), sowie MHC Klasse I Moleküle des Haplotyps H-2^b exprimieren. Um B16 als Modell für solide Tumore zu verwenden werden die Tumorzellen s.c. injiziert; für ein Metastasen-Modell werden die Zellen i.v. injiziert. Die auf diese Weise induzierten Tumore erweisen sich als vergleichbar aggressiv, wie das maligne Melanom des Menschen.

Mit Hilfe dieses Modells wurden ebenfalls viel versprechende Experimente zur Vakzinierung gegen das Melanom durchgeführt. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass eine Immunisierung von Mäusen mit dendritischen Zellen, die mit dem Tumorantigen TRP-2 transduziert oder gepulst waren, die Bildung von Lungenmetastasen bzw. das Wachstum eines soliden Tumors verhinderten [65, 66, 67]. Darüber hinaus zeigte sich auch, dass die Anwesenheit von Treg sich negativ auf die Wirkung der Vakzinierung auswirkte [68, 69, 70].

1.2.3 Treg in der Tumorimmunologie

Die Tatsache, dass Treg eine Rolle bei der Unterdrückung von Immunreaktionen gegen Tumore spielen wurde sowohl human als auch im murinen Modell nachgewiesen. In einer Studie mit 104 Patientinnen mit Ovarialkarzinom wurde gezeigt, dass Treg durch das von Tumorzellen

len und infiltrierenden Makrophagen produzierte Chemokin CCL22 zum Tumor migrierten, wo sie sich anreicherten. Dort supprimierten sie tumorspezifische Reaktionen von Effektor T-Zellen. Die Anwesenheit der Treg im Tumor ging außerdem mit einer erhöhten Todesrate einher [71].

Bei der Untersuchung von karzinomatöser neoplastischer Meningitis wurde festgestellt, dass in der Zerebrospinalflüssigkeit von Patienten erhöhte Konzentrationen der chemotaktisch aktiven Chemokine CCL17 und CCL22 auftraten, die zu einer lokal erhöhten Anzahl von Treg führte, was wiederum mit einer schlechteren Prognose einher ging [72].

Diese Daten deuten darauf hin, dass die Anwesenheit von Treg am Ort der Tumorentwicklung ein immunsuppressives Milieu fördert, das zu verstärktem Tumorwachstum beiträgt. Um wirksame Tumorthérapien entwickeln zu können ist es daher essentiell eine Methode zu finden, mittels der Treg aus Tumorpatienten entfernt oder ihre Funktion inhibiert werden kann.

Auch in murinen Tumormodellen konnte eine Akkumulation von Treg in Tumoren nachgewiesen werden. In einem Fibrosarkom machten Treg in späten Stadien den Hauptteil der infiltrierenden Lymphozyten aus [73]. Im murinen Kolonkarzinom CT26 wurde gezeigt, dass die Anzahl der Treg in tumortragenden Mäusen in drainierenden Lymphknoten und Milz stark ansteigt [74]. Auch in Sarkomen wurde beobachtet, dass eine relativ große Menge an Treg im Tumoringfiltrat zu finden ist [75].

Für das B16 Melanom wurde ebenfalls gezeigt, dass Treg im Tumor vorkommen [76]. Obwohl noch nicht mit Sicherheit geklärt ist, ob Treg spezifisch im B16 Melanom akkumulieren, ob sie zum Tumorort migrieren, oder ob sie im Tumor oder den drainierenden Lymphknoten konvertiert werden, gibt es einen einzelnen Hinweis auf ihren Ursprung im Tumor. Mittels BrdU Einbau wurde festgestellt, dass tumorinfiltrierende Treg durch TGF- β , das von unreifen DC produziert wird, zur Proliferation angeregt werden [47].

Diese Daten zeigen, dass Treg auch im Maussystem eine entscheidende Rolle spielen.

Aus diesen Gründen wurden in murinen Tumormodellen verschiedene Möglichkeiten der Treg-Depletion oder Inaktivierung getestet, um eine Vakzierung und/oder Therapie zu verbessern.

Zur *in vivo* Depletion von Treg wird meist ein monoklonaler Antikörper (mAk) gegen das für Treg charakteristische Oberflächenmolekül CD25 eingesetzt. Dieser mAk (PC61) wird systemisch appliziert und bewirkt die Depletion der Treg. Dabei ist immer noch umstritten ob es sich dabei um eine Komplement-vermittelte Entfernung oder lediglich eine Antikörper-vermittelte Inaktivierung der Zellen handelt [77, 78, 79, 80].

Es konnte gezeigt werden, dass eine Depletion der Treg mittels PC61-Injektion vor der Inokulation der B16-Tumorzellen zu einer Abstoßung der Tumore führte und eine Immunität gegenüber B16 erzielt wurde. Über die Frage welche Zellen dabei für die Tumorabstoßung verantwortlich sind gibt es widersprüchliche Aussagen in der Literatur. Dieser Effekt könnte sowohl durch CD8-Zellen und NK-Zellen, ausschließlich durch CD4-Zellen oder einer gemeinsamen Wirkung dieser drei Faktoren vermittelt werden [81, 82].

In anderen Studien wurde die Treg-Depletion durch PC61 mit weiteren therapeutischen Methoden kombiniert, um die Effektivität der Tumorabstoßung zu erhöhen.

In einer Studie wurden Treg in Mäusen mittels PC61 depletiert und anschließend mit einer Kombination aus Vakzinierung mit GM-CSF-produzierenden bestrahlten B16-Zellen und einer Blockierung von CTLA-4 behandelt. Auf diese Weise sollten neben der PC61-induzierten Depletion von Treg außerdem tumorspezifische Immunreaktionen durch bestrahlte B16-Zellen und die Antikörper-vermittelte Blockierung des inhibitorischen Rezeptors CTLA-4, der auf aktivierten konventionellen CD4⁺ T-Zellen exprimiert wird, verstärkt induziert werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass diese Behandlung zur Verlangsamung des Tumorstadiums führte, was darauf zurückzuführen war, dass die Tumore durch die Behandlung stärker von aktivierten Effektor T-Zellen infiltriert wurden. Die Überlebensrate der Mäuse wurde außerdem deutlich erhöht [76, 83].

Neben bestrahlten Tumorzellen wird auch die Injektion von Antigen-beladenen DC als Mittel verwendet, um Tumor-spezifische T-Zellen zu aktivieren. Reife DC, die entweder durch Elektroporation mit mRNA für ein bestimmtes Antigen oder durch Kokultur mit lysierten Tumorzellen zur Präsentation von Tumorantigenen gebracht wurden, aktivieren nach ihrer Injektion in Mäuse antigenspezifische CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen. Dadurch kommt es zum

verlangsamten Tumorwachstum. Durch eine zusätzliche Depletion der Treg mittels PC61 vor dieser Behandlung kann dieser Effekt erheblich verbessert werden und führt zu lang anhaltendem Schutz vor Tumorwachstum [68, 69].

Diese Studien zeigen, dass Treg suppressiv auf potentielle tumorreaktive T-Zellen wirken und somit bei der Tumormunität eine entscheidende Rolle spielen. In der Konsequenz hemmt ihre Depletion ein anschließendes Tumorwachstum.

Welche Wirkung die Treg-Depletion allerdings zu späteren Zeitpunkten der Tumorentwicklung hat, was für therapeutische Zielsetzungen von Bedeutung wäre, ist nicht hinreichend geklärt.

Für die Anwendung im Menschen steht bislang kein, mit PC61 vergleichbarer Antikörper, zur Verfügung. Allerdings wurde in einigen humanen Studien ein Fusionsprotein aus IL-2 und Diphtherie Toxin (ONTAK, Denileukin Diftitox) verwendet, das ebenfalls in der Lage ist Treg *in vivo* zu depletieren. Über das IL-2-Ende bindet dieses Fusionsprotein an CD25 auf Treg und wird internalisiert. In der Zelle wird das Diphtherie Toxin aktiviert und verhindert die weitere Proteinbiosynthese, wodurch die Zelle stirbt.

Berichte über den durch ONTAK erreichten Depletionserfolg von Treg in Melanompatienten sind jedoch widersprüchlich. Insgesamt konnte keine verbesserte Prognose erzielt werden [84, 85].

Bei einem relativ neuen Ansatz macht man sich die Wirkung der kostimulatorischen Moleküle OX40 und OX40L zunutze. OX40 wird auf konventionellen und regulatorischen CD4⁺ T-Zellen exprimiert. Während die Bindung von OX40 an seinen Liganden (OX40L) bei konventionellen CD4⁺ T-Zellen zur Ausbildung von Effektorfunktionen führt, wirkt sie auf Treg inhibierend. In der Folge verlieren sie die Fähigkeit Effektorzellen zu supprimieren [86, 32, 87]. Durch die Injektion von mit OX40L transfizierten DC konnte bereits gezeigt werden, dass T-Zell-vermittelte Reaktionen gegen Tumore verbessert wurden [88].

1.3 Zielsetzung

Die bisher verwendeten klassischen Behandlungsmethoden zeigen im Melanom nur wenig Erfolg, da sich die Tumorzellen durch eine hohe Resistenz gegenüber Chemotherapeutika wie DTIC auszeichnen. Darüber hinaus wirken diese Behandlungsmethoden nur unspezifisch auf sich schnell teilende Zellen.

Neue Therapieansätze, wie die Beladung von DC mit Tumorantigenen, wirken selektiv auf die Tumorzellen und nicht auf andere proliferierende Zellen des Körpers. Klinische Studien zeigten jedoch, dass diese neuen Tumorthérapien alleine nicht ausreichen, um eine Abstoßung bereits etablierter Tumore bewirken zu können. Dies könnte beispielsweise auf die immunsuppressive Wirkung von Treg zurückzuführen sein. Diese Zellen können in verschiedenen Tumoren beim Menschen aber auch im Mausmodell nachgewiesen werden und ihre Anwesenheit korreliert mit einer negativen Prognose.

Eine Möglichkeit Tumorabstoßungsreaktionen zu verbessern könnte daher die Depletion von Treg darstellen. In diesem Zusammenhang konnte bereits die präventive Therapie, also die Treg-Depletion vor der Tumordinokulation, erfolgreich eingesetzt werden, um Vakzinierungen gegen verschiedene Tumore im Mausmodell zu verbessern.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob eine Depletion der Treg als therapeutische Maßnahme, also nach der Tumordinokulation, eingesetzt werden könnte. Dazu wurden folgende Teilaspekte untersucht.

Zunächst sollte die Effektivität der Treg Depletion durch die Injektion des mAk PC61 bestimmt werden. Dabei sollte ebenfalls festgestellt werden, ob durch die Injektion dieses Antikörpers Nebenwirkungen auf andere Lymphozyten entstehen.

Anschließend sollte diese Methode eingesetzt werden, um Treg in tumortragenden Mäusen einerseits präventiv oder therapeutisch zu depletieren. Hier sollte die Wirkung des Zeitpunktes der Treg-Depletion auf das Tumorwachstum charakterisiert werden. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob Tumorantigen-spezifische T-Zellen durch Injektion von Tumorlysat-beladenen DC zusätzlich aktiviert werden können und so eine Tumorabstoßung induziert wird.

Ein weiterer zu untersuchender Aspekt war die Wirkung der Treg-Depletion auf die Verteilung von Lymphozyten in Tumor-drainierenden Lymphknoten und den Tumoren. In diesem Zusammenhang sollte festgestellt werden, ob die Depletion von Treg die Zusammensetzung der Tumordinfiltrierenden Lymphozyten verändert. Hierbei sollten insbesondere Unterschiede zwischen der präventiven und der therapeutischen Applikation des mAk PC61 untersucht werden.

In funktionellen Analysen sollte außerdem die Frage geklärt werden, ob der mAk PC61 in der Lage ist aktivierte Effektor T-Zellen zu depletieren oder zu inaktivieren.

2 Material

2.1 Geräte und Zubehör

Tabelle 2.1: Geräte und Zubehör

| Geräte | Typ und Zubehör | Hersteller |
|--|---|---|
| Brutschränke | MCO-20 AIC | Sanyo Fisher Sales (Europe) GmbH, München, D |
| | MCO-17 AI | |
| Durchflusszytometer | BD FACSCanto + FACSDiva Software | BD Biosciences, Heidelberg, D |
| Erntegerät | MicroBeta FilterMate-96 Harvester | PerkinElmer (Packard), Waltham, USA |
| Flüssigkeits-Szintillations- Analysator | MicroBeta TriLux 1450LSC and Luminescence Counter | PerkinElmer, Waltham, USA |
| Gelgießstand | Cast-It S | Peqlab, Erlangen, D |
| Gelkammer | PerfectBlue Doppelgel- system Twin S; Gelgröße 10×10 cm | Peqlab, Erlangen, D |
| Geldokumentations- system | ChemiDoc XRS System | Bio-Rad, München,D |

| Geräte | Typ und Zubehör | Hersteller |
|----------------------|--|--|
| Hamiltonpipette | 1 ml | Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, CH |
| Horizontalschüttler | Polymax wave platform shaker | Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, D |
| Kryotom | CM 1850 UV | Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, D |
| MACS Magneten | Quadro MACS Separator Mini MACS Separator | Miltenyi Biotec, Bergisch- Gladbach, D |
| Mikroskope | ID03 Leica DM IL Leica DM IRB | Carl Zeiss GmbH, Offenbach, D Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, D |
| Peristaltische Pumpe | Peristaltic Pump P-1 | GE Healthcare Europe GmbH, München, D |
| pH-Meter | PH211 autocalibration bench pH/mV-meter | HANNA Instruments, Leighton Buzzard, GB |
| Multikanalpipette | Finnpipette (8 Kanäle) | Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, USA |
| Pipetten | 2 μ l - 1000 μ l | Gilson, Bad Camberg, D |
| Pipettierhilfe | Pipetus | Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, D |

| Geräte | Typ und Zubehör | Hersteller |
|------------------|--|---|
| Präparierbesteck | | Dumont, CH |
| Photometer | Helios Gamma UV-Vis Spectrophotometer | Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, USA |
| Sterilbank | Herasafe HS 18, Klasse II | Heraeus Instruments, Hanau, D |
| Trockenschrank | | Memmert GmbH + Co.KG, Schwabach, D |
| Vortex | TopMix 94323 | Heidolph Instruments GmbH, u.Co.KG, Schwabach, D |
| Waagen | ABJ-120-4M EW600-2M | Kern und Sohn GmbH, Balingen, D |
| Zählkammer | Neubauer 0,0025mm ² /0,1mm | Brand GmbH, Schwerin, D |
| Zentrifuge | Multifuge RF | Heraeus Instruments, Hanau, D |

2.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 2.2: Verbrauchsmaterial

| | | |
|------------------------------------|---|---|
| Blot-Membran | PVDF Membranes; hydrophob Porengröße: 0,45 μm | Roche, Mannheim, D |
| Blotting-Papier | WhatmanR GB003 | Whatman GmbH, Dassel, D |
| Dialyseschläuche | MWCO: 12.000- 14.000 | Fisher Scientific GmbH, Schwerte, D |
| FACS-Röhrchen | BD Falcon TM 5 ml | BD Biosciences, Heidelberg, D |
| Falconröhrchen | 15 ml und 50 ml (Polystyrol) | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D |
| Glaspipetten | 10 ml | Hirschmann, Eberstadt, D |
| Kanülen | BD Microlance TM 3 30GA1/2 (0,3 mm×13 mm) 26G×1/2" (0,45 mm×13 mm) 22G×1 1/4Nr.12 (0,7 mm×30 mm) | Beckton Dickinson, Heidelberg, D |
| Kompartimen- tierter Bioreaktor | Celline CL 1000 | INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald, D |
| Kryo-Röhrchen | Nunc Cryo Tube Vials (1 ml) | Nunc GmbH, Invitrogen, Karlsruhe,D |

| | | |
|------------------|--|---|
| MACS-Säulen | LD MS | Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, D |
| Lochplatten | Microtest U-bottom 96-well 96-well cell culture cluster flatbottom 24-well cell culture cluster flatbottom 6-well cell culture plates | BD Biosciences, Heidelberg, D Costar®, Corning, New York, USA Costar®, Corning, New York, USA BD Biosciences, Heidelberg, D |
| Pasteur Pipetten | Pasteur Capillary pipettes; short size; 150mm | WU, Mainz, D |
| Petrischalen | 100×15 mm | Falcon, BD Biosciences, Heidelberg, D |
| Plastikpipetten | 2ml, 10ml, 25ml | SARSTEDT AG u. Co., Nümbrecht, D |
| Reaktionsgefäße | Eppendorf-Gefäße 0,5 ml; 1,5 ml | Eppendorf AG, Hamburg, D |
| Skalpelle | Disposable Scalpels | Feather Safety Razor CO., LTD., Osaka, Japan |
| Spritzen | BD Discardit II, 5 ml, 10ml, 20ml, 60ml | BD Biosciences, Heidelberg, D |

| | | |
|--------------------|---|--|
| Sterilfilter | Minisart 0,20 μm | Sartorius, Göttingen, D |
| Zellkulturflaschen | 25 cm^2 ; 75 cm^2 ; 175 cm^2 | Nunc GmbH, Invitrogen, Karlsruhe, D |
| Zellkulturschalen | 100 \times 15 mm; 60 \times 15 mm | Nunc GmbH, Invitrogen, Karlsruhe, D |
| Zellsiebe | 70 μm | Falcon, BD Biosciences, Heidelberg, D |

2.3 Antikörper und Chemikalien

2.3.1 Antikörper

Tabelle 2.3: Antikörper

| Antikörper | Klon | Isotyp | Spezies | Hersteller |
|-----------------------------|----------|-----------------|------------------------|--|
| B220-PE | RA3-6B2 | IgG2a, κ | Ratte | BD Biosciences, Heidelberg, D |
| CD3 ϵ -FITC | 145-2C11 | IgG1, κ | Armenischer Hamster | BD Biosciences, Heidelberg, D |
| CD4-APC/-PE -FITC/-PerCP | RM4-5 | IgG2a, κ | Ratte | BD Biosciences, Heidelberg, D |
| CD8 α -FITC | 53-6.7 | IgG2a, κ | Ratte | BD Biosciences, Heidelberg, D |
| CD11b-APC/ -PE | M1/70.15 | IgG2b, κ | Ratte | BD Biosciences, Heidelberg, D |
| CD11c-APC/ -PE | HL3 | IgG1, λ | Armenischer Hamster | BD Biosciences, Heidelberg, D |
| CD25-APC -PE | 7D4 | IgM, κ | Ratte | Beckman Coulter, Krefeld, D |
| CD25 | PC61 | IgG1, λ | Ratte | BD Biosciences, Heidelberg, D |
| CD69-PE | H1.3F3 | IgG1, λ | Armenischer Hamster | BD Biosciences, Heidelberg, D |
| CD90.1 (Thy-1.1)-PE | OX-7 | IgG1, κ | Maus- BALB/c | BD Biosciences, Heidelberg, D |
| F4/80-PE | CI:A3-1 | IgG2b | Ratte | AbD Serotec, Düsseldorf, D |
| F4/80-APC | BM8 | IgG2a, κ | Ratte | NatuTec (eBioscience), Frankfurt a. M., D |
| FoxP3-FITC | FJK-16s | IgG2a, κ | Ratte | NatuTec(eBioscience), Frankfurt a. M., D |
| Gr-1-PE | RB6-8C5 | IgG2b, κ | Ratte | BD Biosciences, Heidelberg, D |
| IL-2-APC | JES6-5H4 | IgG2b, κ | Ratte | eBioscience, San Diego, USA |

| Antikörper | Klon | Isotyp | Spezies | Hersteller |
|--------------------|-------------|------------------|----------------|---|
| IL-4-APC | 11B11 | IgG1, κ | Ratte | eBioscience, San Diego, USA |
| IFN- γ -APC | XMG1.2 | IgG1, κ | Ratte | eBioscience, San Diego, USA |
| NK1.1-APC | PK136 | IgG2a | Maus | Caltac (Invitrogen GmbH), Karlsruhe, D |
| MHCII-FITC | 2G9 | IgG2a, κ | Ratte | BD Biosciences, Heidelberg, D |
| V α 2 TCR | B20.1 | IgG2a, λ | Ratte | BD Biosciences, Heidelberg, D |

2.3.2 Chemikalien

Tabelle 2.4: Chemikalien

| Chemikalien | Firma |
|---|---|
| Ammoniumchlorid | Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D |
| Ammoniumperoxydisulfat (APS) | Roth, Karlsruhe, D |
| Aqua ad injectabilia | Braun, Melsungen, D |
| β -Mercaptoethanol | Merck, Darmstadt, D |
| Stammlösung: 50 mM | |
| BD GolgiPlug TM | BD Biosciences, Heidelberg, D |
| Protein Transport Inhibitor (Containing Brefeldin A) | |
| Biocoll-Trennlösung, 1,077 g/ml | Biochrom AG, Berlin, D |
| Bovines Serumalbumin (BSA) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D |
| CFSE | Invitrogen, Karlsruhe, D |
| Complete Freund's Adjuvants | Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D |
| <i>Di</i> -Natriumhydrogenphosphat | Merck, Darmstadt, D |
| DMSO | Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D |
| DMEM High Glucose (4,5g/l) w/o Glutamine | Gibco TM /Invitrogen, Karlsruhe, D |
| DNase II | Roth, Karlsruhe, D |
| ECL-Reagenz | GE Healthcare Europe GmbH, München, D |
| Ethanol, 70%, 99,9% | Roth, Karlsruhe, D |
| EDTA | Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D |
| FCS ¹ (Fetal Calf Serum Gold) | PAA Laboratories, Pasching, A |
| Glycin | Roth, Karlsruhe |
| HEPES, 1M | PAA Laboratories, Pasching, A |
| Heparin-Natrium (25000 I.E./5ml) | Braun, Melsungen, D |

¹Charge: A64905-0786

| Chemikalien | Firma |
|--|---|
| Ionomycin | Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D |
| Isopropanol | Roth, Karlsruhe, D |
| Kaliumhydroxycarbonat | Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D |
| Kollagenase Typ VI | Worthington; CellSystems Biotechnologie Vertrieb GmbH, St. Katharinen, D |
| Lipopolysaccharide from <i>Escherichia coli</i> 0111:B4 | Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D |
| L-Glutamin, 200 mM (100×) | PAA Laboratories, Pasching, A |
| Methanol | Roth, Karlsruhe |
| [<i>methyl</i> - ³ H]-Thymidin (926 GBq/mmol; 25 Ci/mmol) | GE Healthcare Europe GmbH, München, D |
| Natrium- <i>di</i> -hydrogenphosphat | Merck, Darmstadt, D |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | Roth, Karlsruhe, D |
| Natriumpyruvat, 100 mM | Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D |
| Natronlauge, 1 M | Roth, Karlsruhe, D |
| Ovalbumin (OVA) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D |
| Paraformaldehyd | Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D |
| PBS instamed 9,55 g/l | Biochrom AG, Berlin, D |
| Penicillin/Streptomycin Lösung (100×) | PAA Laboratories, Pasching, A |
| Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D |
| RPMI 1640 Medium, flüssig ohne Glutamin | PAA Laboratories, Pasching, A |
| RPMI 1640 Medium, Pulver ohne Natriumbicarbonat | Gibco, Invitrogen, Karlsruhe |
| Salzsäure, 1N | Roth, Karlsruhe, D |
| Saponin | Merck, Darmstadt, D |

| Chemikalien | Firma |
|--------------------|-------------------------------|
| TEMED | Roth, Karlsruhe, D |
| Tris-Base | Roth, Karlsruhe, D |
| Trypanblau | Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D |
| Trypsin/EDTA (10×) | PAA Laboratories, Pasching, A |
| Tween-20 | Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D |

2.4 Kits

| | |
|---|---|
| CD4 ⁺ Isolation Kit, mouse | Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, D |
| CD25 ⁺ Microbead Kit, mouse | Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, D |
| CellTrace TM CFSE Cell Proliferation Kit | Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D |
| FITC anti-mouse/rat FoxP3 Staining Set | NatuTec (eBioscience), Frankfurt a. M., D |
| PKH26 Fluorescent Cell Linker KIT | Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D |

2.5 Puffer und Medien

2.5.1 Puffer und Lösungen für Zellkultur

PBS

| | | |
|----------------------------------|-----|--------|
| NaCl | 137 | mM |
| KCl | 0,2 | mM |
| Na ₂ HPO ₄ | 1,4 | mM |
| KH ₂ PO ₄ | 0,2 | mM |
| in H ₂ O bidest. | | pH 7,3 |

FACS-Puffer

| | | |
|--------|---|---------|
| FCS | 1 | % (v/v) |
| in PBS | | pH 7,3 |

FACS-Puffer mit Saponin

| | | |
|---------|-----|---------|
| FCS | 1 | % (v/v) |
| Saponin | 0,1 | % (w/v) |
| in PBS | | pH 7,3 |

MACS-Puffer

| | | |
|--------|-----|---------|
| BSA | 2,5 | % (w/v) |
| EDTA | 2 | mM |
| in PBS | | pH 7,3 |

Erythrozyten-Lysepuffer

| | | |
|--|-----|----|
| NH ₄ Cl | 155 | mM |
| KHCO ₃ | 10 | mM |
| EDTA | 0,1 | mM |
| in H ₂ O _{bidest.} | | |

Kollagenaselösung

| | | |
|----------------|------|---------|
| Kollagenase IV | 0,5 | % (w/v) |
| DNase II | 0,05 | % (w/v) |
| in FACS-Puffer | | pH 7,3 |

4% Paraformaldehyd

Zur Herstellung der 4%igen Paraformaldehydlösung wurden 450 ml H₂O_{dest} unter Rühren auf 60°C erhitzt und 20 g PFA Pulver hinzugefügt. Dazu wurde tropfenweise 2N NaOH gegeben, bis die Lösung klar wurde. Die Lösung wurde mit 50 ml PBS (x 10) aufgefüllt und der pH auf 7,2 eingestellt. Aliquots wurden bei -20°C gelagert.

2.5.2 Puffer für Proteinanalytik

Natriumphosphat-Puffer

Die Konzentrationen der beiden Phosphatkomponenten wurde anhand der Henderson-Hasselbalch-Gleichung ($pH = pK_s + \log_{10} \times \frac{c(A^-)}{c(HA)}$) für einen pH von 7,0 ermittelt:

| | |
|--|---------|
| 0,1 M Na ₂ HPO ₄ | 61,3 ml |
| 0,1 M NaH ₂ PO ₄ | 38,7 ml |

Elutionspuffer

| | |
|--|--------|
| Glycin/HCl | 0,1 M |
| in H ₂ O _{bidest.} | pH 2,7 |

SDS-Ladepuffer

| | |
|----------------|-----------------|
| Tris/HCl | 62,5 mM; pH 6,8 |
| SDS | 2 % (w/v) |
| Glycerin | 10 % (v/v) |
| DTT | 50 mM |
| Bromphenolblau | 0,01 % (w/v) |

Trenngelpuffer

| | |
|--|--------|
| Tris/HCl | 1,5 M |
| in H ₂ O _{bidest.} | pH 8,8 |

Sammelgelpuffer

| | |
|--|--------|
| Tris/HCl | 0,25 M |
| in H ₂ O _{bidest.} | pH 6,8 |

Mischverhältnisse für 2 Minigele (11%)

| | Trenngel | | Sammelgel | |
|-----------------------------------|----------|----|-----------|----|
| Acrylamid (30%) | 7,3 | ml | 1,25 | ml |
| Bisacrylamid (2%) | 2,2 | ml | 0,5 | ml |
| Trenngelpuffer | 5,0 | ml | - | - |
| Sammelgelpuffer | - | - | 6,3 | ml |
| H ₂ O _{dest.} | 4,8 | ml | 4,0 | ml |
| SDS (10%) | 400 | μl | 120 | μl |
| APS (100 mg/ml) | 100 | μl | 60 | μl |
| TEMED | 50 | μl | 30 | μl |

10x Elektrophoresepuffer

| | | |
|----------|------|----|
| Tris/HCl | 256 | mM |
| SDS | 35 | mM |
| Glycin | 1,92 | M |

Coomassie-Färbelösung

| | | |
|-----------------------------------|-----|---------|
| Methanol | 45 | % (v/v) |
| H ₂ O _{dest.} | 45 | % (v/v) |
| Essigsäure | 10 | % (v/v) |
| Coomassie-Blau | 1,5 | mM |

Entfärbelösung

| | | |
|-----------------------------------|----|---------|
| Ethanol | 10 | % (v/v) |
| Essigsäure | 10 | % (v/v) |
| H ₂ O _{dest.} | 80 | % (v/v) |

2.5.3 Zellkulturmedien

B16-Medium

DMEM (High Glucose)

| | | |
|------------|----|---------|
| FCS | 5 | % (v/v) |
| HEPES | 10 | mM |
| L-Glutamin | 2 | mM |
| Pen/Strep | 1 | % (v/v) |

B16-Einfriermedium

DMEM (High Glucose)

| | | |
|------------|----|---------|
| FCS | 5 | % (v/v) |
| HEPES | 10 | mM |
| L-Glutamin | 2 | mM |
| Pen/Strep | 1 | % (v/v) |
| DMSO | 10 | % (v/v) |

PC61-Komplettmedium

RPMI

| | | |
|--|-----|---------|
| FCS | 5 | % (v/v) |
| Natriumpyruvat | 1 | mM |
| L-Glutamin | 2 | mM |
| Pen/Strep | 1 | % (v/v) |
| β -Mercaptoethanol (Stammlösung: 50 mM) | 0,1 | % (v/v) |

PC61-Nährmedium

RPMI

| | | |
|--|-----|---------|
| Natriumpyruvat | 1 | mM |
| L-Glutamin | 2 | mM |
| Pen/Strep | 1 | % (v/v) |
| β -Mercaptoethanol (Stammlösung: 50 mM) | 0,1 | % (v/v) |

PC61-Einfriermedium

RPMI

FCS 5 % (v/v)

Natriumpyruvat 1 mM

L-Glutamin 2 mM

Pen/Strep 1 % (v/v)

 β -Mercaptoethanol 0,1 % (v/v)

(Stammlösung: 50 mM)

DMSO 10 % (v/v)

R5

RPMI

FCS 5 % (v/v)

HEPES 10 mM

L-Glutamin 2 mM

Pen/Strep 1 % (v/v)

R10

RPMI

FCS 10 % (v/v)

HEPES 10 mM

L-Glutamin 2 mM

Pen/Strep 1 % (v/v)

DC-Medium

RPMI

FCS 5 % (v/v)

HEPES 10 mM

L-Glutamin 2 mM

Pen/Strep 1 % (v/v)

GM-CSF 10 % (v/v)

2.6 Versuchstiere

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 6-8 Wochen alte C57BL/6N Mäuse (Charles River, Sulzfeld) und OTII-transgene Mäuse (OTII-Mäuse) verwendet, die zusätzlich zum transgenen T-Zell-Rezeptor (transgene α -Kette = V α 2) den Thymozytenmarker Thy-1.1 exprimieren.

Der transgene TCR der OTII CD4⁺ Zellen erkennt das MHC Klasse II spezifische OVA-Peptid 323-339 (KISQAVHAAHAEINEAG) im Kontext mit dem MHC-Haplotyp I-A^b.

C57BL/6N Mäuse weisen den gleichen Haplotyp auf exprimieren jedoch den Thymozytenmarker Thy-1.2.

Die Tiere wurden in Makrolonkäfigen des Typs II bei einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 Stunden gehalten und hatten *ad libitum* Zugang zu Futter und Trinkwasser.

Genehmigungen zur Tötung von Mäusen und Organentnahme lagen vor, die Experimente wurden ordnungsgemäß aufgezeichnet und über den Tierschutzbeauftragten der Universität Heidelberg dem Regierungspräsidium Karlsruhe gemeldet.

Eine Genehmigung zur Durchführung von Tumorexperimenten an lebenden Wirbeltieren lag ebenfalls unter dem Aktenzeichen 35-9185.81/G-4/05 beim Regierungspräsidium Karlsruhe vor.

3 Methoden

3.1 Zellen und Kultivierungsbedingungen

3.1.1 Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurde mit der Zelllinie B16F10 (B16; murine Melanomzellen) und dem Hybridom PC61 gearbeitet. Die Zelllinie B16F10 wächst adhärent als einschichtiger Zellrasen, das Hybridom PC61 wächst in Suspension. Zur Kultivierung und Expansion wurden die Zellen in ihrem entsprechendem Medium (s. 2.5.3) in Zellkulturflaschen verschiedener Größe bei 37°C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank aufbewahrt.

B16 Zellen wurden je nach Konfluenzgrad alle 2-4 Tage passagiert. Dazu wurde das Medium abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gespült und mit Hilfe von Trypsin/ EDTA vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Dazu wurden die Zellen in Anwesenheit von 1 ml Trypsin/EDTA im Brutschrank inkubiert und anschließend mit serumhaltigem Medium abgespült. Dabei diente das Serum dem Abstoppen der enzymatischen Aktivität des Trypsins. Die Zellen wurden in ein Falconröhrchen überführt und abzentrifugiert (7 min; 300×g, 4°C). Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in B16-Medium resuspendiert und im Verhältnis 1:2 bis 1:12 ausgesät.

PC61 Zellen wurden alle vier bis fünf Tage passagiert, indem sie direkt in Falconröhrchen überführt, abzentrifugiert und 1:10 verdünnt weiter kultiviert wurden.

3.1.2 Einfrieren und Auftauen

Zunächst wurden die B16 Zellen mit Trypsin vom Boden der Kulturschale oder -flasche abgelöst und die PC61 Zellen direkt aus der Kulturflasche in Falconröhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde abzentrifugiert (7 min; 300×g, 4°C) und das Zellpellet in DMSO-haltigem Einfriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. DMSO verhindert die Eiskristallbildung in den Zellen während des Einfriervorgangs.

Die Kryoröhrchen wurden über Nacht in einer Einfrierbox, die mit Isopropanol gefüllt war, auf -80°C herunter gekühlt. Danach wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff (-210°C) überführt, in dem sie über Jahre konserviert werden können.

Zum Auftauen wurden die Zellen im 37°C Wasserbad zügig aufgetaut (1 min), in 10 ml warmem Medium aufgenommen und einmal gewaschen, um toxische DMSO-Reste zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in 7 ml Kulturmedium (B16-Medium bzw. PC61-Nährmedium) resuspendiert, in eine Zellkulturflasche (25 cm^2) überführt und kultiviert.

3.1.3 Zellzahlbestimmung

Um Anzahl und Vitalität von Zellen in einer Zellsuspension zu ermitteln wurden die Zellen 1:10 mit Trypanblau gemischt und die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauerzählkammer bestimmt. Trypanblau wird von einer intakten Zellmembran ausgeschlossen, kann also nur in Zellen eindringen bei denen die Integrität der Zellmembran nicht mehr gegeben ist. Dies ist bei toten oder apoptotischen Zellen der Fall. Die Zellzahl die in 16 Zählquadraten der Neubauerzählkammer bestimmt wird, multipliziert man mit 10^4 und mit dem Verdünnungsfaktor 10 (bei einer 1:10 Verdünnung mit Trypanblau). Dadurch ergibt sich die Konzentration lebender Zellen pro μl Medium.

3.1.4 Isolierung von Lymphozyten aus Lymphknoten und Milz

Lymphozyten wurden aus Milz und peripheren Lymphknoten (pLN) von C57BL/6N Mäusen oder OTII Mäusen isoliert. Bei den pLN handelt es sich um die unter der Haut befindlichen Unterkieferlymphknoten (*Lymphonodus (Lnn.) mandibularis*) und die Halslymphknoten (*Lnn. cervicales superficiales*), sowie die Lymphknoten des Achsellymphzentrums (*Lnn. axillares et cubiti*), die Leisten- (*Lnn. inguinales superficiales*) und die Kniefaltenlymphknoten (*Lnn. subiliaci*). Vor der Organentnahme wurden die Mäuse durch CO_2 -Begasung zunächst getötet. Anschließend konnten die Lymphknoten und die Milz steril entnommen werden. Zur Gewinnung der Lymphozyten wurden die Lymphknoten und die Milz mechanisch zerkleinert und durch ein Zellsieb ($70\ \mu\text{m}$) gegeben. Diese Zellsuspension wurde abzentrifugiert (10 min; $300\times g$; 4°C) und einmal mit PBS gewaschen (Zellpellet in 10 ml PBS aufgenommen, abzentrifugiert, Überstand verworfen). Um die Erythrozyten aus der Milzzell-

suspension zu entfernen, wurde zusätzlich eine Erythrozytenlyse durchgeführt. Hierzu wurden Zellpellets aus einer Milz mit 3 ml Erythrozytenlysepuffer resuspendiert. Nach 3 min wurde die Reaktion mit PBS abgestoppt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die Zellzahl der Lymphozyten bestimmt und die Zellen für weiterführende Experimente verwendet.

3.1.5 Isolierung von Lymphozyten aus Tumorgewebe

Um tumorinfiltrierende Lymphozyten zu isolieren wurden tumortragenden Mäusen die Tumore steril entnommen und das Gewebe anschließend mechanisch zerkleinert. Damit infiltrierende Lymphozyten aus dem Gewebe isoliert werden konnten, musste zunächst die Tumormatrix entfernt werden. Dazu wurden die zerkleinerten Tumore 30-45 min bei 37°C in 5 ml Kollagenaselösung pro Tumor verdaut. Der Verdau wurde anschließend mit R10 abgestoppt und die Tumore durch ein Zellsieb gedrückt. Die Lymphozytensuspension wurde danach einmal mit R10 gewaschen und die Zellzahl der Lymphozyten bestimmt.

3.1.6 Anreicherung von CD4⁺ Zellen mittels magnetischer Zellsortierung (MACS)

Die magnetische Zellsortierung (*MACS = magnetic activated cell sorting*) ermöglicht die Anreicherung einer Zellpopulation aus einer Gesamtpopulation aufgrund der Bindung von an Antikörper gekoppelten paramagnetischen Partikeln (Beads), an spezifische Oberflächenmoleküle. Die Anreicherung von CD4⁺ Zellen erfolgte beispielsweise mittels eines CD4⁺ T Cell Isolation Kit der Firma Miltenyi Biotec.

Mit diesem Kit werden zunächst CD8⁺ Zellen, Makrophagen, B-Zellen, NK-Zellen und erythroide Zellen mit biotinylierten Antikörpern markiert und über paramagnetische Partikel, die an gegen Biotin gerichtete Antikörper gebunden sind, in einem magnetischen Feld zurückgehalten. Auf diese Weise werden CD4 Zellen negativ angereichert und somit weder die Funktionalität noch der Reifegrad der CD4⁺ Zellen durch die Bindung eines Antikörpers beeinflusst. Für die Aufreinigung von Lymphozyten aus Lymphknoten und Milz wurden die Zellen gezählt und gemäß den Herstelleranweisungen auf 15×10^7 Zellen in einem Volumen von 40 μl in MACS-Puffer eingestellt. Für die negative Anreicherung der CD4⁺ Zellen wurde diese Zellsuspension mit 10 μl Biotin-Antikörper-Cocktail pro 40 μl MACS-Puffer versetzt.

Nach einer zehnminütigen Inkubation bei 4°C wurden 30 μl MACS-Puffer und 20 μl Anti-Biotin-Microbeads pro 10^7 Zellen zur Zellsuspension gegeben und der Ansatz für weitere 15 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension einmal mit MACS-Puffer gewaschen und auf 15×10^7 Zellen pro 3 ml in MACS-Puffer eingestellt. Die Zellen wurden über eine LD-Säule gegeben und mit 3 ml MACS-Puffer eluiert. Die LD-Säule war zuvor im MACS-Magneten befestigt und mit MACS-Puffer äquilibriert worden. Die Reinheit der angereicherten Zellen wurden mittels FACS-Analyse überprüft, bevor die Zellen für weitere Experimente eingesetzt wurden.

3.1.7 Anreicherung von CD25⁺ Zellen aus CD4⁺ Zellen mittels MACS

Die Anreicherung von CD25⁺ Zellen erfolgte mittels eines CD25⁺-MicroBead Kit der Firma Miltenyi Biotec. Hierbei wird aus zuvor angereicherten CD4⁺ Zellen die Subpopulation der CD4⁺CD25⁺ Zellen positiv angereichert. Die CD25⁺ Zellen werden mit einem PE-konjugierten Antikörper gegen CD25 markiert. Über paramagnetische Partikel, an die gegen PE gerichtete Antikörper gebunden sind, werden die so markierten Zellen detektiert und in einem Magnetfeld zurückgehalten.

Nach der Anreicherung von CD4⁺ Zellen (s. 3.1.6) aus einer Lymphozytensuspension wurden die CD4⁺ Zellen gezählt und entsprechend den Angaben des Herstellers auf 1×10^7 Zellen in 100 μl MACS-Puffer eingestellt.

Für die positive Anreicherung von CD25⁺ wurde die Zellsuspension mit 10 μl CD25-Antikörper pro 100 μl MACS-Puffer versetzt und für 10 min bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden einmal mit MACS-Puffer für 10 min bei $300 \times g$ und 4°C gewaschen, in 90 μl MACS-Puffer pro 1×10^7 Zellen aufgenommen und mit 10 μl anti-PE Beads für 15 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit MACS-Puffer gewaschen und auf 15×10^7 in 500 μl MACS-Puffer eingestellt. Die Zellsuspension wurde über eine MS-Säule gegeben, die zuvor mit MACS-Puffer äquilibriert worden war und drei Mal mit je 500 μl MACS-Puffer gespült. Die in der Säule verbleibenden Zellen wurden nach dem Entfernen des Magneten mit einem Stempel aus der Säule gedrückt und einmal in MACS-Puffer gewaschen. Um den Reinheitsgrad der CD25⁺ Zellen zu erhöhen, wurden sie ein weiteres Mal über eine MS-Säule gegeben. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte die Bestimmung der Zellzahl

der CD25⁺ Zellen. Die Reinheit der angereicherten Zellen wurden mittels FACS-Analyse überprüft, bevor die Zellen für weitere Experimente eingesetzt wurden.

3.1.8 Isolierung und Reifung dendritischer Zellen aus murinem Knochenmark (BM-DC)

Um dendritische Zellen (DC) aus Knochenmark von Mäusen zu gewinnen, wurden Tibia und Femur steril entnommen und mit 70%igem Ethanol gereinigt. Mit Hilfe einer 20 ml Spritze und einer 26G×1/2" Kanüle wurde das Knochenmark mit PBS aus den Knochen herausgespült und durch auf- und abpipettieren eine Einzelzellsuspension hergestellt. Diese Zellsuspension wurde über ein Zellsieb gegeben und gewaschen (7 min; 300×g; 4°C). Kontaminierende Erythrozyten wurden durch eine zweiminütige Inkubation in 1 ml Erythrozyten-Lysepuffer lysiert. Im Anschluss wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und die Zellzahl bestimmt. Danach wurden die Zellen in einer 24-Loch Platte in einer Dichte von $1,5 \times 10^6$ Zellen pro Loch in DC-Medium ausgesät.

Murine DC sind während der ersten Tage in Kultur adhärent, lösen sich jedoch während der Reifung vom Boden der Kulturplatten ab. Um verunreinigende Zellen zu entfernen wurden die DC daher am zweiten Tag gründlich mit DC-Medium gewaschen und am vierten Tag wurde vorsichtig die Hälfte des Mediums ausgetauscht. Nach sechs Tagen in Kultur wurden die Zellen geerntet und gewaschen. Sie konnten entweder direkt als unreife DC verwendet, oder über Nacht mit Antigen beladen und gereift werden. Dazu wurden die geernteten DC in einer Dichte von 3×10^6 Zellen in 3 ml DC-Medium pro Loch in eine 6-Loch Platte ausgesät und wie in 3.2 beschrieben behandelt.

3.2 Beladung und Stimulierung von murinen BM-DC

Um DC als antigenpräsentierende Zellen z. B. in Proliferationstests nutzen zu können, müssen unreife DC mit Antigen beladen und gereift werden. Dendritische Zellen wurden wie in 3.1.8 beschrieben generiert und anschließend entweder mit OVA oder mit B16-Tumorzelllysate inkubiert.

Für die Beladung mit OVA wurden 100µg/ml OVA zu den DC-Kulturen gegeben.

Für die Beladung mit Tumorlysat wurden zunächst 1×10^8 B16 Zellen geerntet, in 1 ml PBS aufgenommen und durch eine viermalige Folge von Einfrieren bei -80°C und Auftauen im 37°C Wasserbad lysiert. Von diesem Lysat wurden $100 \mu\text{l}$ zu den DC in die 6-Loch Platte gegeben. Als Reifestimulus wurden immer 100 ng/ml Lipopolysaccharid (LPS) hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von ca. 16 Stunden konnten die DC für Versuche verwendet werden.

3.3 Durchflusszytometrie (FACS)

Mit Hilfe eines Durchflusszytometers (*FACS = fluorescence activated cell sorting*) können Zellen in Suspension anhand ihrer Größe, Struktur, Oberflächenmoleküle oder intrazellulären Proteinen charakterisiert und quantifiziert werden.

Die Zellsuspension wird durch hydrodynamischen Druck, mit Hilfe der Mantelflüssigkeit in die Messkanüle gepresst, wobei die Zellen vereinzelt werden. Die Zellen passieren einen oder mehrere Laserstrahlen einer bestimmten Wellenlänge, wodurch das Laserlicht eine Streuung erfährt, die von verschiedenen Detektoren erkannt wird. Die Vorwärts-Lichtstreuung (*FSC - forward scatter*) gibt einen Anhaltspunkt für die Größe der Zellen, die Seitwärts-Streuung (*SSC - sideward scatter*) korreliert mit der Granularität bzw. dem Kern/Plasma-Verhältnis der Zellen.

Zusätzlich können Zellen auch bezüglich ihrer Oberflächenmoleküle oder intrazellulärer Proteine untersucht werden. Dazu werden die entsprechenden Moleküle mit Antikörpern markiert, an die ein Fluoreszenzfarbstoff (Fluorophor) gekoppelt ist. Die Fluorophore werden durch den Laserstrahl angeregt und emittieren Licht mit charakteristischer Wellenlänge (s. Tab. 3.1) das wiederum von den Detektoren erkannt wird.

Die am häufigsten verwendeten Fluorochrome sind Fluorescein Isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Allophycocyanin (APC) und Peridinin-Chlorophyll-Protein Complex (PerCP).

Das von den Detektoren aufgefangene Messsignal wird in ein digitales Signal umgewandelt und kann anhand spezieller Software analysiert werden. Als Durchflusszytometer wurde das FACSCanto System von BD mit der Auswertungssoftware FACSDiva verwendet.

| Fluorochrom | Absorptions-Wellenlänge [nm] | Emissions-Wellenlänge [nm] |
|-------------|------------------------------|----------------------------|
| FITC | 488 | 519 |
| PE | 488; 532 | 578 |
| APC | 595; 633; 635; 647 | 660 |
| PerCP | 488; 532 | 678 |

Tabelle 3.1: Absorptions- und Emissionsspektren von Fluorochromen

3.3.1 Nachweis von Oberflächenmolekülen

Nach Aufarbeitung der Lymphozyten aus Milz und Lymphknoten wurden 1×10^5 bis 1×10^6 Zellen in FACS-Röhrchen überführt und mit eiskaltem FACS-Puffer gewaschen (7 min; $300 \times g$; 4°C). Die Zellen wurden in $100 \mu\text{l}$ FACS-Puffer aufgenommen und 20-30 min bei 4°C mit vorher bestimmten Konzentrationen (je nach Antikörper 0,5 - $1 \mu\text{g}$ pro 1×10^6 Zellen) Fluorochrom-konjugierter Antikörper gegen die zu untersuchenden Oberflächenmoleküle inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit FACS-Puffer gewaschen, in $300 \mu\text{l}$ FACS-Puffer aufgenommen und im Durchflusszytometer analysiert.

Dabei wurden die Lymphozyten zuerst anhand ihrer Größe und Granularität in FSC und SSC identifiziert und über die Bindung fluoreszenzmarkierter Antikörper näher untersucht.

3.3.2 Intrazelluläre Forkhead-Box-P3-Färbung

Für die Identifizierung von murinen regulatorischen T-Zellen wird eine Kombination aus drei Markern verwendet: CD4 und CD25 auf der Zelloberfläche und der Transkriptionsfaktor FoxP3 im Nukleus.

Die mittels MACS isolierten $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ Zellen wurden mit FACS-Puffer gewaschen und zunächst 20 min mit anti-CD4-APC und anti-CD25-PE inkubiert. Danach wurden die Zellen einmal mit FACS-Puffer gewaschen.

Anschließend erfolgte der intrazelluläre Nachweis von FoxP3. Dazu mussten die Zellen permeabilisiert werden, damit der Fluorochrom-markierte FoxP3-Antikörper in die Zelle bzw. den Zellkern gelangen kann. Dies geschah mit Hilfe von 1 ml „Fixation/ Permeabilisation working solution“ aus dem FITC anti-mouse/rat Foxp3 Staining Set von NatuTec (eBioscience) für 2-18 Stunden bei 4°C im Dunkeln. Anschließend wurden die Zellen einmal mit

2 ml FACS-Puffer und zweimal mit 2 ml „Permeabilisation Buffer“ gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem FoxP3-Antikörper für 30 min bei 4°C. Die Zellen wurden einmal mit FACS-Puffer gewaschen und im Durchflusszytometer analysiert.

3.3.3 Intrazelluläre Zytokinfärbung

Um intrazelluläre Zytokine in *in vivo* aktivierten CD4⁺ Zellen im FACS nachweisen zu können, müssen die Zellen zunächst in Anwesenheit von Brefeldin A mit PMA/Ionomycin re-stimuliert werden. Brefeldin A stammt aus dem Pilz *Eupenicillium brefeldianum* und hemmt den Transport von Vesikeln vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) zum Golgi Apparat. PMA bewirkt eine allosterische Aktivierung der Proteinkinase C (PKC), Ionomycin ist ein Calcium Ionophor und mobilisiert intrazelluläre Calciumspeicher. Zusammen bewirken sie die unspezifische Aktivierung von T-Zellen.

Aus Lymphknoten und Milz wurden Zellsuspensionen hergestellt und für fünf Stunden mit 0,001% BD GolgiPlugTM, 2 ng/ml PMA und 0,4 µg/ml Ionomycin in R10 im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in FACS-Röhrchen überführt, mit 1ml FACS-Puffer aufgefüllt und 7 min bei 300×g und 4°C abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen und für 20-30 min mit fluorochrom-markierten Antikörpern gegen extrazelluläre Marker (CD4, Thy-1.1, CD25) inkubiert. Nach einem weiteren Waschschritt wurden die Zellen für 20 min bei 4°C mit 150 µl 4% PFA fixiert und anschliessend zweimal mit FACS-Puffer mit Saponin gewaschen. Saponin formt reversibel Poren in die Zellmembran, durch die die Antikörper ins Zellinnere gelangen können.

Für die intrazelluläre Zytokinfärbung wurden die fluorochrom-markierten Antikörper gegen Zytokine mit FACS-Puffer, der 0,1% Saponin enthielt, verdünnt und die Zellen für 30 min bei 4°C damit inkubiert. Die Zugabe von Saponin verhinderte, dass sich die Poren während des Färbevorganges schlossen. Die Zellen wurden mit FACS-Puffer + 0,1% Saponin gewaschen und für die Messung in 300 µl FACS-Puffer aufgenommen.

3.4 Carboxy-Fluorescein-Succinimidyl-Ester (CFSE)-Färbung

Eine Möglichkeit, die Zellteilungsrate (Proliferation) von Zellen zu bestimmen, ist die Markierung mit Carboxy Fluorescein Succinimidyl Ester (CFSE). Die Vorstufe von CFSE ist

5-(und -6)-Carboxyfluorescein-Diacetate, succinimidyl ester (CFDA, SE). Bei diesem handelt es sich um ein ungeladenes farbloses Molekül das in der Lage ist, durch die Zellmembran zu diffundieren. In der Zelle wird es dann von unspezifischen Esterasen zu anionischem fluoreszierendem CFSE gespalten, das aminoreaktiv und nicht mehr membrangängig ist.

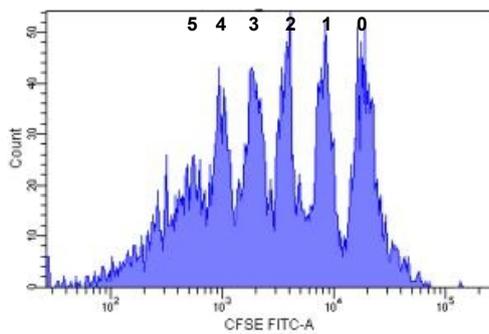


Abb. 3.1: **Halbierung der Fluoreszenz von CFSE-gefärbten Zellen.**

Es bindet über Lysin-Seitenketten oder andere zugängliche Amine irreversibel an zytosolische Proteine. Bei der Zellteilung, wird das CFSE gleichmäßig auf beide Tochterzellen verteilt. Im Durchflusszytometer kann man daher aufgrund der Halbierung der Fluoreszenz pro Teilungszyklus erkennen, wie viele Zellteilungsrunden durchlaufen wurden.

Für die Färbung wurden CD4 Zellen mittels MACS isoliert. Nachdem sie einmal mit PBS gewaschen worden waren wurden 2×10^7 Zellen mit $5 \mu\text{M}$ CFSE

in 5 ml PBS für 10 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch die Zugabe von FCS abgestoppt. Die Zellen wurden dreimal mit R10 gewaschen, ihre Zellzahl bestimmt und für *in vitro* oder *in vivo* Proliferationstests eingesetzt.

3.4.1 In vitro Proliferationstest

Im Proliferationstest wird die Teilungsfähigkeit (Proliferationsfähigkeit) von Zellen untersucht. Dazu wurden CD4⁺ Zellen aus OTII-Mäusen zusammen mit OVA-beladenen DC kultiviert (*MLR = mixed lymphocyte reaction*).

Um die Proliferation der transgenen CD4⁺ Zellen bestimmen zu können wurden die CD4⁺ Zellen zuvor mit CFSE gefärbt (s. 3.4). In eine 96-Loch Rundboden-Platte wurden 2×10^5 CD4⁺ Zellen ausgesät und 2×10^4 reife antigen-beladene dendritische Zellen dazu gegeben. Nach 3-5 Tagen der Kokultur wurden die CFSE-positiven Zellen im FACS analysiert.

3.4.2 In vivo Proliferationstest

Für *in vivo* Proliferationsexperimente wurden CD4⁺ Zellen aus OTII Mäusen isoliert (s. 3.1.6). Die Zellen wurden mit CFSE gefärbt (s. 3.4) und 5-10×10⁶ Zellen i. v. in C57BL/6N Mäuse gespritzt. Nach einem Tag wurden den Rezipienten s.c. 1×10⁶ OVA-beladene DC in die Fußsohlen der Vorderpfoten injiziert.

Drei bis fünf Tage später wurden die drainierenden Lymphknoten (*Lnn. axillares et cubiti*) entnommen, eine Einzelzellsuspension hergestellt (s. 3.1.4) und die Proliferation der Donorzellen mittels Analyse der CFSE-Verdünnungen im FACS bestimmt.

3.5 PKH26-Färbung

PKH ist ein patentierter Fluoreszenzfarbstoff, der nach seinem Entdecker Paul Karl Horan benannt ist. PKH enthält unter anderem einen lipophilen Anteil, der während der Färbeprozedur in die Zellmembran diffundiert, und eine fluoreszierende Gruppe, die an der Zelloberfläche exponiert wird. Die rot fluoreszierende Gruppe von PKH26 kann im FACS im PE-Kanal detektiert werden. Die stabile Bindung des Farbstoffes an die Zellen hat keinen Einfluss auf wichtige funktionale Oberflächenmoleküle, es bewirkt hingegen, dass die Zellen über einen langen Zeitraum auch *in vivo* detektiert werden können.

Für die PKH26-Färbung von CD4⁺CD25⁻ und CD4⁺CD25⁺ Zellen wurde das PKH26 Fluorescent Cell Linker KIT von Sigma-Aldrich verwendet. Von den mittels MACS isolierten Zellen wurden jeweils 2×10⁷ Zellen in 15 ml Falconröhrchen pipettiert und einmal mit warmem PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde vorsichtig den Angaben des Herstellers entsprechend mit 1 ml „Diluent C“ resuspendiert. Dazu wurde je 1 ml „Dye Stocksolution“ (0,001% PKH26 dye $\hat{=}$ 4×10⁻⁶ M PKH26) zugegeben. Die Zellen wurden 3 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert bevor die Reaktion durch Zugabe von 2 ml FCS abgestoppt wurde. Nach 1 min wurden 4 ml R10 zugegeben und die Zellen 10 min bei 300×g und Raumtemperatur abzentrifugiert.

Das Pellet wurde in R10 resuspendiert, in ein frisches Röhrchen überführt und dreimal mit R10 gewaschen. Die Zellzahl wurde bestimmt und die Zellen für *in vivo* Versuche zum Migrations-Verhalten von CD4⁺CD25⁺ Zellen verwendet.

3.6 Proteinanalytik

3.6.1 Produktion von monoklonalen Antikörpern

Zur Produktion von monoklonalen Antikörpern verwendet man hybride Myelomzelllinien (Hybridome). Dabei handelt es sich um Myelomzellen (Plasmazelltumore), die mit Antikörper-produzierenden Plasmazellen fusioniert wurden. Der Ursprung eines jeden Hybridoms ist eine einzelne Zelle, daher werden von einer Hybridomzelllinie monoklonale Antikörper, also Antikörper mit einer einzigartigen Spezifität, produziert [89].

PC61 ist ein monoklonaler Antikörper, der in der Ratte generiert wurde. Es handelt sich um einen Antikörper des Isotyps IgG1 (λ) der gegen murines CD25 gerichtet ist und vom gleichnamigen Hybridom produziert wird. Der Antikörper wurde später zur *in vivo* Depletion von regulatorischen T-Zellen eingesetzt [77].

Die Hybridomzellen wurden in einem kompartimentierten Bioreaktor (Celline CL 1000) kultiviert. Dieser zeichnet sich dadurch aus, dass ein oberes Medium- und ein unteres Zellkompartiment durch eine semipermeable Celluloseacetat-Membran, mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa, voneinander abgetrennt sind. Dadurch wird die Diffusion von Nährstoffen in das Zellkompartiment hinein und von Stoffwechselprodukten aus dem Zellkompartiment gewährleistet.

Alle 4-7 Tage wurde der Kulturüberstand geerntet. Dazu wurde zunächst die Zellsuspension aus dem Zellkompartiment entnommen und die Zellen mit frischem Komplettmedium 1:20 verdünnt und 25 ml dieser Verdünnung wieder ausgesät. Anschließend wurde das Nährmedium aus Mediumkompartiment verworfen und durch frisches ersetzt.

Zur Gewinnung des Kulturüberstandes, der die Antikörper enthält, wurde die restliche Zellsuspension einmal bei $1000\times g$ abzentrifugiert, in ein neues Falconröhrchen überführt und einmal bei $3500\times g$ abzentrifugiert. Danach wurde der Überstand, der die Antikörper enthält, in einem frischen Falconröhrchen bei $-20^{\circ}C$ bis zur Aufreinigung gelagert.

3.6.2 Proteinaufreinigung mit Protein G-Säule

Zur Aufreinigung des PC61-Antikörpers aus dem Zellkulturüberstand wurde eine Protein G Säule (5ml) der Firma GE Healthcare verwendet. Protein G wird aus der Zellwand von Streptokokken der Gruppe G gewonnen und zeichnet sich dadurch aus, dass es am c-Terminus

drei homologe Bindungsdomänen mit hoher Affinität zum Fc-Teil von IgG aufweist. Diese Bindungsaffinität nutzt man, um Antikörper der Subklasse IgG aufzureinigen.

Die Protein G-Säule wurde mit dem 10-fachen des Säulenvolumens mit einem 20 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) äquilibriert. Danach wurde der sterilfiltrierte Kulturüberstand von PC61 über die Säule gegeben und anschließend wurde mit 5-10 Säulenvolumen Natriumphosphatpuffer nachgespült.

Der an die Säule gebundene Antikörper wurde pH-abhängig mit dem Elutionspuffer aus der Säule gewaschen und die Fraktionen in vorbereiteten Reaktionsgefäßen aufgefangen. Die Proteinkonzentration der einzelnen Fraktionen wurde photometrisch mittels der Messung der Lichtabsorption der Aminosäure Tryptophan bestimmt. Diese Aminosäure ist in allen Proteinen enthalten und anhand ihrer Absorption lässt sich in guter Näherung die Proteinkonzentration errechnen. Eine OD_{280} von 1,35 entspricht einer IgG-Konzentration von 1,0 mg/ml.

Die Fraktionen, die eine OD von über 0,5 aufwiesen, wurden vereinigt und über Nacht gegen PBS dialysiert.

Mit Hilfe der SDS-PAGE wurde überprüft, ob die aufgereinigten Antikörper die korrekte Molekülmasse aufwiesen (Abb. 3.2). Zusätzlich wurde jede Charge frisch aufgereinigten Antikörpers wie in 3.7.2 beschrieben auf seine Funktionalität getestet um später für weiterführende Experimente eingesetzt werden zu können.

Zur Lagerung wurde die Säule mit 30-50 ml Elutionspuffer gewaschen, danach mit 15-30 ml Natriumphosphatpuffer regeneriert und mit 15-30 ml 20% Ethanol gespült. Anschließend wurde sie in 20% Ethanol bei 4°C gelagert.

3.6.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE nach Laemmli [90] wird verwendet, um Proteine nach ihrer relativen Molekülmasse aufzutrennen. Durch hydrophobe Wechselwirkungen lagert sich das anionische Detergenz SDS an Proteine an, welche durch die negativ geladenen Gruppen des SDS eine ihrem Molekulargewicht annähernd proportionale negative Ladung erhalten. Dadurch wandern die Proteine im elektrischen Feld zur Anode und werden nach ihrer Größe und somit nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Beweglichkeit R_f (R_f = zurückgelegte

Strecke des Proteins/ zurückgelegte Strecke der Lauffront) der Proteine im elektrischen Feld verhält sich dabei linear proportional zum Logarithmus der relativen Molekülmasse. Durch Mitführen von Standardproteinen mit bekanntem Molekulargewicht, kann das Molekulargewicht von unbekanntem Proteinen ermittelt werden. Um eine gute Auftrennung auch bei großen Probenvolumen zu gewährleisten, setzt sich das SDS-Gel aus Sammel- und Trenngel zusammen. Im Sammelgel werden die Proteine zunächst fokussiert, bevor sie ins Trenngel wandern.

Das 11%ige Trenngel wurde zwischen zwei in einen Gelgessstand eingespannte Glasplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation in senkrechter Lage wurde das Isopropanol abgezogen und das Sammelgel, in das ein Probenkamm eingepasst wurde, auf das Trenngel gegossen.

Die aufzutrennenden Proteine wurden in SDS-Ladepuffer aufgenommen und 5 min bei 95°C aufgeköcht, um die Proteine zu denaturieren. Anschließend wurden sie mit einer Hamiltonpipette auf das Sammelgel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 80-100 Volt solange durchgeführt, bis das im SDS-Ladepuffer enthaltene Bromphenolblau die untere Grenze des Gels erreicht hatte. Die Gele wurden anschließend mit Coomassieblau angefärbt.

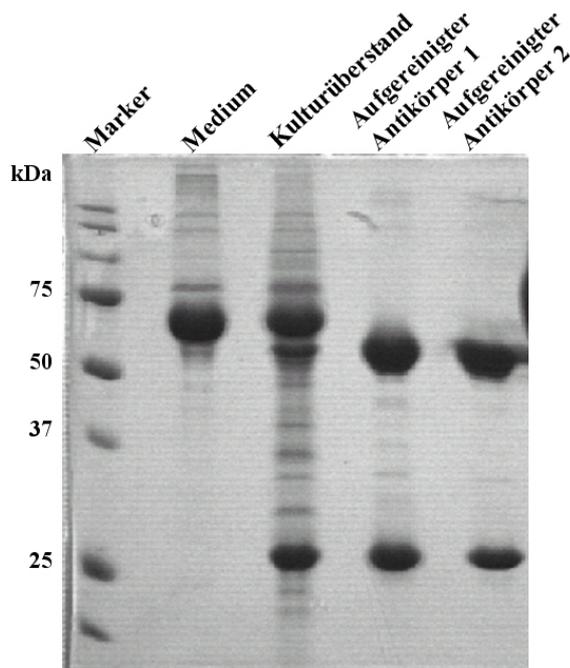


Abb. 3.2: **Reinheit des mAk PC61 nach Aufreinigung mittels Protein G Säule.**

Jeweils 10 μ l des PC61-Nährmediums, des Kulturüberstandes und der aufgereinigten Antikörper wurden in einem 11%igen SDS-Gel aufgetrennt. Das im Medium enthaltene FCS weist eine Größe von 70 kDa auf. Die aufgereinigten Antikörper setzen sich aus je zwei schweren (50 kDa) und zwei leichten (25 kDa) Ketten zusammen.

3.6.4 Coomassie-Färbung

Zur Detektion der Proteine in den SDS-Gelen wurden die Gele für ca. 20-30 min in Coomassie-Färbelösung geschwenkt.

Coomassie ist ein Triphenylmethan-Farbstoff, der sich an basische Aminosäuren anlagert und dadurch Proteine färbt.

Nach der Färbeprozedur wurden die Gele über Nacht mit der Entfärbelösung entfärbt, wobei der Hintergrund entfärbt wird und die Proteinbanden sichtbar bleiben.

3.7 Tumorexperimente

Die Durchführung von Tumorexperimenten an lebenden Wirbeltieren war vom Regierungspräsidium Karlsruhe genehmigt (s. 2.6).

3.7.1 Tumorinokulation

Zur Induktion von B16 Tumoren in C57BL/6N Mäusen wurden zunächst kultivierte B16-Zellen (s. 3.1.1) geerntet und zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt und die Zellsuspension auf 2×10^6 Zellen / ml in PBS eingestellt. C57BL/6N Mäusen wurde die linke Flanke rasiert und an dieser Stelle $50 \mu\text{l}$ ($\cong 1 \times 10^5$) der B16-Zellsuspension s. c. injiziert. Sobald der Tumor makroskopisch zu detektieren war (Tag 5 nach Tumorinokulation), wurden alle 2-3 Tage Höhe (h), Breite (b) und Tiefe (t) der Tumore mit Hilfe eines Messschiebers gemessen. Das Volumen der Tumore wurde mit Hilfe der Formel $h \times b \times t \times \frac{\pi}{6}$ ermittelt.

3.7.2 In vivo Depletion von CD4⁺CD25⁺ Zellen in tumortragenden Mäusen

Um die Rolle der regulatorischen T-Zellen im B16 Tumor Modell zu untersuchen, wurde diese Subpopulation zu verschiedenen Zeitpunkten der Tumorentwicklung mit Hilfe des anti-CD25 mAk PC61 *in vivo* depletiert. Dies geschah durch die einmalige i. p. Injektion von jeweils $300 \mu\text{g}$ des aufgereinigten PC61 Antikörpers. Die Depletion wurde entweder einen Tag vor der Tumorinokulation (Gruppe 1), oder fünf (Gruppe 2) bzw. zehn Tage (Gruppe 3) danach durchgeführt.

3.7.3 Kombination der Depletion von $CD4^+CD25^+$ Zellen und der Injektion von Tumorantigen-beladenen DC

Die Depletion von regulatorischen T-Zellen sollte ergänzend zur Stimulation einer tumorspezifischen Immunantwort mittels Tumorantigen-beladenen DC eingesetzt werden.

Zu diesem Zweck wurden C57BL/6N Mäusen fünf Tage nach der Tumordinokulation zunächst wie in 3.7.2 beschrieben PC61 injiziert. Anschließend wurden diesen Mäusen s.c. DC injiziert, die zuvor mit Tumorlysate beladen worden waren (s. 3.2). Diese DC-Injektionen wurden zweimal in jeweils dreitägigem Abstand wiederholt (s. Abb. 3.3).

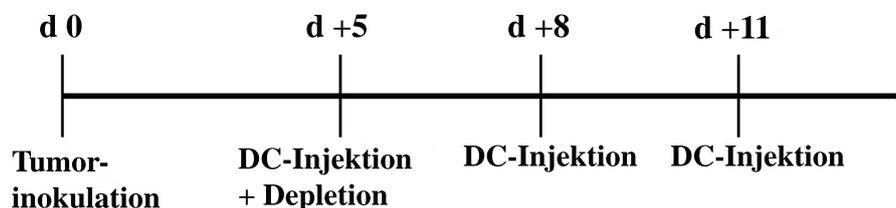


Abb. 3.3: Schema der therapeutischen Kombination aus Injektionen von PC61 und Tumorlysate-beladenen DC.

3.7.4 In vivo Untersuchung des Migrationsverhaltens von $CD4^+CD25^-$ und $CD4^+CD25^+$ Zellen

Um festzustellen, ob der B16 Tumor einen Einfluss auf die Migration von exogenen $CD4^+CD25^-$ bzw. $CD4^+CD25^+$ Zellen ausübt, wurden diese Zellpopulationen mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und i. v. in tumortragende C57BL/6N Mäuse injiziert.

Dazu wurden die Zellen mittels MACS isoliert (s. 3.1.6 und 3.1.7) und mit PKH26 (s. 3.5) oder CFSE (s. 3.4) gefärbt. Anschließend wurden $3-5 \times 10^6$ Zellen i.v. zu verschiedenen Zeitpunkten in tumortragende C57BL/6N Mäuse gespritzt.

Drei bis sieben Tage später wurden die tumordrainierenden Lymphknoten (*Lnn. inguinales superficiales*), die nicht-drainierenden Lymphknoten, die Milz und der Tumor entnommen und Einzelzellsuspensionen hergestellt (s. 3.1.4). Die Zellen wurden im Durchflusszytometer quantifiziert.

3.8 Überprüfung des transgenen Status der OTII transgenen Mäuse

OTII transgene Mäuse wurden im Tierstall der Universität gezüchtet. In regelmäßigen Abständen musste der transgene Status der Mäuse kontrolliert werden. Dies erfolgte über die Messung der Expression von V α 2 (α -Kette des transgenen TCR) und Thy-1.1 der mononukleären Zellen im peripheren Blut (PBMC).

Dazu wurden den Mäusen einige Tropfen Blut aus der ventralen Schwanzvene (*Vena saphena*) entnommen, mit 100 μ l einer 10%igen Heparinlösung vermischt und das Blut mit warmem RPMI auf 1,5 ml aufgefüllt. Jeweils 3 ml Ficoll (Biocoll; Dichte: 1,077 g/l bei 10°C) wurden mit dem Blut-RPMI-Gemisch überschichtet und anschließend 20 min bei 700 \times g und Raumtemperatur zentrifugiert. Die Interphase, die die Lymphozyten enthielt, wurde vollständig abgenommen, in FACS-Röhrchen überführt und einmal mit FACS-Puffer gewaschen.

Um zu überprüfen, zu welchem Anteil der OVA-transgene T Zell-Rezeptor (TCR) auf den CD4 Zellen der OTII Mäuse exprimiert wird, wurde eine Dreifachfärbung der Lymphozyten mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern durchgeführt. Die Zellen wurden mit einem gegen V α 2 (Alphakette des transgenen TCR) gerichteten, einem gegen den genetischen Marker Thy-1.1 gerichteten und einem gegen CD4 gerichteten Antikörper angefärbt. Anschließend wurde wie in 3.3.1 beschrieben eine Analyse der Oberflächenmoleküle mit dem Durchflusszytometer durchgeführt.

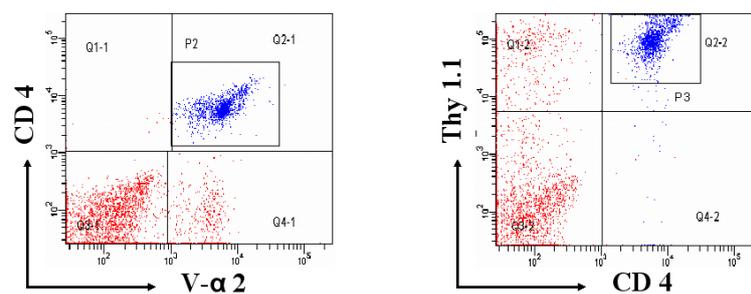


Abb. 3.4: FACS-Analyse des Blutes von OTII transgenen Mäusen.

P2 zeigt CD4⁺V α 2⁺ transgene T-Zellen. P3 zeigt die Thy-1.1-Expression auf den transgenen CD4-Zellen.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchung der Bindungs- und Depletionseigenschaften des CD25 mAk PC61

In der vorliegenden Arbeit sollte an einem Mausmodell für das maligne Melanom (B16) untersucht werden, ob regulatorische T-Zellen (Treg) einen Einfluss auf die Entwicklung des B16 Melanoms haben. Hierfür sollten die Treg vor und während des Tumorwachstums mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers (mAk) PC61 *in vivo* depletiert werden. Von dem mAk PC61 ist bekannt, dass er CD4⁺CD25⁺ Zellen depletiert [77, 91].

Um PC61 einsetzen zu können, musste zunächst seine depletierende Wirkung beurteilt werden. Daher war es erforderlich zunächst die Bindungseigenschaften und die Funktionalität des mAk zu untersuchen.

4.1.1 In vitro Test auf Bindungseigenschaften

Um die Bindungseigenschaften des aus Kulturüberstand aufgereinigten PC61 *in vitro* zu überprüfen, wurde zunächst eine FACS-Färbung mit Treg durchgeführt. Mittels MACS isolierte Treg wurden mit aufgereinigtem PC61 inkubiert. Nach einem Waschschrift und einem Blockierungsschrift mit Ratte-IgG wurde der an die Zellen gebundene mAk PC61 durch einen FITC-konjugierten sekundären Ziege-anti-Ratte Antikörper detektiert. Als Kontrollfärbung wurden die Zellen mit einem kommerziell erhältlichen FITC-konjugierten Antikörper gegen CD25 (CD25-FITC, Klon 7D4) gefärbt.

In Abb. 4.1 sind die Histogramme der mittleren Fluoreszenzintensität (*mean fluorescence intensity* = MFI) dargestellt, die mit dem mAk PC61 bzw. mit dem kommerziell erhältlichen direkt-markierten mAk 7D4 erzielt wurden. Der MFI-Wert gibt die mittlere Menge an gebundenem Antikörper pro Zelle an, wodurch man Aufschluss über die Bindekapazität der

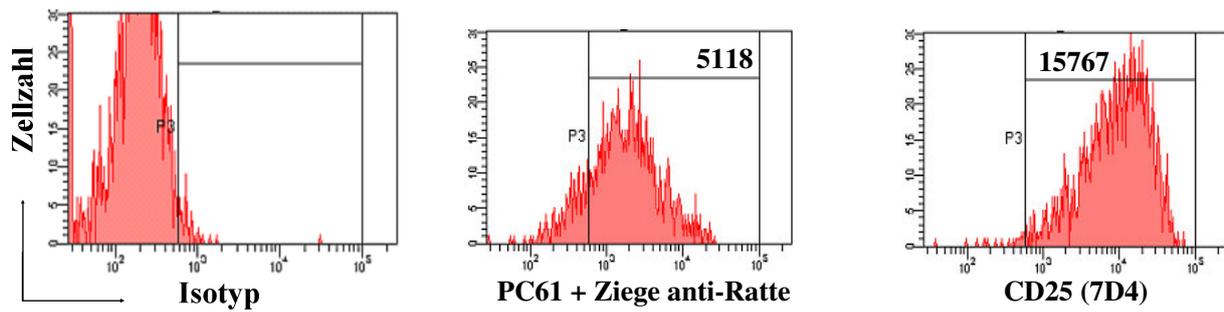


Abb. 4.1: Vergleich der Bindekapazität der α CD25 mAk PC61 und 7D4.

1×10^6 mittels MACS isolierte $CD4^+CD25^+$ wurden nach dreitägiger Ruhephase mit $1 \mu\text{g}$ aufgereinigtem PC61 inkubiert. Anschließend wurde der mAk mit einem sekundären Ziege anti-Ratte-FITC Antikörper detektiert.

Als Positivkontrolle diente ein direkt-konjugierter CD25-Antikörper (7D4). Mittels FACS wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von PC61 und 7D4 bestimmt.

Antikörper erhält. Der MFI-Wert für die mit PC61 gefärbten Zellen lag bei 5118, wohingegen der MFI-Wert für die mit 7D4 gefärbten 15767 betrug.

Dieses Ergebnis zeigt, dass sowohl der aufgereinigte Antikörper als auch der mAk 7D4 im Vergleich zur Isotypkontrolle *in vitro* an CD25 binden.

Die stärkere Färbung der Zellen durch den 7D4 Antikörper lässt sich vermutlich darauf zurückführen, dass es sich beim kommerziell erhältlichen Antikörper um den Isotyp IgM handelt, der für gewöhnlich als Pentamer vorliegt und daher über eine größere effektive Bindungsstärke (Avidität) verfügt. Dagegen handelt es sich bei PC61 um einen IgG1 Antikörper, der nur als Monomer vorkommt. Andererseits lässt sich der Unterschied in der MFI auch dadurch erklären, dass der gemessene Proteingehalt nach der Aufreinigung des Antikörpers auch beschädigte Antikörpermoleküle enthalten kann. Dadurch ist die eigentliche Konzentration an eingesetztem Antikörper geringer.

4.1.2 In vivo Test auf Funktionalität

Nachdem nachgewiesen worden war, dass PC61 *in vitro* eine spezifische Bindekapazität für CD25 aufwies, wurde *in vivo* überprüft, ob eine Injektion des Antikörpers in C57BL/6N Mäusen zur Depletion der $CD4^+CD25^+$ Zellen führt. Außerdem sollte ermittelt werden, wie lange die Depletion der $CD4^+CD25^+$ Zellen anhält.

Zu diesem Zweck wurden C57BL/6N Mäusen verschiedene Konzentrationen (200 - 800 μg) des PC61 Antikörpers i. p. injiziert. Nach zwei bis 21 Tagen wurden Lymphknoten und Milzen entnommen, Zellsuspensionen hergestellt und die Anzahl der $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ Zellen im FACS quantifiziert.

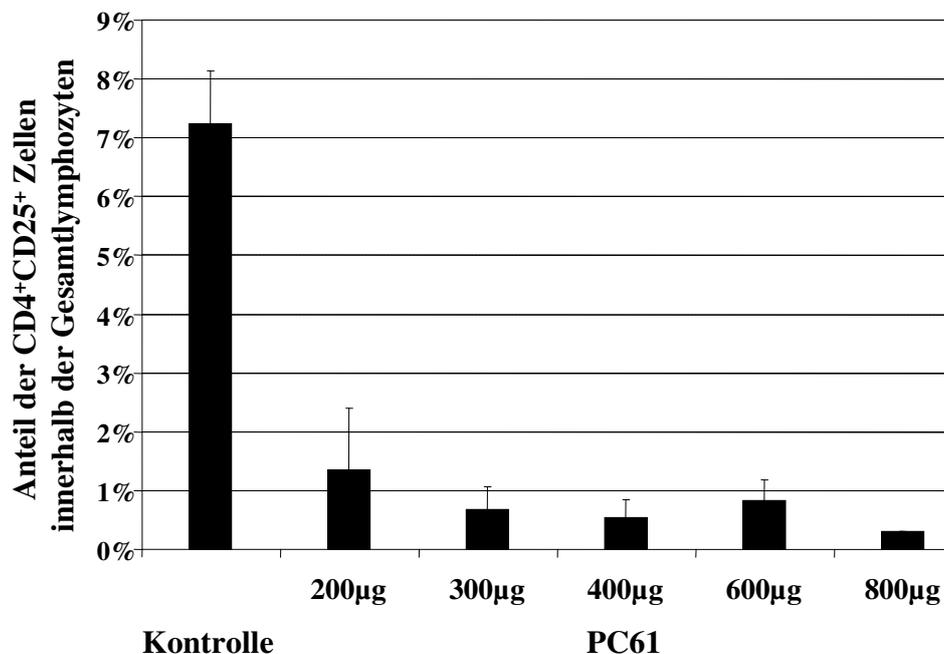


Abb. 4.2: Depletion von $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ T-Zellen nach Injektion von verschiedenen Konzentrationen PC61.

Verschiedene Mengen von PC61 (200, 300, 400, 600, 800 μ) wurden i.p. in C57BL/6N Mäuse injiziert. Nach zwei Tagen wurden Lymphknoten und Milzen entnommen und die Anzahl der CD25^+ CD4 -Zellen per FACS-Analyse ermittelt. Die Balken stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichung von insgesamt 17 Mäusen aus drei verschiedenen Experimenten dar.

In Abb. 4.2 sind die so ermittelten Werte graphisch dargestellt. Die Anzahl der CD4^+ CD25^+ Zellen in unbehandelten Mäusen (Kontrolle) lag zwischen sechs und acht Prozent, bezogen auf die Gesamtzahl der CD4^+ Zellen. Nach einmaliger Injektion von 200 μg PC61 ließen sich zwischen 0,8 % und 2 % detektieren. Nach Injektionen von 300, 400, 600 oder 800 μg PC61 pendelte sich diese Zellpopulation zwischen 0,2 % und 1 % ein. In allen Experimenten stieg die Anzahl der $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ Zellen unabhängig von der injizierten Antikörperkonzentration nach 14 bis 21 Tagen wieder auf die normalen Werte an.

In allen folgenden Experimenten wurde eine Antikörpermenge von 300 μg verwendet, da zwischen den hohen Antikörperkonzentrationen (400 μg , 600 μg , 800 μg) nur geringfügige Unterschiede in der Effektivität der Depletion festzustellen waren, der Depletionserfolg mit 200 μg PC61 jedoch etwas niedriger ausfiel. Darüber hinaus sollte mit einer möglichst geringen Konzentration an eingesetztem Antikörper eine eventuelle Depletion aktivierter Effektorzellen vermieden werden.

Um sicherzustellen, dass es sich bei den im FACS nachgewiesenen $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ Zellen um Treg handelte, wurden diese Zellen weiter charakterisiert. Dazu wurden die Zellen auf die Koexpression des Transkriptionsfaktors FoxP3 untersucht, da dieser fast ausschließlich in Treg exprimiert wird. Dazu wurden 300 μg PC61 in naive C57BL/6N Mäuse injiziert. Nach drei Tagen wurden Lymphozyten aus PC61-behandelten Mäusen und unbehandelten Mäusen (Kontrolle) isoliert und durchflusszytometrisch untersucht.

In Abb. 4.3 ist der Effekt einer Injektion von 300 μg PC61 auf die $\text{CD25}^+\text{FoxP3}^+$ Zellen innerhalb der CD4 T-Zell-Population dargestellt.

Mit Hilfe der FACSDiva Software wurden zunächst die CD4^+ T-Zellen ausgewählt. Diese Zellpopulation wurde dann weitergehend auf ihre CD25 - und FoxP3-Expression hin untersucht. In der unbehandelten Maus (Kontrolle) lag die Anzahl der $\text{CD25}^+\text{Foxp3}^+$ doppelpositiven CD4 T-Zellen in den Lymphknoten bei 6,6 % und in der Milz bei 5,5 % (Abb. 4.3; links). In der Maus, der 300 μg PC61 injiziert worden waren, ließen sich in den Lymphknoten nur noch 0,9 % und in der Milz 0,6 % $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{FoxP3}^+$ T-Zellen detektieren (Abb. 4.3; rechts).

Die Population der $\text{CD4}^+\text{CD25}^-\text{FoxP3}^+$ Zellen nahm nach der Behandlung mit PC61 geringfügig zu. Dabei handelt es sich vermutlich um Treg, die nur sehr wenig CD25 exprimieren und somit der PC61-vermittelten Depletion entgehen [92, 93]. Dennoch war die Anzahl der gesamten FoxP3⁺ Zellen stark reduziert (von 10,5 % 3,6 % in den Lymphknoten und von 9,9 % auf 3,7 % in der Milz). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{FoxP3}^+$ Zellen tatsächlich depletiert werden und nicht lediglich die CD25 -Expression herunter regulieren.

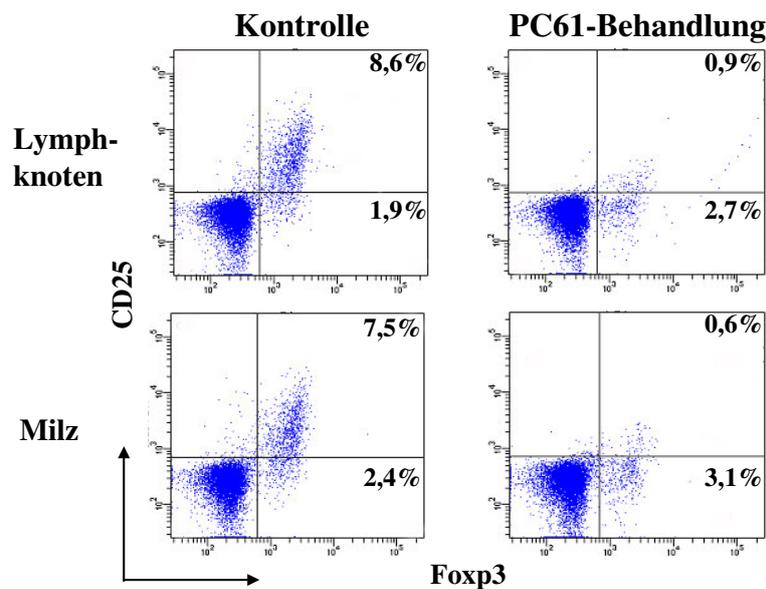


Abb. 4.3: Expression von CD25 und FoxP3 bei CD4 T-Zellen in Lymphknoten und Milz nach PC61-Injektion.

C57BL/6N Mäusen wurden 300 μg PC61 injiziert. Drei Tage nach der Antikörper-Applikation wurden Lymphknoten und Milz entnommen und die Anzahl der CD25⁺FoxP3⁺ Zellen innerhalb der CD4 T-Zell-Population mittels FACS analysiert.

Diese Daten zeigen, dass eine einmalige Injektion von 300 μg PC61 zur Depletion von CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg führt.

4.1.3 Effekt der PC61 Applikation auf verschiedene Lymphozytenpopulationen

Nachdem gezeigt worden war, dass die Applikation von 300 μg PC61 effektiv zur Depletion von CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg eingesetzt werden konnte, sollte untersucht werden, ob die Injektion des Antikörpers Auswirkungen auf die Zusammensetzung, die Vitalität und den Aktivierungszustand der verschiedenen Lymphozytensubpopulationen (CD4⁺ T-Zellen, CD8⁺ T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, NKT-Zellen, dendritische Zellen und Makrophagen) hat.

Einer Gruppe von Mäusen wurde PC61 injiziert, die Kontrollgruppe blieb unbehandelt. Nach zwei bis sieben Tagen wurden Blut, Lymphknoten und die Milz entnommen und mittels FACS analysiert. Dabei wurden die Zellzahlen der einzelnen Populationen (Tab. 4.1) sowie der Aktivierungszustand von CD4⁺-, CD8⁺-, dendritischen Zellen und Makrophagen

mittels der Detektion von Aktivierungsmarkern auf der Zelloberfläche bestimmt (Abb. 4.4, 4.5).

Ein Marker für frühe Aktivierungsprozesse von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen ist das Oberflächenmolekül CD69. Dendritische Zellen (DC) und Makrophagen regulieren die MHCII-Expression auf der Zelloberfläche nach Stimulierung herauf. Darüber hinaus regulieren DC die Oberflächenexpression von kostimulatorischen Molekülen wie B7.2 (CD86) nach ihrer Aktivierung herauf.

| | Anteil der Gesamtlymphozyten [%] | | | | | | |
|--------------------------|----------------------------------|-------------------|------------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|
| | CD8-Zellen | CD4-Zellen | DC | Makrophagen | B-Zellen | NK-Zellen | NKT-Zellen |
| <i>Kontrolle</i> | | | | | | | |
| Blut | 4,1 ± 2,5 | 15,4 ± 9,0 | 4,8 ± 3,2 | 6,7 ± 2,2 | 14 ± 9,1 | 5,8 ± 2,9 | 1,3 ± 2,2 |
| LN | 23,8 ± 10,2 | 49,4 ± 4,6 | 3,3 ± 1,0 | 3,5 ± 0,8 | 21,6 ± 3,0 | 2,3 ± 1,1 | 1,2 ± 0,6 |
| Milz | 9,7 ± 3,1 | 21,7 ± 3,9 | 6,7 ± 1,4 | 7,6 ± 1,0 | 48,9 ± 8,4 | 7,5 ± 3,0 | 0,7 ± 0,1 |
| <i>PC61 – Behandlung</i> | | | | | | | |
| Blut | 3,3 ± 1,4 | 10,8 ± 3,4 | 2,9 ± 1,1 | 5,5 ± 1,5 | 11,5 ± 3,7 | 4,2 ± 1,1 | 0,2 ± 0,1 |
| LN | 26,1 ± 9,4 | 44,9 ± 7,5 | 3,4 ± 1,2 | 4,1 ± 0,5 | 20,8 ± 1,6 | 2,2 ± 0,9 | 1,1 ± 0,6 |
| Milz | 9,9 ± 3,9 | 18,3 ± 2,0 | 9,6 ± 2,6 | 7,2 ± 1,1 | 51,0 ± 6,7 | 7,6 ± 0,3 | 1,2 ± 1,0 |

Tabelle 4.1: **Prozentualer Anteil der CD4⁺- und CD8⁺ T-Zellen, dendritischen Zellen, Makrophagen, B-Zellen, NK- und NKT-Zellen der Gesamtlymphozyten mit und ohne PC61-Injektion.**

Sieben Tage nach der Applikation von 300 µg PC61 wurden Lymphozyten aus Blut, Lymphknoten und Milz isoliert und mittels FACS der Anteil der CD4- und CD8-, DC und Makrophagen bestimmt. Die Vergleichswerte stammten von Lymphozyten aus unbehandelten Kontrollmäusen. Angegeben sind die Mittelwerte ± Standardabweichung. $n = 4$ aus zwei unabhängigen Experimenten.

In Tab. 4.1 sind die Mittelwerte ± Standardabweichung der prozentualen Anteile der verschiedenen Lymphozytensubpopulationen innerhalb der Gesamtlymphozytenpopulation in Blut, Lymphknoten und Milz von unbehandelten Kontrollmäusen und PC61-behandelten Mäusen angegeben. Der durchschnittliche Anteil aller Lymphozytenpopulationen war im Blut von PC61-behandelten Mäusen geringfügig niedriger als in den Kontrollmäusen, was

jedoch unter Berücksichtigung der Standardabweichung ein zu vernachlässigender Befund war. In Lymphknoten und Milz lagen die Werte für die Anteile der einzelnen Lymphozytenpopulationen zwischen PC61-behandelten und Kontrolltieren im gleichen Bereich, wiesen also weder eine Zu- noch eine Abnahme auf.

Diese Daten zeigen, dass die Applikation von PC61 keine Änderung der allgemeinen Zusammensetzung der untersuchten Lymphozytenpopulationen in den untersuchten Organen bewirkt.

In Abbildung 4.4 ist die Anzahl der aktivierten $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen in Blut, Lymphknoten und Milz dargestellt. Die Anzahl der $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Zellen in den PC61-behandelten Mäuse war wie erwartet im Blut von 2,4 % auf 1,0 %, in den Lymphknoten von 4,8 % auf 1,3 % und in der Milz von 2,5 % auf 0,6 % reduziert. Die Expression von CD69 auf $CD4^+$ - und $CD8^+$ T-Zellen war allgemein sehr niedrig und wies in keinem der untersuchten Organe einen Unterschied zwischen den beiden Gruppen auf (im Blut $CD4^+$: jeweils 0,2 %; $CD8^+$: jeweils 0,1 %; in den Lymphknoten $CD4^+$: 0,9 % bzw. 0,8 %; $CD8^+$: jeweils 0,4 %; in der Milz $CD4^+$: 0,2 % bzw. 0,3 %; $CD8^+$: 0,3 % bzw. 0,4 %).

Abb. 4.5 zeigt die mittlere Fluoreszenz von MHC II auf DC und Makrophagen sowie die MFI von CD86 auf DC. DC und Makrophagen exprimieren bereits in ruhendem Zustand MHC II, regulieren die Expression jedoch nach der Aktivierung herauf. Über die MFI kann diese stärkere Expression analysiert werden, da anhand dieses Wertes die relative Menge an MHC II-Molekülen auf der Oberfläche der untersuchten Zellen ermittelt werden kann.

Die MFI für die MHC II-Expression auf DC und Makrophagen im Blut betrug bei den Kontrollen 17539 bzw. 16530. Bei den PC61-behandelten Mäusen lagen die Werte etwas niedriger bei 11694 bzw. 10494. Diese niedrige Expression von MHCII nach der Applikation von PC61 war jedoch nur im Blut zu beobachten. Im Blut sind weniger als 50 % der Zellen Lymphozyten und da die entscheidenden Immunreaktionen gegen Infektionen und Tumore jedoch hauptsächlich in den Lymphknoten, der Milz und dem Infektionsort stattfinden, sind Schwankungen der Expression von Oberflächenmolekülen auf Lymphozyten im Blut nicht entscheidend für Immunreaktionen.

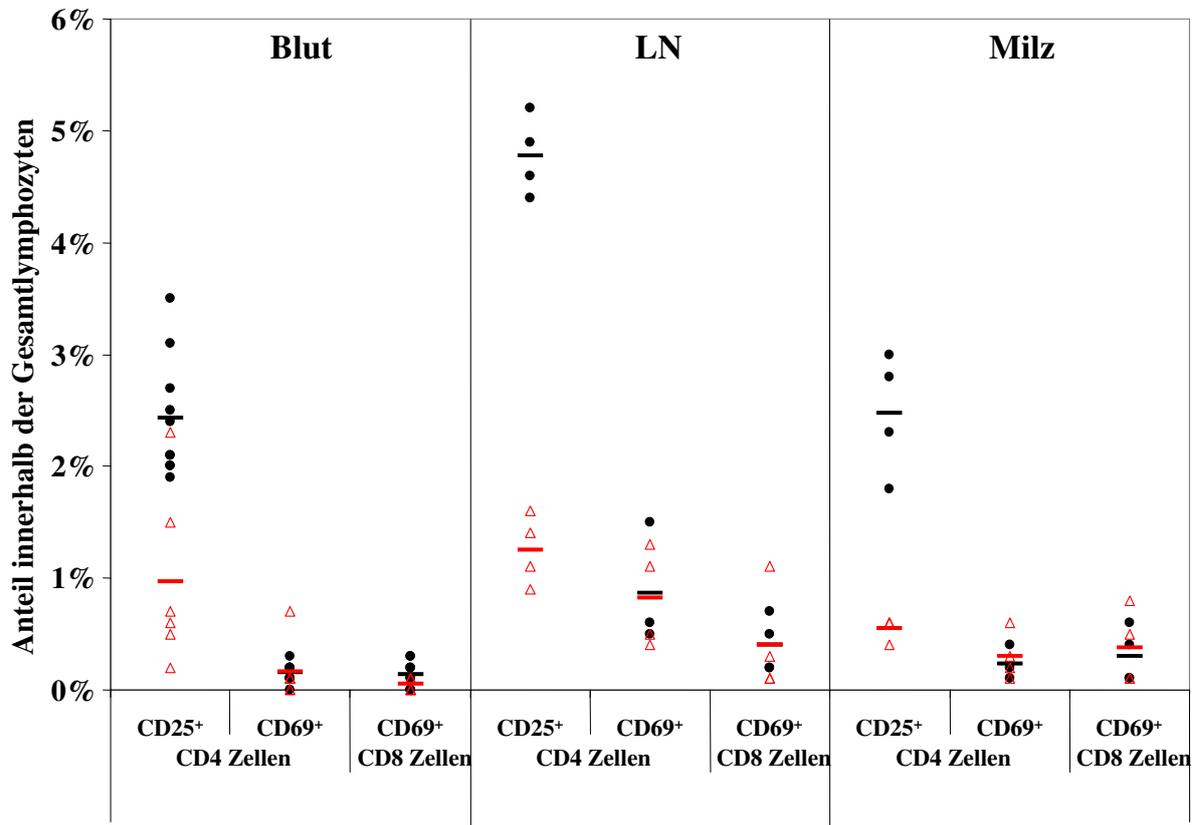


Abb. 4.4: Aktivierungsgrad von CD4⁺- und CD8⁺ T-Zellen in Blut, Lymphknoten und Milz.

Sieben Tage nach der Applikation von 300 μg PC61 wurden Lymphozyten aus Blut, Lymphknoten und Milz isoliert und mittels FACS der Aktivierungsgrad der CD4- und CD8-Zellen anhand der CD69-Expression bestimmt. Vergleichswerte stammten von Lymphozyten aus unbehandelten Kontrollmäusen. $n = 4$ aus zwei unabhängigen Experimenten.

● = Kontrollen, - = Mittelwerte der Kontrollen;

△ = PC61-behandelt, - = Mittelwerte der PC61-behandelten Mäuse.

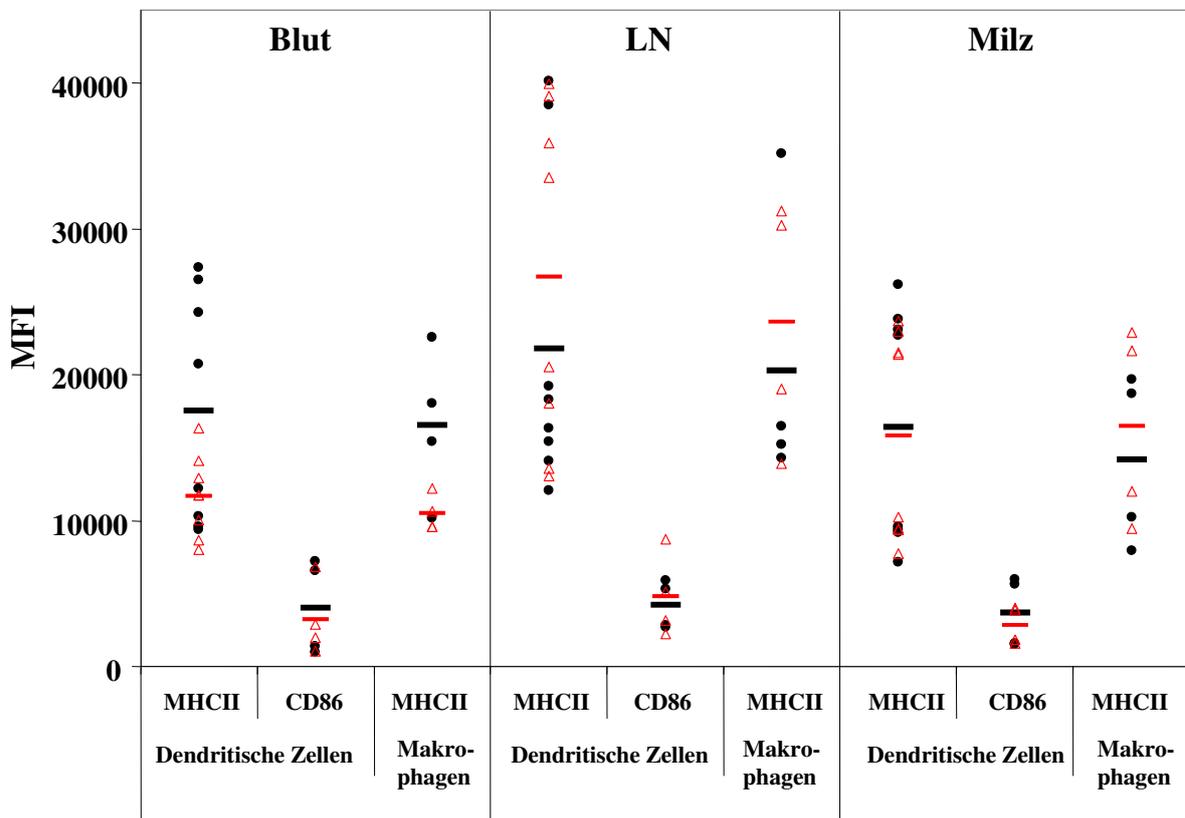


Abb. 4.5: Aktivierungsgrad von Dendritischen Zellen und Makrophagen in Blut, Lymphknoten und Milz.

Sieben Tage nach der Applikation von 300 μg PC61 wurden Lymphozyten aus Blut, Lymphknoten und Milz isoliert und mittels FACS der Aktivierungsgrad der DC und Makrophagen anhand der MHCII- und CD86-Expression bestimmt. Vergleichswerte stammten von Lymphozyten aus unbehandelten Kontrollmäusen. $n = 4$ aus zwei unabhängigen Experimenten.

● = Kontrollen, - = Mittelwerte der Kontrollen;

△ = PC61-behandelt, - = Mittelwerte der PC61-behandelten Mäuse

In den Lymphknoten waren die Werte für die MFI der MHC II-Expression auf DC bzw. Makrophagen in PC61-behandelten Mäusen geringfügig höher (26710 bzw. 23586) als in den Kontrollen (21771 bzw. 20282). Auch in der Milz waren nur geringfügige Unterschiede festzustellen (PC61-behandelt: 15801 bzw. 16488; Kontrolle: 16379 bzw. 14139).

Die MFI-Werte für die Expression von CD86 auf DC wies ebenfalls keinen Unterschied zwischen PC61-behandelten Mäusen und Kontrollmäusen in den untersuchten Organen auf. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Injektion von 300 μg PC61 in naiven Mäusen effektiv $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ Zellen depletiert. Andere Zellen des Immunsystems werden weder in ihrer Anzahl reduziert noch verändert sich ihr Aktivierungszustand.

4.2 Treg-Depletion als additive Methode zur Behandlung des B16 Melanoms

4.2.1 Wirkung von PC61 Applikation auf das Wachstum des B16 Melanoms

Im vorangehenden Abschnitt wurde gezeigt, dass die einmalige Injektion von 300 μg PC61 zur Depletion von $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{Foxp3}^+$ Zellen (Treg) für 14-21 Tage, führt ohne die Zusammensetzung der Lymphozyten im Allgemeinen oder deren Aktivierungszustand zu ändern. Diese Methode sollte im Folgenden angewendet werden, um den Einfluss von Treg auf das B16-Melanom zu untersuchen. Die Depletion von Treg durch die Injektion von PC61 vor der Tumorinokulation (präventiv) wurde bereits als erfolgreiche Methode zur Inhibierung des B16-Wachstums beschrieben [82, 94, 95]. Im Folgenden sollte festgestellt werden, welche Wirkung die Depletion von Treg durch PC61 auf das Wachstum des Tumors ausübt, wenn der Tumor bereits seit einiger Zeit wächst (therapeutisch).

Dazu wurden C57BL/6N Mäusen entweder einen Tag vor (präventiv) oder fünf Tage nach der Tumorinokulation (therapeutisch) 300 μg PC61 injiziert. Anschließend wurde alle zwei Tage das Volumen der Tumore bestimmt. Wenn das Tumolvolumen ca. 600-700 mm^3 überschritt, wurden die Mäuse getötet.

In Abb. 4.6 ist das Wachstum der Tumore in den verschiedenen Gruppen dargestellt. Die Tumore der unbehandelten Mäuse (Kontrolle - \diamond) wuchsen bis zum 13. Tag relativ langsam.

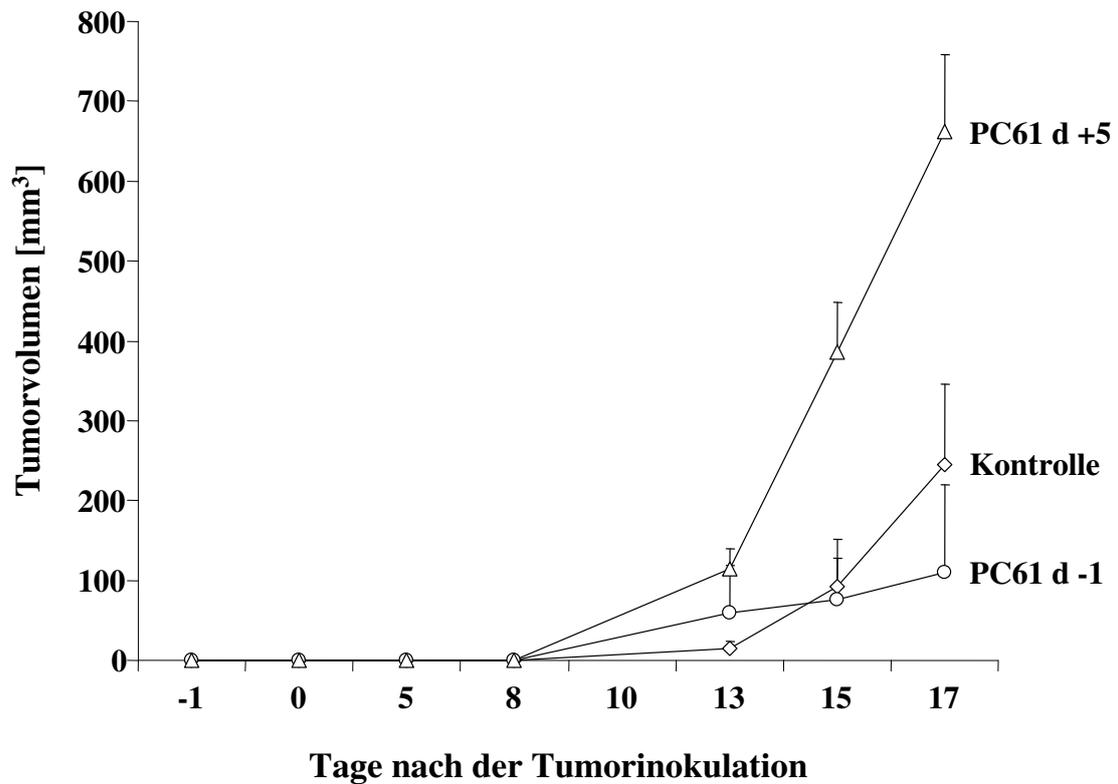


Abb. 4.6: Einfluss der $CD25^+$ Depletion auf das Wachstum von B16 Melanomen.

C57BL/6N Mäusen wurden entweder einen Tag vor der Tumorinokulation oder fünf Tage danach $300 \mu\text{g}$ PC61 injiziert. Alle drei bis vier Tage wurde das Tumolvolumen bestimmt. $n = 3$. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM.

An Tag 15 bzw. 17 verdoppelte sich das Tumolvolumen jedoch jeweils und wies an Tag 17 ein Tumolvolumen von 245 mm^3) auf. In der vor Tumorinokulation mit PC61 behandelten Gruppe (\circ) wuchs nur in einer von drei Mäusen ein Tumor, der bis Tag 13 schneller wuchs, als die Tumore der Kontrollgruppe. An Tag 15 verlangsamte sich das Wachstum jedoch und an Tag 17 entsprach das Tumolvolumen 109 mm^3 . Die anderen Mäuse blieben tumorfrei. Bei den Mäusen, denen fünf Tage nach der Tumorinokulation PC61 injiziert worden war, wuchsen die Tumore wesentlich schneller und erreichten an Tag 17 ein Tumolvolumen von 662 mm^3 .

In einem Wiederholungsexperiment wurden C57BL/6N Mäusen entweder einen Tag vor (präventiv) oder fünf bzw. zehn Tage nach der Tumordinokulation (therapeutisch) 300 μg PC61 injiziert. Anschließend wurde alle zwei Tage das Volumen der Tumore bestimmt.

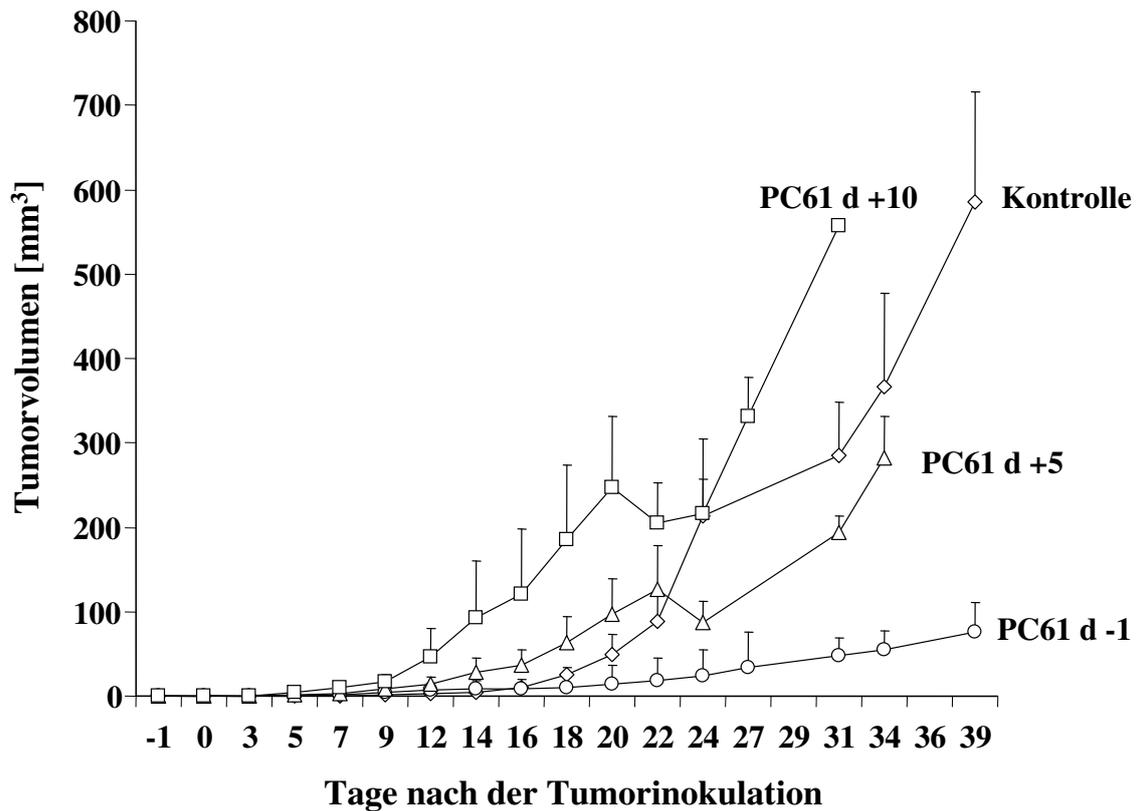


Abb. 4.7: Einfluss der CD25^+ Depletion auf das Wachstum von B16 Melanomen.

C57BL/6N Mäusen wurden entweder einen Tag vor der Tumordinokulation oder fünf bzw. zehn Tage danach 300 μg PC61 injiziert. Alle zwei bis drei Tage wurde das Tumolvolumen bestimmt. $n = 7$. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM.

Abb. 4.7 zeigt, dass die Tumore der Kontrollgruppe (\diamond) zunächst relativ langsam wuchsen und nach ca. 21 Tagen ein Volumen von 100 mm^3 überschritten. In den nachfolgenden 14 Tagen stieg das Volumen exponentiell an und erreichte an Tag 36 einen durchschnittlichen Wert von ca. 600 mm^3 .

Im Gegensatz dazu nahm das Tumorwachstum in den beiden Gruppen, die erst nach der Tumordinokulation mit PC61 behandelt worden waren, schneller zu (\triangle , \square). Die Tumore die-

ser Mäuse wuchsen zunächst für zehn bis zwölf Tage wesentlich schneller (d 12-20/22) als die Tumore der Kontrollmäuse; danach stagnierte das Wachstum für ca. vier Tage (d 20-24) und nahm anschließend wieder zu. Die Mäuse aus diesen Gruppen mussten insgesamt früher getötet werden, als die Kontrollmäuse und die Mäuse, die vor der Tumorinokulation mit PC61 behandelt worden waren. Bei den vor der Tumorinokulation mit PC61 behandelten Mäusen (○) wuchsen die Tumore wesentlich langsamer und hatten nach 39 Tagen noch nicht ein Volumen von 100 mm³ überschritten.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass eine präventive CD25-Depletion das Tumorstadium verlangsamt. Eine therapeutische CD25-Depletion scheint hingegen eine Beschleunigung des Tumorstadiums hervorzurufen.

4.2.2 Effektor T-Zellen in Lymphorganen von tumortragenden Mäusen

Die vorangegangenen Experimente deuten darauf hin, dass der Zeitpunkt der Depletion eine wichtige Rolle spielt. Eine Möglichkeit, weshalb die Tumore nach therapeutischer Antikörperinjektion schneller wachsen ist, dass tumorspezifische Effektor T-Zellen (Teff), die nach ihrer Aktivierung eine erhöhte CD25-Expression aufweisen, durch den CD25-Antikörper ebenfalls depletiert werden.

Um zu überprüfen, ob mit der PC61-Injektion eine Depletion von aktivierten T-Zellen einhergeht, wurde C57BL/6N Mäusen fünf Tage nach der Tumorinokulation PC61 injiziert. Weitere sieben Tage später wurden die Tumor-drainierenden Lymphknoten entnommen und die CD4 T-Zellen mittels FACS-Analyse auf die Expression der Aktivierungsmarker CD25- bzw. CD69 untersucht. Als Vergleich dienten unbehandelte tumortragende Mäuse.

Abb. 4.8 zeigt eine repräsentative Analyse der CD25- und CD69-Expression auf CD4⁺ T-Zellen einer Kontrollmaus und einer mit PC61 behandelten Maus. Bei der Kontrollmaus exprimierten 4,2 % der CD4-Zellen CD25 und 4,6 % waren CD69⁺. In der PC61-behandelten Maus waren kaum CD25⁺ T-Zellen nachweisbar (0,3 %). CD69 wurde hingegen von 3,7 % der CD4-Zellen exprimiert. Dieses Ergebnis zeigt, dass trotz CD25-Depletion aktivierte T-Zellen vorhanden waren. Dies konnte in allen untersuchten Mäusen bestätigt werden.

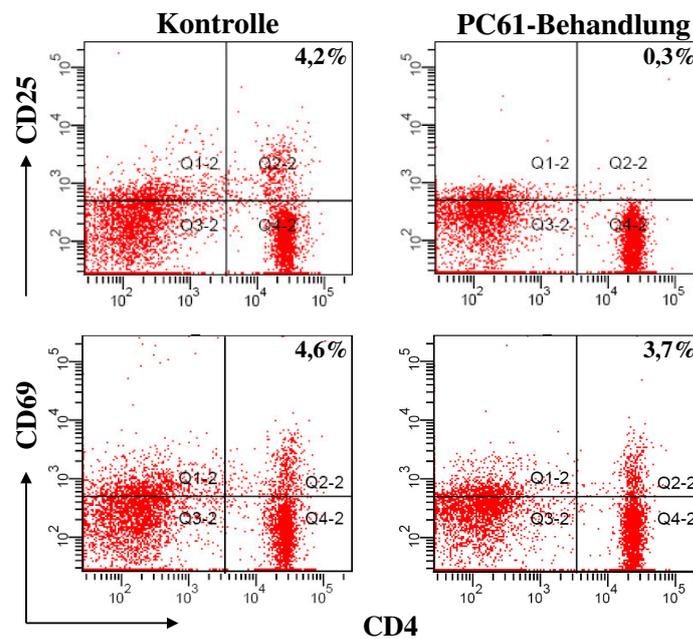


Abb. 4.8: Expression von CD69 auf CD4⁺ T-Zellen in tumor-drainierenden Lymphknoten.

Fünf Tage nach der Tumorinokulation wurde C57BL/N Mäusen PC61 injiziert, die Mäuse der Kontrollgruppe blieben nach der Tumorinokulation unbehandelt. Sieben Tage später wurden die drainierenden Lymphknoten entnommen und die Expression von CD25 und CD69 mittels FACS-Analyse bestimmt.

Diese Daten deuten darauf hin, dass die Injektion von PC61 nach der Tumorinokulation nicht zur zusätzlichen Depletion von Effektor T-Zellen führt.

4.2.3 Behandlungsversuche zur Therapie des B16 Melanoms

In der Erforschung von Methoden, die das Tumorwachstum einschränken oder verhindern sollen, unterscheidet man zwischen sogenannten präventiven Methoden - der „Behandlung“ vor der Tumorzellinjektion - und therapeutischen Methoden - der Behandlung nach der Tumorinokulation. Oft werden zuerst die präventiven Methoden getestet. Hier wurde bislang gezeigt, dass die Vakzinierung mit Tumorantigen-beladenen DC vor der Gabe von Melanomzellen das nachfolgende Tumorwachstum verlangsamt oder insbesondere zusammen mit Treg-Depletion sogar vor Tumorwachstum schützen kann [65, 69, 66, 68, 96].

Da in tumortragenden Mäusen nach CD25-Depletion noch aktivierte T-Zellen nachgewiesen werden konnten, sollten diese T-Zellen in folgenden Experimenten durch Tumorantigen-

beladene DC stimuliert werden. Das Ziel war eine verstärkte Aktivierung von Tumor-spezifischen T-Zellen, die in der Abwesenheit von Treg den Tumor bekämpfen sollten.

Jeweils vor der Injektion der Tumorantigen-beladenen DC wurde deren Phänotyp mittels FACS bestimmt. Dabei wurde einerseits die Expression von CD11c (DC-Marker), andererseits die Expression von MHCII und CD86 als Aktivierungsmarker untersucht.

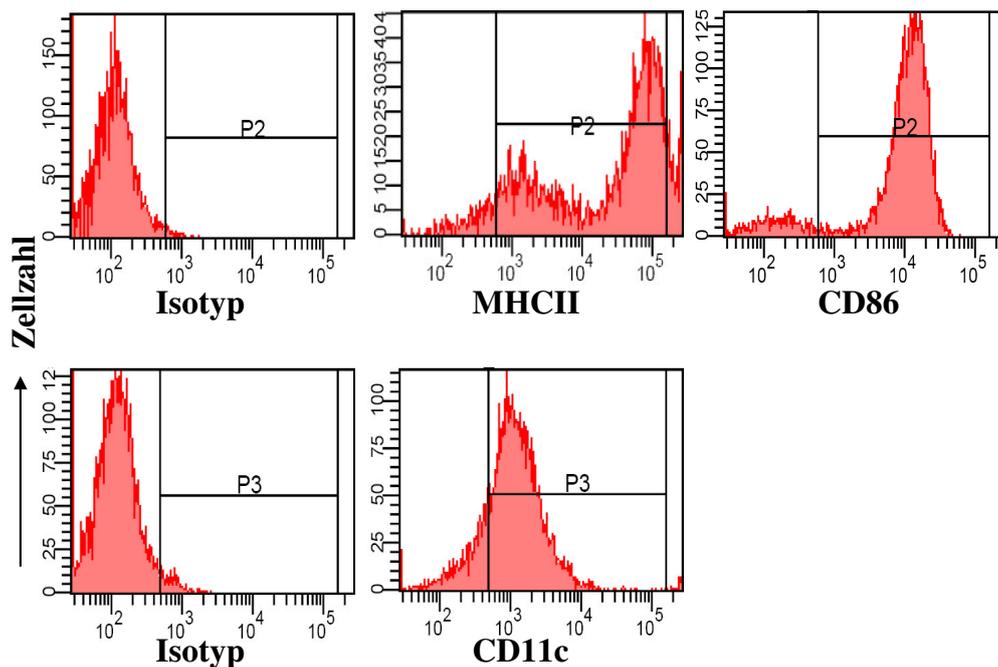


Abb. 4.9: Phänotyp der zur Therapie verwendeten Tumorantigen-beladenen DC.

Vor der Injektion der Tumorantigen-beladenen BM-DC wurde anhand der Oberflächenexpression untersucht, in welchem Aktivierungszustand sich die Zellen befanden. 5×10^5 DC wurden mit Antikörpern gegen CD11c (DC-Marker), MHCII und CD86 gefärbt und mittels FACS analysiert.

Abb. 4.9 zeigt repräsentativ den Phänotyp der mit Tumorlysat gepulsten DC. Die Anzahl der CD11c⁺ Zellen lag bei 80,4 %, die mittlere Fluoreszenzintensität für die Expression von MHCII lag bei 52891, diejenige für die Expression von CD86 lag bei 13153.

Diese hohe Expression von MHCII und dem Kostimulatorischen Molekül CD86 weisen darauf hin, dass die Tumorantigen-beladenen DC aktiviert waren.

Fünf Tage nach der Tumordinokulation begann die Behandlung von tumortragenden Mäusen durch Depletion von Treg mittels PC61-Injektion und Vakzinierung mit Tumorantigen-beladenen DC. Wie in Abb. 4.10 dargestellt, wurde eine Kontrollgruppe von C57BL/6N Mäusen nur mit PC61 behandelt. Eine Gruppe bekam Injektionen von Tumorantigen-beladenen DC und eine weitere Gruppe erhielt eine Kombination aus beidem. Die DC-Injektionen wurden zweimal im Abstand von jeweils drei Tagen wiederholt. Die Kontrollgruppe wurde nach der Tumordinokulation nicht weiter behandelt. Alle zwei bis drei Tage wurden die Tumorumfänge bestimmt.

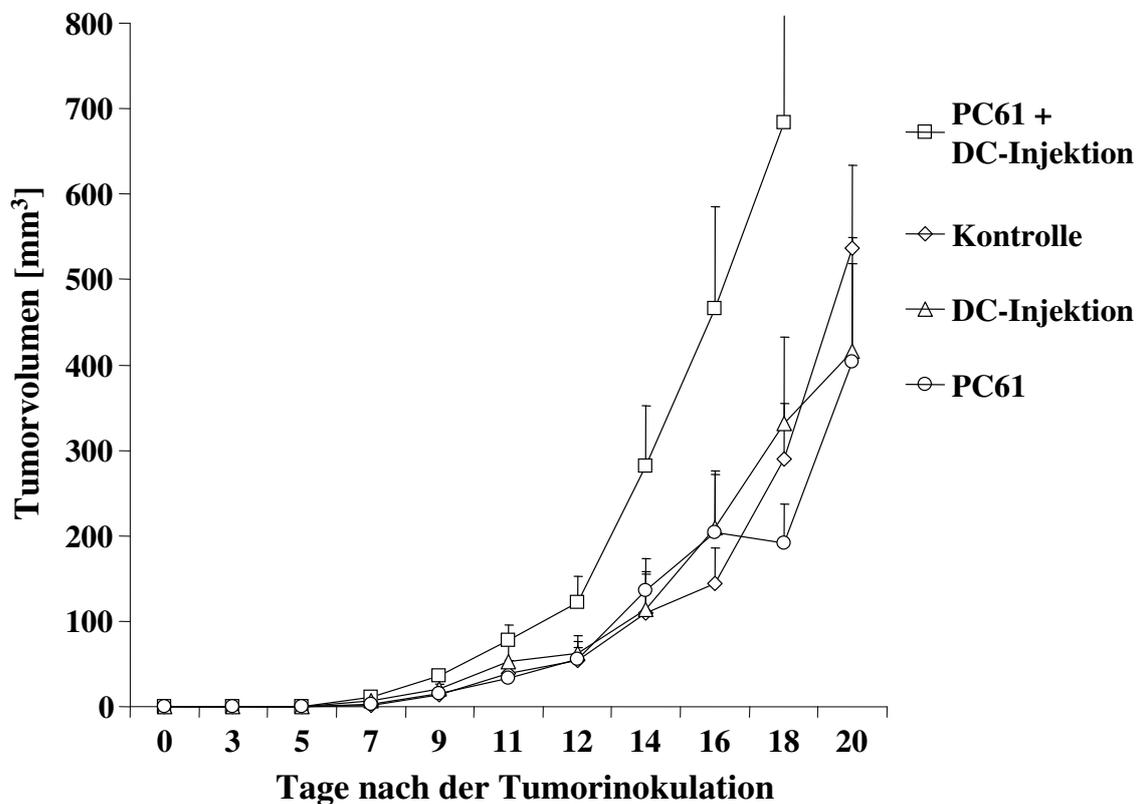


Abb. 4.10: B16-Wachstum im Rahmen der Therapie aus Treg-Depletion und DC-Stimulierung.

C57BL/6N Mäusen wurden fünf Tage nach der Tumordinokulation entweder 300 μg PC61, Tumorantigen-beladene DC oder eine Kombination aus beidem injiziert. Die Kontrollgruppe wurde nicht behandelt. Alle zwei bis drei Tage wurde das Tumorumfang bestimmt. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von insgesamt zwei Versuchen; $n = 7$. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM.

In Abb. 4.10 ist zu erkennen, dass die Tumore in den unbehandelten Mäusen (Kontrolle = \diamond) innerhalb der ersten zehn bis zwölf Tage relativ langsam wuchsen, wobei nach zwölf Tagen das durchschnittliche Volumen von 100 mm^3 überschritten wurde. Innerhalb der folgenden acht Tage nahm das Tumorwachstum exponentiell zu und erreichte ein Volumen von über 500 mm^3 .

In den Gruppen, die entweder nur mit PC61 (\circ) oder nur mit DC (\triangle) behandelt worden waren wuchsen die Tumore vergleichbar schnell wie die Tumore der Kontrollmäuse.

Bei den Mäusen, die mit PC61 und Antigen-beladenen DC behandelt worden waren (\square), beschleunigte sich jedoch das Tumorwachstum nach zehn Tagen. Die Tumore überschritten bereits nach zwölf Tagen ein Volumen von 100 mm^3 und erreichten nach 16 Tagen ein Volumen von über 600 mm^3 . Die Mäuse dieser Gruppe mussten nach 18 Tagen getötet werden, als das Tumolvolumen 684 mm^3 erreicht hatte. Verglichen mit den anderen Gruppen, deren Tumore zu diesem Zeitpunkt ca. 270 mm^3 aufwiesen, handelte es sich um eine Steigerung des Volumens um über 250 %.

Die überraschende Potenzierung des Tumorwachstums nach der kombinatorischen Behandlung mit PC61 und DC weist, wie in 4.2.1 bereits erwähnt, darauf hin, dass der Applikationszeitpunkt einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung des Tumors hat.

Da die zur Behandlung verwendeten DC einen eindeutig aktivierten Phänotyp aufwiesen (Abb. 4.9), kann die Verstärkung des Tumorwachstums nicht darauf zurückzuführen sein, dass die DC eine tolerogene Wirkung ausüben.

Diese Daten lassen sich dahingehend zusammenfassen, dass weder die Treg-Depletion, noch die Injektion von Tumorantigen-beladenen DC oder deren Kombination als therapeutische Maßnahme zur Eindämmung des schon vorhandenen Tumorwachstums geeignet sind.

4.3 Lymphozyten im Tumorinfiltrat

Um zu untersuchen, ob tumorassoziierte regulatorische T-Zellen während des B16 Wachstums eine Rolle spielen sollte festgestellt werden, in welcher Anzahl diese Zellen im Tumorinfiltrat vorkommen. Zu diesem Zweck wurden Lymphozyten aus B16 Tumoren isoliert und der Anteil der $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Zellen mittels FACS bestimmt.

4.3.1 Reaktivität von Antikörpern auf B16-Zellen

Für die spätere Phänotypisierung des Tumorinfiltrates war es zunächst erforderlich die Reaktivität der verwendeten Antikörper mit B16-Zellen zu untersuchen. So sollte ausgeschlossen werden, dass es durch unspezifische Antikörper-Bindungen an Tumorzellen zu falschen positiven Signalen kommt.

In Abb. 4.11 ist die durchflusszytometrische Analyse der Antikörper-Bindung an B16-Zellen dargestellt. In der oberen Reihe sind die Isotypkontrollen für PE, FITC und APC abgebildet. Als Positivkontrolle wurde eine Färbung gegen MHC Klasse I durchgeführt (linke Spalte, zweites Histogramm von oben), da dieses Molekül von allen Körperzellen (auch Tumorzellen) exprimiert wird.

Bei den anderen verwendeten Antikörpern handelt es sich um Marker für Lymphozytenpopulationen (CD8, CD4 = T-Zellen; CD3 = T-Zellen und NKT-Zellen ; CD19 oder B220 = B-Zellen; Gr-1 = Granulozyten; F4/80 oder CD11b = Makrophagen; CD11c = dendritische Zellen; NK1.1 = NK- und NKT-Zellen) bzw. Aktivierungsmarker (CD25 für T-Zellen; MHCII, CD80, CD86 für DC und Makrophagen).

Die Tumorzellen wurden mit dem überwiegenden Anteil der benutzten Antikörper nicht angefärbt. Die Ausnahmen bildeten die Antikörper gegen B220 (B-Zellen) und Gr-1 (Granulozyten). Diese Färbung könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Antikörper an ein Epitop auf den Tumorzellen binden, das demjenigen ähnelt für das sie spezifisch sind.

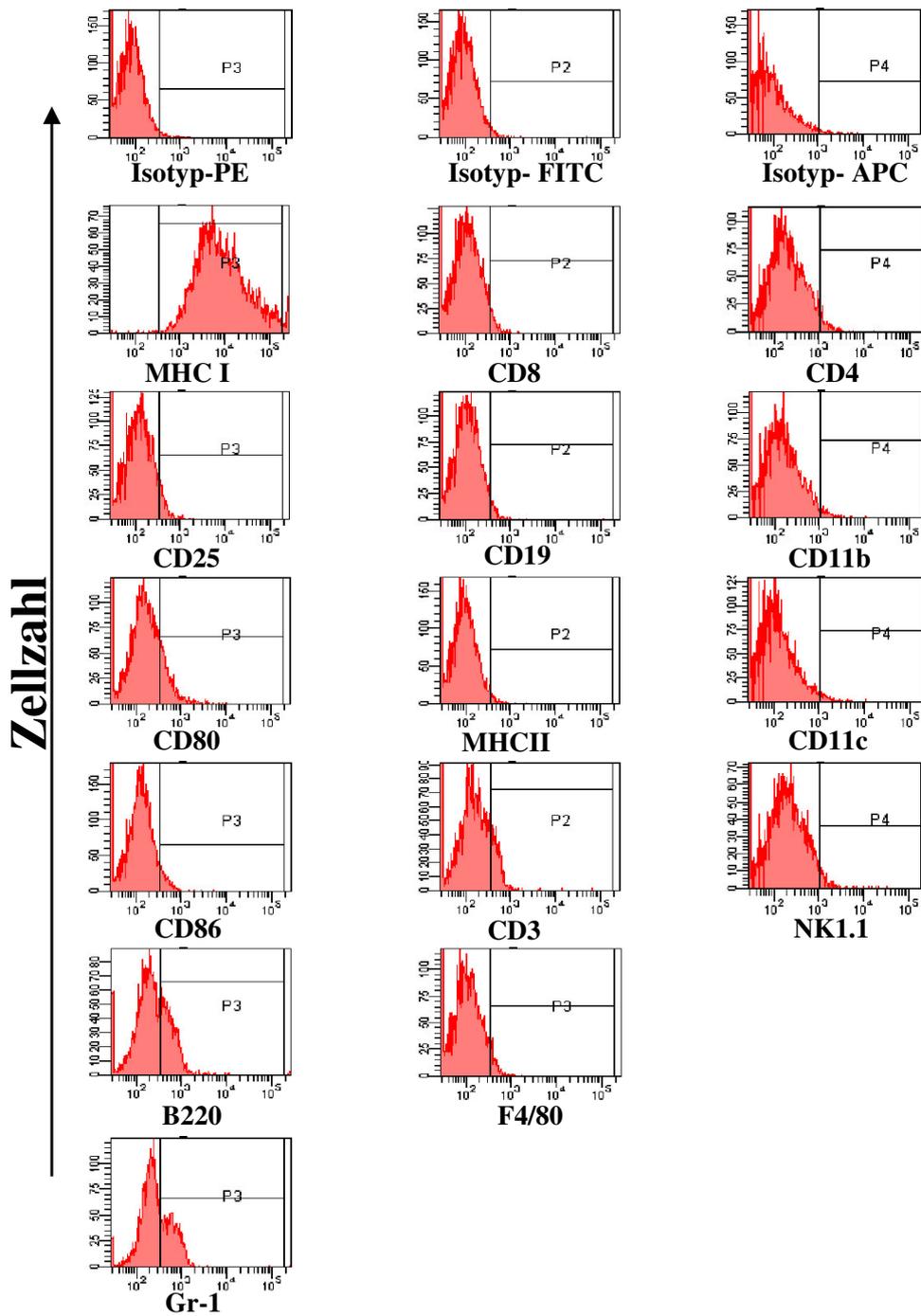


Abb. 4.11: Färbung von B16-Zellen mit verschiedenen direkt-markierten Antikörpern.

Jeweils 5×10^5 B16-Zellen wurden mit je $1 \mu\text{g}$ der jeweiligen Fluorochrom-markierten Antikörpern gefärbt. Anschließend wurden die Zellen mittels FACS analysiert. Die gates (P2, P3, P4) geben den Anteil der positiven Zellen bezogen auf die Isotypkontrollen an.

4.3.2 Charakterisierung von tumorinfiltrierenden Lymphozyten

Nachdem ausgeschlossen worden war, dass die zur Charakterisierung von Lymphozyten verwendeten Antikörper eine Kreuzreaktivität mit B16-Zellen aufwiesen, sollte das Vorkommen von tumorinfiltrierende Lymphozyten im B16-Melanom untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden B16-Tumore entnommen und Zellsuspensionen hergestellt. Diese Zellsuspensionen wurden durchflusszytometrisch auf die Anwesenheit von verschiedenen Lymphozytenpopulationen (CD4-Zellen, CD8-Zellen, B- Zellen, NK-Zellen, NKT-Zellen, DC und Makrophagen) untersucht.

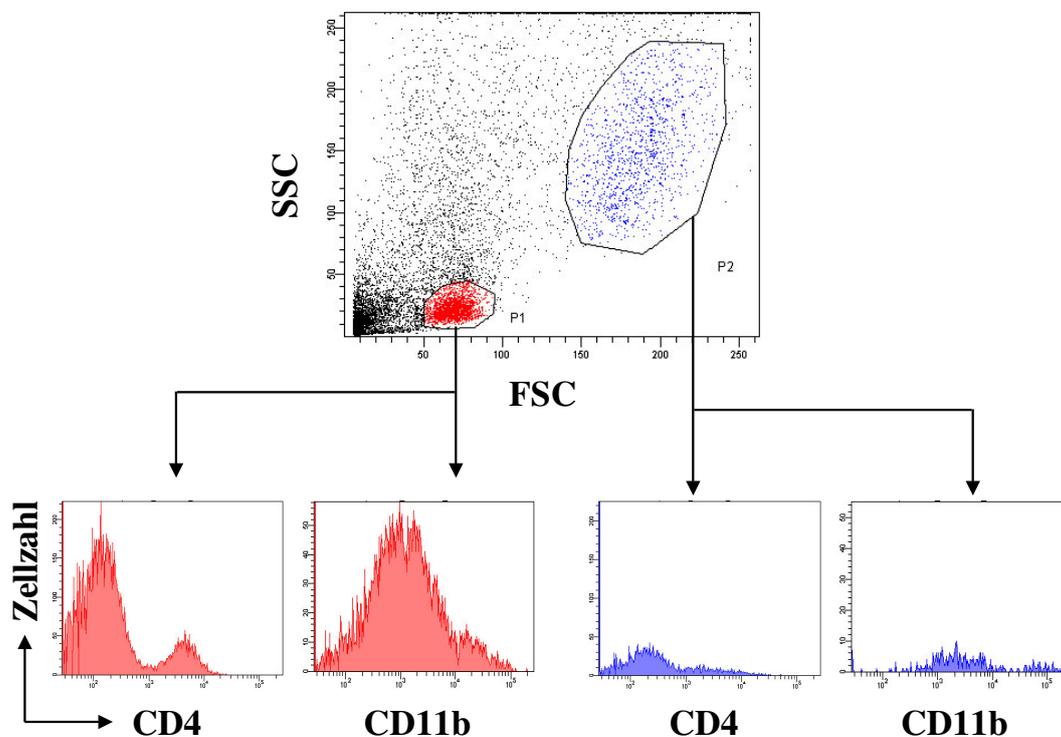


Abb. 4.12: FSC/SSC-Ansicht der tumorinfiltrierenden Lymphozyten.

Jeweils 5×10^5 aus B16-Tumoren isolierte Zellen wurden mittels FACS analysiert. Dabei konnte bereits anhand der Größe und Granularität zwischen Lymphozyten und Tumorzellen unterschieden werden. P1 = Lymphozyten; P2 = Tumorzellen.

In der FSC/SSC-Ansicht in Abb. 4.12 ist zu erkennen, dass Lymphozyten und Tumorzellen sich anhand ihrer Größe und Granularität unterscheiden lassen. P1 markiert die Lympho-

zyten (Lymphozytengate) während P2 die Tumorzellen kenntlich macht. Dabei exprimieren die Tumorzellen weder T-Zell spezifische Moleküle wie z.B. CD4 noch Makrophagenmarker wie CD11b (Abb. 4.12 rechts) oder DC-Marker (CD11c, nicht gezeigt). Die tumorinfiltrierenden Lymphozyten wurden weiterhin auf Oberflächenmarker untersucht.

In Abb. 4.13 ist die Anzahl der infiltrierenden Lymphozyten für die einzelnen B16-Tumoren dargestellt. Die Gesamtzahl des Infiltrates betrug zwischen 5 % und 20 % der Gesamtzellzahl der gewonnenen Zellsuspension und variierte somit stark. Unter Berücksichtigung der Mittelwerte stellten Makrophagen den höchsten Anteil im Lymphozyteninfiltrat (17,4 %, 9,7 %), gefolgt von CD4⁺ T-Zellen (8,9 %), NK-Zellen (8,2 %) und CD8⁺ T-Zellen (7 %). Die am geringsten vertretenen Populationen waren DC (5,1 %), B-Zellen (4,5 %) und NKT-Zellen (4,1 %).

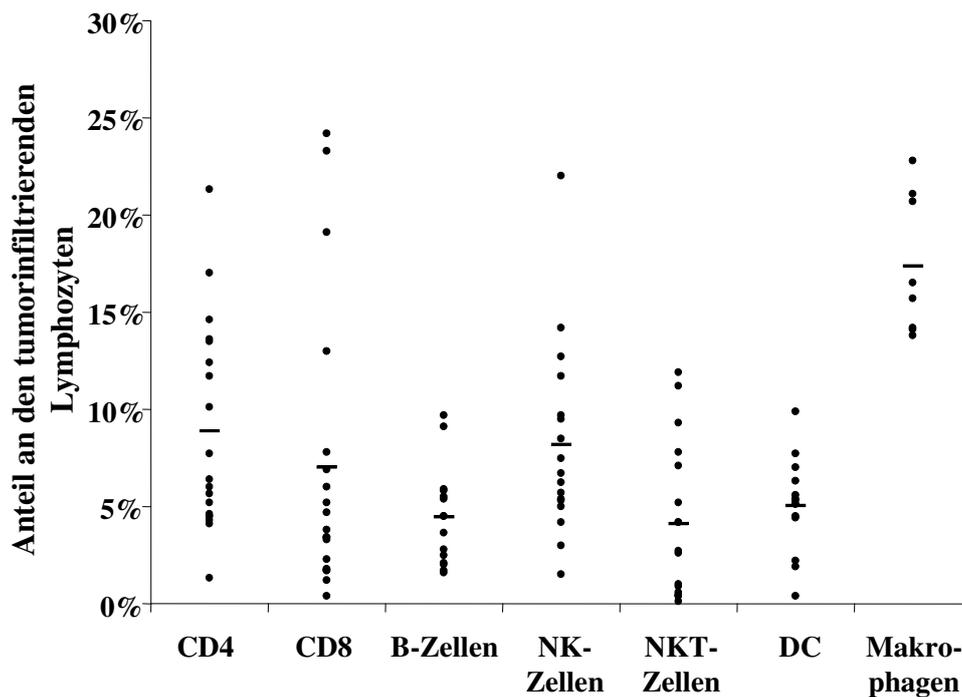


Abb. 4.13: Anteile der verschiedenen Lymphozytensubpopulationen im Tumorinfiltrat.

Jeweils 5×10^5 aus B16-Tumoren isolierte Zellen wurden mit je $1 \mu\text{g}$ der jeweiligen Fluorochrom-markierten Antikörper gegen spezifische Oberflächenmarker für die verschiedenen Lymphozytenpopulationen gefärbt und mittels FACS analysiert. Die Punkte geben die Werte der einzelnen Mäuse an, der Balken zeigt die Mittelwerte. Dargestellt sind die Werte von insgesamt 19 Mäusen aus drei unabhängigen Versuchen.

● = Einzelwerte; - = Mittelwerte.

Nachdem gezeigt worden war, dass $CD4^+$ T-Zellen in den Tumor migrieren, stellte sich die Frage, ob sich unter diesen Zellen $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Treg befinden. Dazu wurde die $CD4^+$ Zellpopulation mittels FACS-Analyse auf die Expression von CD25 und FoxP3 untersucht.

Abbildung 4.14 zeigt den Anteil der $CD25^+FoxP3^+$ Zellen innerhalb der $CD4^+$ T-Zellen in den drainierenden Lymphknoten verglichen mit dem Tumordinfiltrat. Während in den drainierenden Lymphknoten der Gesamtanteil der $CD4^+$ T-Zellen bei durchschnittlich 33,9 % lag (Daten nicht gezeigt), waren im Tumordinfiltrat im Durchschnitt 8,9 % der Lymphozyten $CD4^+$ (Abb. 4.13). In den drainierenden Lymphknoten lag der Anteil der $CD25^+FoxP3^+$ Zellen innerhalb der gesamten $CD4^+$ -Zellpopulation bei 8,6 %. Der Anteil der $CD25^+FoxP3^+$ im Tumor lag bei 24,4 % (Abb. 4.14).

Diese Daten zeigen, dass im Tumordinfiltrat der Anteil an Treg vergleichsweise groß ist.

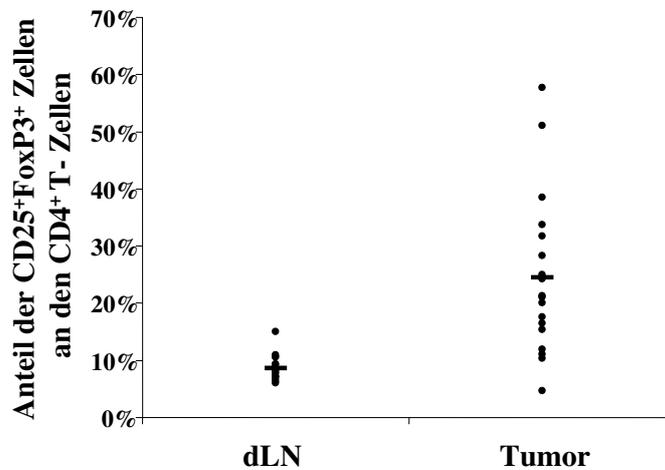


Abb. 4.14: Treg in drainierenden Lymphknoten und Tumoren.

Jeweils 5×10^5 aus B16-Tumoren oder drainierenden Lymphknoten isolierte Zellen wurden mit je $1 \mu\text{g}$ der Fluorochrom-markierten Antikörper gegen CD4, CD25 und FoxP3 gefärbt und mittels FACS analysiert. Die Punkte geben die Werte der $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Zellen für die einzelnen Mäuse (Tumore) an, der Balken zeigt die Mittelwerte. Dargestellt sind die Werte von insgesamt 18 Mäusen aus drei unabhängigen Versuchen. dLN = drainierende Lymphknoten.

4.3.3 Effektivität der Treg-Depletion in tumortragenden Mäusen

Die vorangegangenen Ergebnisse zeigen, dass regulatorische T-Zellen einen bedeutenden Anteil der CD4-Zellen im Tumordinfiltrat ausmachen. Vor dem Hintergrund, dass das Wachstum von etablierten B16-Tumoren durch die Depletion von Treg nicht inhibiert werden konnte, ergab sich die Frage, ob der mAk PC61 in der Lage ist Treg innerhalb von etablierten Tumoren zu depletieren.

Im Folgenden sollte daher die Effektivität der CD25-Depletion auf die Infiltration des Tumors durch Treg untersucht werden.

Zu diesem Zweck wurde Mäusen einen Tag vor oder fünf bzw. zehn Tage nach der Tumordinokulation PC61 injiziert. Nach 21 bis 28 Tagen wurden die Tumore entnommen und die infiltrierenden $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ mittels FACS analysiert.

In Abb. 4.15 sind die repräsentativen FACS-Analysen der drainierenden Lymphknoten, der Milz und des Tumors einer Kontrollmaus und einer PC61-behandelten Maus dargestellt. Bei der Kontrollmaus waren in allen untersuchten Organen $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Zellen in normaler Anzahl von 7,3 bzw. 8,6 % (vgl. 4.1.2) detektierbar. Bei der PC61-behandelten Maus waren die $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ jedoch nur in Lymphknoten und Milz depletiert (0,3 bzw. 0,1 %). Im Tumor der PC61-behandelten Maus waren hingegen vergleichbare Zahlen von Treg (3,2 %) zu finden, wie im Tumor der Kontrollmaus (2,9 %).

In Abb. 4.16 ist zu erkennen, dass der Anteil der $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ in Tumoren von präventiv (einen Tag vor Tumordinokulation) PC61-behandelten Mäusen signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe (13,8 % vs. 24,7 %) war. Die Anzahl der infiltrierenden Treg in den Tumoren der Mäuse, die fünf bzw. zehn Tage nach Tumordinokulation eine PC61-Injektion bekamen, unterschieden sich nicht von denen der Kontrollgruppe (17,8 bzw. 24,0 % vs. 24,7 %).

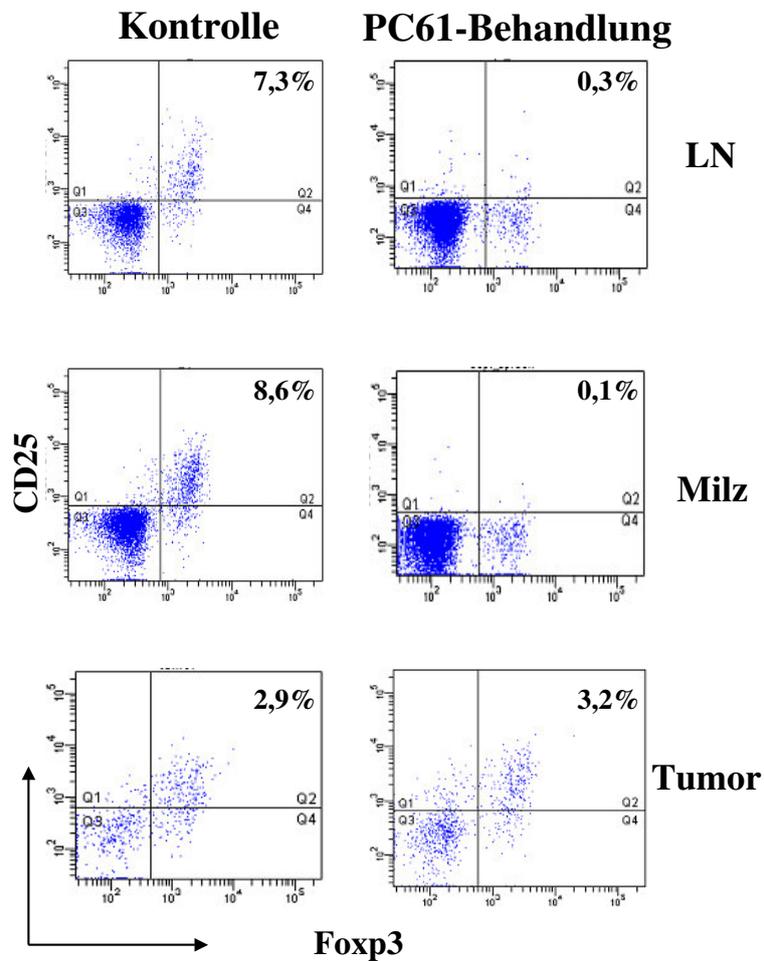


Abb. 4.15: Treg in Lymphknoten, Milzen und Tumoren.

Mäuse wurden einen Tag vor oder fünf bzw. zehn Tage nach der Tumorinokulation durch PC61-Injektion depletiert. Drei bis vier Wochen später wurden die Tumore entnommen und jeweils 5×10^5 aus den Tumoren isolierte Zellen mit je $1 \mu\text{g}$ der Fluorochrom-markierten Antikörper gegen CD4, CD25 und FoxP3 gefärbt. Die Zellen wurden im FACS analysiert. Gezeigt sind nur die eingegrenzten CD4⁺ Zellen.

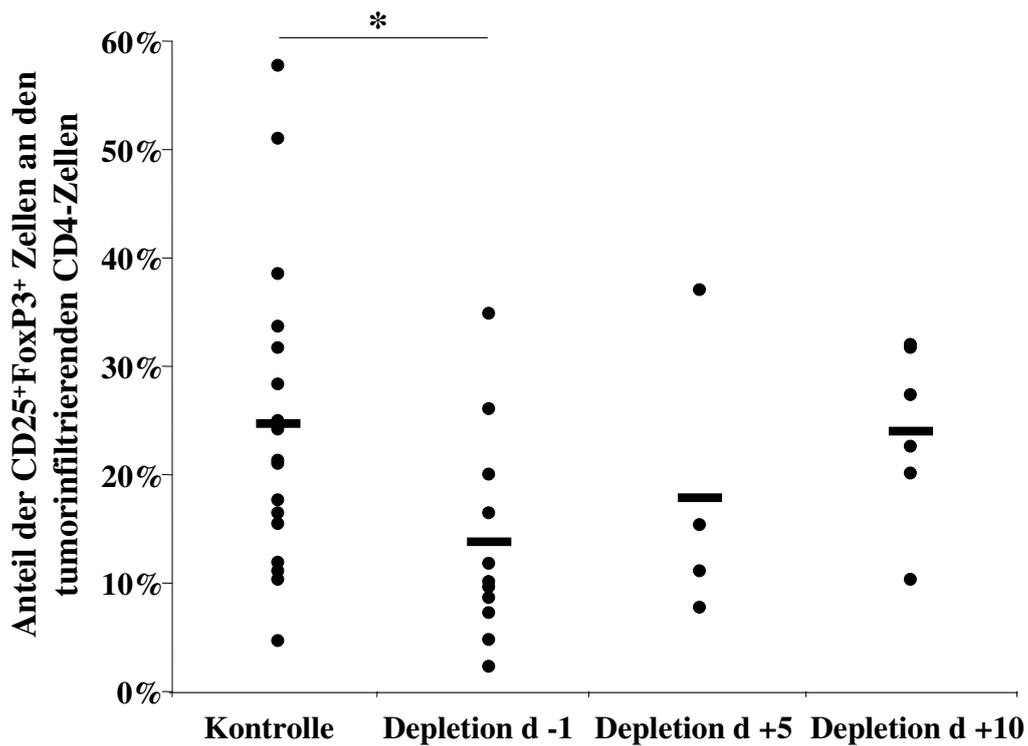


Abb. 4.16: Treg im Tumoringfiltrat nach verschiedenen Depletions-Zeitpunkten.

Jeweils 5×10^5 aus B16-Tumoren isolierte Zellen wurden mit je $1 \mu\text{g}$ der Fluorochrom-markierten Antikörper gegen CD4, CD25 und FoxP3 gefärbt. Die Punkte geben die Werte der $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{FoxP3}^+$ Zellen für die einzelnen Mäuse (Tumore) an, der Balken zeigt die Mittelwerte. Dargestellt sind die Werte von insgesamt 38 Mäusen aus drei unabhängigen Versuchen. Die Signifikanz wurde mittels zweiseitigen homoskedastischen T-Tests mit Microsoft Excel berechnet. * = $p < 0,05$.

Diese Daten zeigen, dass nur die Depletion der regulatorischen T-Zellen vor der Tumoringkulation eine Auswirkung auf die Anzahl dieser Zellen in den B16-Tumoren hat. Eine Depletion, die während des Tumoringwachstums durchgeführt wird bewirkt keine signifikante Reduktion der Treg im Tumor. Anscheinend wird durch Änderung des Zeitpunktes der PC61-Injektion das Infiltrationsmuster signifikant beeinflusst.

An einer Abstoßungsreaktion von B16 Tumoren sind sowohl $CD4^+$ als auch $CD8^+$ T-Zellen beteiligt. Um zu untersuchen, ob durch die Injektion von PC61 zu verschiedenen Zeitpunkten des Tumorwachstums die Infiltration des Tumors durch $CD4^+$ und $CD8^+$ -Zellen verändert wird, wurde der prozentuale Anteil dieser Zellpopulationen im Tumor analysiert.

Dazu wurde einen Tag vor oder fünf bzw. zehn Tage nach der Tumoringokulation PC61 in C57BL/6N Mäuse injiziert. Nach 21 bis 28 Tagen wurden die Tumore entnommen und die infiltrierenden $CD4^+$ bzw. $CD8^+$ Zellen mittels FACS analysiert.

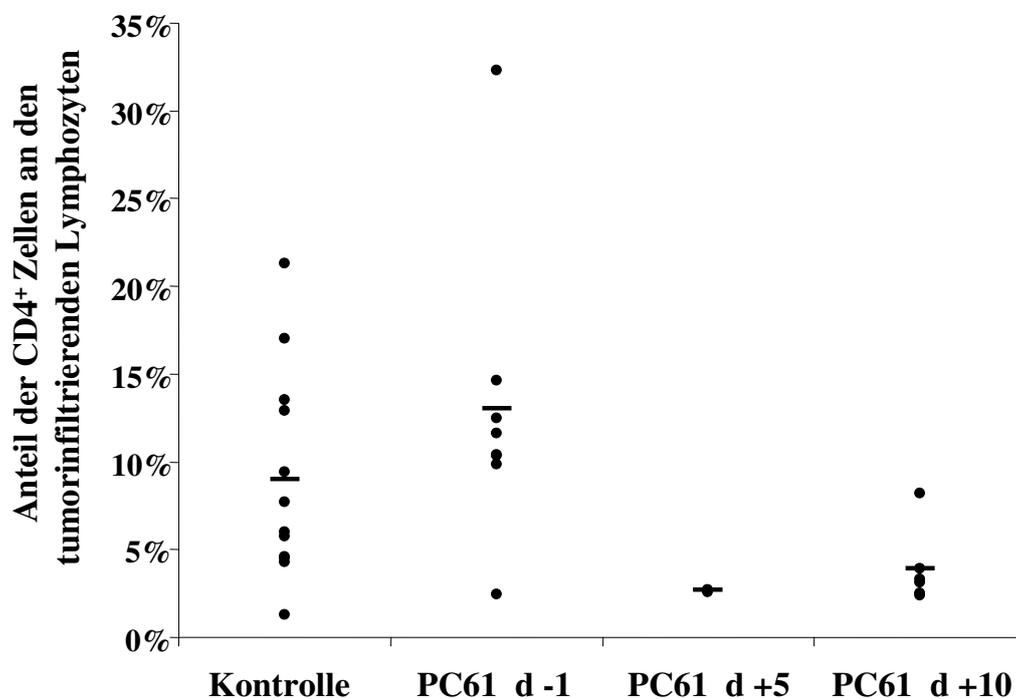


Abb. 4.17: Treg im Tumorinfiltrat nach verschiedenen Depletions-Zeitpunkten.

Jeweils 5×10^5 aus B16-Tumoren isolierte Zellen wurden mit je $1 \mu\text{g}$ der Fluorochrom-markierten Antikörper gegen $CD4$ gefärbt. Die Punkte geben die Werte der $CD4^+$ Zellen für die einzelnen Mäuse (Tumore) an, der Balken zeigt die Mittelwerte. Dargestellt sind die Werte von insgesamt 25 Mäusen aus zwei unabhängigen Versuchen.

Abb. 4.17 zeigt, dass bei den Kontrollmäusen durchschnittlich 9 % der infiltrierenden Lymphozyten $CD4^+$ Zellen waren. Im Tumorinfiltrat der präventiv mit PC61 behandelten Mäuse lag der Anteil mit 13 % geringfügig über dem der Kontrollen. In den Tumoren der fünf bzw.

zehn Tage nach Tumorinokulation mit PC61 behandelten Mäuse waren diese Anteile deutlich reduziert und lagen bei 2,7 % bzw. 3,9 %.

In Abb. 4.18 sind die Anteile der CD8⁺ Zellen im Tumordinfiltrat der wie oben beschrieben mit PC61 behandelten Gruppen dargestellt.

In den Tumoren der Kontrollen handelte es sich bei 3,8 % der infiltrierenden Lymphozyten um CD8⁺ Zellen. Die Tumore der vor der Tumorinokulation mit PC61 behandelten Mäuse enthielten mit durchschnittlich 11,8 % signifikant mehr CD8⁺ Zellen als die Kontrolltumore. Bei den therapeutisch an Tag fünf und zehn mit PC61 behandelten Mäusen lagen diese Werte mit 4,5 % und 6 % in ähnlicher Höhe wie in den Kontrolltumoren.

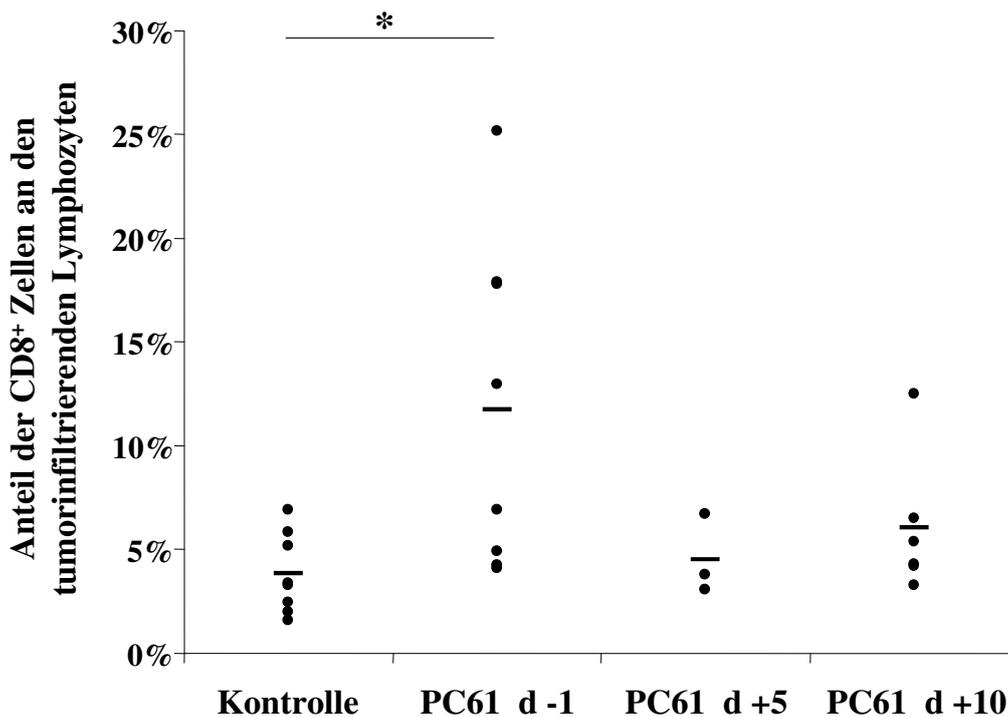


Abb. 4.18: Treg im Tumordinfiltrat nach verschiedenen Depletions-Zeitpunkten.

Jeweils 5×10^5 aus B16-Tumoren isolierte Zellen wurden mit je $1 \mu\text{g}$ der Fluorochrom-markierten Antikörper gegen CD8 gefärbt. Die Punkte geben die Werte der CD8⁺ Zellen für die einzelnen Mäuse (Tumore) an, der Balken zeigt die Mittelwerte. Dargestellt sind die Werte von insgesamt 25 Mäusen aus zwei unabhängigen Versuchen. Die Signifikanz wurde mittels zweiseitigen homoskedastischen T-Tests mit Microsoft Excel berechnet. * = $p < 0,05$.

Diese Daten deutet darauf hin, dass es durch den Einsatz von PC61 lediglich zu geringfügigen Unterschieden im Infiltrationsmuster der CD4⁺ Zellen im allgemeinen kommt.

Im Gegensatz dazu werden die Tumore nach präventivem PC61 Einsatz weniger durch Treg und mehr durch CD8⁺ Zellen infiltriert. Die therapeutische Applikation von PC61 zeigt hingegen im Vergleich mit Tumoren aus unbehandelten Mäusen keine Änderung des Infiltrationsmusters von Treg oder CD8⁺ Zellen. Somit scheint der Zeitpunkt der PC61-Applikation eine entscheidende Rolle für die Infiltration durch Effektorzellen und Treg zu spielen.

4.4 Untersuchung des Einflusses von PC61 auf die Funktion von T-Zellen

Obwohl in 4.2.2 gezeigt wurde, dass in tumortragenden Mäusen nach der Injektion von PC61 aktivierte CD4-Zellen zu finden sind, besteht die Möglichkeit, dass diese CD69⁺ Zellen nicht funktionell sind. Mit der Injektion von PC61 konnte allerdings keine Tumorreduktion erreicht werden. Sie führte im Gegenteil sogar eher zu einem schnelleren Tumorwachstum, besonders wenn gleichzeitig mit Tumorantigen-beladenen DC behandelt wurde. Man könnte daher annehmen, dass durch die Injektion von PC61 nicht ausschließlich Treg depletiert werden, sondern auch CD25⁺ Effektor T-Zellen.

Daher sollte im Folgenden die Funktionalität von Effektor T-Zellen in Anwesenheit von PC61 *in vivo* mit Hilfe des OTII Modells untersucht werden. Auf den CD4⁺ T-Zellen von OTII Mäusen wird ein transgener T-Zell Rezeptor exprimiert, der das MHC Klasse II spezifische OVA-Peptid 323-339 (KISQAVHAAHAEINEAG) erkennt. Durch eine Stimulation mit OVA-beladenen DC wird eine Proliferation der transgenen T-Zellen hervorgerufen. Zusätzlich zum transgenen T-Zell-Rezeptor exprimieren die T-Zellen den Thymozytenmarker Thy-1.1, wodurch sie nach einem adoptiven Transfer in C57BL/6N von den Rezipientenzellen (Thy-1.2) unterschieden werden können.

Mit Hilfe dieses Modells sollte getestet werden, ob aktivierte transgene CD4-Zellen nach Injektion von PC61 in der Lage sind zu proliferieren und Zytokine zu produzieren.

4.4.1 Einfluss von PC61 auf Proliferationsfähigkeit von CD4⁺ T-Zellen

Um die Proliferationsfähigkeit von CD4-Zellen in Anwesenheit von PC61 zu untersuchen, wurden CD4-Zellen aus Lymphknoten und Milzen von OTII-transgenen Thy-1.1⁺ Mäusen isoliert. Die CD4-Zellen wurden mit CFSE gefärbt und i.v. in naive C57BL/6N Mäuse injiziert. Einen Tag später wurden reife mit OVA beladene DC s.c. in diese Mäuse gespritzt. Einer Gruppe von Mäusen wurde zusätzlich PC61 injiziert. Nach drei bis fünf Tagen wurden die Lymphknoten entnommen, Zellsuspensionen hergestellt und mittels FACS analysiert. Dabei konnte anhand des Thymozytenmarkers Thy-1 zwischen endogenen (Thy-1.1⁻) und exogenen (Thy-1.1⁺) T-Zellen unterschieden werden.

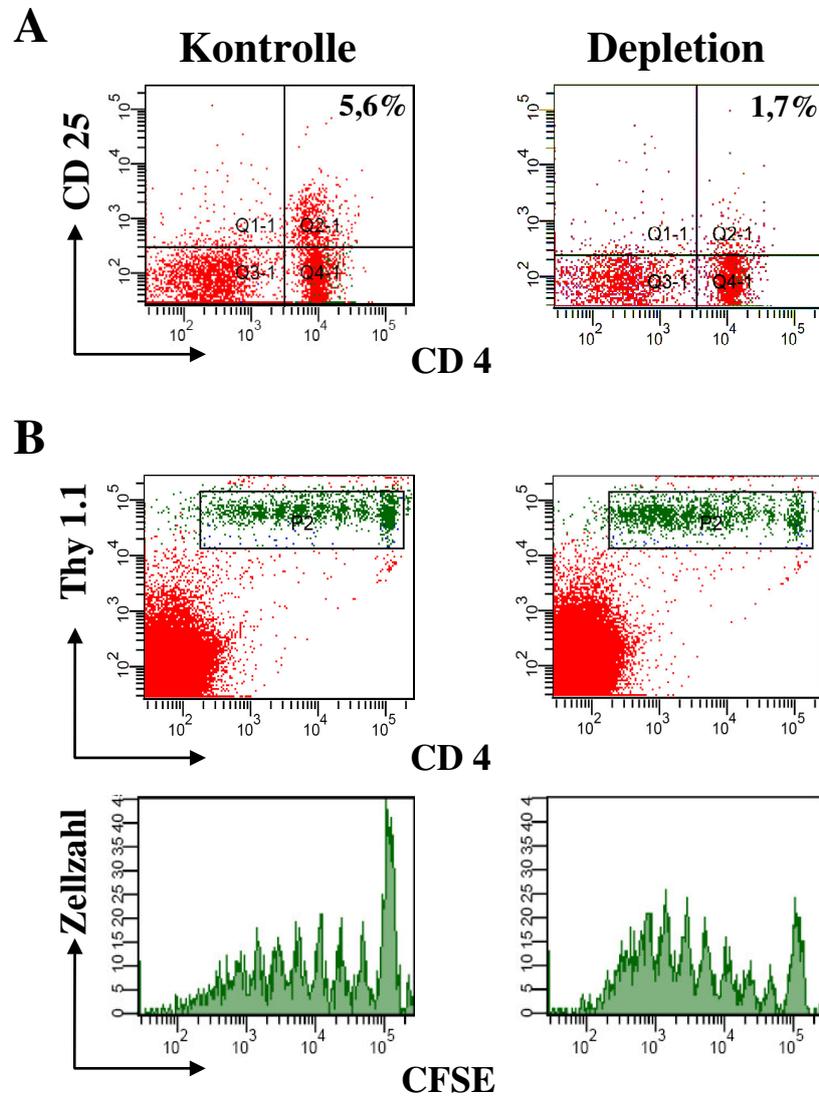


Abb. 4.19: Proliferation von OTII transgenen CD4-Zellen.

CD4-Zellen wurden mittels MACS aus OTII Mäusen isoliert und mit CFSE gefärbt. Anschließend wurden $3-5 \times 10^6$ CFSE⁺ Zellen i.v. in C57BL/6N Mäuse injiziert. Einen Tag später wurden den Mäusen mit OVA beladene DC s.c. injiziert, wobei einer Gruppe von Mäusen zusätzlich PC61 i.p. appliziert wurde. Nach drei bis fünf Tagen wurden die Lymphknoten entnommen und die Proliferation der transgenen T-Zellen mittels FACS analysiert. (A) Vergleich des Anteils der endogenen CD4⁺CD25⁺ Zellen in Kontrollmäusen und PC61-behandelten Mäusen. (B) Vergleich der CFSE-Verdünnung der transgenen T-Zellen in Kontrollmäusen und PC61-behandelten Mäusen.

Anhand der Verdünnung von CFSE wurde die Proliferation detektiert, wobei die höchste CFSE-Konzentration (10^5) Aufschluss über die noch ungeteilten Zellen gab.

Wie in Abb. 4.19 A dargestellt, war die Anzahl der endogenen $CD4^+CD25^+$ in PC61-behandelten Mäusen verglichen mit Kontrollmäusen wie erwartet stark reduziert. In den PC61-behandelten Mäusen konnte eine stärkere Verdünnung von CFSE nachgewiesen werden, was auf eine stärkere Proliferation und somit Aktivierung der transgenen T-Zellen in diesen Mäusen hindeutet.

Zusätzlich wurde der prozentuale Anteil der $CFSE^+$ Zellen bestimmt, der aus den Mäusen der beiden Versuchsgruppen re-isoliert werden konnte. Abbildung 4.20 zeigt, dass der Anteil der aus PC61-behandelten Mäuse isolierten $CFSE^+$ Zellen im Mittel etwas höher war (1,1 %), als der der aus Kontrollmäusen isolierten Zellen (0,7 %).

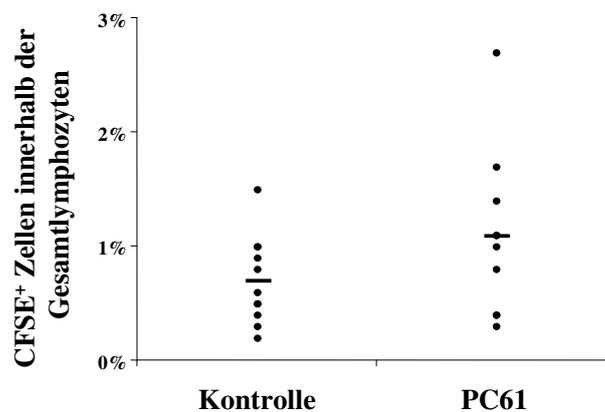


Abb. 4.20: Isolierung von OTII transgenen CD4-Zellen nach adoptivem Transfer.

Nach adoptivem Transfer von $3-5 \times 10^6$ $CFSE^+$ OTII CD4-Zellen in C57BL/6N Mäuse wurde nach *in vivo*-Stimulierung mit DC der prozentuale Anteil der re-isolierten $Thy-1.1^+CFSE^+$ OTII CD4-Zellen aus den Lymphknoten der C57BL/6N Mäuse bestimmt. Dargestellt sind die Werte von insgesamt 18 Mäusen aus drei unabhängigen Versuchen. Die Balken geben die Mittelwerte an.

Dieses Ergebnis zeigt, dass die Anwesenheit von PC61 keine suppressive Wirkung auf die Proliferationsfähigkeit von aktivierten CD4-Zellen ausübt. Vielmehr deutet sich an, dass die Proliferation von OTII-Donorzellen in CD25 depletierten Mäusen wie erwartet verstärkt ist.

4.4.2 Einfluss von PC61 auf Zytokinproduktion von CD4⁺ T-Zellen

Eine weitere wichtige Eigenschaft von T-Zellen ist ihre Fähigkeit Zytokine zu produzieren. Um zu untersuchen, ob T-Zellen nach *in vivo* Aktivierung durch Antigen-beladene DC in PC61-behandelten Mäusen in der Lage sind Zytokine zu produzieren, wurde weiterhin das oben beschriebene transgene (OTII) Modell verwendet. Dazu wurde der intrazelluläre Interleukin-2 (IL-2)-Gehalt in proliferierenden T-Zellen untersucht.

Wie in 4.4.1 beschrieben wurden OTII CD4-Zellen mit CFSE gefärbt und in naive C57BL/6N Mäuse injiziert. Eine Gruppe wurde nicht weiter behandelt (Kontrolle), einer Gruppe wurden OVA-beladene DC injiziert (DC) und einer Gruppe wurden sowohl OVA-beladene DC als auch PC61 injiziert (DC+PC61). Nach drei Tagen wurden die Lymphknoten entnommen und Zellsuspensionen hergestellt. Diese Zellsuspensionen wurden mit 2 ng/ml PMA und 0,4 µg/ml Ionomycin für fünf Stunden restimuliert. Anschließend wurde mittels FACS der intrazelluläre IL-2 Gehalt der CFSE⁺ Zellen ermittelt. Dabei diente die unbehandelte Kontrollgruppe dazu, die unspezifische Produktion von IL-2 zu ermitteln.

In den mit DC bzw. DC und PC61 behandelten Gruppen war der Anteil der CFSE⁺ Zellen die gleichzeitig IL-2⁺ waren relativ hoch (63 % bzw. 63,7 %; Abb. 4.21 A). In den PC61-behandelten Mäusen waren etwas mehr IL-2⁺CFSE⁺ Zellen zu detektieren als in nicht PC61-behandelten Mäusen (34,3 %; 29,2 %). Die Anzahl der IL-2⁺CFSE⁺ Zellen in Mäusen, die nach der Injektion der transgenen Zellen nicht weiter behandelt worden waren (Kontrolle) lag bei 9,3 % (Abb. 4.21 B).

Diese Daten lassen sich dahingehend zusammenfassen, dass die Anwesenheit von PC61 weder auf die Proliferationsfähigkeit von Effektor T-Zellen, noch auf ihre Fähigkeit Zytokine zu produzieren einen negativen Einfluss hat. Eine Depletion der Treg durch PC61 bewirkte sogar eine geringfügige Verbesserung der Proliferation und IL-2-Produktion.

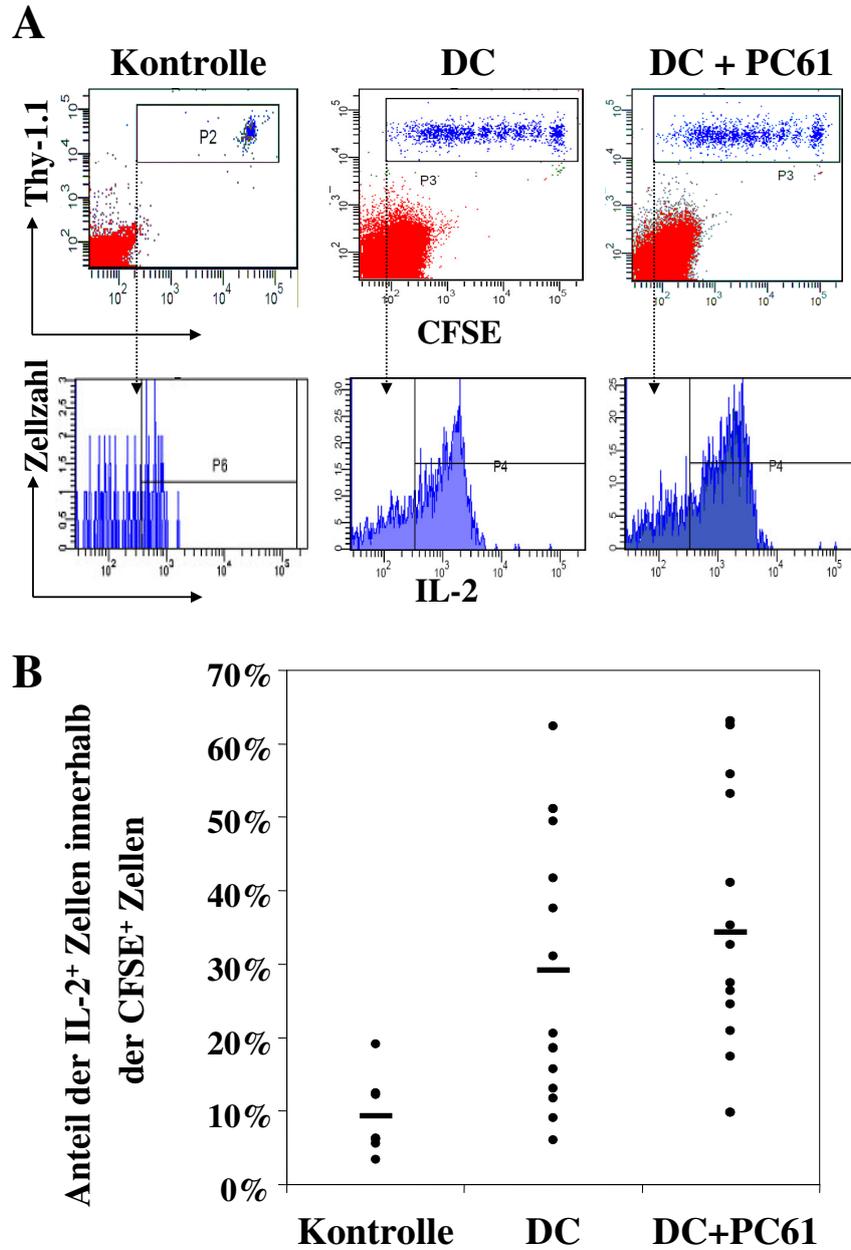


Abb. 4.21: Interleukin-2-Produktion von OTII transgenen CD4-Zellen.

CD4-Zellen wurden mittels MACS aus OTII Mäusen isoliert und mit CFSE gefärbt. Anschließend wurden $3-5 \times 10^6$ CFSE⁺ Zellen i.v. in C57BL/6N Mäuse injiziert. Kontrolle: keine weitere Behandlung; DC: Injektion von OVA-beladenen DC; DC+PC61: Injektion von OVA-beladenen DC und PC61.

Nach drei bis fünf Tagen wurden die Lymphknoten entnommen und die Proliferation der transgenen T-Zellen mittels FACS analysiert. (A) Beispiel für den Vergleich des Anteils der IL-2⁺CFSE⁺ Zellen in Mäusen, denen nur OVA-beladene DC injiziert und Mäusen, denen OVA-beladene DC und PC61 injiziert worden waren. (B) Anteil der IL-2⁺CFSE⁺ Zellen in Kontrollmäusen, DC-injizierten und DC+PC61 injizierten Mäusen. Dargestellt sind die Werte von insgesamt 39 Mäusen aus vier unabhängigen Versuchen. Die Balken geben die Mittelwerte an.

4.5 Migrationsverhalten von $CD4^+$ und $CD4^+CD25^+$ Zellen in tumortragenden Mäusen

In den vorangegangenen Abschnitten wurde gezeigt, dass eine $CD25$ -Depletion in B16-tragenden Mäusen keine Verzögerung des Tumorwachstums zur Folge hatte. Im Gegenteil bewirkte die Treg-Depletion in Kombination mit Injektionen von mit Tumorlysat beladenen DC eine Beschleunigung des B16-Wachstums. Es konnte gezeigt werden, dass diese Wirkung nicht auf eine gleichzeitige Depletion von aktivierten Effektor T-Zellen zurückzuführen ist. Eine Analyse der Infiltration der B16 Tumore durch regulatorische T-Zellen ergab, dass die Treg-Depletion keine Wirkung auf den Anteil der im Tumor zu detektierenden Treg hatte. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob B16 Tumore in der Lage sind Treg aktiv zu rekrutieren bzw. konventionelle T-Zellen in Treg zu konvertieren.

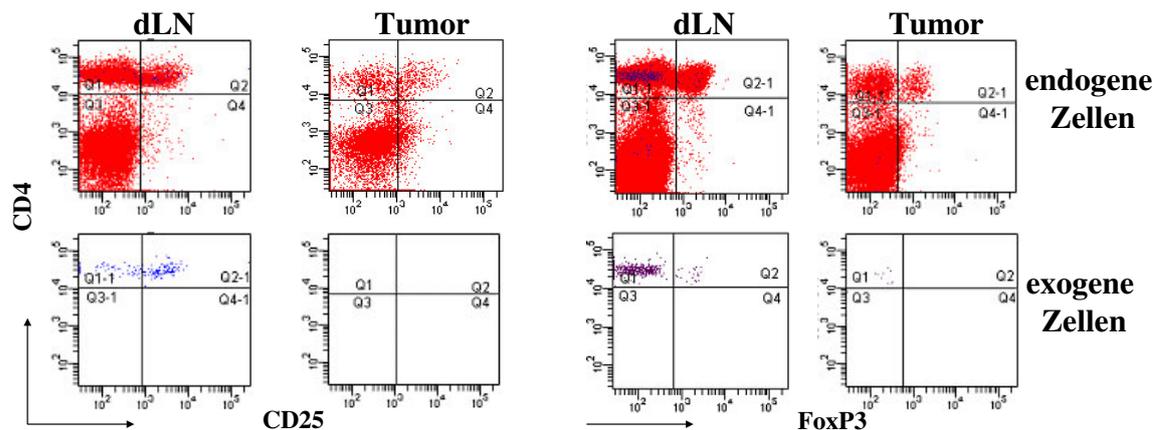


Abb. 4.22: Isolierung von $PKH-PE^+$ Zellen aus tumortragenden Mäusen nach adoptivem Transfer.

$CD4^+CD25^+$ Zellen wurden mit $PKH-PE$ gefärbt. $1-2 \times 10^6$ gefärbte Zellen wurden entweder einen Tag vor der Tumorinokulation oder fünf bis zehn Tage danach i.v. in tumortragende Mäuse injiziert. Nach vier bis fünf Tagen wurden die Lymphknoten, die Milz und der Tumor entnommen und Zellsuspensionen hergestellt. Mittels FACS-Analyse wurde der Anteil der $PKH-PE^+CD25^+$ Zellen innerhalb der $CD4$ -Zellen quantifiziert.

Zu diesem Zweck wurden $PKH-PE$ - oder $CFSE$ -gefärbte $CD4^+CD25^+$ oder $CD4^+CD25^-$ Zellen in tumortragende Mäuse injiziert. Nach ein bis sieben Tagen wurden die tumordrainierenden Lymphknoten (dLN), die nicht-drainierenden Lymphknoten (ndLN), die Milz und

der Tumor entnommen und Zellsuspensionen hergestellt. Mittels FACS wurde untersucht, in welchen Organen die gefärbten injizierten (exogenen) Zellen zu finden waren.

In vier voneinander unabhängigen Versuchen wurden die gefärbten CD4-Zellen entweder vor der Tumorinokulation oder zu verschiedenen Zeitpunkten während des Tumorwachstums injiziert. Es wurden sowohl aus naiven als auch aus B16-tragenden Mäusen isolierte Zellen verwendet. Überraschenderweise wurden die vor der Tumorinokulation injizierten Treg (CD4⁺CD25⁺) nicht in den Tumoren gefunden. Von den nach der Tumorinokulation injizierten Treg wurden nur 0,016 % in den Tumoren detektiert (Abb.4.23). Trotzdem wurden jeweils große Mengen an endogenen CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ in den Tumoren nachgewiesen (Abb.4.22).

Unabhängig vom Zeitpunkt der Injektion konnten die exogenen Treg in Lymphknoten und Milzen in vergleichbarer Menge wie in unbehandelten Kontrollmäusen gefunden werden. Entgegen der Erwartung, ließ sich dabei kein verstärktes „homing“ der Treg in drainierende Lymphknoten feststellen. Im Gegenteil wurde kein deutlicher Unterschied zwischen der Menge der exogenen Treg in drainierenden und nicht-drainierenden Lymphknoten oder Lymphknoten aus unbehandelten Kontrollmäusen beobachtet.

Auch die exogenen CD4⁺CD25⁻ T-Zellen wurden nur in äußerst geringer Anzahl im Tumor detektiert. Auch in diesem Fall konnten große Mengen endogener Treg (CD4⁺FoxP3⁺) im Tumor nachgewiesen werden (Abb.4.23, rechts).

Diese Daten deuten insgesamt darauf hin, dass der B16-Tumor eine Barriere schafft, die exogen zugeführte Zellen aber auch Proteine (mAk PC61) nicht durchdringen können.

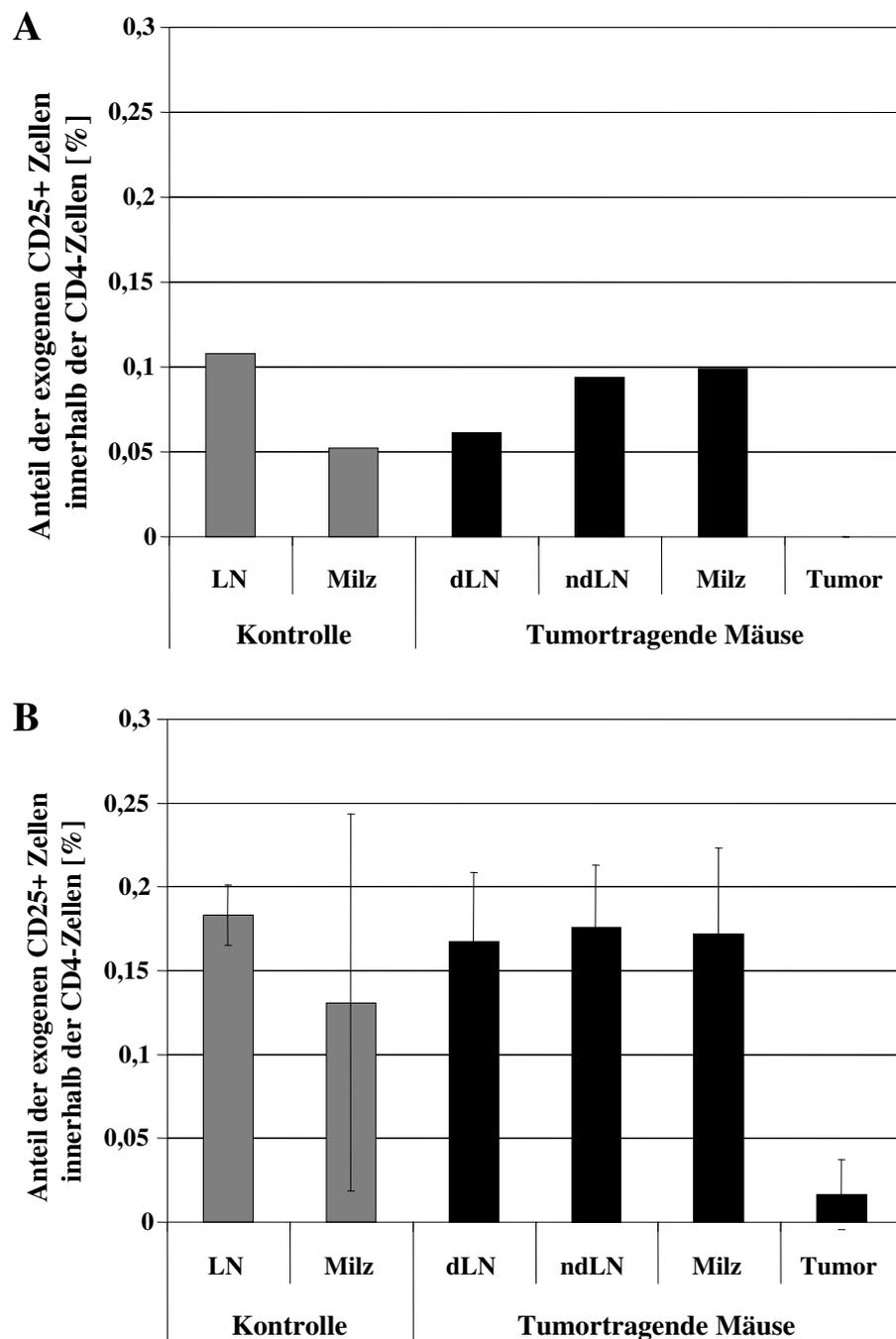


Abb. 4.23: Prozentualer Anteil von exogenen PKH-PE⁺ Zellen in Lymphknoten, Milz und Tumoren.

CD4⁺CD25⁺ Zellen wurden mit PKH-PE gefärbt. $1-2 \times 10^6$ gefärbte Zellen wurden entweder einen Tag vor der Tumorinokulation (A) oder fünf Tage danach (B) i.v. in tumortragende Mäusen injiziert. Nach vier bis fünf Tagen wurden die drainierenden-, nicht-drainierenden Lymphknoten, die Milz und der Tumor entnommen und Zellsuspensionen hergestellt. Mittels FACS-Analyse wurde der Anteil der PKH-PE⁺CD25⁺ Zellen innerhalb der CD4-Zellen quantifiziert. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung; A: n=2; B: n=4.

5 Diskussion

Die heute angewendeten Therapien gegen das maligne Melanom sind insgesamt langfristig nicht erfolgreich. Chirurgische Entfernung des Primärtumors ist die einzig wirkungsvolle Behandlungsmethode, wobei eine Rekurrenz wahrscheinlicher wird, je weiter das Tumorstadium zum Zeitpunkt der Exzision fortgeschritten ist. Dieser Sachverhalt begründet sich dadurch, dass durch den Tumor immunsuppressive Mechanismen induziert werden, die möglicherweise Immunantworten inhibieren können.

Vakzinierungs-Experimente in Mäusen belegen eindeutig, dass durch präventive Depletion von regulatorischen T-Zellen der Schutz vor Tumoren erheblich gesteigert wird. Klinisch ist diese Art der Tumorbehandlung allerdings nicht umzusetzen, da Tumore spontan auftreten, eine präventive Treg-Depletion aber unweigerlich zu Autoimmunkrankheiten führen würde. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden inwieweit die Depletion von Treg als therapeutische Maßnahme angewendet werden kann.

5.1 Treg-Depletion als therapeutische Maßnahme gegen das B16-Melanom

Bevor die Depletion von Treg in tumortragenden Mäusen angewendet wurde, war es zunächst notwendig zu untersuchen, wie effektiv der mAk PC61 Treg *in vivo* depletiert. Nach einmaliger Injektion des mAk war nach zwei Tagen der Anteil der CD4⁺CD25⁺ Zellen um 81 % bis 95 % reduziert (Abb. 4.2). Die geringfügige Zunahme der CD4⁺FoxP3⁺ Zellen, die kein CD25 exprimieren (Abb. 4.3) lässt sich dadurch erklären, dass vermutlich ein kleiner Anteil der Treg die CD25-Expression herunter reguliert [92, 93]. In verschiedenen Publikationen wurde diskutiert, ob die Injektion von PC61 zur Komplement-vermittelten Entfernung der Treg oder zur Herabregulierung von CD25 auf der Oberfläche der Treg führt [77, 78, 79, 80]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Gesamtzahl der FoxP3⁺ Zellen in Lymphknoten und Milzen

durch eine Injektion von PC61 stark reduziert. Gleichzeitig war die Anzahl der $CD4^+FoxP3^+$ Zellen, die kein CD25 exprimierten, in diesen Mäusen nur geringfügig höher, als in unbehandelten Kontrollmäusen (Abb. 4.3). Daraus lässt sich schließen, dass die Depletion der Treg durch PC61 vermutlich über Komplement-vermittelte Entfernung und nicht über Inaktivierung der Zellen verläuft.

Der mAk PC61 ist 15 bis 20 Tage im Blut der Mäuse nachweisbar [82]. Diese Zeit korreliert mit der Abwesenheit der $CD4^+CD25^+$ Zellen in den peripheren lymphoiden Organen. Etwa drei Wochen nach der Applikation von PC61 sind wieder normale Anzahlen an Treg in Lymphknoten und Milz nachweisbar (Daten nicht gezeigt, [82, 68]).

Die Verteilung der Lymphozyten in Blut, Lymphknoten und Milz änderte sich durch PC61 Applikation nicht (Tab. 4.1). Die Vitalität und Zusammensetzung der Lymphozyten wird durch die Anwesenheit von PC61 ebenfalls nicht verändert. Die Untersuchung des Aktivierungszustandes der $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen in PC61-behandelten Mäusen ergab keine Änderung der Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD69 (Abb. 4.4). Auch DC und Makrophagen in PC61-behandelten Mäusen zeigten keine deutlichen Unterschiede in der Expression der Aktivierungsmarker MHC Klasse II und CD86 (Abb. 4.5). Die Ergebnisse zeigen, dass die Injektion von PC61 keine Aktivierung und keine Inhibierung von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen bewirkt. DC und Makrophagen blieben ebenfalls unbeeinflusst.

Im experimentellen Mausmodell bewirkt eine, der Tumorinokulation vorangehende, Injektion von PC61 eine deutliche Inhibierung des Tumorwachstums (Abb. 4.7). Diese Wirkung wurde in der Literatur bereits für das B16-Melanom, aber auch für verschiedene andere Tumorarten beschrieben [81, 82, 94, 74, 97].

Fünf oder zehn Tage nach der Tumorinokulation ist eine Depletion der Treg durch PC61 hingegen nicht mehr wirksam bzw. sogar kontraproduktiv, denn durch Injektion von PC61 zu diesen Zeitpunkten wuchsen die Tumore sogar schneller, als Tumore in unbehandelten Mäusen (Abb. 4.7). Dieses Ergebnis konnte bereits in anderen murinen Tumormodellen beobachtet werden. In einer Studie zu einem Fibrosarkom-Modell konnte gezeigt werden, dass eine Applikation von PC61 zum Zeitpunkt der Tumorinokulation nicht mehr wirksam gegen das Tumorwachstum ist [95]. Bei Untersuchungen von Modellen für Leukämie, Myelomen und Sarkomen stellte sich heraus, dass an Tag 2 nach der Tumorinokulation eine Injektion

von PC61 keine schützende Wirkung mehr zeigt [91]. Diese Befunde bestätigen, dass die inhibierende Wirkung der Treg-Depletion mittels PC61 auf das Tumorstadium stark vom Zeitpunkt der Applikation abhängig ist. Ko *et al.* führen die Umkehr des protektiven Effektes einer PC61-Injektion bei fortgeschrittenem Tumorstadium darauf zurück, dass dieser mAk nicht ausschließlich Treg sondern auch CD25⁺ aktivierte Effektor T-Zellen depletiert [95]. Diese Hypothese wurde in einem *delayed-type hypersensitivity* (DTH)-Modell bestätigt [98]. In der vorliegenden Arbeit konnte dieses Ergebnis jedoch nicht bekräftigt werden.

Neben CD25 gilt CD69 als früher Aktivierungsmarker für T-Zellen. Die Untersuchung von CD4⁺ T-Zellen in tumortragenden Mäusen zeigte, dass in PC61-behandelten Mäusen zwar die CD4⁺CD25⁺ T-Zellen depletiert waren, jedoch vergleichbare Anzahlen von CD4⁺CD69⁺ Zellen gefunden wurden, wie in unbehandelten Mäusen (Abb. 4.8). Dieser Befund widerspricht der Annahme der gleichzeitigen Depletion von aktivierten Effektor T-Zellen durch PC61.

In den von Ko *et al.* und Lahl *et al.* durchgeführten Studien wurden Antikörper-Konzentrationen von 500 μg pro Maus verwendet, während in der vorliegenden Arbeit je 300 μg appliziert wurden. Vermutlich entscheidet die eingesetzte Konzentration des mAk über die potentielle Depletion von Effektor T-Zellen.

Die Depletion von Treg mittels PC61 wird jedoch eher selten als einzige Methode der Tumorstadiumprävention angewendet. Weitaus häufiger wird sie in Kombination mit anderen Vakzinierungsstrategien beschrieben. So wurde wiederholt berichtet, dass die PC61-vermittelte Depletion von Treg erfolgreich zur Verbesserung von Vakzinierungen gegen Tumore eingesetzt werden kann [76, 83]. Diese Vakzinierungen können einerseits durch Injektion von lethal bestrahlten Tumorzellen oder tumorspezifischen Peptiden, andererseits durch die Injektion von mit Tumorantigen-beladenen DC erfolgen [99, 63]. Dabei gilt die Injektion von DC als beste Methode der Antigengabe bei Vakzinierungen [65, 66, 67].

In tumortragenden Mäusen zeigte sich weder durch therapeutische Applikation von PC61 (s.o.) noch durch therapeutische Injektionen von Tumorantigen-beladenen DC eine Wirkung auf das Wachstum von B16-Tumoren. Die Kombination aus PC61- und DC-Applikation hatte jedoch zur Folge, dass die Tumore schneller wuchsen (Abb. 4.10). Diese Beobachtung

führte zu der Frage, warum die Kombination dieser beiden Methoden das Tumorwachstum beschleunigt. Eine Möglichkeit wäre, dass die Methode zur Beladung der DC und damit die anschließende Präsentation der Tumorantigene nicht effektiv genug war, um die Generierung und Aktivierung von tumorspezifischen Effektor T-Zellen zu bewirken. An dieser Stelle sei jedoch angemerkt, dass im Labor in dem die Versuche im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden in Vorversuchen gezeigt werden konnte, dass die präventive Injektion von mit Tumorlysat-gepulsten DC, die auf die gleiche Weise wie hier beschrieben beladen und gereift wurden, zu verbesserter Immunität gegenüber dem B16-Melanom in den so behandelten Mäusen führte. In Mäusen mit bereits etablierten Tumoren können die T-Zellen jedoch durch den Tumor anerg sein und somit nicht mehr in der Lage durch die DC aktiviert zu werden [100, 101].

Es gibt verschiedene Wege, die Präsentation von Antigenen in DC hervorzurufen. Dabei spielt die Art des Antigens eine wichtige Rolle, denn davon hängt ab, welcher Weg der Prozessierung und damit auch der Präsentation in der DC eingeschlagen wird. Werden DC mit RNA oder DNA transfiziert, wird daraufhin das codierte Antigen in der DC exprimiert, durch das Proteasom abgebaut und auf MHC Klasse I präsentiert. Bei der Beladung der DC mit Peptiden oder Tumorlysat werden die Antigene durch Endozytose aufgenommen, endosomal prozessiert und über MHC Klasse II präsentiert.

Es gibt widersprüchliche Berichte darüber, welche Methode der Antigenbeladung effektiver zur Aktivierung von tumorspezifischen Immunreaktionen durch T-Zellen ist. Maksimow *et al.* konnten zeigen, dass eine Beladung von DC mittels DNA zu Immunität gegenüber eines Lymphoms führte. Durch eine Modifikation des Antigens konnte erreicht werden, dass es hauptsächlich über den endosomalen Weg prozessiert wurde. Dadurch kam es jedoch zum Verlust der Immunität gegenüber dem Tumor, bedingt durch eine Aktivierung von spezifischen Treg. Die Aktivierung dieser Zellen ging nicht mit ihrer Expansion einher und durch eine vorhergehende Depletion der Treg konnte die DC-vermittelte Immunität wieder hergestellt werden [102]. In dieser Studie war die Präsentation des Antigens über MHC Klasse I effektiver in der Aktivierung von Effektor T-Zellen gegen den Tumor, wohingegen die Modifikation zur Präsentation über MHC Klasse II zur Aktivierung von spezifischen Treg führte. Für das B16-Modell gibt es Berichte die nahe legen, dass auch bei der Vakzinierung gegen diesen Tumor eine Präsentation über MHC Klasse I zu einer besseren Tumorabstoßung führt.

Die Injektion von DC, die mit dem Melanom-spezifischen Peptid TRP-2 transduziert worden waren, schützten 58 % der mit Tumorzellen inokulierten Mäuse vor einem Tumorwachstum. Wurden die DC nicht transduziert, sondern mit dem Peptid gepulst konnte lediglich in 35 % der Tiere ein Tumorwachstum verhindert werden [103]. Auch Steitz *et al.* zeigten, dass durch die Verwendung von mit TRP-2 transduzierten DC eine stärkere Aktivierung von tumorspezifischen T-Zellen erreicht wurde, als durch die Applikation von mit TRP-2 Peptid gepulsten DC [104]. Diese Berichte zeigen, dass die Präsentation über MHC Klasse I meist effektiver für die Induktion von tumorreaktiven T-Zellen ist. Die in dieser Arbeit vorliegenden Daten unterstützen diesen Befund. Durch die Beladung mit Tumorlysat wurden die Tumorantigene über den weniger effektiven endosomalen Weg prozessiert und durch MHC Klasse II präsentiert. Dadurch war die Aktivierung von tumorspezifischen T-Zellen nicht ausreichend für eine effektive gegen den Tumor gerichtete Immunantwort (Abb. 4.10).

Zur Aktivierung von T-Zellen ist, neben der Präsentation von Peptiden durch den MHC, die Expression von kostimulatorischen Molekülen auf der Oberfläche der DC unerlässlich. Ohne ausreichende Kostimulation kommt es zu Anergie in T-Zellen und somit zum Verlust einer Immunantwort durch diese Zellen. In verschiedenen Studien zeigte sich, dass neben den klassischen kostimulatorischen Molekülen B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) die Expression von OX40L eine verstärkte Tumorreaktion hervorrufen kann. Da bekannt ist, dass Treg über die Bindung von OX40 an OX40L in ihrer Funktion gehemmt werden, ist die Verwendung von OX40L bei der Vakzinierung gegen Tumore ein viel versprechender Ansatz [86, 32, 87].

In der Tat konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von B16-Tumoren durch intratumorale Injektion von OX40L-exprimierenden DC ein verlangsamtes Tumorwachstum zur Folge hatte. Diese Wirkung wurde durch Aktivierung von tumorspezifischen CD4⁺ T-Zellen erreicht [105].

In einer anderen Studie wurden DC verwendet, die gleichzeitig mit mRNA für TRP-2 und OX40L transfiziert worden waren. Nach therapeutischer Injektion dieser DC (Tag 3 nach Tumorinokulation) blieben B16-tragende Mäuse zu 40 % tumorfrei. Dabei handelte es sich um einen durch CD4⁺ T-Zellen vermittelten Effekt. Diese T-Zellen exprimierten CD69 und produzierten IL-2 und IFN- γ . Die CD8⁺ T-Zellen zeigten hingegen keine Verstärkung ihrer zytotoxischen Aktivität [88].

Diese Ergebnisse verdeutlichen nochmals, dass viele Faktoren für die Beladung und Stimulierung von DC wichtig sind, um eine spätere effektive Aktivierung von T-Zellen gewährleisten zu können.

Neben der Art der Antigengabe spielen auch die Menge an verwendetem Antigen und die Effektivität des Reifestimulus eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von spezifischen T-Zellen. Eine hohe Expression von Peptid:MHC-Komplexen auf den DC kann zur Einleitung des induzierten Zelltodes (*activation-induced cell death* - AICD) von T-Zellen mit hoher Avidität für das präsentierte Antigen führen [106].

Die in der vorliegenden Arbeit für die Behandlung des B16-Melanoms verwendeten DC zeigten eine relativ starke Expression von MHC Klasse II und CD86 (Abb. 4.9). Da durch Injektionen dieser DC das Tumorstadium nicht verlangsamt werden konnte wäre es denkbar, dass diese DC tatsächlich zur Induktion von AICD führten (Abb. 4.10). Dies könnte in der Abwesenheit von Treg sogar verstärkt der Fall sein. In der Literatur gibt es hierzu jedoch keine Beobachtungen.

Darüber hinaus muss in Betracht gezogen werden, dass s.c. injizierte DC nicht direkt am Ort der Injektion wirken. Sie wandern zunächst in den drainierenden Lymphknoten, wo sie durch CD4⁺ T-Zellen aktiviert werden. Daraufhin exprimieren die DC OX40L und 4-1BBL, durch die eine Kostimulation und Aktivierung von CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen erfolgt [107]. Dieser „Umweg“ könnte bei einem schon bestehenden Tumor dazu führen, dass die Aktivierung von tumorspezifischen T-Zellen zu spät erfolgt. Durch eine zu schwache Aktivierung von Immunantworten kommt es dann wiederum zur Selektion von Tumorzellen, die die zur Immunisierung verwendeten Antigene nicht mehr präsentieren.

Insgesamt tragen sowohl die Art der Antigenbeladung, das Antigen und der Reifungsreifestimulus sowie die Art der Applikation zur Effektivität von DC-Vakzinen bei.

Viele Tumore, besonders B16 exprimieren lediglich schwache Selbstantigene, was eine Behandlung schwierig macht. Methoden zur Optimierung von DC-Vakzinen können daher hilfreich für die Verbesserung von Tumortherapien sein.

5.2 Infiltration des Tumors durch Lymphozyten

Die Abstoßung von Tumoren ist direkt abhängig davon, durch welche Zellen der Tumor infiltriert wird. Effektor T-Zellen und NK-Zellen sind meistens an einer Abstoßungsreaktion beteiligt. Dagegen geht eine verstärkte Infiltration durch suppressive Zellen, wie z.B. Treg mit einer schlechten Prognose einher. Um zu erfahren, welche Zellen an der Abstoßung beteiligt sind und welche Zellen sie verhindern, hilft beispielsweise eine Analyse des Infiltrationsmusters von Lymphozyten in den Tumor.

B16-Tumore werden nur sehr geringfügig von Lymphozyten infiltriert. Innerhalb dieses Infiltrates findet man hauptsächlich Makrophagen, $CD4^+$ T-Zellen und NK-Zellen und $CD8^+$ T-Zellen (Abb. 4.13).

Entgegen anderen Berichten [47, 108] konnte in der vorliegenden Arbeit keine erhöhte Anzahl an $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Zellen in den drainierenden Lymphknoten verglichen mit den nicht-drainierenden Lymphknoten oder mit den Lymphknoten von naiven Mäusen festgestellt werden (Abb. 4.8, 4.14). Vermutlich finden jedoch die entscheidenden Reaktionen im Tumor selbst und nicht in den Lymphknoten statt. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der Fokus auf die tumorassoziierten Treg gelegt.

5.2.1 Effektivität der Treg-Depletion in tumortragenden Mäusen

Die Depletion von Treg während der Tumorentwicklung führt zum Verlust ihrer in der präventiven Anwendung beobachteten inhibierenden Wirkung auf das Tumorstadium. Verschiedene Berichte deuten darauf hin, dass der Zeitpunkt der Treg-Depletion entscheidend für den Behandlungserfolg ist [95, 91]. Diese Beobachtungen führten zu der Frage, inwiefern die Verteilung der tumorinfiltrierenden Treg und konventionellen T-Zellen durch den Zeitpunkt der Injektion von PC61 verändert wird.

In den Tumoren von präventiv mit PC61 behandelten Mäusen nahm die Anzahl der tumorinfiltrierenden $CD4^+$ T-Zellen durch eine präventive Injektion von PC61 nur geringfügig zu, wohingegen die Depletion von Treg während des Tumorstadiums zu einer Verringerung der $CD4^+$ T-Zellen im Tumor führte (Abb. 4.17).

In präventiv mit PC61 behandelten Mäusen findet man jedoch signifikant weniger Treg und signifikant mehr $CD8^+$ T-Zellen im Tumordinfiltrat als in unbehandelten Mäusen. Im Gegen-

satz dazu war die Menge der Treg und der CD8⁺ T-Zellen in unbehandelten Kontrollen oder therapeutisch mit PC61 behandelten Mäusen miteinander vergleichbar (Abb. 4.16, 4.18).

Ähnliche Beobachtungen wurden bereits in anderen murinen Tumormodellen gemacht. Beispielsweise konnte in 3'-methylcholanthrene-induzierten Tumoren gezeigt werden, dass eine präventive Depletion der Treg eine erhöhte Infiltration der Tumore mit CD8⁺ T-Zellen zur Folge hat, wodurch es zur Abstoßung des Tumors kommt [75].

In einem murinen Mammakarzinom-Modell wurde ebenfalls nachgewiesen, dass eine der Tumorerinokulation vorausgehende Depletion der Treg zur Infiltration von aktivierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen führt, die eine Tumoralstoßungsreaktion nach sich zieht [108].

Durch die Depletion der gesamten CD4⁺ T-Zellen konnte in einem murinen Fibrosarkom-Modell (Ag104) erreicht werden, dass mehr aktivierte CD8⁺ T-Zellen in den Tumor einwanderten. In diesem Modell war die Depletion der CD4⁺ T-Zellen sogar therapeutisch wirksam [73].

Insgesamt sprechen diese Daten dafür, dass die Tumoralstoßung hauptsächlich durch CD8⁺ T-Zellen vermittelt wird. Um eine erhöhte Infiltration des Tumors durch diese Zellen zu erreichen scheint allerdings in den meisten Fällen nur die präventive Behandlung durch Treg-Depletion zu wirken. Zu späteren Zeitpunkten kann das immunsuppressive Milieu des Tumors durch eine Depletion der Treg nicht mehr verändert werden.

Diese Befunde deuten darauf hin, dass der Zeitpunkt zu dem die Depletion der Treg durchgeführt wird entscheidend für den weiteren Verlauf des Tumorwachstums ist. Außerdem kann ebenfalls die Art der Antikörper-Applikation eine Rolle spielen. Während die Anzahl der Treg im Blut und den Lymphknoten nach der Injektion von PC61 sinkt, verändert sie sich im Tumor nicht. Ob dies an einer schlechten Penetration des mAk in den Tumor oder an einer schnellen Konversion von Effektor T-Zellen in neue Treg liegt ist unklar.

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob eine Depletion der Treg mittels systemischer mAk-Applikation die empfehlenswerteste Methode ist, um eine tumorspezifische T-Zell Antwort zu unterstützen.

Nair et al. berichteten über eine andere Art der Treg Depletion. Dabei wurde durch Injektion von DC, die mit Foxp3 mRNA transfiziert waren, eine spezifische Depletion von Treg durch CTL induziert. Dabei zeigte ein Vergleich mit PC61-vermittelter Treg-Depletion, dass die

Foxp3-DC-Vakzinierung selektiv tumorassoziierte Treg depletiert, jedoch nicht die Treg in der Peripherie [92].

Interessanterweise ließ sich nach einer direkten Injektion des mAk PC61 in die Tumore keine Verzögerung des Wachstums beobachten (Daten nicht gezeigt). Auch im Tumordinfiltrat waren die CD25⁺FoxP3⁺ Zellen nicht reduziert.

Die gezielte Depletion der tumorassoziierten Treg mit Hilfe von an palmyliertes Protein A gebundenem FasL konnte in einem Lymphom-Modell erfolgreich angewendet werden [109]. Es wäre sinnvoll zu untersuchen, ob der mAk PC61 durch die Kopplung an palmyliertes Protein A seine Wirkung ebenfalls gezielt im Tumor ausüben könnte.

Eine Alternative zur Depletion wäre die Inhibierung der suppressiven Funktion der Treg z.B. über das OX40-Molekül. Die Bindung dieses Moleküls an seinen Liganden (OX40L) bewirkt in konventionellen CD4⁺ T-Zellen eine Aktivierung, in Treg hingegen bewirkt sie eine Aufhebung ihrer suppressiven Funktion *in vitro* und *in vivo* [32]. Wie bereits erwähnt, konnte durch OX40L-exprimierende DC eine verstärkte Tumorreaktion hervorgerufen werden [105, 88].

Erst kürzlich wurde beschrieben, dass auf Treg CD39 (nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1) exprimiert wird. Dabei handelt es sich um ein Ektoenzym das in der Lage ist ATP zu AMP und letztlich zu Adenosin zu degradieren. Konventionelle T-Zellen exprimieren den Adenosinrezeptor A2A und können durch die Bindung von Adenosin an diesen Rezeptor inhibiert werden [110, 111]. Durch die Inaktivierung dieser Adenosinrezeptoren beispielsweise mittels eines Agonisten kann die inhibierende Wirkung des durch Treg generierten Adenosins blockiert werden. Ob diese Methode allerdings als therapeutische Maßnahme in Tumormodellen geeignet ist muss erst getestet werden.

Der von Shimizu *et al.* beschriebene mAk DTA-1, erkennt GITR (Glucocorticoid-Induced TNF Receptor Family Related Protein), das wie CD25 hauptsächlich von Treg exprimiert wird. DTA-1 bindet an GITR und verhindert *in vitro* und *in vivo* die durch Treg vermittelte Suppression von konventionellen T-Zellen. Dabei werden die Treg nicht depletiert, sondern es kommt zu einer gesteigerten Aktivierung der Effektor T-Zellen, da GITR kostimulierend auf diese Zellen wirkt. [30]. Für diesen mAk konnte außerdem gezeigt werden, dass er eine inhibierende Wirkung auf das Tumorwachstum hat, wenn er therapeutisch eingesetzt wird

[95, 112]. Diese Wirkung beruht ebenfalls auf seinen kostimulierenden Eigenschaften, die zu einer gesteigerten T-Zell-Aktivierung führen.

Diese Daten zeigen, dass durch die Entfernung von Treg bzw. Aufhebung ihrer Funktion Vakzinierungen verbessert werden können. Jedoch entscheidet bei der Depletion der Zeitpunkt über die Effektivität. Die Inaktivierung der Treg durch den mAk DTA-1 oder durch OX40-OX40L Interaktion, die gleichzeitig mit einer Aktivierung von Effektor T-Zellen einhergeht, scheint eine geeignete Methode zur Behandlung bestehender Tumore zu sein.

5.2.2 Wirkung von PC61 mAk auf Effektor T-Zellen

Obwohl in tumortragenden Mäusen nach der Injektion von PC61 aktivierte ($CD69^+$) $CD4$ T-Zellen nachweisbar waren, könnte die Wahrscheinlichkeit bestehen, dass diese Zellen nicht optimal aktiviert und somit nicht funktionell sind. Da durch eine zusätzliche Injektion von Tumorantigen-beladenen DC das Tumorwachstum beschleunigt wurde, deutete zunächst alles darauf hin, dass tumorspezifische Effektor T-Zellen, die durch die DC aktiviert worden waren, durch PC61 depletiert wurden (Abb. 4.10). In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass durch die Injektion von PC61 endogene $CD4^+CD25^+$ regulatorische T-Zellen depletiert wurden, gleichzeitig jedoch exogene aktivierte OTII transgene $CD4^+$ Effektor T-Zellen nicht in ihrer Fähigkeit zu proliferieren gehemmt (Abb. 4.19) waren. Auch die Produktion von IL-2 durch die transgenen Effektor T-Zellen wurde durch PC61 nicht negativ beeinflusst (Abb. 4.21).

Die Beobachtung, dass aus PC61-behandelten Mäusen durchschnittlich mehr OTII transgene Zellen re-isoliert werden konnten deutet ebenfalls darauf hin, dass durch die Injektion des mAk keine Effektor T-Zellen depletiert werden (Abb. 4.20).

Eine Begründung, warum aktivierte Effektor T-Zellen *in vivo* nicht von PC61 depletiert werden wäre, dass die Expression von CD25 auf diesen Zellen *in vivo* nicht so stark heraufreguliert wird, wie bei *in vitro* stimulierten T-Zellen. Für $CD8^+$ T-Zellen konnte gezeigt werden, dass auf *in vitro* aktivierten T-Zellen die CD25-Expression unabhängig vom Stimulus immer stark heraufreguliert wird. Im Gegensatz dazu kann *in vivo* keine CD25-Expression auf den aktivierten T-Zellen nachgewiesen werden. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass eine Ge-

nerierung von funktionellen Effektor T-Zellen *in vivo* nicht unmittelbar mit der Expression von CD25 korreliert [113].

Da auch in der vorliegenden Arbeit keine CD25-Expression in proliferierenden CD4⁺ T-Zellen detektiert werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass PC61 Effektor T-Zellen aufgrund mangelnder CD25-Expression nicht depletieren kann.

5.2.3 Ursprung der tumorinfiltrierenden Treg

Im Körper können Treg generell einen unterschiedlichen Ursprung haben. Es gibt die natürlichen Treg, die wie konventionelle T-Zellen, die Selektion im Thymus durchlaufen [36, 37]. Daneben besteht auch die Möglichkeit, Treg in der Peripherie durch Konversion von konventionellen T-Zellen zu induzieren. Dazu ist die Anwesenheit von TGF- β notwendig [18]. Tumorassoziierte Treg können ihren Ursprung im Pool der natürlich vorkommenden Treg haben. Diese können in die unmittelbare Umgebung des Tumors migrieren und dort durch Proliferation expandieren. Ein anderer Ursprung können konventionelle T-Zellen sein, die im Tumor zu Treg konvertieren.

Sowohl CD4⁺CD25⁺ Treg als auch CD4⁺CD25⁻ konventionelle T-Zellen, die tumortragenden Mäusen injiziert wurden, konnten nicht im Tumorgewebe gefunden werden. Auch in den drainierenden Lymphknoten konnte weder eine erhöhte Anzahl dieser exogenen Zellen gefunden werden, noch proliferierten sie in Lymphknoten oder Tumoren.

Gleichzeitig wurden jedoch endogene CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ in den Tumoren gefunden (Abschnitt 4.5, Abb. 4.22, Abb. 4.23).

Diese Daten widersprechen einer Studie von Ghiringhelli *et al.*, in der über den Einbau von 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) nachgewiesen wurde, dass in B16-tragenden Mäusen CD3⁺CD4⁺CD25⁺ Treg durch Proliferation in den drainierenden Lymphknoten expandieren [47]. Allerdings werden in dieser Studie keine Daten für den BrdU-Einbau in tumorassoziierte Treg für das B16-Modell gezeigt.

Die Daten der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass endogene CD4⁺ T-Zellen sowie Treg vom Beginn des Tumorwachstums an im Tumor zu finden sind. Dabei scheinen die Zellen nicht aufgrund ihrer Antigenpezifität rekrutiert zu werden, da auch CD4⁺ T-Zellen

aus tumortragenden Rezipienten nicht in die Tumore von Donormäusen migrieren (Abb. 4.22, rechts). Die Tatsache, dass Treg, Teff und sogar vermeintlich Tumorantigen-spezifische CD4⁺ T-Zellen aus den drainierenden Lymphknoten von tumortragenden Mäusen, die zehn Tage nach der Tumorinokulation injiziert wurden, nicht mehr in den Tumor wandern deutet darauf hin, dass der B16 Tumor ab einer gewissen Größe die Einwanderung von T-Zellen verhindert. Ein solches Szenario wurde auch schon in einem autochtonen („spontan“ auftretenden) Tumormodell in der Maus gezeigt. In diesem Modell wurden ebenfalls nur sehr geringe Mengen von T-Zellen im Tumor gefunden. Eine systemische Applikation von CpG führte zu einer stark verbesserten Infiltration der Tumore durch CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Diese Wirkung ist auf eine Heraufregulation der Adhäsionsmoleküle ICAM und VCAM auf dem Endothel der Blutgefäße zurückzuführen [114].

Es ist daher vorstellbar, dass der Tumor ab einer gewissen Größe ein Millieu schafft, durch das ein Übertritt von Zellen und Proteinen (mAk) aus dem Blut ins Tumorgewebe verhindert wird.

Durch eine zusätzliche Behandlung mit proinflammatorischen Stimuli wie z.B. CpG oder LPS wird diese Barriere überwunden [114].

Bei direkter Injektion von CpG in Tumore wurde in einem anderen Tumormodell eine Abstoßung der Tumore erreicht, was in diesem Zusammenhang auf eine verstärkte Aktivierung von DC zurückgeführt wurde [115].

Auch im B16 Modell konnte eine gewisse Verbesserung einer Vakzinierung durch intratumorale Injektion von CpG erreicht werden. In der gleichen Studie konnte diese Wirkung allerdings im autochtonen Melanom Modell nicht nachgewiesen werden [116]. Eine andere Studie ergab, dass durch die Injektion von CpG das Wachstum von B16 verlangsamt wurde. In diesem Falle war die Immunreaktion jedoch nicht durch T-Zellen oder NK-Zellen sondern durch Makrophagen vermittelt [117].

Bei der Anwendung von CpG als Adjuvant für eine Tumorthherapie muss noch die jeweils richtige Art der Anwendung (lokal oder systemisch) bestimmt werden. In diesem Zusammenhang wurde bereits von einer immunsuppressiven Wirkung durch Änderung des Applikationsortes berichtet [118].

Um den Ursprung der tumorinfiltrierenden Treg zu erklären, wäre folgende Hypothese denkbar. Zu Beginn des Tumorwachstums ist das Tumorgewebe noch „durchlässig“, wodurch Teff und Treg einwandern und zunächst auch im Tumor proliferieren können. Wenn sich der Tumor etabliert hat, schützt er sich vor weiterer Infiltration durch T-Zellen, indem er eine Herabregulierung von Adhäsionsmolekülen in den Blutgefäßen bewirkt. Der Tumor produziert dann immunsupprimierende Substanzen wie TGF- β , wodurch Teff in Treg umgewandelt werden.

Ob dieses Szenario tatsächlich innerhalb des Tumors geschieht muss noch genau untersucht werden.

5.3 Immunsuppression durch andere Mechanismen

Die Mechanismen, durch die Tumore der Erkennung und Abstoßung durch das Immunsystem entgehen können sind komplex. Um eine wirksame Therapie zu finden, sollte man sich daher nicht ausschließlich auf eine Subpopulation von Lymphozyten konzentrieren, sondern auch die Wirkung anderer suppressiver Zellen oder Mechanismen berücksichtigen.

Neben regulatorischen T-Zellen können beispielsweise *myeloid derived suppressor cells* (MDSC) [119] tumorspezifische T-Zell-Reaktionen supprimieren. Diese Zellen exprimieren neben einigen beschriebenen Markern für Monozyten (CD31, Gr-1) und Makrophagen (CD11b) die α -Kette des IL-4 Rezeptors. MDSC verstoffwechseln L-Arginin mit Hilfe der Enzyme Arginase 1 (ARG1) und Stickoxid Synthase 2 (NOS2). Dadurch kommt es in T-Zellen zur Inhibierung der Translation der ζ -Kette des T-Zell-Rezeptors und zur Inhibierung der Phosphorylierung von Molekülen, die an der Signalgebung durch den IL-2 Rezeptor beteiligt sind [120]. Dadurch sind die T-Zellen nicht mehr in der Lage aktiviert zu werden und/oder zu proliferieren.

Eine Akkumulation von MDSC in tumortragenden Mäusen konnte bereits für verschiedene Tumorarten beschrieben werden [121].

Ein anderer Mechanismus, der zu Immunsuppression im Zusammenhang mit Tumoren beiträgt, ist die Verfügbarkeit der Aminosäure Tryptophan. Das Enzym Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) baut Tryptophan ab, wobei die entstehenden Abbauprodukte (hauptsächlich

Kynurenin) und der erniedrigte Tryptophanspiegel immunsupprimierend wirken.IDO wird von DC aber auch von Tumorzellen gebildet und kann die Induktion von Apoptose oder eine Konversion von konventionellen T-Zellen in Treg bewirken [122, 123, 124]. Außerdem kann IDO eine Aktivierung von T-Zellen verhindern [125]. Durch den Einsatz von siRNA wurde gezeigt, dass das „Silencing“ von IDO in B16 Zellen zu verminderter Apoptose in T-Zellen führte und das Tumorstadium verlangsamt wurde [126].

Um eine effektive Therapie von Tumoren, insbesondere des Melanoms zu entwickeln, müssen also all diese Mechanismen berücksichtigt werden. Selbst wenn eine erfolgreiche Depletion von Treg im Tumor erreicht würde, müsste verhindert werden, dass durch Tryptophanmangel im Tumor *de novo* Treg induziert werden. Gleichzeitig müssten auch die MDSC im Tumor depletiert werden, um zu verhindern, dass sie Effektorzellen hemmen.

5.4 Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Treg durch eine einzelne Injektion von PC61 effektiv für zwei bis drei Wochen reduziert werden. Dabei werden andere Lymphozyten gleichzeitig nicht in ihrer Vitalität oder ihrem Aktivierungsgrad beeinflusst.

Wie oben beschrieben gibt es verschiedene suppressive Mechanismen, die es Tumoren ermöglichen dem Immunsystem zu entgehen. Treg spielen dabei unumstritten eine wichtige Rolle, denn durch die präventive Depletion dieser Zellen wird die Tumormunität eindeutig positiv beeinflusst. Bei therapeutischem Einsatz des mAk zeigte sich jedoch eine das Tumorstadium begünstigende Wirkung. Dieser Effekt war nicht auf eine Depletion oder Inaktivierung von Effektor T-Zellen zurückzuführen.

Auffällig war hingegen das unterschiedliche Infiltrationsmuster von Treg und CD8⁺ T-Zellen in B16-Tumoren, wenn den Mäusen vor oder nach der Tumornokulation PC61 injiziert worden war. Dabei war überraschend, dass sich das Infiltrationsmuster nur durch die präventive Injektion von PC61 nicht jedoch durch therapeutische Applikation veränderte. Eine Erklärung hierfür wäre, dass der mAk nicht in der Lage ist, bereits bestehende Tumore zu penetrieren, somit die Tumor-assoziierten Treg nicht depletieren und gleichzeitig auch nicht die Infiltration anderer Lymphozyten beeinflussen kann.

Diese Beobachtungen geben einen Hinweis darauf, dass die Verteilung der Lymphozyten am Ort der Tumorentstehung im Falle von B16 entscheidend die Entwicklung des Tumors beeinflusst. Ein viel versprechender Ansatz zur Therapie von B16 Melanomen wäre daher die Entwicklung einer Methode, die es ermöglicht, die Infiltration des Tumors durch Lymphozyten zu modulieren.

Darüber hinaus wurde hier gezeigt, dass der B16-Tumor während seiner Entwicklung anscheinend sehr früh ein Milieu schafft, das den Übertritt von Zellen aus den Gefäßen ins Tumorgewebe verhindert. Dadurch können Effektor Zellen keine Abstoßung des Tumors mehr bewirken. Gerade in bereits etablierten Tumoren interagieren außerdem neben Treg verschiedene suppressive Zellen am Ort der Tumorentstehung.

Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass für die Therapie von Tumoren eine einfache Depletion von Treg nicht ausreichend ist. Um es Effektor T-Zellen zu ermöglichen ins Tumorgewebe zu migrieren, muss die immunsuppressive Barriere des Tumors aufgelöst werden. Zusätzlich müssten neben den Treg auch MDSC und IDO-produzierende DC entfernt oder in ihrer Funktion inhibiert werden. Nur durch eine Kombination dieser verschiedenen Methoden wäre eine erfolgreiche Immuntherapie gegen Tumore denkbar.

6 Literaturverzeichnis

- [1] G. Dranoff, E. Jaffee, A. Lazenby, P. Golumbek, H. Levitsky, K. Brose, V. Jackson, H. Hamada, D. Pardoll, and R. C. Mulligan. Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(8):3539–43, 1993.
- [2] Y. Becker, E. Sprecher, I. Bentov, and C. Berkowitz. Bone marrow-derived dendritic cells and the protection against X-ray-induced thymic leukemia in mice. A new interpretation. *In Vivo*, 7(3):281–4, 1993.
- [3] T. P. Arstila, A. Casrouge, V. Baron, J. Even, J. Kanellopoulos, and P. Kourilsky. A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity. *Science*, 286(5441):958–61, 1999.
- [4] U. Bommhardt, M. Beyer, T. Hunig, and H. M. Reichardt. Molecular and cellular mechanisms of T cell development. *Cell Mol Life Sci*, 61(3):263–80, 2004.
- [5] B. Stockinger. T lymphocyte tolerance: from thymic deletion to peripheral control mechanisms. *Adv Immunol*, 71:229–65, 1999.
- [6] J. W. Kappler, N. Roehm, and P. Marrack. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell*, 49(2):273–80, 1987.
- [7] K. A. Hogquist, T. A. Baldwin, and S. C. Jameson. Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nat Rev Immunol*, 5(10):772–82, 2005.
- [8] R. H. Schwartz. Natural regulatory T cells and self-tolerance. *Nat Immunol*, 6(4):327–30, 2005.

-
- [9] J. J. Neefjes and F. Momburg. Cell biology of antigen presentation. *Curr Opin Immunol*, 5(1):27–34, 1993.
- [10] J. D. Fraser, B. A. Irving, G. R. Crabtree, and A. Weiss. Regulation of Interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28. *Science*, 251(4991):313–6, 1991.
- [11] F. A. Harding, J. G. McArthur, J. A. Gross, D. H. Raulet, and J. P. Allison. CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature*, 356(6370):607–9, 1992.
- [12] L. G. Radvanyi, Y. Shi, H. Vaziri, A. Sharma, R. Dhala, G. B. Mills, and R. G. Miller. CD28 costimulation inhibits TCR-induced apoptosis during a primary T cell response. *J Immunol*, 156(5):1788–98, 1996.
- [13] B. Afzali, G. Lombardi, R. I. Lechler, and G. M. Lord. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clin Exp Immunol*, 148(1):32–46, 2007.
- [14] T. R. Mosmann and R. L. Coffman. Th1 and Th2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*, 7:145–73, 1989.
- [15] S. Romagnani. Th1/Th2 cells. *Inflamm Bowel Dis*, 5(4):285–94, 1999.
- [16] M. A. Santana and Y. Rosenstein. What it takes to become an effector T cell: The process, the cells involved, and the mechanisms. *J Cell Physiol*, 195(3):392–401, 2003.
- [17] P. R. Mangan, L. E. Harrington, D. B. O’quinn, W. S. Helms, D. C. Bullard, C. O. Elson, R. D. Hatton, S. M. Wahl, T. R. Schoeb, and C. T. Weaver. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature*, 441(7090):231–4, 2006.
- [18] E. Bettelli, Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T. B. Strom, M. Oukka, H. L. Weiner, and V. K. Kuchroo. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, 441(7090):235–8, 2006.

-
- [19] J. Lohr, B. Knoechel, J. J. Wang, A. V. Villarino, and A. K. Abbas. Role of IL-17 and regulatory T lymphocytes in a systemic autoimmune disease. *J Exp Med*, 203(13):2785–91, 2006.
- [20] S. R. Bennett, F. R. Carbone, F. Karamalis, J. F. Miller, and W. R. Heath. Induction of a CD8+ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4+ T cell help. *J Exp Med*, 186(1):65–70, 1997.
- [21] J. F. Miller, C. Kurts, J. Allison, H. Kosaka, F. Carbone, and W. R. Heath. Induction of peripheral CD8+ T-cell tolerance by cross-presentation of self antigens. *Immunol Rev*, 165:267–77, 1998.
- [22] Y. Nishizuka and T. Sakakura. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science*, 166(906):753–5, 1969.
- [23] W. J. Penhale, A. Farmer, R. P. Mckenna, and W. J. Irvine. Spontaneous thyroiditis in thymectomized and irradiated wistar rats. *Clin Exp Immunol*, 15(2):225–36, 1973.
- [24] S. Sakaguchi, K. Fukuma, K. Kuribayashi, and T. Masuda. Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *J Exp Med*, 161(1):72–87, 1985.
- [25] F. Powrie, M. W. Leach, S. Mauze, L. B. Caddle, and R. L. Coffman. Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. *Int Immunol*, 5(11):1461–71, 1993.
- [26] P. J. Morrissey, K. Charrier, S. Braddy, D. Liggitt, and J. D. Watson. CD4+ T cells that express high levels of CD45RB induce wasting disease when transferred into congenic severe combined immunodeficient mice. Disease development is prevented by cotransfer of purified CD4+ T cells. *J Exp Med*, 178(1):237–44, 1993.
- [27] S. Sakaguchi, N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*, 155(3):1151–64, 1995.

- [28] A. Herbelin, J. M. Gombert, F. Lepault, J. F. Bach, and L. Chatenoud. Mature mainstream TCR alpha beta+CD4+ thymocytes expressing L-selectin mediate "active tolerance" in the nonobese diabetic mouse. *J Immunol*, 161(5):2620–8, 1998.
- [29] R. S. McHugh, M. J. Whitters, C. A. Piccirillo, D. A. Young, E. M. Shevach, M. Collins, and M. C. Byrne. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity*, 16(2):311–23, 2002.
- [30] J. Shimizu, S. Yamazaki, T. Takahashi, Y. Ishida, and S. Sakaguchi. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol*, 3(2):135–42, 2002.
- [31] D. Bruder, M. Probst-Kepper, A. M. Westendorf, R. Geffers, S. Beissert, K. Loser, H. Von Boehmer, J. Buer, and W. Hansen. Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *Eur J Immunol*, 34(3):623–30, 2004.
- [32] B. Valzasina, C. Guiducci, H. Dislich, N. Killeen, A. D. Weinberg, and M. P. Colombo. Triggering of OX40 (CD134) on CD4(+)CD25+ T cells blocks their inhibitory activity: a novel regulatory role for OX40 and its comparison with GITR. *Blood*, 105(7):2845–51, 2005.
- [33] S. E. Allan, S. Q. Crome, N. K. Crellin, L. Passerini, T. S. Steiner, R. Bacchetta, M. G. Roncarolo, and M. K. Levings. Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int Immunol*, 19(4):345–54, 2007.
- [34] C. L. Bennett, J. Christie, F. Ramsdell, M. E. Brunkow, P. J. Ferguson, L. Whitesell, T. E. Kelly, F. T. Saulsbury, P. F. Chance, and H. D. Ochs. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet*, 27(1):20–1, 2001.
- [35] M. E. Brunkow, E. W. Jeffery, K. A. Hjerrild, B. Paepfer, L. B. Clark, S. A. Yasayko, J. E. Wilkinson, D. Galas, S. F. Ziegler, and F. Ramsdell. Disruption of a new

- forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet*, 27(1):68–73, 2001.
- [36] K. Aschenbrenner, L. M. D’cruz, E. H. Vollmann, M. Hinterberger, J. Emmerich, L. K. Swee, A. Rolink, and L. Klein. Selection of Foxp3+ regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire+ medullary thymic epithelial cells. *Nat Immunol*, 8(4):351–8, 2007.
- [37] C. S. Hsieh, Y. Zheng, Y. Liang, J. D. Fontenot, and A. Y. Rudensky. An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires. *Nat Immunol*, 7(4):401–10, 2006.
- [38] L. Gorelik and R. A. Flavell. Abrogation of TGFbeta signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease. *Immunity*, 12(2):171–81, 2000.
- [39] W. Chen, W. Jin, N. Hardegen, K. J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady, and S. M. Wahl. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*, 198(12):1875–86, 2003.
- [40] A. M. Thornton and E. M. Shevach. Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol*, 164(1):183–90, 2000.
- [41] E. M. Shevach, R. S. McHugh, C. A. Piccirillo, and A. M. Thornton. Control of T-cell activation by CD4+ CD25+ suppressor T cells. *Immunol Rev*, 182:58–67, 2001.
- [42] E. M. Shevach. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol*, 2(6):389–400, 2002.
- [43] R. C. Bast, D. W. Kufe, R. E. Pollok, R. R. Weichselbaum, J. F. Holland, and E. Frei. *Cancer Medicine*. Wiley, 6. edition, 2007.
- [44] P. Van Der Bruggen, C. Traversari, P. Chomez, C. Lurquin, E. De Plaen, B. Van Den Eynde, A. Knuth, and T. Boon. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*, 254(5038):1643–7, 1991.

-
- [45] A. Sica, A. Saccani, B. Bottazzi, N. Polentarutti, A. Vecchi, J. Van Damme, and A. Mantovani. Autocrine production of IL-10 mediates defective IL-12 production and NF-kappa B activation in tumor-associated macrophages. *J Immunol*, 164(2):762–7, 2000.
- [46] C. Murdoch, A. Giannoudis, and C. E. Lewis. Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. *Blood*, 104(8):2224–34, 2004.
- [47] F. Ghiringhelli, P. E. Puig, S. Roux, A. Parcellier, E. Schmitt, E. Solary, G. Kroemer, F. Martin, B. Chauffert, and L. Zitvogel. Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J Exp Med*, 202(7):919–29, 2005.
- [48] Melanoma Molecular Map Project. <http://www.mmmp.org/MMMP>.
- [49] C. M. Balch, S. J. Soong, J. E. Gershenwald, J. F. Thompson, D. S. Reintgen, N. Cascinelli, M. Urist, K. M. McMasters, M. I. Ross, J. M. Kirkwood, M. B. Atkins, J. A. Thompson, D. G. Coit, D. Byrd, R. Desmond, Y. Zhang, P. Y. Liu, G. H. Lyman, and A. Morabito. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the american joint committee on cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol*, 19(16):3622–34, 2001.
- [50] C. M. Balch, S. J. Soong, M. B. Atkins, A. C. Buzaid, N. Cascinelli, D. G. Coit, I. D. Fleming, J. E. Gershenwald, Jr. Houghton, A., J. M. Kirkwood, K. M. McMasters, M. F. Mihm, D. L. Morton, D. S. Reintgen, M. I. Ross, A. Sober, J. A. Thompson, and J. F. Thompson. An evidence-based staging system for cutaneous melanoma. *CA Cancer J Clin*, 54(3):131–49; quiz 182–4, 2004.
- [51] E. Fenig, E. Eidelevich, E. Njuguna, A. Katz, H. Gutman, A. Sulkes, and J. Schechter. Role of radiation therapy in the management of cutaneous malignant melanoma. *Am J Clin Oncol*, 22(2):184–6, 1999.
- [52] G. Stevens and A. Hong. Radiation therapy in the management of cutaneous melanoma. *Surg Oncol Clin N Am*, 15(2):353–71, 2006.

-
- [53] G. J. Hill, S. E. Moss, F. M. Golomb, T. B. Grage, W. S. Fletcher, J. P. Minton, and E. T. Kremenz. DTIC and combination therapy for melanoma: III. DTIC (NSC 45388) surgical adjuvant study COG PROTOCOL 7040. *Cancer*, 47(11):2556–62, 1981.
- [54] T. Schatton, G. F. Murphy, N. Y. Frank, K. Yamaura, A. M. Waaga-Gasser, M. Gasser, Q. Zhan, S. Jordan, L. M. Duncan, C. Weishaupt, R. C. Fuhlbrigge, T. S. Kupper, M. H. Sayegh, and M. H. Frank. Identification of cells initiating human melanomas. *Nature*, 451(7176):345–9, 2008.
- [55] J. M. Kirkwood, M. H. Strawderman, M. S. Ernstoff, T. J. Smith, E. C. Borden, and R. H. Blum. Interferon alfa-2b adjuvant therapy of high-risk resected cutaneous melanoma: the Eastern Cooperative Oncology Group Trial EST 1684. *J Clin Oncol*, 14(1):7–17, 1996.
- [56] J. M. Kirkwood, J. G. Ibrahim, V. K. Sondak, J. Richards, L. E. Flaherty, M. S. Ernstoff, T. J. Smith, U. Rao, M. Steele, and R. H. Blum. High- and low-dose interferon alfa-2b in high-risk melanoma: first analysis of intergroup trial E1690/S9111/C9190. *J Clin Oncol*, 18(12):2444–58, 2000.
- [57] J. M. Kirkwood, J. Manola, J. Ibrahim, V. Sondak, M. S. Ernstoff, and U. Rao. A pooled analysis of eastern cooperative oncology group and intergroup trials of adjuvant high-dose interferon for melanoma. *Clin Cancer Res*, 10(5):1670–7, 2004.
- [58] S. Verma, I. Quirt, D. Mccready, K. Bak, M. Charette, and N. Iscoe. Systematic review of systemic adjuvant therapy for patients at high risk for recurrent melanoma. *Cancer*, 106(7):1431–42, 2006.
- [59] G. P. Adams and L. M. Weiner. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol*, 23(9):1147–57, 2005.
- [60] D. S. Krause and R. A. Van Etten. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *N Engl J Med*, 353(2):172–87, 2005.
- [61] M. Marchand, F. Brasseur, P. Van Der Bruggen, P. Coulie, and T. Boon. Perspectives for immunization of HLA-A1 patients carrying a malignant melanoma expressing gene MAGE-1. *Dermatology*, 186(4):278–80, 1993.

- [62] M. Marchand, N. Van Baren, P. Weynants, V. Brichard, B. Dreno, M. H. Tessier, E. Rankin, G. Parmiani, F. Arienti, Y. Humblet, A. Bourlond, R. Vanwijck, D. Lienard, M. Beauduin, P. Y. Dietrich, V. Russo, J. Kerger, G. Masucci, E. Jager, J. De Greve, J. Atzpodien, F. Brasseur, P. G. Coulie, P. Van Der Bruggen, and T. Boon. Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1. *Int J Cancer*, 80(2):219–30, 1999.
- [63] F. O. Nestle, S. Alijagic, M. Gilliet, Y. Sun, S. Grabbe, R. Dummer, G. Burg, and D. Schadendorf. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med*, 4(3):328–32, 1998.
- [64] B. Thurner, I. Haendle, C. Roder, D. Dieckmann, P. Keikavoussi, H. Jonuleit, A. Bender, C. Maczek, D. Schreiner, P. Von Den Driesch, E. B. Brocker, R. M. Steinman, A. Enk, E. Kampgen, and G. Schuler. Vaccination with MAGE-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J Exp Med*, 190(11):1669–78, 1999.
- [65] T. Tuting, J. Steitz, J. Bruck, A. Gambotto, K. Steinbrink, A. B. Deleo, P. Robbins, J. Knop, and A. H. Enk. Dendritic cell-based genetic immunization in mice with a recombinant adenovirus encoding murine TRP2 induces effective anti-melanoma immunity. *J Gene Med*, 1(6):400–6, 1999.
- [66] M. Bellone, D. Cantarella, P. Castiglioni, M. C. Crosti, A. Ronchetti, M. Moro, M. P. Garancini, G. Casorati, and P. Dellabona. Relevance of the tumor antigen in the validation of three vaccination strategies for melanoma. *J Immunol*, 165(5):2651–6, 2000.
- [67] M. W. Schreurs, A. A. Eggert, A. J. De Boer, J. L. Vissers, T. Van Hall, R. Offringa, C. G. Figdor, and G. J. Adema. Dendritic cells break tolerance and induce protective immunity against a melanocyte differentiation antigen in an autologous melanoma model. *Cancer Res*, 60(24):6995–7001, 2000.

- [68] S. Van Meirvenne, M. Dullaers, C. Heirman, L. Straetman, A. Michiels, and K. Thielemans. In vivo depletion of CD4+CD25+ regulatory T cells enhances the antigen-specific primary and memory CTL response elicited by mature mRNA-electroporated dendritic cells. *Mol Ther*, 12(5):922–32, 2005.
- [69] S. J. Prasad, K. J. Farrand, S. A. Matthews, J. H. Chang, R. S. Mchugh, and F. Ronchese. Dendritic cells loaded with stressed tumor cells elicit long-lasting protective tumor immunity in mice depleted of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol*, 174(1):90–8, 2005.
- [70] A. K. Simon, E. Jones, H. Richards, K. Wright, G. Betts, A. Godkin, G. Screaton, and A. Gallimore. Regulatory T cells inhibit Fas ligand-induced innate and adaptive tumour immunity. *Eur J Immunol*, 37(3):758–67, 2007.
- [71] T. J. Curiel, G. Coukos, L. Zou, X. Alvarez, P. Cheng, P. Mottram, M. Evdemon-Hogan, J. R. Conejo-Garcia, L. Zhang, M. Burow, Y. Zhu, S. Wei, I. Kryczek, B. Daniel, A. Gordon, L. Myers, A. Lackner, M. L. Disis, K. L. Knutson, L. Chen, and W. Zou. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med*, 10(9):942–9, 2004.
- [72] Juergen Haas, Laila Schopp, Brigitte Storch-Hagenlocher, Benedikt Fritzsching, Christian Jacobi, Linda Milkova, Brigitte Fritz, Alexander Schwarz, Elisabeth Suri-Payer, Manfred Hensel, and Brigitte Wildemann. Specific recruitment of regulatory t-cells into the csf in lymphomatous and carcinomatous meningitis10.1182/blood-2007-08-104877. *Blood*, pages blood–2007–08–104877, 2007.
- [73] P. Yu, Y. Lee, W. Liu, T. Krausz, A. Chong, H. Schreiber, and Y. X. Fu. Intratumor depletion of CD4+ cells unmasks tumor immunogenicity leading to the rejection of late-stage tumors. *J Exp Med*, 201(5):779–91, 2005.
- [74] B. Valzasina, S. Piconese, C. Guiducci, and M. P. Colombo. Tumor-induced expansion of regulatory T cells by conversion of CD4+CD25- lymphocytes is thymus and proliferation independent. *Cancer Res*, 66(8):4488–95, 2006.

-
- [75] J. D. Bui, R. Uppaluri, C. S. Hsieh, and R. D. Schreiber. Comparative analysis of regulatory and effector T cells in progressively growing versus rejecting tumors of similar origins. *Cancer Res*, 66(14):7301–9, 2006.
- [76] S. A. Quezada, K. S. Peggs, M. A. Curran, and J. P. Allison. CTLA4 blockade and GM-CSF combination immunotherapy alters the intratumor balance of effector and regulatory T cells. *J Clin Invest*, 116(7):1935–45, 2006.
- [77] H. Osawa and T. Diamantstein. A rat monoclonal antibody that binds specifically to mouse T lymphoblasts and inhibits IL 2 receptor functions: a putative anti-IL 2 receptor antibody. *J Immunol*, 132(5):2445–50, 1984.
- [78] A. P. Kohm, J. S. McMahon, J. R. Podojil, W. S. Begolka, M. Degutes, D. J. Kaspro-wicz, S. F. Ziegler, and S. D. Miller. Cutting Edge: Anti-CD25 monoclonal antibody injection results in the functional inactivation, not depletion, of CD4+CD25+ T regu-latory cells. *J Immunol*, 176(6):3301–5, 2006.
- [79] L. A. Stephens and S. M. Anderton. Comment on "Cutting edge: anti-CD25 mo-noclonal antibody injection results in the functional inactivation, not depletion, of CD4+CD25+ T regulatory cells". *J Immunol*, 177(4):2036; author reply 2037–8, 2006.
- [80] S. Zelenay and J. Demengeot. Comment on "Cutting edge: anti-CD25 monoclonal antibody injection results in the functional inactivation, not depletion, of CD4+CD25+ T regulatory cells". *J Immunol*, 177(4):2036–7; author reply 2037–8, 2006.
- [81] J. Shimizu, S. Yamazaki, and S. Sakaguchi. Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol*, 163(10):5211–8, 1999.
- [82] E. Jones, M. Dahm-Vicker, A. K. Simon, A. Green, F. Powrie, V. Cerundolo, and A. Gallimore. Depletion of CD25+ regulatory cells results in suppression of melanoma growth and induction of autoreactivity in mice. *Cancer Immun*, 2:1, 2002.
- [83] R. P. Suttmuller, M. H. Den Brok, M. Kramer, E. J. Bennink, L. W. Toonen, B. J. Kullberg, L. A. Joosten, S. Akira, M. G. Netea, and G. J. Adema. Toll-like receptor

- 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *J Clin Invest*, 116(2):485–94, 2006.
- [84] P. Attia, A. V. Maker, L. R. Haworth, L. Rogers-Freezer, and S. A. Rosenberg. Inability of a fusion protein of IL-2 and diphtheria toxin (Denileukin Diftitox, DAB389IL-2, ONTAK) to eliminate regulatory t lymphocytes in patients with melanoma. *J Immunother (1997)*, 28(6):582–92, 2005.
- [85] K. Mahnke, K. Schonfeld, S. Fondel, S. Ring, S. Karakhanova, K. Wiedemeyer, T. Bedke, T. S. Johnson, V. Storn, S. Schallenberg, and A. H. Enk. Depletion of CD4+CD25+ human regulatory T cells in vivo: Kinetics of Treg depletion and alterations in immune functions in vivo and in vitro. *Int J Cancer*, 120(12):2723–33, 2007.
- [86] I. Takeda, S. Ine, N. Killeen, L. C. Ndhlovu, K. Murata, S. Satomi, K. Sugamura, and N. Ishii. Distinct roles for the OX40-OX40 ligand interaction in regulatory and nonregulatory T cells. *J Immunol*, 172(6):3580–9, 2004.
- [87] M. P. Colombo and S. Piconese. Regulatory-T-cell inhibition versus depletion: the right choice in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*, 7(11):880–7, 2007.
- [88] J. Dannull, S. Nair, Z. Su, D. Boczkowski, C. Debeck, B. Yang, E. Gilboa, and J. Vieweg. Enhancing the immunostimulatory function of dendritic cells by transfection with mRNA encoding OX40 ligand. *Blood*, 105(8):3206–13, 2005.
- [89] G. Kohler and C. Milstein. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256(5517):495–7, 1975.
- [90] U. K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680–685, 1970.
- [91] S. Onizuka, I. Tawara, J. Shimizu, S. Sakaguchi, T. Fujita, and E. Nakayama. Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res*, 59(13):3128–33, 1999.

-
- [92] S. Nair, D. Boczkowski, M. Fassnacht, D. Pisetsky, and E. Gilboa. Vaccination against the forkhead family transcription factor Foxp3 enhances tumor immunity. *Cancer Res*, 67(1):371–80, 2007.
- [93] J. D. Fontenot, J. P. Rasmussen, L. M. Williams, J. L. Dooley, A. G. Farr, and A. Y. Rudensky. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity*, 22(3):329–41, 2005.
- [94] H. Nagai, T. Horikawa, I. Hara, A. Fukunaga, S. Oniki, M. Oka, C. Nishigori, and M. Ichihashi. In vivo elimination of CD25+ regulatory T cells leads to tumor rejection of B16F10 melanoma, when combined with interleukin-12 gene transfer. *Exp Dermatol*, 13(10):613–20, 2004.
- [95] K. Ko, S. Yamazaki, K. Nakamura, T. Nishioka, K. Hirota, T. Yamaguchi, J. Shimizu, T. Nomura, T. Chiba, and S. Sakaguchi. Treatment of advanced tumors with agonistic anti-GITR mAb and its effects on tumor-infiltrating Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells. *J Exp Med*, 202(7):885–91, 2005.
- [96] R. P. Sutmoller, L. M. Van Duivenvoorde, A. Van Elsas, T. N. Schumacher, M. E. Wildenberg, J. P. Allison, R. E. Toes, R. Offringa, and C. J. Melief. Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25(+) regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med*, 194(6):823–32, 2001.
- [97] B. D. Johnson, W. Jing, and R. J. Orentas. CD25+ regulatory T cell inhibition enhances vaccine-induced immunity to neuroblastoma. *J Immunother (1997)*, 30(2):203–14, 2007.
- [98] K. Lahl, C. Loddenkemper, C. Drouin, J. Freyer, J. Arnason, G. Eberl, A. Hamann, H. Wagner, J. Huehn, and T. Sparwasser. Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease. *J Exp Med*, 204(1):57–63, 2007.
- [99] F. Wang, E. Bade, C. Kuniyoshi, L. Spears, G. Jeffery, V. Marty, S. Groshen, and J. Weber. Phase I trial of a MART-1 peptide vaccine with incomplete Freund’s adjuvant for resected high-risk melanoma. *Clin Cancer Res*, 5(10):2756–65, 1999.

-
- [100] H. Mizoguchi, J. J. O'Shea, D. L. Longo, C. M. Loeffler, D. W. McVicar, and A. C. Ochoa. Alterations in signal transduction molecules in T lymphocytes from tumor-bearing mice. *Science*, 258(5089):1795–8, 1992.
- [101] K. Staveley-O'Carroll, E. Sotomayor, J. Montgomery, I. Borrello, L. Hwang, S. Fein, D. Pardoll, and H. Levitsky. Induction of antigen-specific T cell anergy: An early event in the course of tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(3):1178–83, 1998.
- [102] M. Maksimow, M. Miiluniemi, F. Marttila-Ichihara, S. Jalkanen, and A. Hanninen. Antigen targeting to endosomal pathway in dendritic cell vaccination activates regulatory T cells and attenuates tumor immunity. *Blood*, 108(4):1298–305, 2006.
- [103] N. Shibagaki and M. C. Udey. Dendritic cells transduced with TAT protein transduction domain-containing tyrosinase-related protein 2 vaccinate against murine melanoma. *Eur J Immunol*, 33(4):850–60, 2003.
- [104] J. Steitz, D. Tormo, D. Schweichel, and T. Tuting. Comparison of recombinant adenovirus and synthetic peptide for DC-based melanoma vaccination. *Cancer Gene Ther*, 13(3):318–25, 2006.
- [105] J. Zaini, S. Andarini, M. Tahara, Y. Saijo, N. Ishii, K. Kawakami, M. Taniguchi, K. Sugamura, T. Nukiwa, and T. Kikuchi. OX40 ligand expressed by DCs costimulates NKT and CD4⁺ Th cell antitumor immunity in mice. *J Clin Invest*, 117(11):3330–8, 2007.
- [106] M. J. Lenardo. Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis. *Nature*, 353(6347):858–61, 1991.
- [107] E. Gilboa. DC-based cancer vaccines. *J Clin Invest*, 117(5):1195–203, 2007.
- [108] N. Chaput, G. Darrasse-Jeze, A. S. Bergot, C. Cordier, S. Ngo-Abdalla, D. Klatzmann, and O. Azogui. Regulatory T cells prevent CD8 T cell maturation by inhibiting CD4 Th cells at tumor sites. *J Immunol*, 179(8):4969–78, 2007.

-
- [109] A. Chen, S. Liu, D. Park, Y. Kang, and G. Zheng. Depleting intratumoral CD4+CD25+ regulatory T cells via FasL protein transfer enhances the therapeutic efficacy of adoptive T cell transfer. *Cancer Res*, 67(3):1291–8, 2007.
- [110] G. Borsellino, M. Kleinewietfeld, D. Di Mitri, A. Sternjak, A. Diamantini, R. Giometto, S. Hopner, D. Centonze, G. Bernardi, M. L. Dell’acqua, P. M. Rossini, L. Battistini, O. Rotzschke, and K. Falk. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*, 110(4):1225–32, 2007.
- [111] S. Deaglio, K. M. Dwyer, W. Gao, D. Friedman, A. Usheva, A. Erat, J. F. Chen, K. Enjyoji, J. Linden, M. Oukka, V. K. Kuchroo, T. B. Strom, and S. C. Robson. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med*, 204(6):1257–65, 2007.
- [112] T. Ramirez-Montagut, A. Chow, D. Hirschhorn-Cymerman, T. H. Terwey, A. A. Kochman, S. Lu, R. C. Miles, S. Sakaguchi, A. N. Houghton, and M. R. Van Den Brink. Glucocorticoid-induced TNF receptor family related gene activation overcomes tolerance/ignorance to melanoma differentiation antigens and enhances antitumor immunity. *J Immunol*, 176(11):6434–42, 2006.
- [113] T. Storni and M. F. Bachmann. On the role of APC-activation for in vitro versus in vivo T cell priming. *Cell Immunol*, 225(1):1–11, 2003.
- [114] N. Garbi, B. Arnold, S. Gordon, G. J. Hammerling, and R. Ganss. CpG motifs as proinflammatory factors render autochthonous tumors permissive for infiltration and destruction. *J Immunol*, 172(10):5861–9, 2004.
- [115] A. T. Den Boer, G. J. Van Mierlo, M. F. Franssen, C. J. Melief, R. Offringa, and R. E. Toes. CD4+ T cells are able to promote tumor growth through inhibition of tumor-specific CD8+ T-cell responses in tumor-bearing hosts. *Cancer Res*, 65(15):6984–9, 2005.
- [116] D. Tormo, A. Ferrer, P. Bosch, E. Gaffal, E. Basner-Tschakarjan, J. Wenzel, and T. Tuting. Therapeutic efficacy of antigen-specific vaccination and toll-like receptor stimu-

- lation against established transplanted and autochthonous melanoma in mice. *Cancer Res*, 66(10):5427–35, 2006.
- [117] I. N. Buhtoiarov, P. M. Sondel, J. C. Eickhoff, and A. L. Rakhmilevich. Macrophages are essential for antitumour effects against weakly immunogenic murine tumours induced by class B CpG-oligodeoxynucleotides. *Immunology*, 120(3):412–23, 2007.
- [118] G. Wingender, N. Garbi, B. Schumak, F. Jungerkes, E. Endl, D. Von Bubnoff, J. Steitz, J. Striegler, G. Moldenhauer, T. Tuting, A. Heit, K. M. Huster, O. Takikawa, S. Akira, D. H. Busch, H. Wagner, G. J. Hammerling, P. A. Knolle, and A. Limmer. Systemic application of CpG-rich DNA suppresses adaptive T cell immunity via induction of IDO. *Eur J Immunol*, 36(1):12–20, 2006.
- [119] V. Bronte, E. Apolloni, A. Cabrelle, R. Ronca, P. Serafini, P. Zamboni, N. P. Restifo, and P. Zanovello. Identification of a CD11b(+)/Gr-1(+)/CD31(+) myeloid progenitor capable of activating or suppressing CD8(+) T cells. *Blood*, 96(12):3838–46, 2000.
- [120] V. Bronte and P. Zanovello. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol*, 5(8):641–54, 2005.
- [121] P. Serafini, C. De Santo, I. Marigo, S. Cingarlini, L. Dolcetti, G. Gallina, P. Zanovello, and V. Bronte. Derangement of immune responses by myeloid suppressor cells. *Cancer Immunol Immunother*, 53(2):64–72, 2004.
- [122] C. Uyttenhove, L. Pilotte, I. Theate, V. Stroobant, D. Colau, N. Parmentier, T. Boon, and B. J. Van Den Eynde. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med*, 9(10):1269–74, 2003.
- [123] F. Fallarino, U. Grohmann, S. You, B. C. Mcgrath, D. R. Cavener, C. Vacca, C. Orabona, R. Bianchi, M. L. Belladonna, C. Volpi, M. C. Fioretti, and P. Puccetti. Tryptophan Catabolism Generates Autoimmune-Preventive Regulatory T Cells. *Transpl Immunol*, 17(1):58–60, 2006.
- [124] A. Curti, S. Pandolfi, B. Valzasina, M. Aluigi, A. Isidori, E. Ferri, V. Salvestrini, G. Bonanno, S. Rutella, I. Durelli, A. L. Horenstein, F. Fiore, M. Massaia, M. P.

-
- Colombo, M. Baccarani, and R. M. Lemoli. Modulation of Tryptophan Catabolism by Human Leukemic Cells Results in the Conversion of CD25⁻ into CD25⁺ T Regulatory Cells. *Blood*, 109(7):2871–7, 2007.
- [125] D. H. Munn, M. D. Sharma, D. Hou, B. Baban, J. R. Lee, S. J. Antonia, J. L. Messina, P. Chandler, P. A. Koni, and A. L. Mellor. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. *J Clin Invest*, 114(2):280–90, 2004.
- [126] X. Zheng, J. Koropatnick, M. Li, X. Zhang, F. Ling, X. Ren, X. Hao, H. Sun, C. Vladau, J. A. Franek, B. Feng, B. L. Urquhart, R. Zhong, D. J. Freeman, B. Garcia, and W. P. Min. Reinstalling antitumor immunity by inhibiting tumor-derived immunosuppressive molecule IDO through RNA interference. *J Immunol*, 177(8):5639–46, 2006.

7 Danksagung

Zunächst möchte ich mich herzlich bei PD Dr. Elisabeth Suri-Payer und Prof. Dr. Karsten Mahnke für die Überlassung des Themas und die gute Betreuung bedanken.

Auch Prof. Dr. Alexander H. Enk danke ich für die ständige Diskussionsbereitschaft und die hilfreichen Anregungen.

Bei Herrn Prof. Dr. Volker Schirmmacher möchte ich mich für die Bereitschaft als Erstgutachter meiner Arbeit zu fungieren und seine freundliche Unterstützung bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Tanja Bedke und Dr. Svetlana Karakhanova für die vielen hilfreichen Hinweise zur praktischen Durchführung von Experimenten, die kritische Durchsicht dieser Arbeit und die gelegentlichen legendären Freitagabende.

Danken möchte ich auch Dr. Sabine Ring, für das „Mäuse-halten“, i.v.-Injektionen bei „schwierigen Kandidaten“ und die vielen guten Ratschläge.

Allen Mitarbeitern des Forschungslabors der Hautklinik danke ich für das freundliche Arbeitsklima, die Hilfe bei allen Problemen und die gemeinsamen Unternehmungen.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für die Unterstützung, den Zuspruch und die Aufmunterungen zwischendurch.