

Aus der Klinik für Innere Medizin  
Schwerpunkt Gastroenterologie, Endokrinologie, Infektiologie und Stoffwechsel  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Thomas M. Gress  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**T-Zell-Dysfunktion im Pankreaskarzinommodell: Rolle der IL-18- und IL-1-  
Rezeptor-Signaltransduktion bei der Induktion intratumoraler T-Zell-Dysfunktion**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
(Dr.rer.nat.)  
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Veronika Lutz**

aus Gunzenhausen

Marburg, 2021

---

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:

12. März 2021

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin.

Dekanin: Frau Prof. Dr. Denise Hilfiker-Kleiner

Referent: Herr Prof. Dr. Malte Buchholz/ Herr PD Dr. Christian Bauer

1. Korreferent: Herr Prof. Dr. Matthias Lauth

**Inhalt**

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	V
<b>1 Einleitung</b> .....	1
1.1 Die Rolle von T-Zellen bei der Immunantwort.....	1
1.2 T-Zelltypen des Immunsystems .....	1
1.2.1 CD4 <sup>+</sup> T-Zellen.....	1
1.2.2 CD8 <sup>+</sup> T-Zellen.....	2
1.3.1 T-Zell-Dysfunktion.....	3
1.3.2 Das NLRP3-Inflammasom und die Interleukin-1-Familie.....	6
1.3.2.1 Das NLRP3-Inflammasom .....	6
1.3.2.2 IL-1 und IL-1-Rezeptor-Signaltransduktion .....	7
1.3.2.3 IL-18 und IL-18-Rezeptor-Signaltransduktion .....	7
1.3.2.4 Die Rolle NLRP3 und NLRP3-vermittelten IL-1 und IL-18 bei Tumorerkrankungen.....	8
1.4 Das Pankreaskarzinom.....	9
1.4.1 Diagnose und traditionelle Behandlung .....	9
1.4.2 Immuntherapien.....	10
1.4.3 Checkpoint-Inhibitoren .....	11
<b>2 Zielsetzung</b> .....	13
<b>3 Materialien &amp; Methoden</b> .....	14
3.1 Materialien .....	14
3.1.1 Laborgeräte .....	14
3.1.2 Verbrauchsmaterialien .....	16
3.1.3 Software .....	17
3.1.4 Reagenzien und Chemikalien.....	18
3.1.5 Nährmedien, Zusätze, Puffer und Lösungen.....	19
3.1.5.1 Nährmedien, und Zusätze .....	19
3.1.5.2 Puffer, Lösungen und Nährmedien.....	20
3.1.6 Antikörper .....	21
3.1.7 Kits.....	25
3.1.8 Zelllinien.....	26
3.1.9 Mauslinien.....	26
3.1.10 Primer.....	27
3.2 Methoden.....	28

3.2.1	Zellkultur.....	28
3.2.1.1	Kultivieren und Passagieren von Zelllinien .....	28
3.2.1.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	29
3.2.1.3	Bestimmung der Zellzahl .....	29
3.2.1.4	Isolation und Differenzierung von cytotoxischen T-Zellen.....	29
3.2.1.5	Isolation und Differenzierung von CD11c <sup>+</sup> DCs.....	30
3.2.1.6	Messung der Migrationsgeschwindigkeit.....	31
3.2.2	Durchflusszytometrie und Durchflusszytometrie basierende Assays.....	31
3.2.2.1	Oberflächenfärbung .....	32
3.2.2.2	Restimulation und intrazelluläre Färbung von Zytokinen und Transkriptionsfaktoren.....	32
3.2.2.3	Zellsortierung.....	33
3.2.2.4	Degranulationsassay .....	33
3.2.2.5	Phänotypisierung von OT-I-Mäusen.....	34
3.2.3	Tierversuche.....	34
3.2.4	Molekularbiologische Methoden .....	36
3.2.4.1	Genotypisierung der <i>Il18r<sup>-/-</sup></i> - und <i>Il1r<sup>-/-</sup></i> -Mäuse.....	36
3.2.4.2	Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR).....	37
3.2.4.3	RNA-Sequenzierung.....	38
3.2.5	Protein-biochemische Methoden.....	40
3.2.5.1	Gewinnung von Zelllysaten und Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA .....	40
3.2.5.2	Immunoblotanalyse .....	40
3.2.5.3	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> (ELISA) .....	42
3.2.6	Auswertung und Statistik .....	42
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>43</b>
4.1	Etablierung der Zuchtlinien <i>Il18r<sup>-/-</sup></i> OT-I und <i>Il1r<sup>-/-</sup></i> OT-I .....	43
4.2	Die Rolle der IL-1- und IL-18-Rezeptor-Signaltransduktion in CTLs <i>in vitro</i> .....	44
4.2.1	Die IL-1- und IL-18-Rezeptor-Signaltransduktion beeinflusst nicht die Differenzierung zu CTLs <i>in vitro</i> .....	44
4.2.2	IL-18 und IL-1 $\beta$ stimulieren die Zytotoxizität von CTLs über ihre Rezeptoren auf den Effektorzellen und indirekt über APCs.....	46
4.3	IL-18-Rezeptor-Signaltransduktion intratumoraler CD8 <sup>+</sup> CTL reduziert die Zytotoxizität und hemmt die Tumorabstoßung .....	47
4.3.1	Intratumorales IL-18 führt zu einem dysfunktionalen Phänotyp in CTLs.....	48

4.3.2	Durch IL-18-Rezeptor-Signaltransduktion verlieren intratumorale CTLs ihre antitumorale Funktion.....	49
4.3.3	Die durch IL-18 induzierte T-Zell-Dysfunktion ist mit einer verringerten T-Zell-Proliferation und Tumordinfiltration assoziiert.....	51
4.3.4	Die Deletion von IL-18-Rezeptoren adoptiv transferierter CTLs disinhiziert die intratumorale Dysfunktion von endogenen CTLs.....	52
4.3.5	Über den IL-18-Rezeptor vermittelte Signaltransduktion induziert Dysfunktion in intratumoralen CTLs über den IL-2/STAT5-Signalweg und verhindert die Entwicklung von <i>stemness-like memory</i> T-Zellen.....	54
4.4	Defizienz der IL-1-Rezeptor-Signaltransduktion intratumoraler T-Zellen reduziert die T-Zell-Dysfunktion nur geringgradig.....	57
4.5	Pankreatische Tumorzellen sind IL-1- und IL-18-Produzenten und werden ihrerseits von diesen beiden Zytokinen beeinflusst .....	59
4.6	Auswirkung von intratumoralem NLRP3 auf die Effektorfunktion von CTLs ..	61
4.6.1	NLRP3-vermittelte Zytokine beeinflussen nicht die Tumorsuppression transferierter CTLs .....	61
4.6.2	NLRP3-Signaltransduktion beeinflusst nicht die Dysfunktionalität von intratumoralen CTLs.....	62
4.6.3	NLRP3-Signaltransduktion wird zur Aktivierung endogener CTLs benötigt	65
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>68</b>
5.1	Die Rolle des IL-1- und IL-18-Rezeptors während der intratumoralen Dysfunktion von CTLs .....	68
5.2	Die Rolle von NF- $\kappa$ B und MAP-Kinasen während einer T-Zell-Dysfunktion....	71
5.3	Unterschiede in der IL-1 und IL-18-Signaltransduktion in CTLs .....	72
5.4	Die Rolle von NLRP3 für die Induktion eines suppressiven Tumormilieu .....	73
5.5	Signaltransduktion über NLRP3 vermittelte Zytokine als wichtiger Baustein der intratumoralen CTL-Aktivierung und CTL-Dysfunktion .....	75
5.6	Die Rolle von NLRP3-vermittelten IL-1 $\beta$ und IL-18 in der klinischen Anwendung .....	77
5.7	Ausblick und Schlussfolgerung.....	78
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>81</b>
<b>7</b>	<b>Abstract.....</b>	<b>83</b>
	Literaturverzeichnis .....	IX
	Tabellenverzeichnis.....	XVII
	Abbildungsverzeichnis.....	XVIII
	Lebenslauf .....	XIX
	Verzeichnis akademischer Lehrer .....	XX

---

Danksagung .....	XXI
Ehrenwörtliche Erklärung.....	XXII

**Abkürzungsverzeichnis**

°C	Grad Celsius
μ	Mikro-
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ANOVA	Varianzanalyse (engl. <i>analysis of variance</i> )
APC	engl. <i>antigen presenting cell</i> , Antigenpräsentierende Zelle
APC	Allophycocyanin
APC/Cy7	Allophycocyanin/Cyanin 7
Aqua ad	Latein: <i>Aqua ad iniectabilia</i>
Art.Nr.	Artikelnummer
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CD	engl. <i>cluster of differentiation</i>
cDNA	engl. <i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
CTL	engl. <i>cytotoxic T lymphocyte</i> , zytotoxische T-Lymphozyt
CTLA-4	engl. <i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
Da	Dalton
DC	engl. <i>dendritic cell</i> , dendritische Zelle
DMEM	engl. <i>Dulbecco's modified eagle media</i>
DNA	engl. <i>desoxyribonucleinacid</i>
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Deoxyribonukleosidtriphosphat

---

engl.	englisch
et al.	Latein: <i>et alii/aliae</i> (und andere)
FACS	engl. <i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	engl. <i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Forw	engl. <i>forward</i>
Foxp3	engl. <i>forkhead box protein 3</i>
g	G-Kraft
g	Gramm
G	Guanin
GSEA	engl. <i>gene set enrichment analysis</i>
HBSS	engl. <i>Hank's buffered salt solution</i>
ICS	engl. <i>intracellular staining</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
<i>i.p.</i>	intraperitoneal
kg	Kilogramm
KPC	Kras <sup>LSL.G12D/+</sup> ; p53 <sup>R172H/+</sup> ; PdxCre <sup>tg/+</sup>
Kras	engl. <i>kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
L	Liter
LAG-3	engl. <i>Lymphocyte activation gene 3</i>
LPS	Lipopolysaccharid

---

m	Mili-
M	Molar (mol/L)
MACS	engl. <i>magnetic activated cell sorting</i>
MHC	engl. <i>major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
Min	Minute
MW	Mittelwert
n	Nano-
n	Stichprobenumfang
NF-κB	engl. <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
Nlrp3	engl. <i>NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3</i>
ns	nicht signifikant
OVA	Ovalbumin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Panc02	murine Pankreaskarzinomlinie
PB	engl. <i>Pacific Blue</i>
PBS	engl. <i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	engl. <i>Polymerase chain reaction</i>
PDAC	engl. <i>pancreatic Ductal Adenocarcinoma</i>
PD-1	engl. <i>programmed cell death protein 1</i>
PE	Phycoerythrin
PE/Cy5.5	Phycoerythrin/Cyanin 5.5
PE/Cy7	Phycoerythrin/Cyanin 7
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein-Komplex

---

PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
q	quantitativ
R	Rezeptor
rev	engl. <i>reverse</i>
RNA	engl. <i>ribonucleic acid</i>
rpm	Runden pro Minute
RPMI	engl. <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
RT	reverse Transkriptase
s.c.	subkutan
SD	engl. <i>standard deviation</i>
SPF	engl. <i>specific-pathogen-free</i> , spezifisch-pathogenfrei
Std	Stunde
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Taq-Polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> Polymerase
Th	T-Helferzelle
TIM-3	engl. <i>T cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TOX	engl. <i>Thymocyte Selection Associated High Mobility Group Box</i>
Treg	regulatorische T-Zelle

## 1 Einleitung

### 1.1 Die Rolle von T-Zellen bei der Immunantwort

Das Immunsystem ist durch eine komplexe Interaktion von Proteinen und löslichen Faktoren gekennzeichnet. Die Aufgabe des Immunsystems ist es den Organismus einerseits vor Pathogenen und Toxinen im Rahmen von Infektionen zu schützen, beseitigt zum anderen aber auch körpereigene Zellen, die sich kanzerogen verändert haben.

T-Lymphozyten (T-Zellen) stehen im Zentrum der spezifischen Immunantwort. Sie reifen durch positive Selektion im Thymus heran. Durch negative Selektion werden Zellen, die körpereigene Peptide binden, in die Apoptose geschickt. Man unterscheidet anhand von immunphänotypischen Oberflächenmerkmalen (engl. *cluster of differentiation*, CD) zwei Arten von T-Zellen. CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen unterscheiden sich in der Reaktivität ihres Haupthistonkompatibilitätskomplexes (MHC). Der T-Zell-Rezeptor von CD4<sup>+</sup> T-Zellen erkennt Antigenpeptide die von MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert werden. Die Präsentation wird von antigenpräsentierenden Zellen, wie dendritischen Zellen (DCs), B-Zellen, Monozyten und Makrophagen, übernommen. CD8<sup>+</sup> T-Zellen erkennen über ihren T-Zell-Rezeptor ihr kognates Antigenpeptid durch Bindung an MHC-Klasse-I-Moleküle, welche von allen kernhaltigen Zellen exprimiert werden (Kumar et al., 2018).

### 1.2 T-Zelltypen des Immunsystems

#### 1.2.1 CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen handelt es sich um T-Helferzellen. Sie werden nochmals in Untergruppen unterteilt, welche sich durch die Produktion von Zytokinen und Expression von Transkriptionsfaktoren unterscheiden. Th1-Zellen sezernieren IFN- $\gamma$ , IL-2 und TNF, aktivieren dadurch Makrophagen und bekämpfen so intrazelluläre Pathogene (Zhu und Paul, 2008). Th2-Zellen produzieren IL-4, IL-5 und IL-13, um durch die Aktivierung von B-Zellen extrazelluläre Pathogene zu bekämpfen (Zhu et al., 2006).

Th17-Zellen hingegen sekretieren IL-17, IL-21 und IL-22 und tragen dadurch zur Aktivierung von neutrophilen Granulozyten bei (Tesmer et al., 2008). Daneben gehört zu den Aufgaben von Th17-Zellen ebenfalls die Bekämpfung von extrazellulären Bakterien. Jedoch sind Th17-Zellen auch bei der Entstehung von inflammatorischen Autoimmunerkrankungen beteiligt. Bei der Tumormunität spielen sie eine kontroverse Rolle. Je nach Endität des Tumors können Th17-Zellen supprimierend oder fördernd wirken (Bailey et al., 2014). Zu den T-Helfer-Zellen gehören auch regulatorische T-Zellen (Tregs). Sie exprimieren den Transkriptionsfaktor *Foxp3*. Durch die Sekretion von TGF $\beta$  und IL-10 halten sie die Immuntoleranz aufrecht. Bei der Tumorentwicklung supprimieren sie die Immunantwort und fördern so das Tumorstadium (Togashi et al., 2019).

### 1.2.2 CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Bei CD8<sup>+</sup> T-Zellen handelt es sich hauptsächlich um zytotoxische T-Effektorzellen (*cytotoxic T cells*, CTLs). Nach ihrer Aktivierung produzieren sie IFN- $\gamma$ , TNF und zytotoxische Granula, welche Perforin und Granzyme enthalten. CTLs können über drei verschiedene Wege ihre Zielzelle zerstören. Zum einen bilden sie die zytotoxischen Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF, die an die entsprechenden Rezeptoren auf der Zielzelle binden. Außerdem können sie durch Exozytose Perforin freisetzen und durch die dadurch gebildeten Poren Granzyme in das Zytoplasma der Zielzellen freisetzen. Ebenfalls exprimieren sie Fas-Liganden, welche durch Fas-Fas-Liganden-Interaktionen an der Zielzelle binden können. Durch jeden der drei Wege werden in den Zielzellen Apoptose-Mechanismen eingeleitet (Halle et al., 2017). Naive CD8<sup>+</sup> T-Zellen bekommen durch antigenpräsentierende Zellen Tumorantigene in den lymphatischen Organen präsentiert. Dadurch erfolgt die Proliferation und Differenzierung zu zytotoxischen Effektorzellen (Kaech et al., 2002). Anschließend zirkulieren und migrieren die CTLs in das antigenpräsentierende Tumorgewebe. Dort erkennen die CTLs ihr kognates Antigen über die Bindung an die T-Zell-Rezeptoren wodurch die Effektorfunktion der CTLs induziert wird. Gelingt es den CTLs durch ihren zytotoxischen Effekt den Tumor

abzustoßen entwickeln sie sich zu T-Gedächtniszellen und schützen den Körper vor einer erneuten Erkrankung (Zhang und Bevan, 2011).

### 1.3.1 T-Zell-Dysfunktion

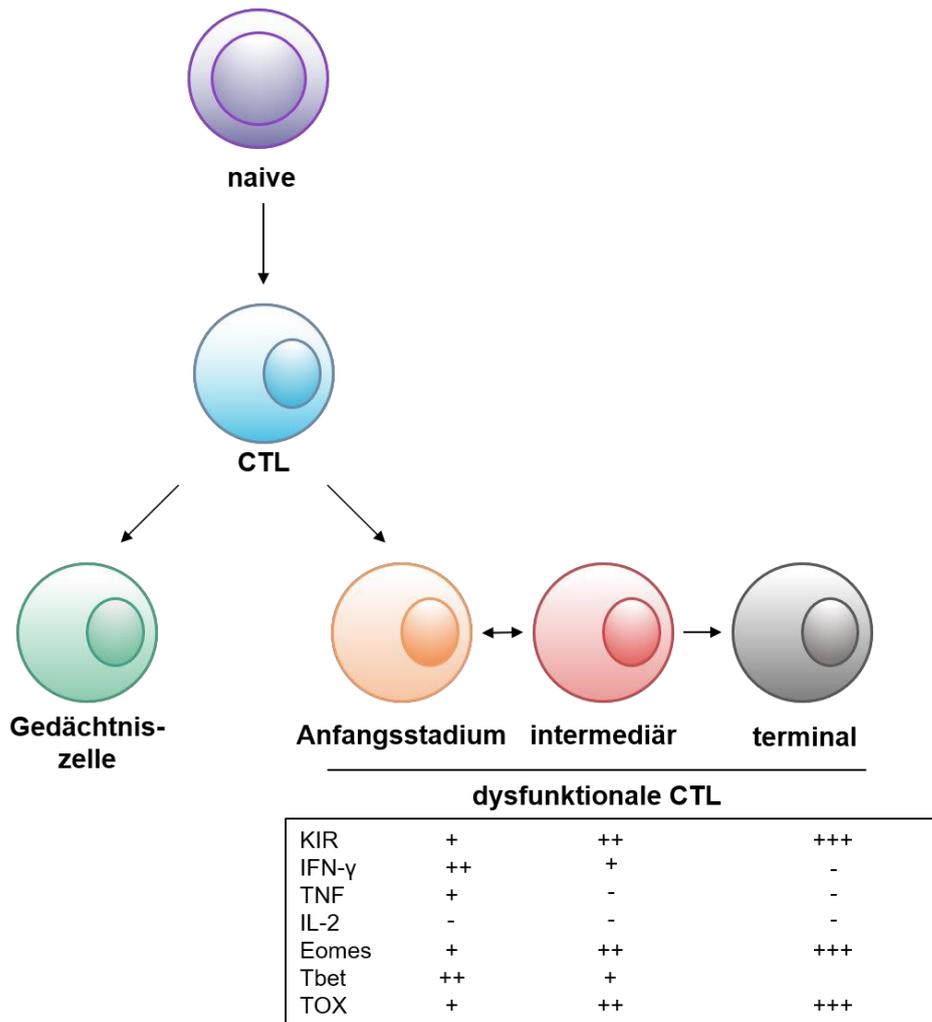
Werden CD8<sup>+</sup> CTLs mit einem starken und anhaltenden Antigenreiz über den T-Zell-Rezeptor konfrontiert, können sie in einen dysfunktionalen Zustand gelangen, den man als T-Zell-Dysfunktion bezeichnet (Wherry, 2011). Das Konzept der T-Zell-Dysfunktion wurde erstmals Ende des 20. Jahrhunderts beschrieben (Gallimore et al., 1998; Zajac et al., 1998). Dort wurde bei chronischen LCMV-Infektionen beobachtet, dass antigenspezifische CTLs zwar ihre Funktionalität verlieren, jedoch nicht apoptotisch werden und als T-Zellen im Organismus verbleiben. Normalerweise geht die Mehrzahl von aktivierten CTLs nach der Aktivierung über ihr kognates Antigen ihrer Effektorfunktion nach und geht danach in Apoptose. Nur ein kleiner Teil differenziert zu Gedächtnis-T-Zellen, um bei einem wiederkehrenden Kontakt des Immunsystems mit dem Antigen eine rasche Induktion der Immunantwort zu gewährleisten. Seitdem wurde gezeigt, dass dysfunktionale CTLs bei einer Vielzahl chronischer Infektionen und Autoimmunerkrankungen auftreten (Day et al., 2006; Ye et al., 2015; McKinney et al., 2015) und hier eine wichtige Rolle bei der Suppression von Immunantworten spielen. Auch in unterschiedlichen humanen Tumorarten konnte das Phänomen der T-Zell-Dysfunktion nachgewiesen werden. Es wurde gezeigt, dass das Aufkommen von dysfunktionalen CTLs eine verminderte Tumorsuppression bedingt (Zarour, 2016).

Dysfunktionale CTLs lassen sich durch die Expression von koinhibitorischen Rezeptoren, sowie durch epigenetische und transkriptionelle Änderungen klar von Effektor-T-Zellen und Gedächtnis-T-Zellen unterscheiden. Bei anhaltender Stimulation des T-Zellrezeptors durch ihr kognates Antigen sind Effektor-CTLs nicht in der Lage alle Zielzellen zu zerstören und Gedächtnis-T-Zellen auszubilden. Stattdessen begeben sich diese CTLs in einen dysfunktionalen Zustand. Dabei verlieren sie zuerst ihre Proliferationskapazität, gefolgt vom Verlust ihrer Effektorfunktion. Dazu zählen der Verlust der IFN- $\gamma$ /TNF-Produktion, sowie eine verringerte Bildung zytotoxischer Granula. Mit zunehmender Dysfunktion werden auch koinhibitorische Rezeptoren

vermehrt exprimiert. Dazu gehören *programmed cell death protein 1* (PD-1), *lymphocyte activation gene 3 protein* (LAG-3), 2B4, *cytotoxic T lymphocyte antigen 4* (CTLA-4) und *T cell immunoglobulin domain and mucin domain-containing protein 3* (TIM-3) (Wherry, 2011). Die Aktivierung von naiven T-Zellen benötigt neben der Stimulation des T-Zell-Rezeptors eine Kostimulation durch kostimulatorische Rezeptoren. Sind die T-Zellen aktiviert exprimieren sie koinhibitorische Rezeptoren, um die aktivierten T-Zellen zu kontrollieren. Werden CTLs dysfunktional exprimieren sie um ein Vielfaches mehr an koinhibitorischen Rezeptoren. Durch das Binden an ihren Liganden werden die dazugehörigen Signalwege und die Aktivierung der CTLs über den T-Zell-Rezeptor inhibiert und den CTLs die Möglichkeit gegeben ihre Funktionalität wiederherzustellen (Barber et al., 2006). Die Anzahl an exprimierten koinhibitorischen Rezeptoren korreliert dabei mit der Dysfunktionalität der CTLs (Blackburn et al., 2009). Charakteristisch ist ebenfalls die Hochregulation des Transkriptionsfaktors Eomesodermin (Eomes) mit gleichzeitiger Herabregulation des Transkriptionsfaktors T-Box Transkriptionsfaktor TBX21 (T-bet), beide gehören zur Familie der T-box Transkriptionsfaktoren (Paley et al., 2012). Zu den vielversprechendsten Markern für dysfunktionale CTLs in jüngster Zeit gehört der DNA-Bindedefaktor *thymocyte selection-associated high mobility group box protein* (TOX) (Khan et al., 2019; Doering et al., 2012). Er gehört zu den Transkriptionsfaktoren, die auf eine Aktivierung des T-Zellrezeptors reagieren (Scott et al., 2019). Während TOX nicht an der Differenzierung zu CTLs oder Gedächtnis-T-Zellen beteiligt ist, so ist es für die Entstehung von dysfunktionalen CTLs unentbehrlich. Eine Deletion von TOX verhindert die Bildung von dysfunktionalen CTLs. Zudem bewirkt es als Transkriptionsfaktor eine epigenetische Reprogrammierung von dysfunktionalen CTLs durch Änderungen in der Chromatinassemblierung (Khan et al., 2019).

Die Dysfunktion von CTLs lässt sich in drei Untergruppen unterteilen (Abb.1). Dabei handelt es sich um im Anfangsstadium der Dysfunktion befindliche Vorläuferzellen, intermediär dysfunktionale Zellen und terminal dysfunktionale Zellen. Sie lassen sich zum einen durch die Expression von koinhibitorischen Rezeptoren charakterisieren. Je mehr koinhibitorischer Rezeptoren gleichzeitig exprimiert werden, desto dysfunktionaler ist die Zelle (Beltra et al., 2020). Außerdem ändert sich mit zunehmender Dysfunktion die Fähigkeit zytotoxische Zytokine zu produzieren (Wherry, 2011). Bereits im Anfangsstadium der Dysfunktion sind T-Zellen nicht mehr in

der Lage IL-2 zu produzieren. Die Produktion von TNF verlieren die Zellen während der intermediären Dysfunktion. IFN- $\gamma$  kann erst von terminal dysfunktionalen T-Zellen nicht mehr produziert werden. Es kommt auch zu Änderungen bei der Expression von Transkriptionsfaktoren. Mit zunehmender Dysfunktion steigt die Expression von Eomes und TOX mit gleichzeitiger Abnahme von T-bet (Beltra et al., 2020).



**Abb. 1: Charakterisierung der verschiedenen Stadien intratumoraler CTLs.**

Naive CD8<sup>+</sup> T-Zellen proliferieren und differenzieren nach Kontakt mit ihrem kognaten Antigen zu CTLs. Gelingt es den CTLs nach Einwandern in den Tumor alle Tumorzellen zu beseitigen differenzieren die CTLs zu Gedächtnis-T-Zellen. Ist die intratumorale Antigenlast zu hoch begeben sich die CTLs in einen dysfunktionalen Status. Dieser kann in drei Gruppen unterteilt werden: Die im Anfangsstadium der Dysfunktion befindlichen Vorläuferzellen, intermediär dysfunktionale T-Zellen und terminal dysfunktionale T-Zellen. Mit zunehmender Dysfunktion kommt es zur Hochregulation von koinhibitorischen Rezeptoren (KIR), verminderter Produktion von zytotoxischen Zytokinen und vermehrter Expression von Eomes und TOX mit gleichzeitiger Verringerung der T-bet-Expression.

Neben der Überstimulation des T-Zell-Rezeptors können auch kostimulierende Signale, wie die inflammatorischen Zytokine IL-6 und Interferone (IFNs) sowie koinhibitorische Signale, wie die suppressiven Zytokine IL-10 und TGF $\beta$ , diesen Zustand beeinflussen. Zusätzlich können noch antigenpräsentierende Zellen, CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, Tregs und NK-Zellen diesen dysfunktionalen Zustand regulieren (Wherry and Kurachi, 2015).

Der dysfunktionale Zustand der CTLs ist jedoch nicht permanent. So können dysfunktionale CTLs durch Blockade der koinhibitorischen Rezeptoren, allen voran durch Blockade des PD-1-Signalwegs, in Kombination mit Blockade der suppressiven Zytokine IL-10 und TGF $\beta$  wieder ihre Effektorfunktion zurückgewinnen. Der klinische Erfolg hängt von mehreren Faktoren ab. Man nimmt an, dass bei dysfunktionalen Vorläuferzellen noch die verlorene Effektorfunktion regeneriert werden kann, wohingegen bei einer terminalen Dysfunktion die Effektorfunktion nicht wieder hergestellt werden kann (Pauken und Wherry, 2015).

### 1.3.2 Das NLRP3-Inflammasom und die Interleukin-1-Familie

#### 1.3.2.1 Das NLRP3-Inflammasom

NLRP3 gehört zu einer Gruppe großer Proteinkomplexe, auch Inflammasome genannt. Das NLRP3-Inflammasom ist unter anderem für die Prozessierung der proinflammatorischen Zytokine Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und Interleukin-18 (IL-18) verantwortlich (Schroder und Tschopp, 2010). Sie bestehen aus einem NLR-Protein, einem Adaptorprotein (ASC) und der Cystein-Protease Caspase-1. Die Aktivierung des Inflammasoms benötigt zwei Schritte. Zuerst erfolgt ein „*priming*“-Schritt. Zum einen wird die Expression von NLRP3 selbst erhöht (Bauernfeind et al., 2009). Dabei wird auch die Transkription von pro-IL-1 $\beta$  erhöht. Pro-IL-18 hingegen wird konstitutiv exprimiert und dadurch nicht beeinflusst. Durch einen Stimulus, der durch Signale von Pathogenen, Toxinen oder freiem ATP ausgelöst werden kann, kommt es zur Assemblierung des Komplexes. Die Aktivierung des Komplexes führt zur Aktivierung von Caspase-1, welche dann die Spaltung der Vorläuferproteine von IL-1 $\beta$  und IL-18 durchführt und so die aktiven Formen von IL-1 $\beta$  und IL-18 entstehen. Von dort aus

werden die prozessierten Zytokine in die extrazelluläre Matrix entlassen (Martinon et al., 2009).

### 1.3.2.2 IL-1 und IL-1-Rezeptor-Signaltransduktion

IL-1 gilt als eines der wichtigsten Zytokine im Zytokinnetzwerk und ist auf unterschiedlichste Weise an Entzündungs-, Infektions- und Immunreaktionen beteiligt. Es wurde 1984 entdeckt (Dinarello, 1984), Zur IL-1-Familie gehören elf verschiedene Zytokine und zehn Rezeptoren. IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  gehören zu den meist erforschten Zytokinen dieser Familie. Beide sind Agonisten und unterscheiden sich kaum in ihrer biologischen Wirksamkeit. IL-1 wird hauptsächlich von antigenpräsentierenden Zellen, wie Makrophagen, Monozyten und DCs, aber auch von Fibroblasten und NK-Zellen produziert (Garlanda et al., 2013).

Beide binden an den IL-1R1. Ihr Antagonist ist IL-1Ra. Bindet dieser an den IL-1R1 wird kein Rezeptorsignal mehr induziert und die Aktivität von IL-1 wird inhibiert. Der IL-1R1 kann unter anderem auf DCs, Endothelzellen, Fibroblasten und T-Zellen gefunden werden. Der aktive Rezeptor aktiviert wiederum die Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- $\kappa$ B über die zytosolischen Signalkaskaden der MAP-Kinasen. Diese dienen unter anderem als Regulatoren für Zellproliferation und das Überleben von Zellen (Dinarello, 2009).

### 1.3.2.3 IL-18 und IL-18-Rezeptor-Signaltransduktion

IL-18 ist ebenfalls ein proinflammatorisches Zytokin der IL-1-Familie. Es wurde zuerst als *Interferon- $\gamma$ -producing-factor* bekannt, nachdem Nakamura et al. das Zytokin im Serum von Mäusen entdeckt und dessen Einfluss auf die Proliferation und IFN- $\gamma$ -Produktion zeigen konnte (Nakamura et al., 1993). Nachdem man jedoch seine pleiotropen Effekte entdeckte wurde es später in IL-18 umbenannt. Pro-IL-18 wird konstitutiv in Kupffer-Zellen, Monozyten, Makrophagen, DCs und Epithelzellen exprimiert (Dinarello et al., 2013). Abhängig vom umgebenden Zytokinmilieu kann IL-

18 proinflammatorisch oder antiinflammatorisch wirken. Zusammen mit IL-12 stimuliert es die IFN- $\gamma$ -Produktion von T-Zellen, NK-Zellen, B-Zellen, DCs und Makrophagen. In Anwesenheit von IL-3 lässt es unter anderem Mastzellen antiinflammatorisches IL-4 und IL-13 produzieren (Palma et al., 2013).

Die Signaltransduktion von IL-18 erfolgt über IL-18-Rezeptoren. Sie gehören zur Familie der IL-1-Rezeptoren. Aus einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette bestehend bildet der IL-18-Rezeptor ein Heterodimer. Bindet aktives IL-18 an IL-18R $\alpha$  bindet IL-18R $\beta$  und bildet den Rezeptorkomplex. Alle Zellen exprimieren IL-18R $\alpha$ , IL-18R $\beta$  wird jedoch nur auf T-Zellen und DCs exprimiert. Ohne IL-18R $\beta$  bindet IL-18 nur an IL-18R $\alpha$  und weist keine proinflammatorische Wirkung auf. Durch die Aktivierung des Rezeptors wird ähnlich wie bei IL-1 unter anderem der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B über verschiedene MAP-Kinasen, wie p38, Erk und JNK aktiviert. Als IL-18-Rezeptor-Antagonist wirken das IL-18-Bindeprotein (IL-18BP) und IL-37. IL-37 hat eine hohe Homologie mit IL-18. Bindet es an IL-18R $\alpha$  verhindert es die Bildung des Heterodimers mit IL-18R $\beta$  und bindet an IL-18. Dadurch wird der STAT3-Signalweg aktiviert, was die proinflammatorische Wirkung von IL-18 unterdrückt (Yasuda et al., 2019).

#### 1.3.2.4 Die Rolle NLRP3 und NLRP3-vermittelten IL-1 und IL-18 bei Tumorerkrankungen

Proinflammatorische Zytokine wie IL-1 und IL-18 spielen eine wichtige Rolle in Inflammationsvorgängen. Hohe Level der Zytokine treten bei chronischen Entzündungen auf, aus denen Tumorerkrankungen hervorgehen können. Patienten mit chronischer Pankreatitis haben ein erhöhtes Risiko an einem Pankreaskarzinom zu erkranken. Dabei zeichnen sich die Pankreatitiden durch einen erhöhten IL-1 $\beta$ -Spiegel aus (Neesse et al., 2015). Auch ein erhöhter Wert von IL-18 wird mit akuter und chronischer Pankreatitis assoziiert. Im Pankreaskarzinom korrelieren erhöhte IL-18-Werte mit einer verringerten Überlebensrate (Li et al., 2019). IL-1 spielt als Inflammationsvermittler eine wichtige Rolle bei der Karzinogenese und beim Tumorwachstum. IL-1 $\beta$ -Spiegel korrelieren mit der Invasivität von Tumoren und der Überlebensrate von Patienten. Durch chronische Inflammation, Aktivierung von

Endothelzellen und Aktivierung von immunsuppressiven Zellen fördert es das Tumorwachstum (Baker et al., 2019). In Tierversuchen mit KPC-Mäusen, die spontan human-ähnliche Pankreaskarzinome entwickeln können, wurde gezeigt, dass durch NLRP3-vermittelte Zytokinproduktion in Makrophagen das Tumorwachstum gefördert und dabei die zytotoxische T-Zellantwort inhibiert wird (Daley et al., 2017). Bis jetzt bleibt dabei die Rolle der T-zellulären Signaltransduktion über die Rezeptoren der IL-1-Rezeptorenfamilie unklar.

In Infektionsmodellen wurde gezeigt, dass die IL-1R1-Signaltransduktion für die Aktivierung von CTL zur Immunantwort gegen den Influenza A Virus notwendig ist (Pang et al., 2013).

## 1.4 Das Pankreaskarzinom

### 1.4.1 Diagnose und traditionelle Behandlung

Das Pankreaskarzinom gehört mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 9% zu den aggressivsten soliden Tumoren (Siegel et al., 2020). Dies liegt zum einen an einer oft spät gestellten Diagnose. Da der Krankheitsverlauf oft nur mit unspezifischen Symptomen einhergeht kann die Diagnose meist erst zu einem späten Zeitpunkt, mit oftmals bereits beginnender Metastasierung, beispielsweise in der Leber, festgestellt werden (Guillén-Ponce et al., 2017). Zum anderen fehlen Behandlungsmöglichkeiten. Nur bei 15 – 20 % der Patienten kann eine vollständige Resektion des Tumors durchgeführt werden, was zu einem medianen Gesamtüberleben von unter zwanzig Monaten führt (Griffin et al., 2015). Schließt man der Resektion eine adjuvante Chemotherapie an, so kann die mediane Überlebenszeit auf 54 Monate verlängert werden (Conroy et al., 2018). Für Patienten mit inoperablen, bereits metastasierenden Pankreaskarzinom bleibt nur die Behandlung durch Chemotherapie. Dabei kommt als heutiger Standard eine Kombinationstherapie aus Gemcitabin/Nab-paclitaxel oder FOLFIRINOX zum Einsatz und bringt eine mediane Überlebenszeit von 8,7 bis 11,3 Monaten (Springfeld et al., 2019).

## 1.4.2 Immuntherapien

Aufgrund der limitierten Wirkung der gängigen Therapieansätze besteht die Notwendigkeit innovative Ansätze der Immuntherapie, welche in anderen Krebsarten bereits erfolgreiche Anwendung finden, bei Pankreaskarzinomerkrankungen zu untersuchen. Alle immuntherapeutischen Ansätze machen sich die enge Verknüpfung und gegenseitige Beeinflussung zwischen Zellpopulationen des angeborenen und adaptiven Immunsystems zunutze. Zum einen finden Vakzinierungen mit antigenpräsentierenden Zellen oder Impfungen mit Peptiden Anwendung. Durch Impfung mit für das Pankreaskarzinom spezifischen Peptiden kann die Aktivierung von antigenspezifischen, antitumoralen T-Zellen induziert werden. Durch die Verabreichung von DCs wird die Antigenpräsentation an CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen verbessert und durch die Sekretion von Zytokinen wie IFN- $\gamma$ , TNF und IL-12 werden CTLs zusätzlich aktiviert (Mucciolo et al., 2020). Ein anderer Ansatz verfolgt den adoptiven Transfer von genetisch veränderten T-Zellen (CAR-T-Zellen). Autologe und allogene Tumor-infiltrierende T-Lymphozyten werden isoliert und *ex vivo* expandiert. Danach werden die isolierten T-Zellen genetisch verändert, um die Immunantwort der T-Zellen zu verbessern. Sie exprimieren dann einen chimerischen Antigenrezeptor (CAR), der spezifisch das Tumorantigen erkennt. Anschließend werden sie wieder dem Patienten verabreicht, um so die antigenspezifische T-Zellantwort zu erhöhen (Sunami und Kleeff, 2019).

Bisherige Versuche Immuntherapien bei Pankreaskarzinom-Patienten anzuwenden bleiben in ihrem Erfolg limitiert. Neben der geringen Antigenität des Pankreaskarzinoms und der damit verbundenen reduzierten T-Zellantwort weist es auch noch eine verringerte Immunogenität auf. Pankreaskarzinome weisen ein hoch immunsuppressives Tumormilieu auf, welche die Tumorzellen vor der Immunantwort durch T-Zellen abschirmt. Durch dieses sogenannte Immunprivileg können die Tumorzellen der Immunantwort entkommen und begrenzen dadurch bisher die klinische Effektivität von Immuntherapien (Beatty und Gladney, 2015; Morrison et al., 2018).

### 1.4.3 Checkpoint-Inhibitoren

Der zurzeit erfolgreichste Ansatz in der Therapie von soliden Tumoren ist der Einsatz von Checkpoint-Inhibitoren. Hierbei binden Checkpoint-Inhibitoren an koinhibitorische Rezeptoren von intratumoralen T-Zellen, die T-Zellen im Rahmen intratumoraler Dysfunktion vermehrt exprimieren. So gewinnen die T-Zellen ihre zytotoxische Effektivität wieder. Zu den bekanntesten Zielmolekülen der Checkpoint-Inhibitoren gehören PD-1 und CTLA4 (Seidel et al., 2018). Die Expression von PD-L1 in Pankreaskarzinom tragenden Mäusen korreliert mit der Überlebensrate dieser. Und auch eine Behandlung mit anti-PD-L1 und anti-PD-1 reduzierte das Tumorwachstum in Versuchen mit Mäusen (Nomi et al., 2007). Während in Tumorarten, wie Melanom- oder Bronchialkarzinom, Checkpoint-Inhibitoren bereits klinisch erfolgreich angewendet werden waren in klinischen Studien zur Monotherapieansätzen mit Checkpointinhibitoren bei Pankreaskarzinompatienten keine Erfolge zu verzeichnen. (Kabacaoglu et al., 2018).

Lediglich bei einer Untergruppe von Pankreaskarzinompatienten ist der Einsatz von Checkpoint-Inhibitoren in Monotherapie effektiv (Henriksen, 2019). Der Erfolg ihres Einsatzes bei soliden Tumoren ist hiernach maßgeblich von der Mikrosatelliteninstabilität tumoraler DNA abhängig. Durch Fehlpaarungsreparatur (*mismatch repair*) während der DNA-Replikation wird die Länge von Mikrosatelliten verändert und erhöht so die Mutationsrate (Eso et al., 2020). Die Präsentation von mutationsbedingten Neoantigenen im MHC-Klasse-I-Kontext verstärkt so die antigenspezifische Immunantwort von zytotoxischen T-Zellen durch den T-Zell-Rezeptor. Es herrscht daher eine hohe Antigenität, was die Angriffspunkte einer Tumorummunantwort erhöht. Mit Hilfe eines Checkpoint-Inhibitors bleiben CTLs aktiviert und können ihre intratumoralen, zytotoxischen Effektormechanismen ausüben. Im Pankreaskarzinom hingegen ist die Antigenität, bedingt durch die fehlende Mikrosatelliteninstabilität, niedrig (Dudley et al., 2016). So ist das Pankreaskarzinom von den Folgen einer gerichteten T-Zell-Antwort geschützt. Da dies bereits zu einer lediglich geringen Effektivität von T-Zellen führt, bewirkt auch der Einsatz von Checkpoint-Inhibitoren keine Verbesserung der Immunantwort. Vor dem Hintergrund geringer Antigenität und geringer Immunogenität der Entität Pankreaskarzinom

werden aktuell eine Vielzahl an Kombinationstherapien getestet (Miller et al., 2020). Hierbei stehen immunstimulatorische Verfahren im Vordergrund. Um die Auswirkungen dieser kombinierten Versuchsansätze zu verstehen, ist es notwendig die Mechanismen und Regulation der intratumoralen T-Zell-Dysfunktion besser zu charakterisieren. Die vorliegende Arbeit untersucht hierbei die Mechanismen T-zellulärer Signaltransduktion der IL-1-Rezeptorfamilie in ihrer Bedeutung für die Induktion intratumoraler T-Zell-Dysfunktion.

## 2 Zielsetzung

CD8<sup>+</sup>T-Effektorzellen (CTLs) spielen bei der erfolgreichen Bekämpfung von Tumoren eine wichtige Rolle. Jedoch zeigen intratumorale CTLs eine dysfunktionale Immunantwort, die sich durch verringerte Effektorfunktionen und eine eingeschränkte Tumorabstoßung auszeichnen. In dieser Arbeit soll nun die Rolle der durch das NLRP3-Inflammasom prozessierte Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-18, sowie deren Rezeptor-Signaltransduktion für die Plastizität und Effektorfunktion von CTLs in einem murinen Pankreaskarzinommodell untersucht werden.

Dabei sollen folgende Fragestellungen beantwortet werden:

1. Welchen Einfluss hat die Signaltransduktion über den IL-1- und IL-18-Rezeptor auf die Plastizität und Zytotoxizität von CTLs *in vitro*?
2. Beeinflusst die Signaltransduktion über den T-zellulären IL-1- und IL-18-Rezeptor den dysfunktionalen Zustand von CTLs im murinen Pankreaskarzinommodell?
3. Beeinflussen die durch NLRP3 aktivierten Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-18 das Wachstumsverhalten von Pankreaskarzinomzellen?
4. Wie wirkt sich die NLRP3-Aktivierung in Zellen des Tumorstromas auf den dysfunktionalen Zustand von adoptiv transferierten und endogenen CTLs aus?

### 3 Materialien & Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Laborgeräte

Tabelle 1: Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
Autoklav DX-65	Systec the autoclave copmany (Linden, Deutschland)
Autoklav VX-65	Systec the autoclave copmany (Linden, Deutschland)
BD FACSAria™ II	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
BD FACSCanto™ II	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
Corning™ Lambda Plus Pipetten 0,5 -10 µl, 20-200 µl	Corning (Corning, USA)
Eisbereiter Scotsman AF80	Hubbard Ice Systems (Ipswich, UK)
Elektrophoresekammer	SERVA Elektrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Elektrophorese Power Supply EV261	Biotec Fischer GmbH (Reiskirchen, Deutschland)
Eppendorf-Pipetten, Discovery Comfort 10-100 µl, 100-1000 µl	Kinesis GmbH (Langenfeld, Deutschland)
EVOS FL Auto 2 Cell Imaging System	Invitrogen (Langenselbold, Deutschland)
Feinwaage BP 110S	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Fluorometer Qubit 2.0	Thermo Scientific Life Technologies (Dreieich, Germany)
Gelgießständer	Sigma aldrich (St. Louis, USA)
Handzähler 4-stellig	Veeder-Root (Connecticut, USA)
Heracell 240i CO2 Inkubator	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Herafreeze™ HFU T Series (- 80°C)	Heraeus (Hanau, Deutschland)
HiSeq® 2500 Sequencing System	Illumina (San Diego, USA)
Kühlschrank FKUv 1610 (4°C) Premium	Liebherr (Bulle, Schweiz)
Geldokumentationssystem GEL Jet Imager mit UV-Trasilluminator	Intas Science Imaging Instruments (Göttingen, Deutschland)
Lichtmikroskop Olympus IMT-2	Olympus Optical Co (Gerstetten, Deutschland)
Li-Cor Odyssey SA Imaging System	LI-COR Biosciences (Lincoln, USA)
Li-Cor Odyssey CLx Imaging System	LI-COR Biosciences (Lincoln, USA)

Gerät	Hersteller
Magnet MiniMACS™ Separator	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Magnet OctoMACS™ Separator	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
QuadroMACS™ Separator	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Magnetrührer MR2000	Heidolph Instruments GmbH & CO. KG (Schwabach, Deutschland)
Magnetständer MACS® Multistand	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Mehrkanalpipette (12-Kanal) 20-200µl	Witeg Labortechnik GmbH (Wertheim, Deutschland)
Megafuge 8	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Mikrowelle VIP20, 900W	Whirlpool (Benton Harbor, USA)
Multifuge 3SR+ centrifuge	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Multipette ® Plus	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Multiskan™ FC Mikrotiterplatten-Photometer	Thermo Scientific, Life Technologies (Dreieich, Deutschland)
Nanodrop 1000 Spektrophotometer	peqlab Biotechnologie (Erlangen, Deutschland)
NovaSeq 6000 Sequencing System	Illumina (San Diego, USA)
Orbital Shaker-Incubator ES-20	Grant Bio (Shepreth, England)
pH-Meter EL20	Mettler-Toledo (Columbus, USA)
Pipetboy acu Integra	INTEGRA Biosciences AG (Zizers, Schweiz)
Schieblehre 16FN	Mahr (Göttingen, Deutschland)
SDS-Page/Blottingkammer	C. B. S. Scientific Co. (San Diego, USA)
SDS-Page/Blotting-Gerät	Peqlab Biotechnologies GmbH (Erlangen, Deutschland)
Sicherheitswerkbank Msc advantage 1.2	Thermo Scientific Life Technologies (Dreieich, Germany)
Stratagene Mx3005P	Thermo Scientific Life Technologies (Dreieich, Germany)
ThermoCell Mixing Block MB-102	BIOER (Hangzhou, China)
Thermocycler T100	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Tiefkühlschrank (-20°C)	Liebherr (Bulle, Schweiz)
Tiefkühlschrank (-80°C) Hera Freeze	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Tierohrlochzange Typ I	LabArt (Waldbüttelbrunn, Deutschland)
Tischkühlzentrifuge Mikro 200 R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG (Tuttlingen, Deutschland)

Gerät	Hersteller
Vortexer REAX 2000	Heidolph Instruments GmbH & CO. KG (Schwabach, Deutschland)
Waage Scout Pro 4000g	OHAUS (Parsippany, USA)
Wasserbad 1002 und 1083	GFL (Burgwedel, Deutschland)
Zählkammer Neubauer improved 0,0025 mm <sup>2</sup> , 0,1mm	Plan Optik AG (Elsoff, Deutschland)

### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Kryo-Röhrchen Cryo.s™ 2 mL	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Combitips advanced (2 - 10 mL)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Combitips plus (2,5 und 10 mL)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Röhre, 5mL, PP	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
Mikrotestplatte 96 Well, R	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
MACS MS-Column	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
MACS LS-Column	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Parafilm „M“ Laboratory Film	Pechiney Plastic Packaging (Chicago, USA)
TC-Schale 60	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
Einmal-Kapillarpipetten, 1 µl	Hirschmann (Eberstadt, Deutschland)
Enthaarungscreme	Veet (Slough, England)
Flaschen und Bechergläser	Duran Group GmbH (Wertheim/Main, Germany)
Pipettenspitzen 10, 200 und 1000 µl	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
Safeseal Reagiergefäße 0,5, 1,5 und 2 mL	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
PP-Röhrchen 15 und 50 mL	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
Einmal-Injektions-Kanüle 27 G Sterican®	Braun (Melsungen, Deutschland)

Produkt	Hersteller
Zellsieb; 30 µm Porengröße	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Skalpell CUTFIX	Braun (Melsungen, Deutschland)
Einmalspritze Tuberkulin 1mL	Braun (Melsungen, Deutschland)
Einmalspritze, 10 mL	Braun (Melsungen, Deutschland)
Einmal-Injektions-Kanüle 26 G Sterican®	Braun (Melsungen, Deutschland)
Einmal-Injektions-Kanüle 20 G Sterican®	Braun (Melsungen, Deutschland)
Multiply-Pro Gefäß, 0,2 mL, PP	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
Kulturplatten 6-, 12-, 24- & 96-Loch CELLSTAR®	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhäusen, Deutschland)
Handschuhe Nitril Skin M	Semperit Technische Produkte Gesellschaft m.b.H., Segment Sempermed (Wien, Österreich)
TC Flaschen T25, T75	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
TC Flaschen T75 für Suspensionszellen	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)

### 3.1.3 Software

Tabelle 3: Software

Produkt	Hersteller
Adobe Illustrator 2020	Adobe Systems (San José, USA)
Endnote (X)	Adept Scientific (Frankfurt, Deutschland)
FACS Diva (8.0.1)	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
Fiji OpenSource Software	National Institutes of Health (Bethesda, USA)
FlowJo (Version 10)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
GraphPad Prism 8	GraphPad Software (La Jolla, USA)
GSEA	Broad Institute of MIT and Harvard (Cambridge, USA Subramanian et al., 2005)
ImageJ 1.52v	National Institutes of Health (Bethesda, USA)
Image Studio Lite Version 5.2	LI-COR Biosciences (Lincoln, USA)
Microsoft Office 2019	Microsoft (Redmond, USA)

Microsoft Windows 10	Microsoft (Redmond, USA)
R Studio (Team)	RStudio (Boston, USA)

### 3.1.4 Reagenzien und Chemikalien

Tabelle 4: Reagenzien und Chemikalien

Reagenz/ Chemikalie	Hersteller
1,2-Bis(dimethylamino)ethane (TEMED)	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Acrylamide (Rothiphorese® Gel 30)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Agarose Standard	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Ammonium persulfate (APS)	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Aqua dest.	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma aldrich (St. Louis, USA)
Brefeldin A	Sigma aldrich (St. Louis, USA)
Bromphenolblau	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Collagenase D	Roche (Basel, Schweiz)
Dithiothreitol (DTT)	Serva electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)
DMSO	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
DNase I, rekombinant	Roche (Basel, Schweiz)
dNTP Mix (10 mM)	Thermo Scientific, Life Technologies (Dreieich, Deutschland)
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-tetraessigsäure (EGTA)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Ethanol absolut (100%)	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Glycin Pufferan	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
HD-Green+ DNA Stain	Intas (Göttingen, Deutschland)
Heparin	Ratiopharm (Ulm, Deutschland)
Isopropanol	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO <sub>3</sub> )	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

Reagenz/ Chemikalie	Hersteller
Methanol $\geq 99,8\%$	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Milchpulver blotting grade, fettarm	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumchlorid	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Natriumpyrophosphat ( $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ )	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Oligo(dT)15 Primer	Promega (Madison, USA)
Polymerase (GoTaq® G2 DNA Polymerase)	Promega (Fitchburg, USA)
Ponceau S	Sigma aldrich (St. Louis, USA)
Sodium dodecyl sulfate (SDS) ultra pure	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
TAE-Puffer (10x)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Tris (alkaline)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Tris-Hydrochlorid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Triton-x-100 pure	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Trypanblau (0,4%)	Thermo Scientific, Life Technologies (Dreieich, Deutschland)
Tween 20	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)

### 3.1.5 Nährmedien, Zusätze, Puffer und Lösungen

#### 3.1.5.1 Nährmedien, und Zusätze

Tabelle 5: Nährmedien und Zusätze

Produkt	Hersteller
4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
2-Merkaptoethanol	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Dulbecco's modified eagle's Medium	Thermo Scientific, Life Technologies (Dreieich, Deutschland)
Fetal Calf Serum (FCS)	Thermo Scientific Life Technologies (Dreieich, Deutschland)
G418 disulfate salt solution	Sigma aldrich (St. Louis, USA)
Hank's Salt Solution (HBSS) mit 0,35 g/L $\text{NaHCO}_3$	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)

Produkt	Hersteller
Ionomycin, Calcium Salz von <i>Streptomyces conglobatus</i>	Sigma aldrich (St. Louis, USA)
Lipopolysaccharide (LPS <i>E.coli</i> 0127:B8)	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Mytomycin C (MMC)	Santa Cruz (Heidelberg, Deutschland)
Natriumpyruvat 100 mM (100x)	Thermo Scientific Life Technologies (Dreieich, Deutschland)
OVA <sup>257-264</sup> Peptid (SIINFEKL)	Invivogen (San Diego, USA)
Penicillin-Streptomycin (5.000 U/mL)	Thermo Scientific, Life Technologies (Dreieich, Deutschland)
Phosphate buffered saline (PBS)	Thermo Scientific, Life Technologies (Dreieich, Deutschland)
Phorbol 12-myristate 13-acetat (PMA)	Sigma aldrich (St. Louis, USA)
Rekombinantes IL-1 $\beta$ , murin (IL-1 $\beta$ )	Peptotech (London, England)
Rekombinantes Interleukin-2, murin (IL-2)	Peptotech (London, England)
Rekombinantes IL-12, murin (IL-12)	Peptotech (London, England)
Rekombinantes IL-18, human (hIL-18)	BioVision (Milpitas, USA)
Rekombinantes IL-18, murin (IL-18)	Thermo Scientific, Life Technologies (Dreieich, Deutschland)
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 + L-Glutamin	Thermo Scientific, Life Technologies (Dreieich, Deutschland)
Trypsin-EDTA (0,5%, 10x)	Thermo Scientific, Life Technologies (Dreieich, Deutschland)

### 3.1.5.2 Puffer, Lösungen und Nährmedien

Tabelle 6: Puffer, Lösungen und Nährmedien

Puffer/Lösungen/Medien	Zusammensetzung
Blottingpuffer	25 mM Tris, 0,1 % SDS, 1,5 % Glycin, 20 % Methanol in H <sub>2</sub> O
BSA-Lösung (3 %)	1,5 g Milchpulver + 50 mL TBST
Denaturierungs-Puffer	25 mM NaOH, 0,2 mM disodium EDTA in H <sub>2</sub> O (pH 8,7)
Erylysepuffer	155 mM NH <sub>4</sub> Cl, 10 mM KCO <sub>3</sub> , 0,1 mM EDTA in H <sub>2</sub> O lösen (pH 7,3)
FACS-Puffer	3% FCS in PBS
Magermilchlösung (5 %)	2,5 g Milchpulver + 50 mL TBST
MACS-Puffer	0.5 % BSA, 2 mM EDTA (pH 8.0) in PBS

<b>Puffer/Lösungen/Medien</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Tumorzellmedium	DMEM + 10 % FCS + 2% Penicillin-Streptomycin
Neutralisierungspuffer	40 mM Tris-HCl in H <sub>2</sub> O (pH 5)
SDS-Probenpuffer (5x)	200 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA (pH 8,0), 1 M Saccharose, 1 mM DTT, 2 % SDS, 0,1 % Bromphenolblau in H <sub>2</sub> O
Phosphatase-Inhibitor	10 mM NaF, 1 mM Na-Orthovanadat,, 25 mM $\beta$ -Glycerophosphat 10 mM Na-Pyrophosphat 750 nM Okadasäure
Protease-Inhibitor	1 $\mu$ M Aprotinin, 1 mM Pefabloc 2,5 $\mu$ M Sojabohnen-Trypsininhibitor, 2,1 $\mu$ M Leupeptin
RIPA-Puffer	1 % Triton-X-100, 1 % Natrium-deoxycholat, 0,2 % SDS, 150 mM NaCl, 50 mM Tris, 20 mM EGTA in H <sub>2</sub> O (pH 7,2)
RPMI-Vollmedium	RPMI + 10 % FCS + 3 % HEPES + 2 % Penicillin-Streptomycin + 2 % Natriumpyruvat + 0,1 % 2-Merkaptoethanol
SDS-Laufpuffer	50mM Tris-HCl, 500 mM Glycin, 0,1 % SDS
TBS	10 mM Tris HCl, 150 mM NaCl in H <sub>2</sub> O (pH 7,4)
TBS-T (1x)	10 mM Tris HCl, 150 mM NaCl in H <sub>2</sub> O (pH 7,4) + 1 mL Tween-20/ L
Tumorlysepuffer	3 mg/mL Collagenase D, 100 U/mL DnaseI in HBSS

### 3.1.6 Antikörper

Tabelle 7: Antikörper

<b>Farbe</b>	<b>Reaktivität</b>	<b>Klasse</b>	<b>Klon</b>	<b>Antigen</b>	<b>Art.Nr.</b>	<b>Anwendung</b>
	Human, Maus, Ratte		L34F12	Erk 1/2	CST 4696	Western Blot
	Human, Maus			GAPDH	Rockland: 600-401- A33	Western Blot

Farbe	Reaktivität	Klasse	Klon	Antigen	Art.Nr.	Anwendung
	Kanninchen			Kanninchen IgG	CST: 7071-1	Western Blot
	Maus			Maus IgG		Western Blot
	Human, Maus, Ratte	IgG1	Clone 27	p38	BD: 612168	Western Blot
	Human, Maus, Ratte			p-Erk 1/2T <sup>202</sup> /Y <sup>204</sup>	CST: 4370	Western Blot
	Human, Maus, Ratte	IgG		p-p38	CST: 9211	Western Blot
Alexa Fluor 488®	Ratte	IgG2a	Dan11 mag	Eomes	53487582	FACS
Alexa Fluor 488®	Maus	IgG1	XMG1.2	IFN- $\gamma$	505813	FACS
Alexa Fluor 488®	Ratte	IgG1	RTK2071	Isotyp	400417	FACS
APC	Maus	IgG2a	RM4-5	CD4	100516	FACS
APC	Maus	IgG2a	53-6.7	CD8a	100712	FACS
APC	Maus	IgG	N418	CD11c	117310	FACS
APC	Maus	IgG1	PC61	CD25	102012	FACS
APC	Maus	IgG2a	104	CD45.2	109814	FACS
APC	Maus	IgG1	B8.2C12	CD366	134008	FACS
APC	Armenischer Hamster	IgG	HTK888	Isotyp	400912	FACS
APC	Maus	IgG2a	MOPC- 173	Isotyp	400219	FACS
APC	Ratte	IgG1	RTK2071	Isotyp	400411	FACS
APC	Ratte	IgG2a	RTK2758	Isotyp	400511	FACS
APC/ Cy7	Maus	IgG2a	53-6.7	CD8a	100713	FACS
APC/ Cy7	Maus	IgG1	PC61	CD25	102025	FACS
APC/ Cy7	Maus	IgG2a	MEL-14	CD62L	104428	FACS

Farbe	Reaktivität	Klasse	Klon	Antigen	Art.Nr.	Anwendung
APC/ Cy7	Maus	IgG2b	M5/114.1 5.2	I-A/I-E	107628	FACS
APC/ Cy7	Ratte	IgG1	RTK2071	Isotyp	400422	FACS
APC/ Cy7	Ratte	IgG2a	RTK2758	Isotyp	400524	FACS
APC/C y7	Ratte	IgG2b	RTK4530	Isotyp	400624	FACS
APC/C y7	Maus	IgG1	MP6- XT22	TNF $\alpha$	506344	FACS
FITC	Maus	IgG2a	RM4-5	CD4	100510	FACS
FITC	Maus	IgG2a	53-6.7	CD8a	100706	FACS
FITC	Maus	IgG	N418	CD11c	117306	FACS
FITC	Maus	IgG2b	IM7	CD44	103006	FACS
FITC	Maus	IgG2a	104	CD45.2	109806	FACS
FITC	Maus	IgG1	Michel- 19	CD83	121506	FACS
FITC	Maus	IgG2a	BM8	F4/80	123108	FACS
FITC	Armenischer Hamster	IgG2a	HTK888	Isotyp	400906	FACS
FITC	Maus	IgG2a	MOPC- 173	Isotyp	400207	FACS
FITC	Ratte	IgG1	RTK2071	Isotyp	400406	FACS
FITC	Ratte	IgG2a	RTK2758	Isotyp	400505	FACS
FITC	Ratte	IgG2b	RTK4530	Isotyp	400605	FACS
FITC	Maus	IgG2a	B20.1	TCR V $\alpha$ 2	127806	FACS
eFluor 660	Maus/human	IgG2a	TXRX10	TOX	50-6502- 82	FACS
PB	Maus	IgG2a	53-6.7	CD8a	558106	FACS
PB	Maus	IgG2a	104	CD45.2	109820	FACS
PB	Maus	IgG	16-10A1	CD80	104724	FACS
PB	Maus/human	IgG1	GB11	Gran- zyne B	515408	FACS
PB	Armenischer Hamster	IgG	HTK888	Isotyp	400925	FACS

Farbe	Reaktivität	Klasse	Klon	Antigen	Art.Nr.	Anwendung
PB	Maus	IgG1	MOPC-21	Isotyp	400151	FACS
PB	Maus	IgG2a	MOPC-173	Isotyp	400235	FACS
PB	Ratte	IgG2a	R35-95	Isotyp	558109	FACS
PE	Maus	IgG2a	RM4-5	CD4	100512	FACS
PE	Maus	IgG2a	53-6.7	CD8a	100707	FACS
PE	Maus	IgG	H1.2F3	CD69	104508	FACS
PE	Maus	IgG2b	PO3	CD86	105106	FACS
PE	Maus	IgG2a	1D4B	CD107a	121612	FACS
PE	Maus	IgG2b	RMP1-30	CD279	109104	FACS
PE	Maus	IgG2a	BM8	F4/80	123110	FACS
PE	Armenischer Hamster	IgG	HTK888	Isotyp	400908	FACS
PE	Maus	IgG1	MOPC-21	Isotyp	400114	FACS
PE	Maus	IgG2a	MOPC-173	Isotyp	400211	FACS
PE	Maus	IgG2b	MG2b-57	Isotyp	401208	FACS
PE	Ratte	IgG2a	RTK2758	Isotyp	400507	FACS
PE	Ratte	IgG2b	RTK4530	Isotyp	400608	FACS
PE	Maus	IgG1	MP6-XT22	TNF $\alpha$	506306	FACS
PE/Cy7	Maus	IgG1	m2B4 (B6)458.1	2B4	133512	FACS
PE/Cy7	Maus	IgG2a	53-6.7	CD8a	100721	FACS
PE/Cy7	Maus	IgG1	XMG1.2	IFN- $\gamma$	505826	FACS
PE/Cy7	Armenischer Hamster	IgG	HTK888	Isotyp	400921	FACS
PE/Cy7	Ratte	IgG2a	RTK2758	Isotyp	400521	FACS
PE/Cy7	Maus	IgG1	4B10	T-bet	644824	FACS
PerCP	Maus	IgG2a	53-6.7	CD8a	100731	FACS
PerCP	Ratte	IgG2a	RTK2758	Isotyp	400529	FACS

Farbe	Reaktivität	Klasse	Klon	Antigen	Art.Nr.	Anwendung
PerCP/ Cy5.5	Maus	IgG2a	53-6.7	CD8a	100733	FACS
PerCP/ Cy5.5	Maus	IgG2a	104	CD45.2	45-0454- 80	FACS
PerCP/ Cy5.5	Ratte	IgG2a	RTK2758	Isotyp	400532	FACS

Alle FACS-Antikörper wurden bei BioLegend (San Diego, USA) bezogen. Lediglich Eomes in Alexa Fluor 488 und TOX in eFluor 660 stammen von Invitrogen (Carlsbad, USA).

### 3.1.7 Kits

Tabelle 8: Kits

Reagenz/ Kit	Hersteller
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
BD Cytotfix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilisation Kit	BD (San Jose, USA)
CD4/CD8 (TIL) MicroBeads, mouse	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
CD11c MicroBeads UltraPure mouse	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
CFSE	Biologend (San Diego, USA)
eBioscience™ Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set	Thermo Scientific Life Technologies (Dreieich, Germany)
IL-1β mouse uncoated ELISA Kit	Invitrogen (Carlsbad, USA)
NEBNext® Ultra™ RNA Library Prep Kit for Illumina	New England Biolabs (Ipswich, USA)
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific Life Technologies (Dreieich, Germany)
ProtoScript® II Reverse Transcriptase	New England Biolabs (Ipswich, USA)
QuantiTect SYBR® Green PCR Kit	Qiagen (Hilden, Detschland)
RNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden, Detschland)
SMART-Seq® v4 Ultra® Low Input RNA Kit for Sequencing	Takara Bio Inc (Kusatsu, Japan)
Tag-it Violet™ Proliferation and Cell Tracking Dye	Biologend (San Diego, USA)

## 3.1.8 Zelllinien

Tabelle 9: Zelllinien

Zelllinie	Abstammung	Medium
Panc02	Murines, Methylcholanthren-induziertes Pankreaskarzinom (Corbett et al., 1984)	Tumorzellmedium
PancOVA	Panc02-Zellen, welche stabil mit Ovalbumin transfiziert wurden (Jacobs et al., 2011)	Tumorzellmedium + 500 mg/L G418
Panc1-eGFP	Humanes, duktales Pancreaskarzinom mit einem GFP exprimierenden Leervektor	Tumorzellmedium
T11 0299	Pankreaskarzinomzellen aus einer KPC-Maus (Düwell et al., 2014)	Tumorzellmedium

## 3.1.9 Mauslinien

Tabelle 10: Mauslinien

Stamm	Beschreibung	Herkunft	Haltung
C57BL/6	-	Institut für medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Universität Marburg	Institut für medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Universität Marburg
C57BL/6 Ly5.1	Kongener Marker CD45.1	Institut für medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Universität Marburg	Klinik für Gastroenterologie, Endokrinologie, Infektiologie und Stoffwechsel, Universität Marburg
OT-I	Transgener OVA-spezifischer T-Zell-Rezeptor auf CD8 <sup>+</sup> Zellen mit C57BL/6 Hintergrund	Institut für medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Universität Marburg	Klinik für Gastroenterologie, Endokrinologie, Infektiologie und Stoffwechsel, Universität Marburg
OT-I <i>Il1r<sup>-/-</sup></i>	OT-I-Maus mit IL-1R1- Defizienz	Klinik für Gastroenterologie, Endokrinologie,	Klinik für Gastroenterologie, Endokrinologie,

Stamm	Beschreibung	Herkunft	Haltung
		Infektiologie und Stoffwechsel, Universität Marburg	Infektiologie und Stoffwechsel, Universität Marburg
OT-I <i>Il18r<sup>-/-</sup></i>	OT-I-Maus mit IL-18R- Defizienz	Klinik für Gastroenterologie, Endokrinologie, Infektiologie und Stoffwechsel, Universität Marburg	Klinik für Gastroenterologie, Endokrinologie, Infektiologie und Stoffwechsel, Universität Marburg
<i>Nlrp3<sup>-/-</sup></i>	NLRP3-defiziente C57BL/6-Maus	Abteilung für klinische Pharmakologie, Medizinische Klinik und Poliklinik IV, LMU München	Klinik für Gastroenterologie, Endokrinologie, Infektiologie und Stoffwechsel, Universität Marburg

Alle Tiere wurden an der Philipps-Universität Marburg, in der tierexperimentellen Einrichtung des Fachbereichs Medizin gehalten. Die Versuchstiere wurden dabei unter SPF-Bedingungen (SPF = spezifisch pathogenfrei) und in IVC-Haltung (IVC = engl. *individually ventilated cage*), bei einem 12 Stunden Hell-Dunkel-Zyklus mit  $22 \pm 2$  °C und mit Standardfutter und Trinkwasser *ad libitum* gehalten. Zum Zeitpunkt der Verwendung waren die Tiere mindestens 6 Wochen alt. Die Tierversuche wurden durch das Regierungspräsidium Gießen (AZ: G78/2016) genehmigt und nach den Ethikvorschriften von Helsinki durchgeführt.

### 3.1.10 Primer

Tabelle 11: Primer Genotypisierung

Name	Sequenz	Hersteller
<i>Il18r</i> WT	5'-ACA GAG GCG AGA ACA AGC AC-3'	biomers.net (Ulm, Deutschland)
WT/ <i>Il18r</i> common	5'-TCA GAT TTC CCC TGG AAC TG-3'	biomers.net (Ulm, Deutschland)
<i>Il18r</i> mutant	5'-CTC GTG CTT TAC GGT ATC GC-3'	biomers.net (Ulm, Deutschland)

WT/ <i>Il1r</i> <sup>-/-</sup> forw	5'-GGT GCA ACT TCA TAG AGA GAT GA-3'	biomers.net (Ulm, Deutschland)
<i>Il18r</i> <sup>-/-</sup> rev	5'-TTC TGT GCA TGC TGG AAA AC-3'	biomers.net (Ulm, Deutschland)
Nlrp3 common	5'-GCTCAGGACATACGTCTGGA-3'	biomers.net (Ulm, Deutschland)
Nlrp3 wild-type	5'-TGAGGTCCACATCTTCAAGG-3'	biomers.net (Ulm, Deutschland)
Nlrp3 mutant	5'-TTGTAGTTGCCGTCGTCCTT-3'	biomers.net (Ulm, Deutschland)

Tabelle 12: Primer qRT-PCR

Name	Artikelnummer	Hersteller
<i>Nlrp3</i>	QT00029771	Qiagen (Hilden, Deutschland)
<i>Il1a</i>	QT00001127	Qiagen (Hilden, Deutschland)
<i>Il18</i>	QT00014560	Qiagen (Hilden, Deutschland)
<i>Il1r</i>	QT00081263	Qiagen (Hilden, Deutschland)
<i>Il18r</i>	QT00082922	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Xs13	QT00224539	Qiagen (Hilden, Deutschland)

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellkultur

#### 3.2.1.1 Kultivieren und Passagieren von Zelllinien

Alle verwendeten Zelllinien wurden in DMEM, das mit 10 % FCS und 2 % Penicillin-Streptomycin (im Folgenden als Tumorzellmedium bezeichnet) kultiviert. Zelllinien, die stabil mit Ovalbumin transfiziert waren erhielten zusätzlich 500 mg/L G418 als Selektionsmittel in die Kultur. Die Zellen wurden in T75-Flaschen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Mediumwechsel erfolgte alle 3-4 Tage. Bei einer Konfluenz von 80-90 % wurden die Zellen gesplittet. Dafür wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für fünf

Minuten in 1xTrypsin-EDTA bei 37°C inkubiert. Das Trypsin wurde durch FCS-haltiges Tumorzellmedium abgestoppt, die Zellsuspension fünf Minuten bei 400 x g zentrifugiert, das Zellpellet in frisches Medium aufgenommen und die Zellen wurden ihrer Wachstumsgeschwindigkeit entsprechend in neuen T75-Flaschen ausgesät.

#### 3.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden Zellen wie unter 3.2.1.1 beschrieben geerntet und für fünf Minuten bei 400 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in Einfriermedium (DMEM +10 % FCS + 10 % DMSO) aufgenommen, resuspendiert und in Kryoröhrchen aliquotiert. Die Kryogefäße wurden anschließend in einem Mr. Frosty-Gefrierbehälter platziert und für 24 Stunden bei -80 °C gelagert. Anschließend erfolgte die Überführung auf Flüssigstickstoff.

Um Zellen aufzutauen wurden die Kryoröhrchen aus dem Flüssigstickstoff entnommen und im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Anschließend erfolgte das Aussäen in T75-Flaschen in bereits vorgewärmten Tumorzellmedium. Am nächsten Tag folgte ein Mediumwechsel.

#### 3.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Um die Zellzahl einer Zellsuspension zu bestimmen wurden 10 µL der Zellsuspension entnommen in einer adäquaten Menge Trypanblau verdünnt. 10 µL der Verdünnung wurden auf eine Neubauer Zählkammer aufgetragen und die Zellen innerhalb der vier Quadranten gezählt. Anhand des Kammerfaktors von  $10^4/\text{mL}$  konnte die Zellzahl errechnet werden.

#### 3.2.1.4 Isolation und Differenzierung von cytotoxischen T-Zellen

Für die Gewinnung von naiven T-Zellen wurden aus einer Maus Milz, sowie zervikale, mesenteriale, renale und lumbale Lymphknoten, sowie die Lymphknoten aus dem

Bauchfell isoliert und durch ein 30 µm Zellsieb homogenisiert. Nach 5-minütiger Lyse der Erythrozyten in Erylsepuffer wurde die Zellsuspension mit RPMI-Vollmedium gewaschen und gezählt. Anschließend wurde die Zellzahl auf  $4 \times 10^7$  Zellen/mL eingestellt und mit 5 µM des OVA-Peptids 257-264 für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen abermals gewaschen und die Zellzahl wurde mit RPMI-Vollmedium auf  $2 \times 10^6$  Zellen/mL eingestellt. Die Zellen wurden dann in einer T75-Flasche in T-Zell-Medium ausgesät und mit 10 ng/mL IL-12 versehen. Die Zellen wurden für 48 Std bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Alle zwei Tage erfolgte ein Mediumwechsel mit der Zugabe von 20 ng/mL IL-2. Nach vier bis sechs Tagen Differenzierung wurden die T-Effektorzellen mittels FACS und der Expression der Oberflächenmarker CD25, CD44, CD62L und CD69 charakterisiert. Nach phänotypischer Charakterisierung der Ausreifung zu Effektor-T-Zellen wurden die CTLs für weiterführende Versuche verwendet.

#### 3.2.1.5 Isolation und Differenzierung von CD11c<sup>+</sup> DCs

Zur Gewinnung von DCs wurden Lymphknoten und Milz einer Maus entnommen und wie unter 3.2.1.4 beschrieben isoliert. Danach wurden die Zellen nach den Herstellerangaben von Miltenyi Biotech mittels MACS-Kit behandelt. In diesem System werden CD11c<sup>+</sup>-Zellen durch die Verwendung von α-Biotin gekoppelten Antikörpern gegen CD11c gewonnen. Durch ein darauffolgendes Markieren mit magnetischen anti-Biotin *microbeads* bleiben die gewünschten CD11c<sup>+</sup>-Zellen beim Durchlauf der MACS-Säulen im magnetischen Feld hängen, wohingegen nicht markierte Zellen durch die Säule wandern und verworfen werden können. Je  $10^8$  Zellen wurden 100 µL CD11c<sup>+</sup> *MicroBeads UltraPure* zugegeben, durch vortexen gemischt und für zehn Minuten bei 4 °C inkubiert. Es folgte ein Waschschrift für zehn Minuten in MACS-Puffer bei 300 x g. Anschließend wurden die Zellen in 500 µL MACS-Puffer aufgenommen und auf eine MS-Säule in einem magnetischen Feld beladen. Die CD11c<sup>+</sup>-Fraktion blieb beim Durchlaufen der Säule haften und wurden mittels Stempel außerhalb des magnetischen Feldes aus der Säule gewonnen. Die Reinheit wurde am Durchflusszytometer kontrolliert.

Zur Differenzierung wurden  $1 \times 10^6$  Zellen/mL in je 3 mL einer 6-Loch-Platte ausgesät und über Nacht mit 10 ng/mL LPS bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

### 3.2.1.6 Messung der Migrationsgeschwindigkeit

Um den Einfluss von IL-1 $\beta$  und IL-18 auf die Migrationsgeschwindigkeit von Panc1, Panc02 und T11-Zellen zu messen wurde mit Hilfe von zeitaufgelöster Mikroskopie die zweidimensionale Migration gemessen.

Die Tumorzellen wurden in 12-Lochplatten so in Tumorzellmedium ausgesät, dass sie am nächsten Tag nahezu 100 % Konfluenz erreicht haben. Zu Beginn wurden die Zellen für eine Stunde mit 0,5  $\mu$ g/mL Mitomycin C behandelt um ihre Proliferation zu hemmen. Anschließend wurden mit einer 200  $\mu$ L Pipettenspitze zwei senkrechte Wunden in den Zellrasen gekratzt und die abgelösten Zellen durch Waschen mit PBS entfernt. Die Zellen wurden wieder mit Tumorzellmedium bedeckt und 10 ng/mL IL-1 $\beta$  oder IL-18 behandelt. Mittels *EVOS FL Auto 2 Cell Imaging System* wurden für 48 Stunden alle drei Stunden automatisch Bilder von mindestens vier Messpunkten pro Loch gemacht. In der anschließenden Analyse der Bilder in *ImageJ Fiji* wurde die Migrationsgeschwindigkeit in  $\mu$ m/h bis 18 Stunden berechnet. Zum besseren Vergleich wurden die Werte der Zelllinien jeweils auf die Ergebnisse ohne Zytokinbehandlung normalisiert.

### 3.2.2 Durchflusszytometrie und Durchflusszytometrie basierende Assays

Mit Hilfe von Durchflusszytometrie können heterogene Zellpopulationen durch den Einsatz von Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gleichzeitig auf eine Vielzahl von Markern untersucht werden.

Einzelne Zellen passieren einen Laserstrahl. Die Lichtemission wird vom Durchflusszytometer als Streuung und Fluoreszenzintensität gemessen und kann Informationen über Größe der Zellen, Lebensfähigkeit und Fluoreszenz markierte Epitope geben. Zur Vermeidung von spektralen Überschneidungen wurden die Färbungen anhand von Isotypfärbungen und Einzelfärbungen kompensiert. Die

Messungen wurden am FACS Canto II oder FACS Aria II mit Hilfe von FACS Diva (8.0.2.) durchgeführt und mit FlowJo analysiert.

### 3.2.2.1 Oberflächenfärbung

Oberflächenfärbungen fanden ohne Fixieren der Zellen statt. Zellen wurden mit FACS-Puffer gewaschen und für zehn Minuten mit anti-Maus CD16/32 die Fc-Rezeptoren geblockt. Nach einem weiteren Waschschriff mit FACS-Puffer wurden die murinen Zellen für 30 Minuten bei 4 °C mit den entsprechenden Antikörpern in FACS-Puffer gefärbt, nochmals mit FACS-Puffer gewaschen und konnten im Durchflusszytometer analysiert werden.

### 3.2.2.2 Restimulation und intrazelluläre Färbung von Zytokinen und Transkriptionsfaktoren

Als Hinweis auf die Zytotoxizität von zytotoxischen T-Zellen dient die Produktion von antitumoralen Zytokinen wie IFN- $\gamma$  und TNF. Um diese nachzuweisen wurden Kokulturen mit anschließender intrazellulären Zytokinfärbung durchgeführt.

Für den Assay wurden als antigenpräsentierende Zellen DCs aus einer Ly5.1 Maus verwendet und für eine Stunde mit 5  $\mu$ M OVA<sup>257-264</sup> beladen. Im nächsten Schritt wurden DCs und CTLs im Verhältnis 10:1 gemischt und in konischen 96-Loch-Platten ausgesät. Für einen engen Kontakt zwischen APCs und CTLs wurden die Platten für eine Minute bei 1000 rpm zentrifugiert. Die Zellen wurden über Nacht bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Am nächsten Tag wurde für eine Stunde 1  $\mu$ g/mL Brefeldin A zur Kultur gegeben.

Die Oberflächenfärbung erfolgte wie unter 3.2.2.1 beschrieben. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit der Fixation/Permeabilisation Lösung aus dem BD *Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilisation Kit* für 20 Minuten bei 4°C fixiert und permeabilisiert. Danach wurden die Zellen zwei Mal mit Permeabilisierungspuffer gewaschen, die intrazellulären Antikörper in diesem Puffer verdünnt und für 30 Minuten auf die Zellen gegeben. Es schlossen sich zwei weitere Waschschriffe mit

Permeabilisierungspuffer an. Zum Schluss wurden die Zellen in FACS-Puffer aufgenommen und im Durchflusszytometer gemessen.

Zur Analyse von Transkriptionsfaktoren wurden die Zellen nach der Oberflächenfärbung (siehe 3.2.2.1) mit PBS gewaschen und für 20 Minuten bei 4 °C mit der Fixierlösung aus den *Foxp3 Transkription Factor Fixation/Permeabilisation Kit* von Thermo Scientific Life Technologies fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen zwei Mal mit Permabilisierungspuffer gewaschen, die Antikörper wurden in Permabilisierungspuffer verdünnt und dann für 30 Minuten zum Färben auf die Zellen gegeben. Im Anschluss wurden die Zellen weitere zwei Mal mit Permeabilisierungspuffer gewaschen, in FACS-Puffer aufgenommen und im Durchflusszytometer analysiert.

### 3.2.2.3 Zellsortierung

*Fluorescence-activated cell sorting* (FACS) erlaubt die Sortierung von gewünschten Zellpopulationen anhand von populationspezifischen Oberflächenmarkern. Um transferierte zytotoxische T-Zellen *ex vivo* zu isolieren wurden Tumorzelllysate mit Hilfe der CD4/CD8 TIL Microbeads von Miltenyi Biotec nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die gewonnenen T-Zellen wurden wie unter 3.2.2.1 beschrieben auf CD8 und CD45.2 gefärbt. Die Sortierung erfolgte unter sterilen Bedingungen am Aria II. Dabei wurden CD45.2<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> und CD45.2<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen in separate Gefäße für anschließende RNA-Sequenzierung sortiert. Die Reinheit lag für gewöhnlich bei  $\geq 98\%$ .

### 3.2.2.4 Degranulationsassay

Zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen können antigenspezifisch Tumorzellen erkennen und töten. Dies geschieht hauptsächlich durch die Sekretion von granulären Partikeln, die bei Aktivierung mit der zytoplasmatischen Membran verschmelzen und dann an der Oberfläche exprimiert werden. Zu diesen lytischen Granula zählt unter anderem auch das Glycoprotein CD107a.

Als Marker für die Effektivität der *in vitro* generierten zytotoxischen T-Zellen wurde die CD107a-Expression von CTLs mittels Durchflusszytometrie gemessen. Dafür wurden ausdifferenzierte CTLs mit Splenozyten oder mit Splenozyten, welche vorher mit 5  $\mu\text{M}$  OVA<sup>257-264</sup> beladen worden waren, im Verhältnis 1:10 gemischt und in konische 96-Lochplatten pipettiert. Die Platte für den Zeitpunkt null Minuten wurde sofort auf Eis gelagert. Platten für fünf Minuten und zwanzig Minuten Inkubationszeit wurden mit Parafilm verschlossen und für fünf Minuten im 65 °C warmen Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Platten für eine Minute bei 1000 rpm zentrifugiert und die Platten der entsprechenden Inkubationszeit lang bei 37 °C inkubiert. Indem die Ansätze in Gefäße mit 4 mL FACS-Puffer pipettiert wurden wurde die Aktivierung abgestoppt. Das weitere Vorgehen erfolgte wie unter 3.2.2.1 beschrieben. Untersucht wurde die Expression von CD107a in CD8<sup>+</sup> CD45.2<sup>+</sup> Zellen.

#### 3.2.2.5 Phänotypisierung von OT-I-Mäusen

Drei Wochen alten Mäusen wurde aus der Schwanzvene Blut entnommen. Nach Erylyse der Blutproben durch Erylysepuffer wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und für 30 Minuten bei 4 °C mit Antikörpern gegen die Expression von CD8 und dem Ovalbumin erkennenden, transgenen T-Zell-Rezeptor V $\alpha$ 2 gefärbt. Nach nochmaligem Waschen erfolgte die Analyse im Durchflusszytometer.

#### 3.2.3 Tierversuche

Zur Untersuchung der antigenspezifischen, intratumoralen Immunantwort wurden  $1 \times 10^6$  Panc02 oder PancOVA-Tumorzellen in 100  $\mu\text{l}$  PBS *s.c.* in Empfängertiere injiziert. Bei einem adoptiven T-Zelltransfer wurden  $1 \times 10^6$  CTLs (Generierung siehe 3.2.1.4) in 100  $\mu\text{l}$  PBS sieben Tage nach Setzen der Tumore *i.p.* in die Tumore tragenden Mäuse gespritzt. Bei Untersuchungen zur Dysfunktion der adoptiv transferierten CTLs wurde das Experiment an Tag 10 beendet, um *ex vivo* Analysen durchzuführen. Wurden die Experimente für Wachstumskurven durchgeführt so wurden alle zwei Tage die Tumorgrößen bestimmt. Die Empfängertiere wurden aus dem Experiment genommen,

wenn der Tumor ein Volumen von 1,5 cm<sup>3</sup> erreicht hatte oder der Tumor komplett abgestoßen worden war.

Zur *ex vivo* Analyse der CTL-Dysfunktion wurden den Empfängertieren an Tag 10 Blut, Milz, Tumor und Tumor drainierender Lymphknoten entnommen. Die Tumore wurden in Tumorlysepuffer verdaut. Alle Proben wurden mit Erylysepuffer behandelt. Zur Herstellung von Einzelzellsupsensionen wurden Milz, Lymphknoten und Tumorlysate durch 30 µm Zellsiebe gefiltert.

Von Blut, Milz, Lymphknoten und den Tumorlysaten wurden Oberflächenfärbungen (siehe 3.2.2.1) auf Exhaustionmarker PD-1, TIM-3, LAG-3 und 2B4 durchgeführt. Zur Identifikation der transferierten CTLs wurde zwischen CD45.2<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> und den endogenen CD45.2<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> CTLs unterschieden.

Transkriptionsfaktoren wurden wie in 3.2.2.2 beschrieben in den Tumorlysaten gefärbt und analysiert.

Ein Teil des Tumorlysates wurde restimuliert. Dafür wurde wie unter 3.2.2.2 beschrieben eine Kokultur im Verhältnis 1:2 mit Splenozyten aus einer Ly5.1 Maus angesetzt. Bei Restimulation von nicht-antigenspezifischen CTLs wurden diese mit 50 ng/mL PMA und 1 µg/mL Ionomycin restimuliert. Die Dauer der Kokultur betrug vier Stunden, unter ständiger Inkubation mit 5 µg/mL Brefeldin A. Anschließend erfolgte die intrazelluläre Färbung von Zytokinen.

Um die Zytokinproduktion von Tumoren zu bestimmen wurden PancOVA-Tumore sieben Tage nach Injektion entnommen, zerkleinert und gewogen. Je 50 mg Tumor wurde in 1 mL RPMI-Vollmedium aufgenommen und für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Überstände wurden abgenommen und für darauffolgende ELISAs bei -20 °C gelagert.

### 3.2.4 Molekularbiologische Methoden

#### 3.2.4.1 Genotypisierung der *Il18<sup>r/-</sup>*- und *Il1r<sup>r/-</sup>*-Mäuse

Um genomische DNA zu gewinnen wurden den zu genotypisierenden Mäusen 1-2 mm der Schwanzspitze entfernt und in 0,5 mL Reaktionsgefäße gegeben. 75 µL der Alkaline Lyse-Reagenz wurden hinzugegeben und für eine Stunde bei 95 °C auf einem Heizblock inkubiert. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß für drei Minuten auf Eis gestellt und die Reaktion mit 75 µL des Neutralisationsreagenz abgestoppt. Die Proben wurden bei -20 °C gelagert.

Zur Durchführung der PCR wurde folgender Reaktionsansatz für eine Probe hergestellt:

Tabelle 13: PCR-Ansatz zur Genotypisierung der *Il18<sup>r/-</sup>*- und *Il1r<sup>r/-</sup>*-Mäuse

Komponenten	Volumen (µL)
Aqua ad.	14,75
Puffer	05,00
5'Primer (10 µM)	01,25
3'Primer (10 µM)	01,25
dNTP-Mix (10 mM)	00,50
GoTaq-Polymerase	00,25
Probe	02,00
<b>Endvolumen</b>	<b>23,00</b>

Im Thermocycler wurde anschließend folgendes PCR-Programm durchgeführt:

Tabelle 14: Geräteeinstellung für PCR

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (s)	
1	94	120	
2	94	20	
3	65	15	-0,5 °C pro Zyklus
4	68	10	
5			Schritt 2-4 für 10 Zyklen wiederholen
6	94	15	
7	60	15	
8	72	10	
9			Schritt 6-8 für 28 Zyklen wiederholen

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (s)
10	72	120
11	10	∞

Nach der erfolgten PCR wurden die Proben mit je 1xProbenpuffer versehen. Um das amplifizierte PCR-Produkt der Größe nach aufzutrennen wurde ein 1 %-iges Agarose-Gel gegossen. Dafür wurde 0,7 g Agarose in 70 ml 1xTAE-Puffer resuspendiert und bei 900 W für 3 Min gelöst. Nach Abkühlen auf 50-60 °C wurde 1 µl des HD Green-Plus-Farbstoffes hinzugegeben und sofort in einen Gelschlitten mit Kamm gegossen. Nach dem Aushärten wurde das Gel in eine Gelkammer gegeben, welche mit 1xTAE-Laufpuffer gefüllt war. Die Geltaschen wurden mit Leiter und Proben befüllt. Die Banden wurden für 30 Minuten bei 120 V aufgetrennt. Für die Bildgebung wurde das Gel UV-Licht ausgesetzt.

#### 3.2.4.2 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Die RNA-Isolation aus Panc1-Zellen wurde mit Hilfe des *RNeasy Minit kits* (Qiagen) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die RNA-Konzentration wurde anschließend mit Hilfe des *Nanodrops 1000* bestimmt.

Um die Genexpressionen der Zellen zu analysieren musste die isolierte RNA mittels reversen Transkriptase in cDNA ungeschrieben werden. 1 µg RNA wurde in 11 µL RNase-freiem Wasser verdünnt. Es wurden 1 µL von 500 µg/mL an Oligo(dT)15 Primer und 1 µL an 10 mM dNTP-Mix hinzugegeben. Es folgte ein fünfminütiger Denaturierungsschritt bei 65 °C. Danach wurden zum Reaktionsansatz *5xProtoScript II reverse Transkriptase-Puffer* (NEB) und 5 mM DTT hinzugegeben und für zwei Minuten bei 25 °C inkubiert. Nach Zugabe von 1 µL *ProtoScript II reverser Transcriptase* (NEB) wurde der Reaktionsansatz für zehn Minuten bei 25 °C und anschließenden 50 Minuten bei 42 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch 15-minütiges Erhitzen bei 70 °C abgestoppt.

Nach der reversen Transkription von RNA in cDNA wurden die Proben durch quantitative Real Time PCR (qRT-PCR) analysiert. Dafür wurde das *QuantiTect SYBR*

*green PCR kit* (Qiagen) verwendet. Dabei interkaliert der Farbstoff *SYBR green* während der Amplifikation mit dem DNA-Doppelstrang, absorbiert dabei Licht bei 494 nm und emittiert Licht bei 521 nm. Nach jedem Amplifikationszyklus wird die Fluoreszenzintensität gemessen woraus die relative Menge der amplifizierten DNA in Echtzeit abgeleitet kann. Die Messung erfolgt ein einer 96-Lochplatte in Duplikaten. Der Ansatz pro Probe war wie folgt:

Tabelle 15: Zusammensetzung Mastermix der qPCR

Komponenten	Volumen (µL)
QuantiTect SYBR green PCR kit	12,5
10x QuantiTect primer assay	2,5
RNase-freies Wasser	9,0
cDNA	1,0
<b>Endvolumen</b>	<b>25,00</b>

Die Amplifikation der cDNA wurde mit *Stratagene Mx3005P qPCR System* (Agilent) mit folgendem Amplifikationsprogramm gemessen:

Tabelle 16: Geräteeinstellung für qPCR

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit
Denaturierung	95°C	15 Minuten
Amplifikation (40x)	94°C	30 Sekunden
	55°C	30 Sekunden
	72°C	30 Sekunden
Dissoziationskurve	95°C	1 Minute
	55°C	30 Sekunden
	55-95°C	

### 3.2.4.3 RNA-Sequenzierung

Die RNA-Sequenzierung dient zur Analyse des Transkriptoms und quantifiziert die Genexpression in einer Zelle. Die RNA-Sequenzierung wurde in einer Kooperation mit Dr. M. Klein vom Institut für Immunologie (AG Bopp/Schmitt) von der Universität Mainz durchgeführt. Wie unter 3.2.2.3 beschrieben wurden endogene und transferierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus tumortragenden Mäusen isoliert. Um mindestens  $5 \times 10^5$  Zellen zu

erhalten wurden beim Vergleich von WT und *Nlrp3*<sup>-/-</sup> CTLs Proben aus mehreren Mäusen vereinigt. RNA wurde nach Herstellerangaben mit dem *RNeasy Minit kit* (Qiagen) isoliert. Die RNA-Qualität wurde am *Bionalyzer 2100* mittels RNA 6000 Nanochip gemessen, die Quantität mit Hilfe eines *Qubit 2.0*-Fluorometers bestimmt. Mit 300 ng RNA wurden mit dem *NEB ultra RN library Prep kit für Illumina* Bibliotheken erstellt und die Sequenzierung an einem *HiSeq2500* an der Universität Mainz durchgeführt. Die RNA zur RNA-Sequenzierung für den Vergleich von WT und *Il18r*<sup>-/-</sup> CTLs wurde aus einzelnen Empfängertieren isoliert und wurde mit Hilfe des *SMART-Seq® v4 Ultra® Low Input RNA Kit for Sequencing* (Takara Bio Inc) in cDNA umgeschrieben und mit dem *NEB ultra RN library Prep kit für Illumina* Bibliotheken erstellt. Die Sequenzierung erfolgte über die Firma Novogene (Peking, China) an einem *Illumina NovaSeq 6000*.

Zur Analyse der Genexpression wurden die erhaltenen Sequenzierungen an das Referenz-Genom der Maus (*Mus musculus* GRCm38) angepasst. Mit Hilfe von *STAR aligner* und ENSEMBL v76 wurden die Gennamen zugeordnet und die Genkarte erstellt.

Um die Unterschiede in der Genexpression darzustellen wurden Heatmaps mit Hilfe von R erstellt. Diese zeigen die farbcodierten z-Werte nach Clusteranalyse.

Eine Analyse der differentiellen Genexpression wurde durchgeführt, um die Unterschiede zwischen den Proben quantifizieren zu können. Dafür wurden die Expressionswerte der einzelnen Proben mit Hilfe von *Broad Institute's Gene set enrichment analysis* (GSEA) zwischen den einzelnen Gruppen miteinander verglichen. Zum einen wurden damit die Daten der Sequenzierungen mit Hilfe der *hallmark geneset collection* von MSigDB auf Unterschiede in der Genexpression untersucht. Zum anderen wurden publizierte Genlisten ausgesucht und in GSEA mit den Ergebnissen der Sequenzierung verglichen. Die zu untersuchenden Gene wurden anhand ihrer Unterschiede zwischen den Gruppen geordnet. Zudem wurde die Signifikanz und die *false discovery rate* (FDR) der Analyse berechnet.

### 3.2.5 Protein-biochemische Methoden

#### 3.2.5.1 Gewinnung von Zelllysaten und Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA

Vor der Zelllyse wurde RIPA-Puffer frisch angesetzt und mit Protease-Inhibitor und Phosphatase-Inhibitor versetzt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit einem Zellschaber in Lysepuffer abgeschabt. Die Zellen wurden im nächsten Schritt sieben Mal durch eine 26G-Kanüle aufgezogen und so homogenisiert. Es folgte ein zehnmütiger Zentrifugationsschritt bei  $16.000 \times g$  und  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  um den Zellschrott von proteinhaltigen Überstand zu trennen. Die Lysate wurden bis zur weiteren Analyse bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

Um gleiche Mengen an Protein bei der Immunoblotanalyse auftragen zu können muss zuerst die Gesamtproteinkonzentration in den Zelllysaten bestimmt werden. Diese wird mit Hilfe des *Biconchonic Acid protein assays* (BCA) ermittelt.

Das Proteinlysate wird 1:10 mit  $\text{H}_2\text{O}$  verdünnt, sowie verschiedenen Konzentrationen zwischen 0 und  $125 \text{ } \mu\text{g/mL}$  BSA-Lösung als Standardreihe zu je  $20 \text{ } \mu\text{L}$  in eine 96-Loch-Platte pipettiert. Anschließend werden zu je  $180 \text{ } \mu\text{L}$  BCA-Reagenz (1 Teil 4 % Kupfersulfat-Lösung, 50 Teile Bicinchoninsäure) hinzugegeben und für 30 Minuten bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  geschüttelt. Die optische Dichte wird bei  $583 \text{ nm}$  gemessen und mittels Standardkurve anhand einer linearen Funktion die Proteinkonzentration bestimmt.

#### 3.2.5.2 Immunoblotanalyse

Zunächst werden die zu untersuchenden Proben in SDS-Probenpuffer aufgenommen und für fünf Minuten bei  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  erhitzt um die Proteine zu denaturieren. Für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurden wie folgt 10 % oder 12,5 %-ige Gele verwendet:

Tabelle 17: Zusammensetzung Polyacrylamidgele

	Sammelgel	Trenngel	
		40-130 kDa	20-100kDa
		10 %	12,5 %
30 % Acrylamid	190 µL	1300 µL	1625 µL
2 % Bisacrylamid	75 µL	500 µL	600 µL
3 M Tris-Hcl pH 8,8	-	500 µL	500 µL
1 M Tris-HCl pH 6,8	190 µL	-	-
10 % SDS	15 µL	40 µL	40 µL
60 % Saccharose	375 µL	-	-
H <sub>2</sub> O	650 µL	1600 µL	700 µL
TEMED	2 µL	4 µL	4 µL
10 % APS	20 µL	25 µL	25 µL

Das Trenngel wurde in einer Gießapparatur zwischen zwei Glasplatten gegossen und anschließend mit Wasser gesättigtem Isobutanol überschichtet, um eine gerade Trennschicht zu gewährleisten. Nach der Polymerisation wurde das Sammelgel auf das Trenngel geschichtet und die Kämme für die Proben gesetzt. Nach Polymerisation des Sammelgels wurden die Gele in die Laufkammer eingesetzt, die Kammer mit SDS-Laufpuffer befüllt und die Kämme gezogen.

In die Geltaschen wurden Proben mit einer Proteinmenge zwischen 30 µg und 50 µg, sowie ein Proteinmarker zur Bestimmung der Proteingrößen aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mit Hilfe eines elektrischen Feldes mit einer Spannung von 80 V bis 110 V.

Nach der Auftrennung der Proteine wurden diese mittels *wet-blotting*-Technik auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Transfer erfolgte für zwölf Stunden bei 120 V und 4 °C.

Nach dem Blotting-Prozess wurde die Membran für eine Minute mit Ponceau Rot-Lösung gefärbt, um die Blotting-Effizienz zu kontrollieren. Anschließend wurden freie Bindestellen der Membran mit einer 5 %-igen Magermilchlösung in TBS für eine Stunde blockiert. Danach wurde die Membran mit dem spezifischen primären Antikörper in 3 % BSA in TBS-T (1:1000), schüttelnd, bei 4 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran drei Mal mit TBS-T gewaschen bevor die Inkubation mit dem Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper erfolgte. Dieser wurde ebenfalls in 3 %

BSA in TBS-T gelöst (1:5000) und für eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wurde die Membran zwei Mal mit TBS-T und einmal mit TBS gewaschen. Die Detektion der Proteine erfolgte am *Odyssey Sa Infrared Imaging System* bzw. dem *Odyssey CLx Imaging System* (LI-COR).

### 3.2.5.3 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

Zum Nachweis der Zytokinproduktion von Tumorzellen *ex vivo* wurden *sandwich enzyme linked immunosorbent assays* (ELISA) durchgeführt. Dafür wurden Tumore sieben Tage nach Injektion aus Mäusen isoliert, gewogen und mit Hilfe eines Skalpell zerkleinert. Je 50 mg Tumor wurden dann in 1 mL RPMI-Vollmedium für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Der Überstand wurde abgenommen und bei -20 °C gelagert. Um zu messen wie viel IL-1 $\beta$  pro Gramm Tumor produziert wird wurde ein IL-1 $\beta$  ELISA nach Herstellerangaben durchgeführt.

### 3.2.6 Auswertung und Statistik

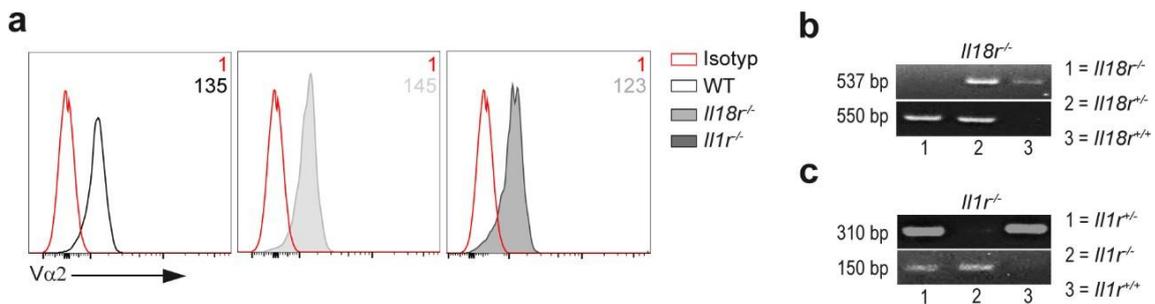
Die Graphen und die Statistik wurden mittels *Prism 8* (GraphPad Software; La Jolla, USA) erstellt. In den Graphen sind, wenn nicht anders ausgewiesen, der Mittelwert mit der dazugehörigen Standardabweichung dargestellt. Für die statistische Auswertung wurde beim Vergleich mehrerer Gruppen eine einfaktorielle ANOVA mit anschließender Tukey-Korrektur angewendet. Wurden lediglich zwei Gruppen miteinander verglichen wurde ein ungepaarter Students' t test angewendet. Als signifikant wurden p-Werte  $\leq 0,05$  erachtet (\*:  $p \leq 0,05$ , \*\*:  $p \leq 0,01$ , \*\*\*:  $p \leq 0,001$ , \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ ).

## 4 Ergebnisse

Dysfunktionale T-Zellen spielen bei der Bekämpfung von Pankreaskarzinomerkrankungen eine wichtige Rolle. Deshalb ist es von großer Bedeutung die Mechanismen zu verstehen die eine solche intratumorale T-Zell-Dysfunktion hervorrufen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die NLRP3 vermittelten Zytokinen IL-1 $\beta$  und IL-18 eine wichtige Rolle bei der T-Zell vermittelten Immunantwort von Viruserkrankungen spielen. Zieht man diese Erkenntnisse mit in Betracht haben wir die Rolle der NLRP3-vermittelten, T-zellulären IL-1- und IL-18-Rezeptor-Signaltransduktion bei der Induktion intratumoraler T-Zell-Dysfunktion untersucht. Es wurden Mauslinien generiert aus deren T-Zellen durch geeignete Peptidstimulation CD8<sup>+</sup> Effektor-CTLs generiert werden konnten, die einerseits das Modellantigen Ovalbumin 257-264 erkannten, andererseits Defekte im IL-1-Rezeptor, beziehungsweise IL-18-Rezeptor aufwiesen. Durch adoptiven T-Zell-Transfer dieser CTLs konnte die Plastizität von T-Zellen in Tumoren, die das Modellantigen OVA exprimieren, charakterisiert werden.

### 4.1 Etablierung der Zuchtlinien *Il18r<sup>-/-</sup>* OT-I und *Il1r<sup>-/-</sup>* OT-I

Es wurden drei Mauslinien mit einem transgenen T-Zell-Rezeptor, welcher das Peptid Ovalbumin 257-264 im MHC I Kontext erkennt, generiert. Alle Mäuse besitzen einen C57/BL6 Hintergrund. Neben OT-I-Tieren (WT) wurden *Il18r<sup>-/-</sup>* OT-I (*Il18r<sup>-/-</sup>*) und *Il1r<sup>-/-</sup>* OT-I (*Il1r<sup>-/-</sup>*) durch Kreuzung der Elternlinien generiert und gezüchtet. Alle drei Linien exprimieren phänotypisch den transgenen T-Zell-Rezeptor  $V\alpha 2$  auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 2a). Tiere die  $V\alpha 2$  exprimierten wurden auf die Deletion des IL-18-Rezeptors (Abb. 2b) und des IL-1-Rezeptors mit Hilfe von Genotypisierung überprüft. In den nachfolgenden Versuchen wurden nur Tiere mit einer homozygoten Rezeptordeletion verwendet.



**Abb. 2: Phäno- und Genotypisierung der generierten Zuchtlinien *Il18r*<sup>-/-</sup> OT-I und *Il1r*<sup>-/-</sup> OT-I.**

(A) CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus peripherem Blut von OT-I (WT), *Il18r*<sup>-/-</sup> OT-I (*Il18r*<sup>-/-</sup>) und *Il1r*<sup>-/-</sup> OT-I (*Il1r*<sup>-/-</sup>) Mäusen wurde mittels FACS-Analyse auf die Expression des transgenen T-Zell-Rezeptors Vα2 untersucht. (B, C) Nach Isolation von DNA aus Ohrstanzen wurden Genotypisierungen mittels PCR durchgeführt. Banden für das WT-Allel haben eine Länge von 538 bp und für das *Il18r*-Allel von 550 bp. In der IL-1-Rezeptor-Genotypisierung lief das WT Allel bei 310 bp und das *Il1r*-Allel bei 150 bp. Die gezeigten Ergebnisse stammen von WT-Tieren (B und C: Bahn 3), einer *Il18r* heterozygoten Maus (B: Bahn 2), einer *Il1r* heterozygoten Maus (C: Bahn 1) und von einer *Il18r* homozygot negativen (B: Bahn 1) und *Il1r* homozygot negativen Maus (C: Bahn 2).

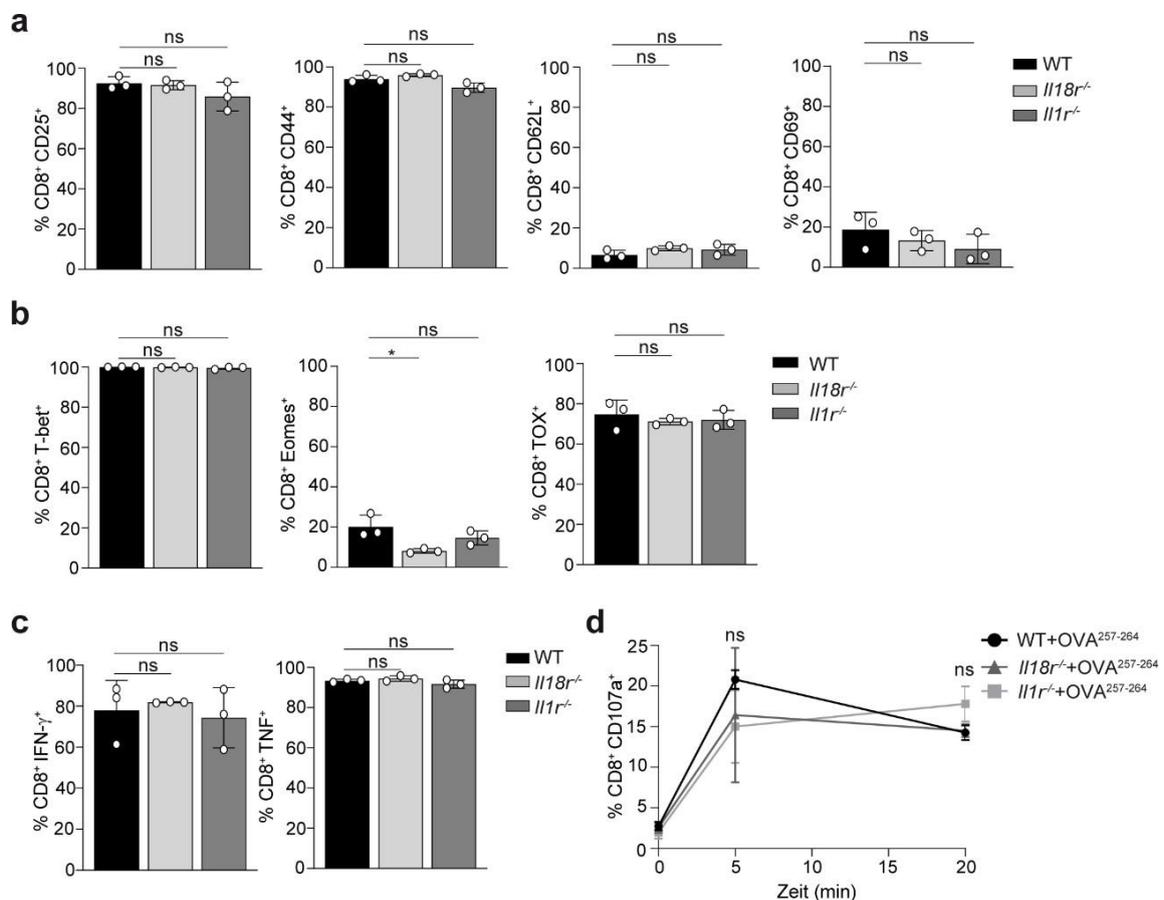
## 4.2 Die Rolle der IL-1- und IL-18-Rezeptor-Signaltransduktion in CTLs *in vitro*

### 4.2.1 Die IL-1- und IL-18-Rezeptor-Signaltransduktion beeinflusst nicht die Differenzierung zu CTLs *in vitro*

In den folgenden Experimenten soll mit Hilfe von IL-18- und IL-1-Rezeptor defizienten CTLs die Rolle ihrer Signaltransduktion auf das Phänomen der intratumoralen Dysfunktion von CTLs in Tumoren untersucht werden. Um sicherzustellen, dass es sich hierbei um ein intratumorales Ereignis handelt wurden die ausdifferenzierten CTLs vor dem adaptiven Transfer verglichen.

Isolierte Zellen aus Milz und Lymphknoten wurden nach Beladung mit ihrem kognaten Antigen OVA<sup>257-264</sup> für fünf Tage unter IL-12 und IL-2 Zugabe zu CTLs differenziert. CD8<sup>+</sup>-T-Zellen von WT, *Il18r*<sup>-/-</sup> und *Il1r*<sup>-/-</sup> zeigten nach fünf Tagen Differenzierung eine CTL-typische Hochregulation der Aktivierungsmarker CD25 und CD44 und eine verminderte Expression von CD62L und CD69 (Abb. 3a). Auch bei der Expression der Transkriptionsfaktoren Eomes, T-bet und TOX unterschieden sich die CTLs aus den drei Mauslinien nicht voneinander (Abb. 3b). Eine charakteristische Funktion von Effektorzellen ist die Freisetzung der Zytokine IFN-γ und TNF nach Stimulation mit ihrem kognaten Antigen. Nach Restimulation mit OVA<sup>257-264</sup> waren die CTLs aller drei

Mauslinien in der Lage IFN- $\gamma$  und TNF zu sezernieren und die Menge an sekretierten Zytokinen unterschied sich nicht signifikant voneinander (Abb. 3c). Als weiterer Parameter für die zytotoxische Funktion der T-Effektorzellen wurde ihre Fähigkeit zur Freisetzung zytotoxischer Granula untersucht. Dafür wurde zeitabhängig die Expression von CD107a nach Antigenpräsentation auf CD8<sup>+</sup>-T-Zellen gemessen (Abb. 3d). Bereits nach fünf Minuten Präsentation von OVA<sup>257-264</sup> exprimierten 15-20 % der WT, *Il18r<sup>-/-</sup>* und *Il1r<sup>-/-</sup>* CTLs CD107a. Das Fehlen des IL-18- und des IL-1-Rezeptors wirkt sich somit nicht auf die Differenzierung zu vollständig funktionellen, aktiv zytotoxischen CD8<sup>+</sup> Effektorzellen aus.



**Abb. 3: Die IL-1- und IL-18-Rezeptordefizienz beeinflusst nicht die Differenzierung zu antigenspezifischen CTLs.**

Ausdifferenzierte CTLs aus WT, *Il18r<sup>-/-</sup>* und *Il1r<sup>-/-</sup>* Mäusen wurden mittels Durchflusszytometrie auf (a) die Expression von CD25, CD44, CD62L und CD69 untersucht. (b) Expression der Transkriptionsfaktoren Eomes, T-bet und TOX (c) IFN- $\gamma$ - und TNF-Sekretion nach Restimulation durch mit OVA<sup>257-264</sup> beladene Splenozyten und (d) die OVA<sup>257-264</sup> induzierten, zeitabhängige CD107a-Expression untersucht. Es werden Mittelwerte und Standardabweichung (CTLs aus n = 3 Mäusen) dargestellt. Die Signifikanzen wurden mit einer einfaktoriellem ANOVA mit post-hoc Tukey-Test berechnet, wobei \*  $p < 0,05$  als signifikant und (ns)  $> 0,05$  als nicht signifikant angenommen wurde.

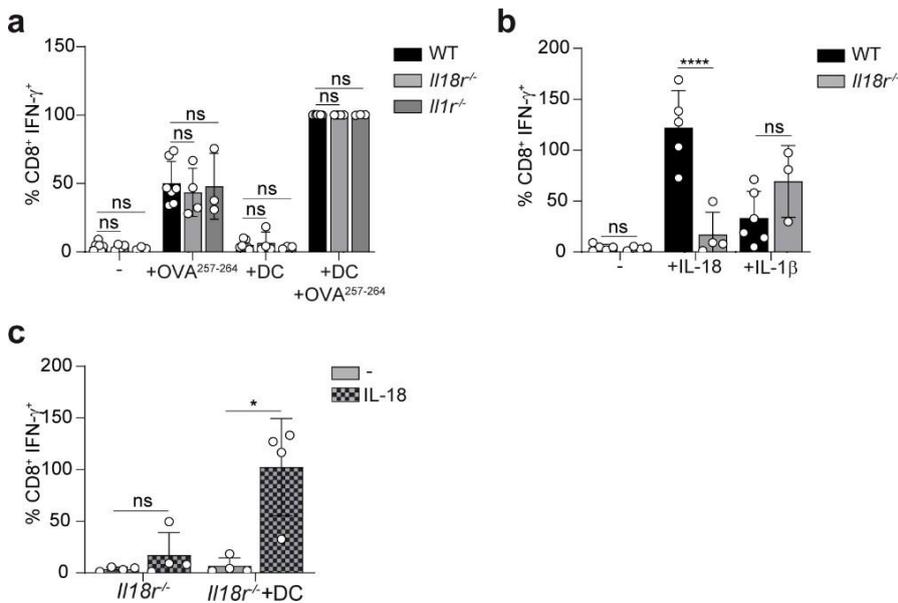
#### 4.2.2 IL-18 und IL-1 $\beta$ stimulieren die Zytotoxizität von CTLs über ihre Rezeptoren auf den Effektorzellen und indirekt über APCs

Um die Rolle der IL-18- und IL-1-Signaltransduktion *in vitro* zu untersuchen wurden WT, *Il18r<sup>-/-</sup>* und *Il1r<sup>-/-</sup>* CTLs *in vitro* mit DCs als antigenpräsentierende Zellen mit ihrem kognaten Antigen kokultiviert und ihre IFN- $\gamma$ -Produktion als Surrogatparameter ihrer Effektorfunktion gemessen. Zusätzlich wurden die Kokulturen mit mIL-18 oder mIL-1 $\beta$  kultiviert.

WT, *Il18r<sup>-/-</sup>* und *Il1r<sup>-/-</sup>* CTLs produzierten nur IFN- $\gamma$ , wenn sie mit ihrem kognaten Antigen OVA<sup>257-264</sup> stimuliert wurden. Dieser Effekt konnte gesteigert werden, wenn das Antigen über DCs präsentiert wurde. Die drei Mauslinien unterschieden sich dabei nicht in ihrer IFN- $\gamma$ -Produktion (Abb.4a).

Bei der Untersuchung von WT versus *Il18r<sup>-/-</sup>* CTLs ohne Kokultur mit DCs und fehlender OVA<sup>257-264</sup>-Stimulation zeigte sich, dass durch Hinzugabe von mIL-18 die IFN- $\gamma$ -Produktion in WT CTLs stark signifikant gegenüber den *Il18r<sup>-/-</sup>* CTLs gesteigert werden konnte (Abb. 4b). Da IL-18 auch als IFN- $\gamma$  induzierender Faktor bekannt ist war dieser Effekt zu erwarten (Okamura et al., 1995). mIL-1 $\beta$  steigerte sowohl in WT als auch in *Il18r<sup>-/-</sup>* CTLs die IFN- $\gamma$ -Produktion. Die Deletion des IL-18-Rezeptor wirkte sich dabei nicht signifikant auf die IFN- $\gamma$ -Produktion aus. Allerdings zeichnete sich ein Trend zur erhöhten IFN- $\gamma$ -Produktion der CTLs unter mIL-1 $\beta$ -Zugabe ab. Zur weiteren Charakterisierung der CTLs sollte der Einfluss von IL-18 auf DCs in Kokultur mit *Il18r<sup>-/-</sup>* CTLs untersucht werden (Abb. 4c). Hierfür wurden *Il18r<sup>-/-</sup>* CTLs mit und ohne DCs in An- und Abwesenheit von mIL-18 kultiviert. *Il18r<sup>-/-</sup>* CTLs produzierten nur in Anwesenheit von DCs unter Zugabe von IL-18 signifikant erhöhte Mengen an IFN- $\gamma$ . Da IL-18 alleine keinen Einfluss auf die CTLs hatte kann geschlussfolgert werden, dass die IFN- $\gamma$ -Produktion der CTLs über IL-18-Stimulation der DCs angeregt wurde.

IL-18 und IL-1 $\beta$  steigern die IFN- $\gamma$ -Produktion in CTLs in Antigen-abhängiger Weise. Zudem ist IL-18 in der Lage die IFN- $\gamma$ -Produktion von CTLs indirekt über antigenpräsentierenden Zellen, wie DCs, zu stimulieren.



**Abb. 4: IL-18-vermittelte Stimulation antigenpräsentierender DC bewirkt eine indirekte Steigerung der Zytotoxizität von CTLs *in vitro*.**

(a) Die IFN- $\gamma$ -Produktion von WT, *Il18r*<sup>-/-</sup> und *Il1r*<sup>-/-</sup> CTLs nach Inkubation mit OVA<sup>257-264</sup> beladenen LPS stimulierten DCs wurde gemessen. Die Werte wurden auf CTLs mit DCs + OVA<sup>257-264</sup> normalisiert. (b) Die IFN- $\gamma$ -Produktion von WT und *Il18r*<sup>-/-</sup> CTLs wurde unter Zugabe von 20 ng/mL mIL-18 oder 10 ng/ml mIL-1 $\beta$  untersucht. (c) Es wurde die IFN- $\gamma$ -Produktion von *Il18r*<sup>-/-</sup> CTL unter Zugabe von 20 ng/mL mIL-18 in An- und Abwesenheit von DCs verglichen. Die Werte wurden aus n = 3-6 unabhängigen Versuchen zusammengefasst. Alle Graphen stellen Mittelwerte und Standardabweichung dar. Für die statistische Auswertung wurde eine einfaktorielle ANOVA mit post-hoc Tukey-Test durchgeführt. \*\*\*\* p < 0,0001, \* p < 0,05 und nicht signifikant (ns) > 0,05.

#### 4.3 IL-18-Rezeptor-Signaltransduktion intratumoraler CD8<sup>+</sup> CTL reduziert die Zytotoxizität und hemmt die Tumorabstoßung

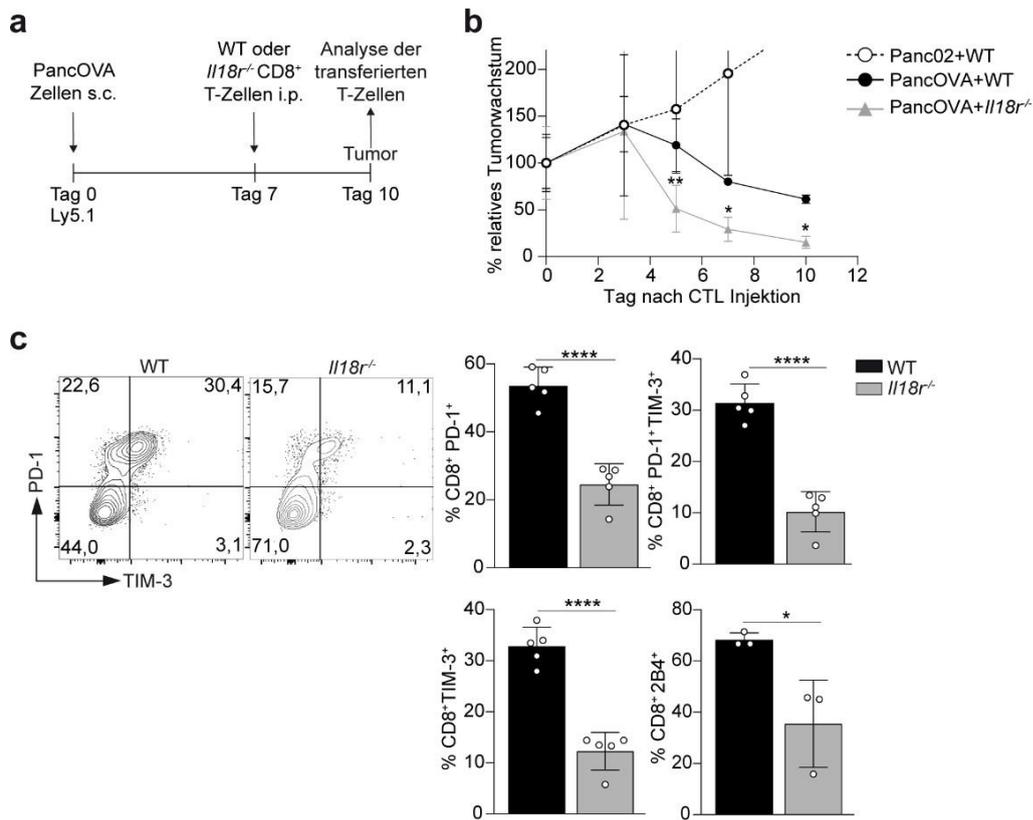
Zusammenfassend hat IL-18 einen direkt aktivierenden Effekt auf die Zytotoxizität von *in vitro* generierten CD8<sup>+</sup> CTL, wirkt also über T-zelluläre IL-18-Rezeptor-Signaltransduktion. Hiervon abzugrenzen sind indirekt aktivierende Effekte der Nlrp3-vermittelten Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-18 über das Tumormilieu. Hypothese der vorliegenden Arbeit ist, dass die aktivierenden Eigenschaften der T-zellulären IL-18-Rezeptor-Signaltransduktion in einer Situation konstanter T-Zell-Rezeptor-Aktivierung Mechanismen aktivieren die einen dysfunktionalen Zustand von CTLs unterstützen. Aus diesem Grund wurden in den folgenden Versuchen durch eine geeignete Anzahl an inokulierten Tumorzellen mit einer definierten Anzahl *ex vivo* generierten Modellantigen-reaktiver T-Zellen Bedingungen *in vivo* geschaffen, bei denen es zu keiner raschen und vollständigen Abstoßung der subkutan applizierten Tumore kommt.

Somit werden die intratumoralen T-Zellen mit einem stetig fortdauernden Antigenstimulus konfrontiert und können einen dysfunktionalen Phänotypen entwickeln.

#### 4.3.1 Intratumorales IL-18 führt zu einem dysfunktionalen Phänotyp in CTLs

Um die Rolle von intratumoraler IL-18-Signaltransduktion im Hinblick auf CD8<sup>+</sup>-Effektorzellfunktion zu untersuchen wurden in PancOVA-Tumor tragende Mäuse WT oder *Il18r<sup>-/-</sup>* CTLs injiziert und drei Tage nach Transfer in Tumorzellsuspensionen phänotypisch analysiert (Abb. 5a). Vergleicht man die durch WT oder durch *Il18r<sup>-/-</sup>* CTLs induzierte antigenspezifische Tumorabstoßung so zeigte sich, dass bei IL-18-Rezeptordefizienz die Tumore schneller abgestoßen wurden (Abb. 5b). Als Parameter der zytotoxischen Dysfunktion wurde zusätzlich die Expression koinhibitorischer Oberflächenmoleküle auf den transferierten CTLs bestimmt. Während transferierte WT CTLs ein hohes Maß an PD-1, TIM-3 sowie kombinierter PD-1/TIM-3 und 2B4-Expression zeigen sind diese auf *Il18r<sup>-/-</sup>* CTLs signifikant reduziert (Abb. 5c).

Zusammenfassend wird die antigenspezifische Tumorabstoßung durch IL-18-Rezeptor-Signaltransduktion in intratumoralen T-Zellen inhibiert. Dies ist mit der vermehrten Expression der koinhibitorischen Rezeptoren PD-1, TIM-3 und 2B4 auf der Oberfläche von adoptiv transferierten T-Zellen assoziiert.



**Abb. 5:** T-zelluläre IL-18-Rezeptor-Signaltransduktion in intratumoralen CD8<sup>+</sup> CTLs resultiert in reduzierter Potenz der Tumorabstoßung sowie einer verminderten Expression koinhibitorischer Moleküle.

(a) Schematische Darstellung des Experiments. PancOVA Zellen wurden s.c. implantiert. Sieben Tage später erfolgte der adoptive Transfer von WT bzw. *Il18r*<sup>-/-</sup> CTLs. An Tag 10 wurden die transferierten CD45.2<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen analysiert. (b) Es wurde eine Wachstumskurve von Panc02 und PancOVA-Tumoren nach adoptivem Transfer von WT oder *Il18r*<sup>-/-</sup> CTLs erstellt. Die Werte wurden an Tag 0 für jede Gruppe auf 100 % gesetzt und die folgenden Tage auf diese Werte normalisiert. Das Tumorstadium in (b) wurde mit n = 3 Mäusen pro Gruppe durchgeführt und steht repräsentativ für ein weiteres unabhängiges Experiment. (c) Die Expression der koinhibitorischen Rezeptoren PD-1, TIM-3 und 2B4 wurde mittels Durchflusszytometrie gemessen (n = 3). Alle Graphen stellen Mittelwerte mit Standardabweichung dar. In (b) wurde die statistische Auswertung mit einer einfaktoriellem ANOVA mit einem post-hoc-Tukey-Test und in (c) mit einem zweiseitigen, ungepaarten t-Test durchgeführt. \*\*\*\* p < 0,0001, \*\* p < 0,01, \* p < 0,05 und nicht signifikant (ns) > 0,5.

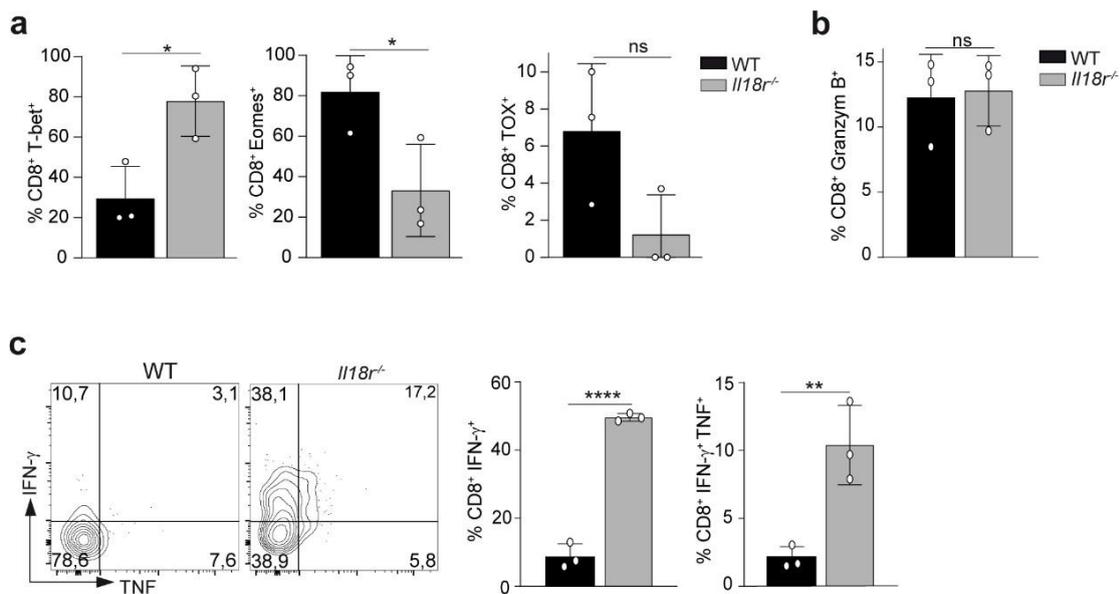
#### 4.3.2 Durch IL-18-Rezeptor-Signaltransduktion verlieren intratumorale CTLs ihre antitumorale Funktion

Dysfunktionale CTLs wurden zudem anhand der Expression von Transkriptionsfaktoren charakterisiert. Bekannt ist, dass dysfunktionale CTLs die Transkriptionsfaktoren Eomes und TOX hochregulieren aber kaum mehr T-bet exprimieren (McLane et al., 2019). Die Analyse der transferierten WT und *Il18r*<sup>-/-</sup> CTLs zeigte, dass *Il18r*<sup>-/-</sup> CTLs für aktive CTLs charakteristisch mehr T-bet exprimierten und

im Gegenzug dazu Eomes und TOX herabregulierten (Abb. 6a). Betrachtete man die Produktion von Granzym B so hatte die IL-18 Signaltransduktion keinen Einfluss auf die Fähigkeit zytotoxische Granula zu produzieren (Abb. 6b).

Neben der Expression von koinhibitorischer Rezeptoren ist ein Verlust der zytotoxischen T-Effektorzellfunktion charakteristisch für eine T-Zell-Dysfunktion (McLane et al., 2019). Nach Restimulation der transferierten CTLs mit OVA<sup>257-264</sup> waren die WT CTL, die intratumoralem IL-18 ausgesetzt waren, kaum mehr in der Lage IFN- $\gamma$  und TNF zu produzieren. *Il18*<sup>-/-</sup> CTLs hingegen hatten ihre zytotoxische Funktion behalten und produzierten signifikant mehr IFN- $\gamma$  und TNF (Abb. 6c).

Neben der Expression eines dysfunktionalen Phänotyps wirkt sich die IL-18-Rezeptor-Signaltransduktion auch auf die zytotoxische Funktion der intratumoralen CTLs aus.



**Abb. 6: IL-18-Rezeptor-Signaltransduktion in intratumoralen CD8<sup>+</sup> CTLs führt zum Verlust der zytotoxischen Funktion von T-Zellen.**

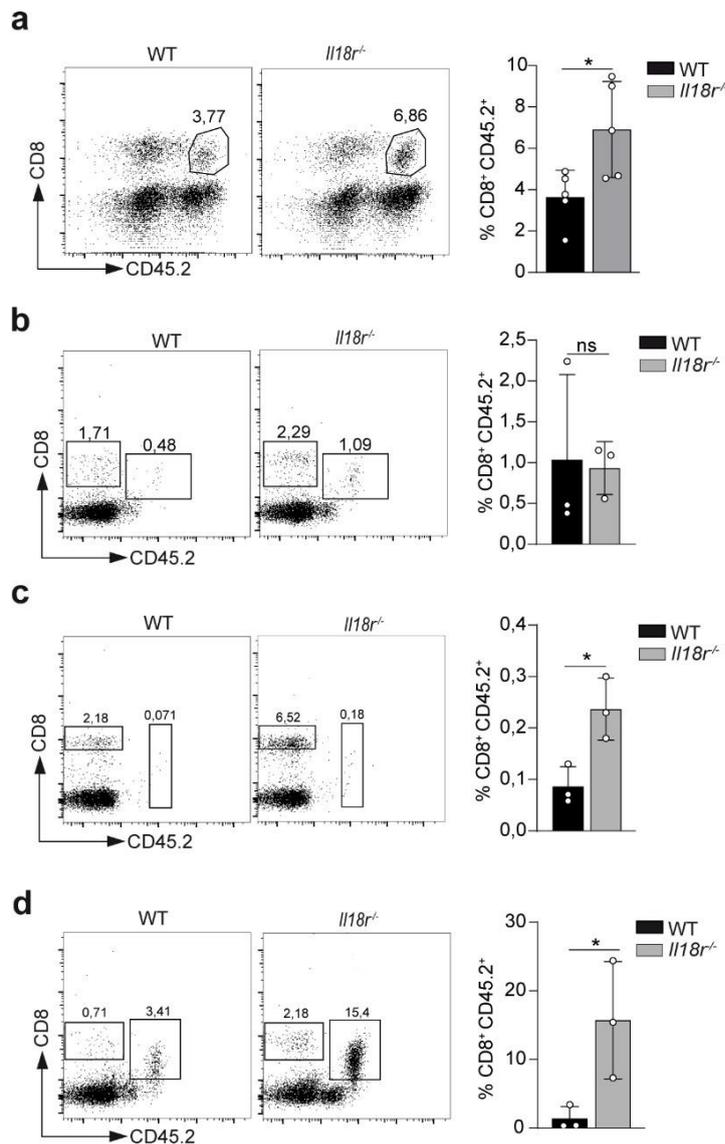
Die Experimente wurden wie in Abbildung 5a beschrieben durchgeführt. (a) Mittels durchflusszytometrischer Analyse wurde die Expression der Transkriptionsfaktoren T-bet, Eomes und TOX in transferierten WT und *Il18*<sup>-/-</sup> CTLs gemessen (n = 3). (b) Außerdem wurde die Granzym B-Produktion mit Hilfe von Durchflusszytometrie bestimmt (n = 3) (c) Die zytotoxische Kapazität der transferierten CTLs wurde anhand der IFN- $\gamma$ - und TNF-Produktion nach Restimulation mit OVA<sup>257-264</sup> bestimmt (n = 3). Alle Graphen stellen Mittelwerte mit Standardabweichung dar. Die statistische Auswertung wurde mit zweiseitigen, ungepaarten t-Tests durchgeführt. \*\*\*\* p < 0,0001, \*\* p < 0,01, \* p < 0,05 und nicht signifikant (ns) > 0,05.

#### 4.3.3 Die durch IL-18 induzierte T-Zell-Dysfunktion ist mit einer verringerten T-Zell-Proliferation und Tumordinfiltration assoziiert

Dysfunktionale T-Zellen zeichnen sich unter anderem durch eine verminderte Proliferation nach Antigenpräsentation aus (Wherry and Kurachi, 2015). Deshalb wurde vorerst die Infiltration und damit die zusammenhängende Proliferation von transferierten WT CTL und *Il18<sup>r/-</sup>* CTLs in lymphatischen Organen und PancOVA-Tumoren verglichen.

Die Infiltration von CTLs in die PancOVA-Tumore war bei *Il18<sup>r/-</sup>* CTLs im Vergleich zu WT CTLs stark erhöht (Abb. 7a). In der Milz war die Infiltration der transferierten CTLs gering, jedoch bei *Il18<sup>r/-</sup>* CTLs signifikant erhöht (Abb. 7b). Die Infiltration in die Tumordrainierenden Lymphknoten war gering und unterschied sich dabei nicht in WT und den *Il18<sup>r/-</sup>* CTLs (Abb. 7c). Bei Analyse der Anzahl an adoptiv transferierten T-Zellen im Blut zeigte sich, dass WT CTLs nur in geringer Zahl im Blut zu finden waren, wohingegen bei IL-18-Rezeptordefizienz eine stark erhöhte Zirkulation vorlag (7d). Diese CTL zirkulieren nach Kontakt mit ihrem kognaten Antigen im Tumor im Blut. Die erhöhte Zahl an *Il18<sup>r/-</sup>* CTLs lässt auf eine stärkere Proliferation schließen.

IL-18-Rezeptor-Signaltransduktion in CTLs hemmt die Infiltration und Proliferation in den lymphatischen Organen und ins Tumorstroma und deutet auf eine Beteiligung von IL-18 an dysfunktionalen CTLs hin.



**Abb. 7: Die durch die IL-18-Signaltransduktion erhöhte Dysfunktion spiegelt sich in einer verringerten Infiltration bzw. Proliferation in lymphatischen Organen.**

(a) Es wurde die Infiltration von CD45.2<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-T-Zellen aus WT oder *Il18r<sup>-/-</sup>*-Mäusen in PancOVA-Tumore gemessen. Außerdem wurde ihre Infiltration in (b) Milz, (c) Lymphknoten und (d) Blut mittels FACS analysiert. (n = 3). Alle Graphen stellen Mittelwerte und die dazugehörige Standardabweichung dar. Für die statistische Auswertung wurden zweiseitige, ungepaarte t-Tests angewandt. \* p < 0,05 und nicht signifikant (ns) > 0,05.

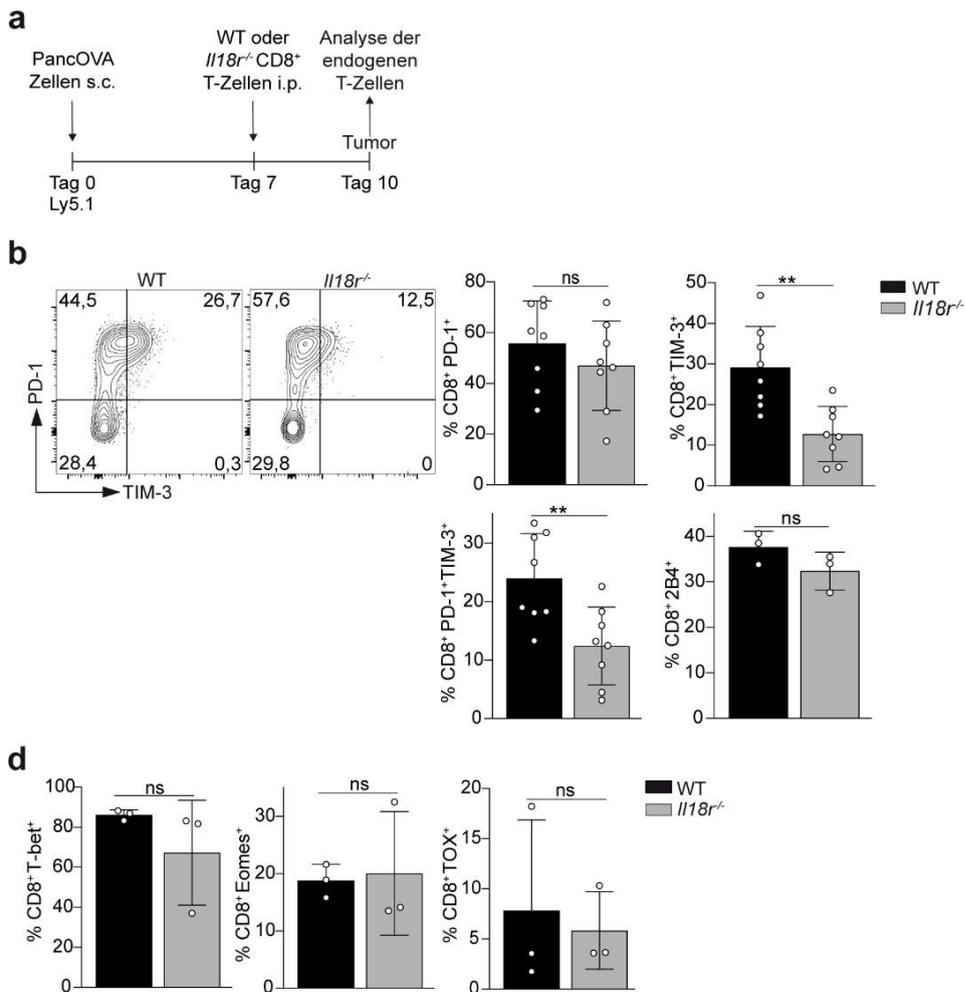
#### 4.3.4 Die Deletion von IL-18-Rezeptoren adoptiv transferierter CTLs disinhibiert die intratumorale Dysfunktion von endogenen CTLs

Die Deletion des IL-18 Rezeptors führte zu einer verstärkten Proliferation, zusammen mit einer erhöhten intratumoralen T-Effektorfunktion und schnelleren Tumorabstoßung. Neben den adoptiv transferierten CD8<sup>+</sup>CTLs findet sich in Tumoren selbstverständlich auch eine große Population endogener CD8<sup>+</sup>T-Zellen wieder. Im

Folgendes wurde untersucht, ob sich die verringerte T-Zell-Dysfunktion adoptiv transferierter *Il18r<sup>-/-</sup>* CTLs auf die endogene CD8<sup>+</sup> T-Zellpopulation auswirkt.

Dafür wurde der Versuch wie bereits unter 4.3.2 erläutert durchgeführt und an Tag 10 die endogene CD8<sup>+</sup>-T-Zellpopulation untersucht (siehe Schema, Abb. 8a). Es wurde die Expression der koinhibitorischen Rezeptoren PD-1, TIM-3 und 2B4 (Abb. 8b) gemessen. Hierbei zeigte sich eine verringerte Expression aller koinhibitorischer Rezeptoren in den endogenen T-Zellen jener Mäuse, denen *Il18r<sup>-/-</sup>* CTLs transferiert wurden. Die Expression von TIM-3, sowie die kombinierte Expression von PD-1/TIM-3 und von 2B4 war signifikant reduziert. Bei der Expression der Transkriptionsfaktoren T-bet, Eomes und TOX hingegen zeigte sich kein Unterschied zu endogenen T-Zellen mit transferierten WT CTLs (Abb. 8c).

Der Verlust der IL-18-Signaltransduktion und damit einhergehende erhaltene Effektorfunktion senkt auch die Dysfunktion des endogenen T-Zellvorkommens und unterstützt so zusätzlich die Tumorsuppression.



**Abb. 8: Die IL-18-Rezeptor-Defizienz in transferierten CTLs reduziert die intratumorale Dysfunktion endogener CTLs.**

(a) Schematische Darstellung des Experiments, analog zu Versuch 5. Es wurden endogene CD45.2<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>-T-Zellen nach adoptiven Transfer von WT oder *Il18r<sup>-/-</sup>* CTLs mittels Durchflusszytometrie analysiert. (b) Die Expression der koinhibitorischen Rezeptoren PD-1 und TIM-3 (n = 8), sowie 2B4 (n = 3), wurden gemessen (n = 8). (c) Außerdem wurde die Expression der Transkriptionsfaktoren Eomes, T-bet und TOX durchflusszytometrisch untersucht (n = 3). Alle Graphen stellen Mittelwerte mit Standardabweichung dar. Die statistische Auswertung wurde mit zweiseitigen, ungepaarten t-Tests durchgeführt. \*\*p < 0,01 und nicht signifikant (ns) > 0,05.

#### 4.3.5 Über den IL-18-Rezeptor vermittelte Signaltransduktion induziert Dysfunktion in intratumoralen CTLs über den IL-2/STAT5-Signalweg und verhindert die Entwicklung von *stemness-like memory* T-Zellen

Es konnte gezeigt werden, dass die IL-18-Rezeptor vermittelte Signaltransduktion in intratumoralen CTLs einen dysfunktionalen Zustand fördert. Zur Analyse der Genexpression der an der Dysfunktion beteiligten Signalwege wurde eine RNA-Sequenzierung durchgeführt.

Dafür wurde die Genexpression von jeweils vier adoptiv transferierten WT und *Il18r<sup>-/-</sup>* CTLs aus PancOVA-Tumoren gemessen. Hierbei zeigte sich, dass im Vergleich zu den WT CTLs in den *Il18r<sup>-/-</sup>* CTLs 3601 Gene herabreguliert und 1109 Gene hochreguliert wurden (Abb. 9a). Zum einen wurden die Sequenzierungsdaten mit der *hallmark genes set collection* von MSigDB abgeglichen. Zum anderen wurden die Daten auch mit publizierten Genlisten mit Hilfe von GSEA abgeglichen. Es wurde eine GSEA unter Verwendung publizierter Genlisten (Bengsch et al., 2018) zur Analyse der T-Zell-Dysfunktion durchgeführt (Abb. 9b). Dabei konnte, wie im *enrichment plot* dargestellt, eine signifikante Reduktion der mit T-Zell-Dysfunktion assoziierten Gene bei Deletion des IL-18-Rezeptors festgestellt werden. Als Marker für eine T-Zelldysfunktion waren beispielsweise *Pdcd1*, *Tigit* und *Eomes* in der Genliste enthalten. Alle drei Gene waren in den *Il18r<sup>-/-</sup>* CTLs im Vergleich zu den WT CTLs signifikant herabreguliert. Die Unterschiede bei *Pdcd1* und *Eomes* zeigen so auch auf RNA-Ebene die beobachteten Unterschiede bei der FACS-Analyse (siehe 4.3.1 und 4.3.2). Bei der Aktivierung der CTLs gab es keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Dafür wurde eine GSEA mit der Genliste von Szabo et al. (2019) durchgeführt. Die Analyse ergab einen FWER p-Wert von 0,114 bei einer FDR von 0,245 (Daten nicht gezeigt). Die verminderte T-Zell-Dysfunktion der *Il18r<sup>-/-</sup>* CTLs führt zur Bildung von *stemness-like memory* T-Zellen (Abb. 9c). Jansen et al. (2019) zeigte, dass die in der heatmap dargestellten Gene in *stemness-like memory* T-Zellen herabreguliert werden. Bis auf *Tox*, *Cd27* und *P2ry1* trifft dies bei den *Il18r<sup>-/-</sup>* CTLs zu. Bei den Genen die laut Jansen et al. (2019) während der Ausbildung von *stemness-like memory* T-Zellen verstärkt exprimiert werden waren bei unserer Sequenzierung lediglich die Expressionen bei *Lef1* und *Tcf7* in *Il18r<sup>-/-</sup>* CTLs im Vergleich zu WT CTLs signifikant erhöht (Abb. 9d). Bei der durch die IL-18-Rezeptor vermittelte Signaltransduktion induzierten T-Zell-Dysfunktion spielt unter anderem der IL-2/STAT5-Signalweg eine Rolle (Abb. 9e). Dies ergab der Abgleich der Sequenzierungsdaten mit der *hallmark genes set collection* von MSigDB (MSigDBv6.1). Die GSEA zeigte, dass durch die Deletion des IL-18-Rezeptors der IL-2/STAT-5-Signalweg signifikant inhibiert wurde. Die Unterschiede in der Genexpression waren bei *Tnfrsf11*, *Il2ra* und *Nfkbiz* am größten. Alle drei Gene waren in den *Il18r<sup>-/-</sup>* CTLs signifikant herabreguliert. Diese Daten deuten darauf hin, dass IL-18 unter anderem über den IL-2/STAT5-Signalweg T-Zell-Dysfunktion in intratumoralen CTLs induziert. Durch das

Fehlen des IL-18-Rezeptors sind intratumorale CTLs in der Lage einen dysfunktionalen Phänotyp zu vermeiden und zu *stemness-like memory* T-Zellen zu werden.

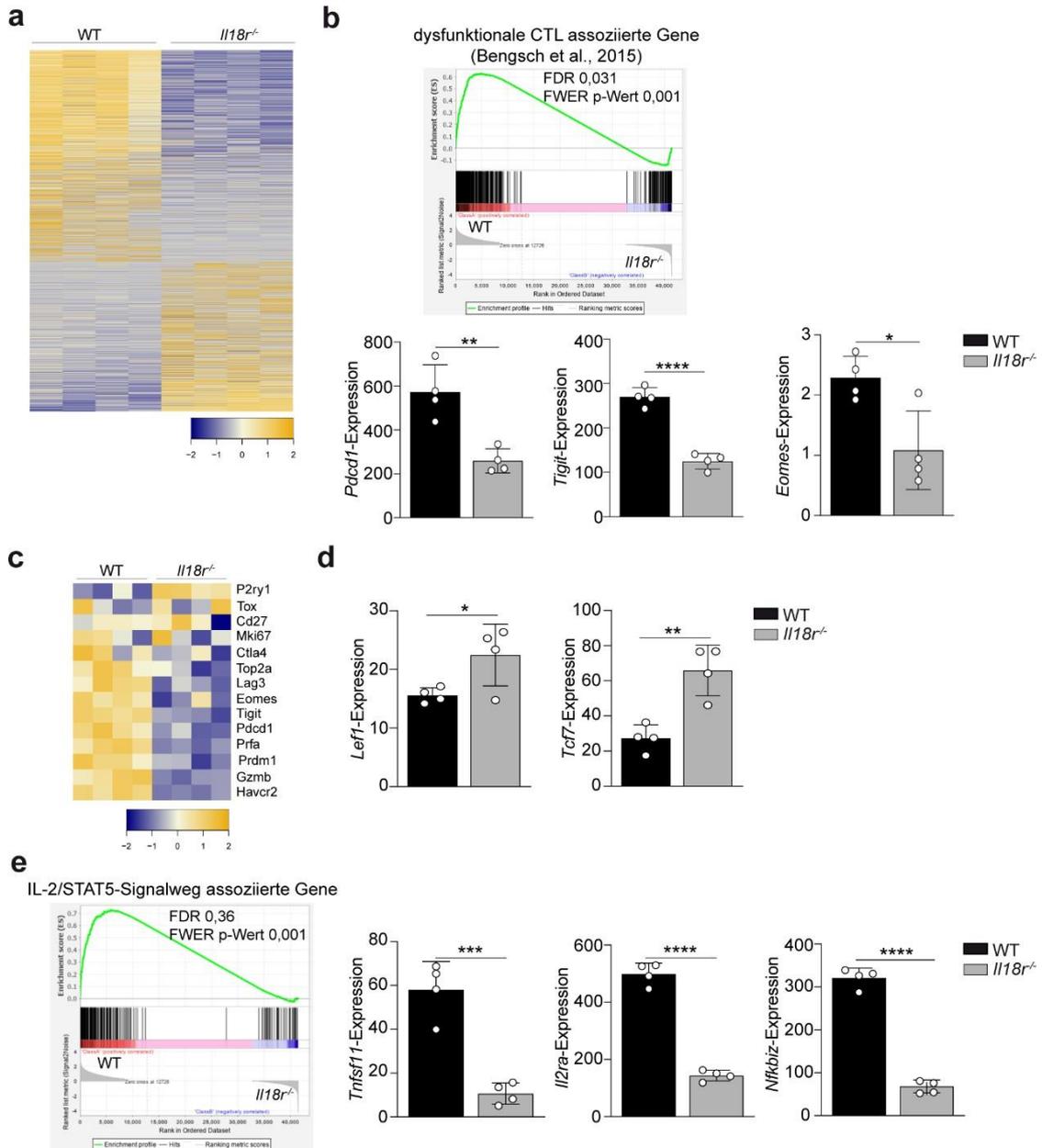


Abb. 9: IL-18-Rezeptor-Signaltransduktion in intratumoralen CTLs induziert eine dysfunktionale Gensignatur durch Aktivierung des IL-2/STAT5-Signalwegs

(a-d) Adoptiv transferierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus WT und *Il18r<sup>-/-</sup>* Tieren wurden aus PancOVA-Tumoren isoliert, RNA wurde isoliert und sequenziert (n = 4). (a) Die Heatmap zeigt farbkodierte z-Werte der differentiellen Genexpression nach Clusteranalyse mit einem fold change von > 1,5 und einer Differenz von mindestens 0,5. (b) Enrichment plot der GSEA, welche die Verteilung der relative Expression von Genen in WT und *Il18r<sup>-/-</sup>* CTLs aus PancOVA-Tumoren, die dysfunktionalen CTLs zugeordnet werden, untersucht. Der dysfunktionale Phänotyp wurde bei Bensch et al. (2018) beschrieben. Mit *Pdcd1*, *Tigit* und *Eomes* wurden beispielhaft Genexpressionen aus dieser Genliste gesondert dargestellt (c) Heatmap der Gene deren Herabregulierung von Jansen et al. (2019) *stemness-like memory* T-Zellen zugeordnet werden. (d) Die Expressionen von *Lef1* und *Tcf7* (e) Enrichment plot der GSEA, basierend auf MSigDBv6.1., welche Gene

vergleicht die dem IL-2/STAT5-Signalweg zugeordnet werden. Die Graphen zeigen mit *Tnfrsf1*, *Il2ra* und *Nfkbiz* die drei am stärksten regulierten Gene dieses Signalwegs. Alle Graphen in b bis d stellen Mittelwerte mit Standardabweichung dar. Die statistische Auswertung wurde mit zweiseitigen, ungepaarten t-Tests durchgeführt. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ .

#### 4.4 Defizienz der IL-1-Rezeptor-Signaltransduktion intratumoraler T-Zellen reduziert die T-Zell-Dysfunktion nur geringgradig

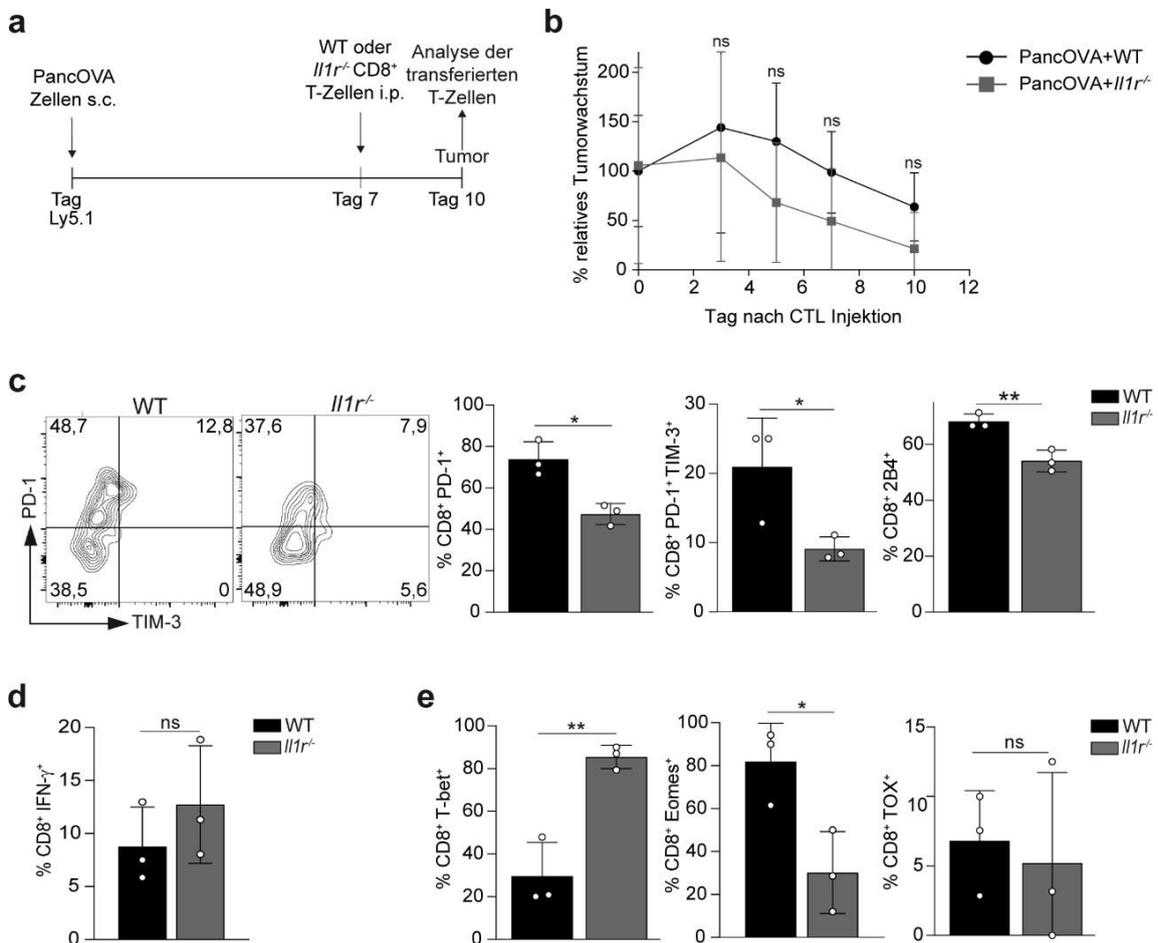
Der IL-18 Rezeptor gehört zur Familie der IL-1 Rezeptoren (Seidel et al., 2018; Tsutsumi et al., 2014). Um festzustellen, ob die durch IL-18 vermittelte Dysfunktion in T-Zellen Rezeptor-spezifisch ist oder die Rezeptorfamilie insgesamt einen Einfluss auf die intratumorale Dysfunktion von T-Zellen hat wurde die intratumorale IL-1-Signaltransduktion in CTLs mit Hilfe von IL-1-Rezeptor defizienten T-Zellen untersucht.

Dafür wurden PancOVA-Tumorzellen in Ly5.1-Mäuse subkutan injiziert, nach sieben Tag WT CTLs oder *Il1r<sup>-/-</sup>* CTLs injiziert und entweder nach drei weiteren Tagen eine *ex vivo*-Analyse der intratumoralen T-Zellen durchgeführt oder das Tumorwachstum im zeitlichen Verlauf bestimmt (Abb. 10a). Bei Betrachtung des Tumorwachstums der der PancOVA-Tumore nach adoptivem Transfer der CTLs zeigte sich, dass nach Transfer der *Il1r<sup>-/-</sup>* CTLs im Gegensatz zu den WT CTLs das Größenwachstum im Verlauf schneller stagnierte und somit die Tumorabstoßung frühzeitiger begann. Allerdings war die Tumorabstoßung im Vergleich zu den WT CTLs nur marginal stärker, so dass der Unterschied zwischen den Gruppen nicht signifikant war (Abb. 10b).

Die nur gering disinhibierte zytotoxische Potenz der adoptiv transferierten *Il1r<sup>-/-</sup>* CTL spiegelte sich auch in den phänotypischen und funktionellen Untersuchungen wieder. Die Expression der koinhibitorischen Rezeptoren PD-1, TIM-3, Koexpression von PD-1/TIM-3 und 2B4 war in den Interleukin-1 Rezeptor defizienten Zellen gering reduziert (Abb. 10c). Die Fähigkeit zytotoxisch auf ihr kognates Antigen zu reagieren und IFN- $\gamma$  zu produzieren wurde durch die IL-1-Signaltransduktion gering aber nicht signifikant gehemmt (Abb.10d). Betrachtet man für die Dysfunktion spezifischen Transkriptionsfaktoren hatte die IL-1-Signaltransduktion keinen Einfluss auf die Expression von TOX. Bei T-bet und Eomes wiesen die IL-1- Rezeptor-defizienten Zellen im Gegensatz zu den WT CTLs eine hohe Expression von T-bet und eine reduzierte

Expression von Eomes auf, wie es charakteristisch für noch funktionelle CTLs ist (Abb. 10e).

Während bei Defizienz der IL-18-Rezeptor-Signaltransduktion die T-Zell-Dysfunktion phänotypisch und funktionell reduziert ist, ist durch Deletion des T-zellüären IL-1-Rezeptors nur eine geringe Reduktion der intratumoralen T-Zell-Dysfunktion zu erreichen, was zu einer nur gering beschleunigten Tumorabstoßung führt. Der zuvor beschriebene Effekt des IL-18-Rezeptor-Signaltransduktion auf die intratumorale T-Zell-Dysfunktion ist somit nicht für alle Mitglieder der Rezeptorfamilie identisch, sondern weist Rezeptor-spezifische Charakteristika auf.



**Abb. 10: Reduktion der T-Zell-Dysfunktion in *Il1r<sup>-/-</sup>* CTLs beschleunigt die Tumorabstoßung nicht signifikant.**

(a) Schematische Darstellung des Experiments, analog zu Versuch 6 mit WT bzw. *Il1r<sup>-/-</sup>* CTLs. (b) Es wurden Wachstumskurven von PancOVA-Tumoren nach adoptiven Transfer von WT oder *Il1r<sup>-/-</sup>* CTLs durchgeführt. Die Werte jeder Gruppe wurden an Tag 0 auf 100 % gesetzt und die folgenden Tage auf diesem Wert normalisiert (n = 3). (c) Die durchflusszytometrische Analyse zur Expression der ko-inhibitorischen Rezeptoren PD-1 (n = 3), PD-1/TIM-3 (n = 3), und 2B4 (n = 3) auf CD45.2<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde durchgeführt.

(d) Das Restimulationsvermögen wurde anhand der IFN- $\gamma$ -Produktion nach Restimulation mit OVA<sup>257-264</sup> (n = 3) bestimmt. (e) Es erfolgte die durchflusszytometrische Expressionsanalyse der Transkriptionsfaktoren T-bet, Eomes und TOX (n = 3). Alle Graphen stellen Mittelwerte mit Standardabweichung dar. In (b) wurde die statistische Auswertung mit einer einfaktoriellen ANOVA mit post-hoc Tukey-Test durchgeführt. Für die statistische Auswertung in Abbildung c bis e wurden zweiseitige, ungepaarte t-Tests angewandt. \*\* p < 0,01, \* p < 0,05 oder nicht signifikant (ns) > 0,05.

#### 4.5 Pankreatische Tumorzellen sind IL-1- und IL-18-Produzenten und werden ihrerseits von diesen beiden Zytokinen beeinflusst

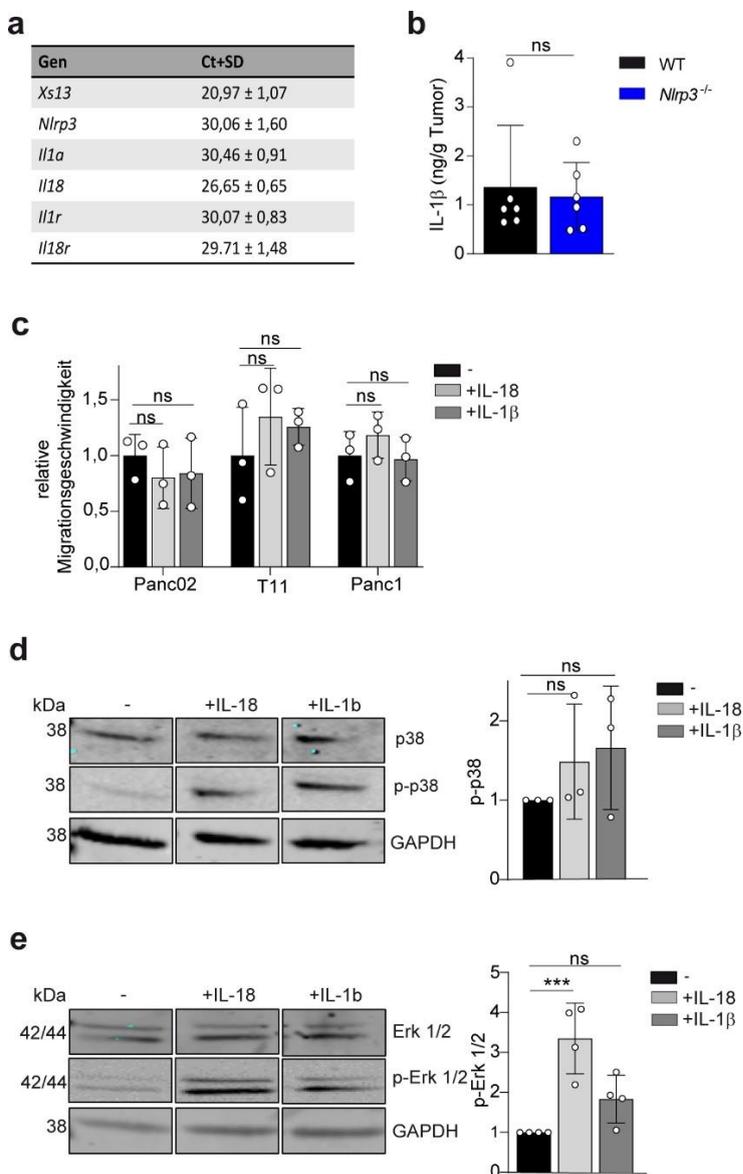
Myeloide Zellen sind Hauptproduzenten der beiden durch NLRP3 biologisch aktivierten Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-18. Es ist allerdings bekannt, dass Pankreaskarzinomzellen ebenfalls NLRP3-vermitteltes IL-1 $\beta$  produzieren können (Das et al., 2020). In wie weit dies in unserem Versuchsmodell zutrifft, und ob IL-1 $\beta$  und IL-18 auch einen direkten Effekt auf Pankreaskarzinomzellen haben, wurde im Folgenden untersucht.

Vorerst wurde mittels qPCR die Genexpression von *Nlrp3*, *Il-1a*, *Il-18*, *Il1r* und *Il18r* in Panc1-eGFP-Zellen bestimmt (Abb. 11a). Als Haushaltsgen diente *Xs13*. Bei Ct-Werten bis 30 ist von einer relevanten Expression auszugehen. Der Ct-Wert von *Xs13* lag bei 20,97. *Il18* war mit einem Ct-Wert von 26,65 noch gut nachweisbar. Alle anderen Gene haben einen Ct-Wert um die 30. Sie werden weniger stark als *Il18* exprimiert sind allerdings in Panc1-eGFP-Zellen vorhanden. In Abb. 11b wurde untersucht, ob überhaupt IL-1 $\beta$  von den Tumoren sezerniert wird. Dafür wurde mittels ELISA die IL-1 $\beta$ -Produktion von PancOVA-Tumoren *ex vivo* in WT und NLRP3-defizienten Empfängermäusen gemessen. Tumore aus WT und NLRP3-defizienten Empfängermäusen sind in der Lage wenige Nanogramm IL-1 $\beta$  pro Gramm Tumor zu sezernieren.

Zur Untersuchung eines direkten Zytokineinflusses auf Pankreaskarzinomzellen wurde die Migrationsgeschwindigkeit unter Zytokinzugabe bestimmt. Das im Tumormilieu enthaltene IL-1 $\beta$  und IL-18 beeinflusste nicht die relative Migrationsgeschwindigkeit von Pankreaskarzinomzellen (Abb. 11c). Es wurde die Migration von Panc02-, T11- und Panc1-eGFP-Zellen unter Einfluss von IL-1 $\beta$  und IL-18 untersucht die jeweilige Geschwindigkeit auf die entsprechende Zelllinien ohne Zytokinzugabe normalisiert. IL-18 und IL-1 $\beta$  veränderten in keiner der Zelllinien signifikant die

Migrationsgeschwindigkeit. Zum Schluss wurde der Einfluss der beiden Zytokine auf die Phosphorylierung der MAP-Kinasen p38 und Erk1/2 in Panc1-eGFP-Zellen untersucht. Dafür wurden die Werte auf die Phosphorylierung ohne Behandlung normalisiert. IL-1 $\beta$ , sowie IL-18, steigerten nur geringfügig die Phosphorylierung von p38 (Abb. 11d). Die Phosphorylierung von Erk1/2 hingegen wurde von beiden Zytokine stärker aktiviert, IL-18 steigerte diese sogar signifikant.

IL-1 $\beta$  und IL-18 werden in unserem Modell nicht nur von antigenpräsentierenden Zellen, sondern auch von den Tumorzellen selbst sezerniert. Die Signaltransduktion der beiden Zytokine aktiviert die MAP-Kinasen p38 und Erk1/2.



**Abb. 11: Intratumorales IL-1 $\beta$  und IL-18 erhöht die Proliferation von pankreatischen Tumorzellen in vitro.**

(a) Die Genexpression von *Nlrp3*, *Il-1a*, *Il-18*, *Il1r* und *Il18r* in Panc1-eGFP-Zellen wurde mittels qPCR bestimmt. Angegeben sind die Ct-Werte mit Standardabweichung. Als Vergleich dienen die Ct-Werte des Haushaltsgens *Xs13* (n = 3). (b) Die IL-1 $\beta$  Produktion von PancOVA-Tumoren, Lymphknoten (LN), Milz, Lunge und Leber aus WT und NLRP3-defizienten Tieren wurde mittels ELISA bestimmt (n = 6). (c) Die relative Migrationsgeschwindigkeit von Panc02, T11 und Panc1-Zellen wurden nach 18h unter Einfluss von IL-1 $\beta$  und IL-18 bestimmt (n = 3). (d) Die relative Phosphorylierung von p38 nach Inkubation mit IL-1 oder IL-18 in Panc1-eGFP-Tumorzellen wurde mit Hilfe von Western Blots untersucht und die Werte wurden auf Panc1-eGFP-Zellen ohne Zytokinzugabe normalisiert (n = 3). (e) Die relative Phosphorylierung von Erk1/2 nach Inkubation mit IL-1 oder IL-18 in Panc1-eGFP-Tumorzellen wurde durch Western Blots gemessen. Die Werte wurden auf die Panc1-eGFP-Zellen ohne Zytokinzugabe normalisiert (n = 4). In (c) wurde die statistische Auswertung mit einer einfaktoriellen ANOVA mit post-hoc Tukey-Test durchgeführt. In (b,d und e) wurde die statistische Auswertung mit zweiseitigen, ungepaarten t-Tests untersucht. \*\*\* p < 0,001 und nicht signifikant (ns) > 0,05.

#### 4.6 Auswirkung von intratumoralem NLRP3 auf die Effektorfunktion von CTLs

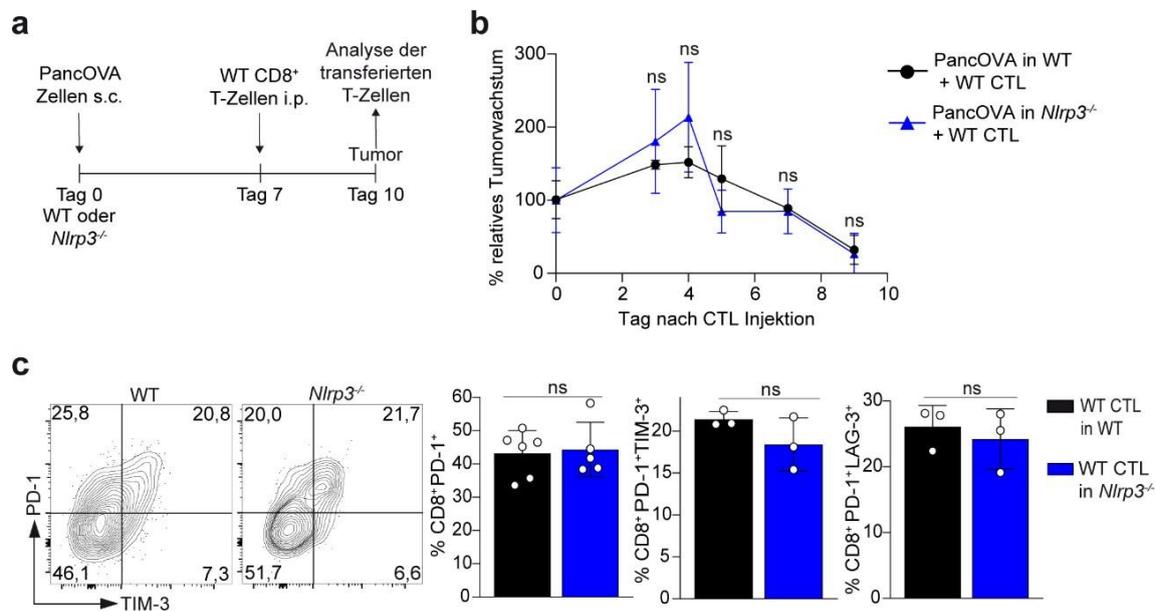
##### 4.6.1 NLRP3-vermittelte Zytokine beeinflussen nicht die Tumorsuppression transferierter CTLs

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die IL-18-Rezeptor-Signaltransduktion einen dysfunktionalen Zustand in T-Zellen fördert, sollte die Signaltransduktion durch die im Tumorstroma enthaltenen Zellen und ihre Auswirkung auf die Funktionalität transferierter T-Zellen untersucht werden. Dafür wurden NLRP3-defiziente Mäuse als Empfängertiere genutzt, da eine NLRP3-Inflammasom-Aktivierung neben Sekretion von IL-1 $\beta$  auch die vermehrte Prozessierung von IL-18 bewirkt.

Hierfür wurden PancOVA-Tumorzellen subkutan in WT oder NLRP3-defiziente (*Nlrp3*<sup>-/-</sup>) injiziert (Abb. 12a). Nach sieben Tagen Tumorstadiums wurden WT CTLs *i.p.* in die Mäuse transferiert und nach drei weiteren Tagen analysiert.

Die Tumorabstoßung durch WT CTLs in WT und *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Empfängertieren unterschied sich zu keinem Zeitpunkt signifikant voneinander (Abb. 12b). Sowohl in den WT als auch in den *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Tieren begann die Tumorabstoßung vier Tage nach CTL-Transfer. Neun Tage nach Transfer waren die Tumore in beiden Mauslinien nahezu verschwunden. Auch bei der Expression der koinhibitorischen Rezeptoren PD-1, TIM-3 und LAG-3 gab es keine Unterschiede in den transferierten CTLs der beiden Empfängergruppen (Abb. 11c).

Da die implantierten Tumorzellen NLRP3-suffizient sind und somit als Produzenten von IL-18 und IL-1 $\beta$  in Frage kommen, kann geschlussfolgert werden, dass die Deletion der NLRP3-vermittelte Zytokinproduktion antigenpräsentierender, myeloider Zellen im Tumorstroma keinen signifikanten Einfluss auf die Dysfunktion von CTLs hat. Dies weist darauf hin, dass myeloide Zellen auch NLRP3 in Tumorzellen als Plattform der intratumoralen T-Zell-Dysfunktion dient.



**Abb. 12: Durch NLRP3-vermittelte Zytokinproduktion beeinflusst nicht die Immunantwort von antigenspezifischen transferierten CTLs.**

(a) Schematische Darstellung des Experiments. PancOVA Zellen wurden s.c. in WT oder *Nlrp3*<sup>-/-</sup>-Mäusen injiziert. Sieben Tage später erfolgte der adoptive Transfer von WT CTL. An Tag 10 wurden die transferierten CD45.2<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen analysiert. (b) Es wurde eine Wachstumskurve nach adoptivem Transfer von WT CTL in WT und *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Empfänger erstellt. Die Werte wurden für jede Gruppe an Tag 0 auf 100 % gesetzt und für die nachfolgenden Tage auf diese Werte normalisiert (n = 3) (c) Die phänotypische Charakterisierung der transferierten CTLs erfolgte anhand der Expression der koinhibitorischen Rezeptoren PD-1, (n = 5-6), TIM-3 und LAG-3 (n = 3) durch Durchflusszytometrie. Alle Graphen stellen Mittelwert mit Standardabweichung dar. In (b) erfolgte die statistische Auswertung durch eine einfaktoriellen ANOVA mit post-hoc Tukey-Test, in (c) durch zweiseitige, ungepaarten t-Tests. mit nicht signifikant (ns) > 0,05.

#### 4.6.2 NLRP3-Signaltransduktion beeinflusst nicht die Dysfunktionalität von intratumoralen CTLs

Spekulativ bleibt, ob nur IL-18 und IL-1 $\beta$  die intratumorale T-Zell-Exhaustion befördern oder über Induktion weiterer Zytokine die Dysfunktion bewirken. Die Tatsache, dass der suppressive Effekt auf endogene CTLs durch Transfer von *Il18*<sup>-/-</sup> CTLs reversibel

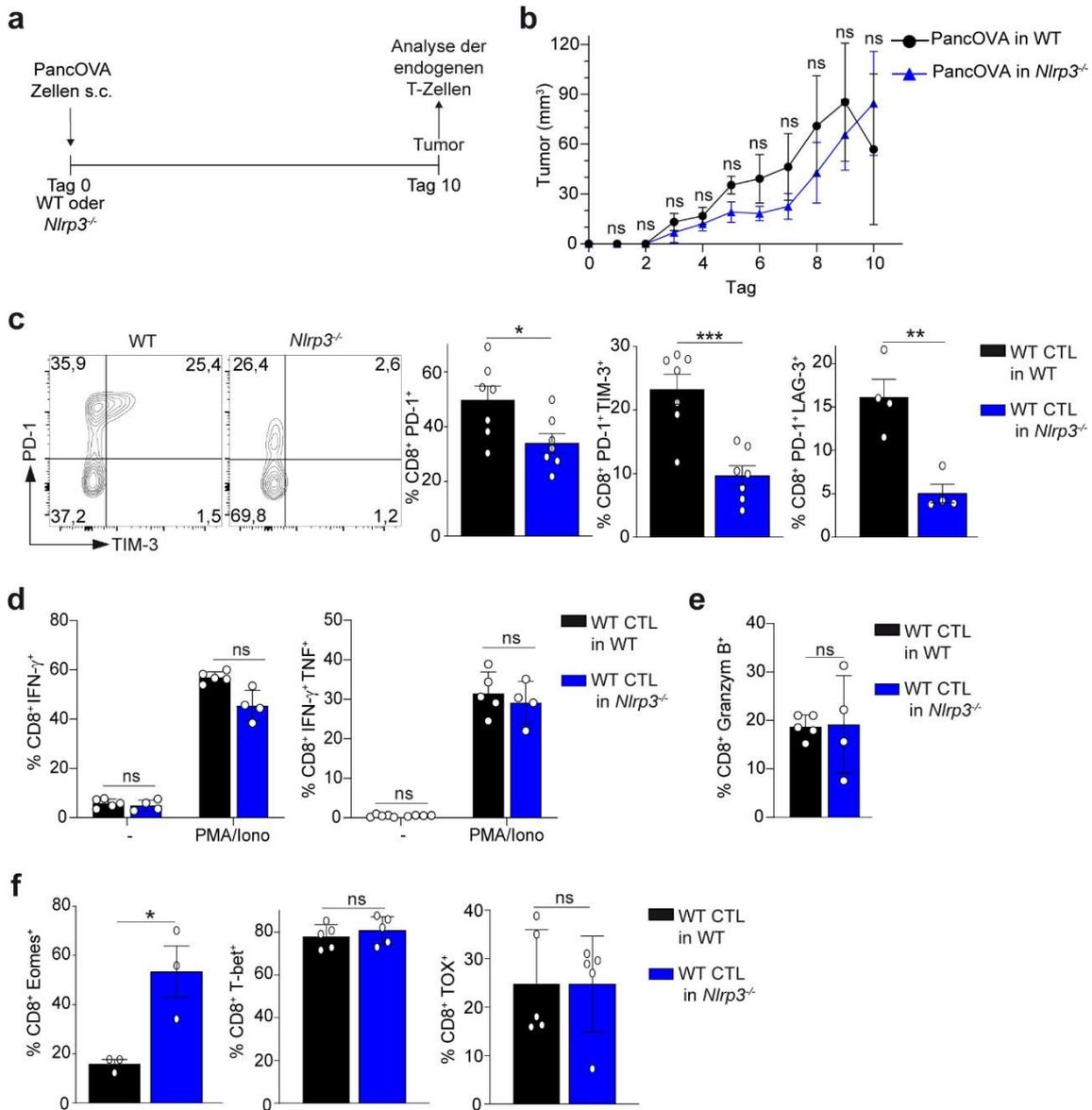
war, spricht für einen transienten Effekt der NLRP3-vermittelten Zytokine. Aus diesem Grund wurde neben dem Effekt eines NLRP3-knockout in Empfänger-mäusen auf die transferierten CTLs auch der Einfluss der NLRP3-Defizienz auf die endogenen intratumoralen CTL untersucht.

Zwar hatten IL-18 und IL-1 $\beta$  als Zytokine, welche durch NLRP3 biologisch aktiviert werden, keinen Einfluss auf die Funktionalität von transferierten CTLs in NLRP3-defizienten Empfänger-mäusen. Hier wurde nun im nächsten Schritt untersucht, welche Rolle die NLRP3-Defizienz in den Empfängertieren auf die endogene, intratumorale CTL-Population hat.

PancOVA-Zellen wurden in WT oder in *Nlrp3*<sup>-/-</sup>-Mäuse subkutan appliziert, zehn Tage nach Tumorinokulation wurden die intratumoralen CTLs untersucht (Abb. 13a). Das Tumorwachstum bis Tag 10 unterschied sich im Tumolvolumen nicht zwischen WT und *Nlrp3*<sup>-/-</sup>-Tieren (Abb. 13b). Die Expression der koinhibitorischen Rezeptoren hingegen zeigten bei CTLs aus *Nlrp3*<sup>-/-</sup>-Mäusen eine signifikant verringerte Expression von PD-1, TIM-3, der Koexpression von PD-1/TIM-3 und LAG-3 (Abb. 13c). Dieser Phänotyp, der einem typischen dysfunktionalen Muster entspricht, spiegelte sich jedoch nicht in der Zytotoxizität der CTLs wieder. Nach Restimulation mit PMA und Ionomycin waren sowohl CTLs von WT Tieren als auch CTLs aus *Nlrp3*<sup>-/-</sup>-Tieren gleichermaßen in der Lage zytotoxisch zu wirken und IFN- $\gamma$  und TNF zu produzieren (Abb. 13d). Auch die Freisetzung von Granzym B durch lytische Granula unterschied sich nicht in den beiden Mausstämmen (Abb. 13e). Bezüglich der Dysfunktion endogener CTLs auf transkriptioneller Ebene wiesen CTLs von WT und *Nlrp3*<sup>-/-</sup>-Tieren keinen Unterschied in der Expression von T-bet und TOX auf (Abb. 13f). Lediglich die Expression des Transkriptionsfaktors Eomes war in den *Nlrp3*<sup>-/-</sup>-CTLs gegenüber CTLs aus WT Tieren signifikant erhöht.

Obwohl die verringerte Expression der koinhibitorischen Rezeptoren PD-1, TIM-3 und LAG-3 in endogenen CTLs aus *Nlrp3*<sup>-/-</sup>-Mäusen charakteristisch für eine verringerten T-Zell-Dysfunktion ist konnte dieser Effekt somit nicht in Bezug auf die zytotoxische Potenz und in Bezug auf die Expression von Transkriptionsfaktoren, welche an der T-

Zell-Dysfunktion beteiligt sind, nachvollzogen werden. Zudem gab es keinen Unterschied in der Tumorabstoßung in WT und *Nlrp3*<sup>-/-</sup>-Mäusen.



**Abb. 13: NLRP3-Defizienz resultiert in einer reduzierten Expression koinhibitorischer Rezeptoren auf endogenen CTLs.**

(a) Schematische Darstellung des Experiments. PancOVA Zellen wurden *s.c.* in WT oder *Nlrp3*<sup>-/-</sup>-Mäuse implantiert. An Tag 10 wurden die endogenen CD8<sup>+</sup>T-Zellen analysiert. (b) Es wurden Wachstumskurven zu PancOVA-Tumoren in WT und in *Nlrp3*<sup>-/-</sup>-Mäusen angefertigt (n = 3). (c) Die Expression der koinhibitorischen Rezeptoren PD-1 (n = 7), TIM-3 (n = 7) und LAG-3 (n = 4) wurde mittels Durchflusszytometer gemessen. (d) Die Restimulationsfähigkeit wurde anhand der Produktion von IFN- $\gamma$  und TNF gemessen (n = 4). (e) Die Fähigkeit lytische Granula zu produzieren wurde durch die Expression von Granzym B durchflusszytometrisch ermittelt (n = 4-5) (f) Ebenfalls wurde die Expression der Transkriptionsfaktoren Eomes (n = 3), T-bet und TOX (n = 5) gemessen. Alle Graphen stellen Mittelwerte mit Standardabweichung dar. In (b) wurde die statistische Auswertung mit einer einfaktoriellen ANOVA mit post-hoc Tukey-Test, in (c-f) mit zweiseitigen, ungepaarten t-Tests durchgeführt. \*\*\* p < 0,001, \*\* p < 0,01, \* p < 0,05 und signifikant (ns) > 0,05.

#### 4.6.3 NLRP3-Signaltransduktion wird zur Aktivierung endogener CTLs benötigt

Nachdem gezeigt werden konnte, dass endogene intratumorale, NLRP3-defiziente CTLs weniger koinhibitorische Rezeptoren als WT CTLs exprimieren wurde eine RNA-Sequenzierung durchgeführt, um diesen Effekt auf Genomebene weiter zu untersuchen.

In intratumoralen, NLRP3-defiziente CTLs waren im Vergleich zu intratumoralen WT CTLs 2760 Gene hochreguliert und 2449 Gene herabreguliert (Abb. 14a). Auch hier wurden die Sequenzierungsdaten mit ausgewählten Genlisten aus Publikationen mit Hilfe von GSEA abgeglichen. Durch eine GSEA mit den Genlisten nach Bengsch et al. (2018) konnte gezeigt werden, dass sich die Änderungen in der Expression der koinhibitorischen Rezeptoren nur bedingt auf eine verringerte T-Zell-Dysfunktion der intratumoralen, NLRP3-defizienten CTLs zurückführen lassen (Abb. 14b). Während beim Vergleich von WT und *Il18r<sup>-/-</sup>* CTLs *Pdcd1*, *Tigit* und *Eomes* in den *Il18r<sup>-/-</sup>* CTLs signifikant herabreguliert wurden trifft dies beim Vergleich von endogenen WT CTLs mit endogenen *Nlrp3<sup>-/-</sup>* CTLs nur bei *Pdcd1* zu. Die Expression von *Eomes* war in den *Nlrp3<sup>-/-</sup>* CTLs sogar signifikant erhöht. Da Gene, wie *Pdcd1*, auch als Aktivierungsmarker wirken wurden die Daten im nächsten Schritt auf Unterschiede in Aktivierungsmarkern untersucht. So zeigte eine GSEA auf die Genexpression von T-Zell-Aktivierungsmarkern (Szabo et al., 2019), dass die intratumoralen, NLRP3-defizienten CTLs im Vergleich zu intratumoralen WT CTLs weniger aktiviert sind (Abb. 13c). Beim Vergleich von WT und *Il18r<sup>-/-</sup>* CTLs gab es keinen Unterschied beim Vergleich der Aktivierungsmarker (siehe 4.3.5). Die drei Aktivierungsmarker mit den größten Unterschieden waren *Il2ra*, *Klrd1* und *Tnfrsf4*. Der Phänotyp der *Nlrp3<sup>-/-</sup>* CTLs erinnert an CD8<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellen, welche nach Liu et al. (2020) über Neuropilin reguliert werden und in denen unter anderem die Genexpression von *Tcf7* und *Jun* gesteigert ist. Die Auswertung der RNA-Sequenzierung aus WT versus NLRP3-defizienten CTLs zeigte, dass CTLs aus *Nlrp3<sup>-/-</sup>* Mäusen eine signifikant gesteigerte Expression von *Nrp1* und *Tcf7* aufwiesen (Abb. 14c). Die Genexpression von *Jun* allerdings war nur geringfügig erhöht. Es kann spekuliert werden, dass NLRP3-defiziente CTLs einen ähnlichen Phänotyp ausbilden, sich also unter Vermeidung eines dysfunktionalen Zustandes direkt zu CD8<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellen entwickeln. Betrachtet man diese Ergebnisse zusammen mit den FACS-Daten aus 4.6.2 so zeigt sich, dass intratumorale, NLRP3-defiziente CTLs im Vergleich zu

intratumoralen WT CTLs eine geringere Dysfunktion aufweisen. Dieser Phänotyp ist bezüglich der Tumorabstoßung vorteilhaft. Dieser Vorteil geht jedoch durch eine verringerte T-Zell-Aktivierung wieder verloren, was letztlich in gleich rascher Tumorabstoßung in WT und NLRP3-defizienten Tieren führt. Zusammenfassend weisen die Daten darauf hin, dass NLRP3-Defizienz die Ausbildung einer starken antitumoralen CTL-Tumorantwort verhindert und stattdessen die Ausbildung von CD8<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellen fördert.

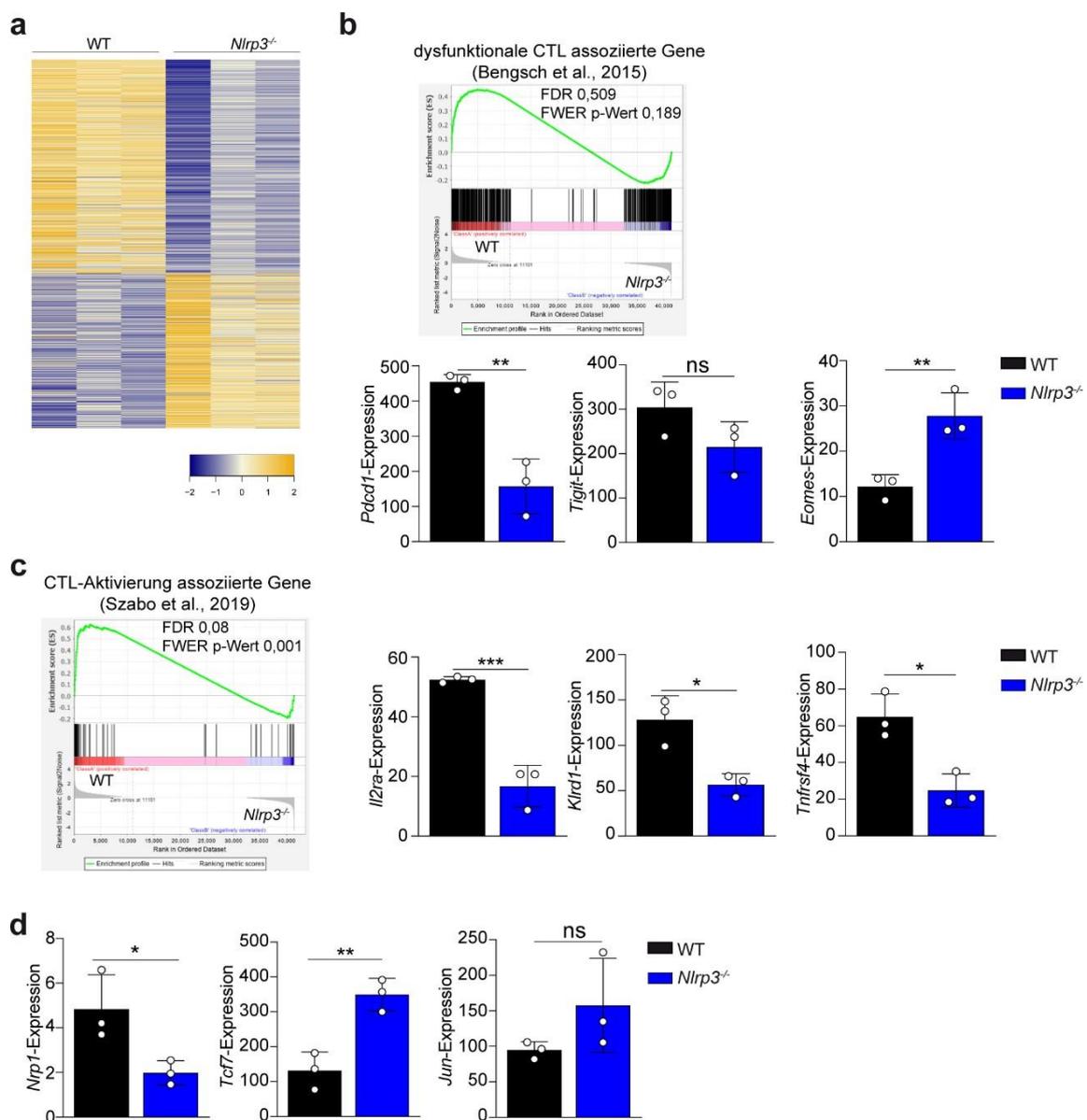


Abb. 14: NLRP3 fördert die Dysfunktion in endogenen CTLs, ist jedoch auch für deren Aktivierung verantwortlich.

(a-c) Endogene CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden aus PancOVA-Tumoren aus WT und *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Tieren isoliert, RNA wurde isoliert und sequenziert (n = 3). (a) Eine Heatmap zeigt die farbcodierten z-Werte der differentiellen

Genexpression nach Clusteranalyse mit einem fold change von  $> 1,5$  und einer Differenz von mindestens 0,5. (b) Enrichment plot einer GSEA, welche die Expression von WT und *Nlrp3*<sup>-/-</sup> CTLs in PancOVA-Tumoren auf die Verteilung von Genen, welche dysfunktionalen CTLs zugeordnet werden, untersucht. Der dysfunktionale Phänotyp wurde bei Bengsch et al. (2018) beschrieben. Als Beispiel für die Unterschiede in den von Bengsch et al. verwendeten Genlisten wurden die Genexpressionen von *Pdcd1*, *Tigit* und *Eomes* gesondert dargestellt (c) Enrichment plot einer GSEA, welche die Expression von WT und *Nlrp3*<sup>-/-</sup> CTLs in PancOVA-Tumoren auf die Verteilung von Genen, welche aktivierten CTLs zugeordnet werden, untersucht. Der dysfunktionale Phänotyp wurde bei Szabo et al. (2019) beschrieben. Beispielhaft für diese Genliste wurden die Genexpressionen von *Il2ra*, *Klrd1* und *Tnfrsf4* gesondert dargestellt. (d) Die Genexpression der Gene *Nrp1*, *Tcf7* und *Jun*. Alle Graphen stellen Mittelwerte mit Standardabweichung dar. Die statistische Auswertung in b bis d wurde mit zweiseitigen, ungepaarten t-Tests durchgeführt. \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$  und signifikant (ns)  $> 0,05$ .

## 5 Diskussion

CD8<sup>+</sup> CTLs spielen bei der Antitumorantwort gegen Pankreaskarzinomzellen eine Schlüsselrolle (Balli et al., 2017; Carstens et al., 2017). Allerdings werden ihre Effektorfunktionen und damit ihre Wirkung auf die Tumorabstoßung durch das Phänomen der intratumoralen T-Zell-Dysfunktion inhibiert. Neben der Überstimulation durch von Tumoren präsentierte Antigene können Zytokine diesen Zustand modulieren. Während die Rezeptor-Signaltransduktion von NLRP3 vermittelten Zytokinen IL-1 $\beta$  und IL-18 in Infektionsmodellen und Autoimmunerkrankungen eine wichtige Rolle spielt, gibt es kaum Erkenntnisse wie die beiden über NLRP3 biologisch aktivierten Zytokine eine intratumorale T-Zellantwort beeinflussen. In dieser Arbeit wurde die Rolle der T-zellulären IL-1- und IL-18-Rezeptor-Signaltransduktion und die Rolle des NLRP3-Inflammasoms im Tumormilieu auf die intratumorale Immunantwort von CTLs im murinen Pankreaskarzinommodell untersucht.

### 5.1 Die Rolle des IL-1- und IL-18-Rezeptors während der intratumoralen Dysfunktion von CTLs

Es ist bereits bekannt, dass inflammatorische Prozesse eine Tumorprogression fördern. Das Tumormikromilieu besteht vorrangig aus inflammatorischen Immunzellen, welche die Migration, Proliferation und das Überleben von Tumorzellen kontrollieren. Diese Immunzellen kommunizieren unter anderem über Chemokine, Selektine und Zytokine (Greten and Grivennikov, 2019). Zu diesen inflammatorischen Zytokinen gehören auch IL-1 $\beta$  und IL-18, die zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem kommunizieren. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-18 eine wichtige Rolle bei der Tumorprogression spielen. IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  steigerten in Melanomen und Mammakarzinomen die Invasivität und Angiogenese der Tumorzellen (Voronov et al., 2003). Außerdem werden in Patienten mit Krebserkrankungen erhöhte IL-18- oder IL-1 $\beta$ -Werte im Serum festgestellt, was mit einer verringerter Überlebensrate korreliert (Apte et al., 2006; Tangkijvanich, 2007). Wie genau sie jedoch die Tumorprogression regulieren ist unklar.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die IL-18-Signaltransduktion über den IL-18-Rezeptor die Effektorfunktion von zytotoxischen T-Zellen supprimiert. Dies geschieht durch die Induktion eines dysfunktionalen Zustandes, wie an Hand durchflusszytometrischer Bestimmung von Transkriptionsfaktoren und RNA-Sequenzierung gezeigt werden konnte. Die Signaltransduktion von IL-1 über den IL-1-Rezeptor führt in einem nur geringeren Maße zu solch einer Dysfunktion.

Während der *in vitro* Differenzierung hatte die IL-1- und IL-18-Rezeptordefizienz noch keinen Einfluss auf die Effektorfunktion der CTLs. Erst nach adoptivem Transfer in tumortragende Mäuse zeigten sich Unterschiede zwischen CTLs mit und ohne Rezeptordefizienz. Ohne den IL-18-Rezeptor konnten die transferierten CTLs die subkutanen Tumore signifikant schneller abstoßen. Ohne IL-1-Rezeptor wurde der Tumor auch schneller abgestoßen, jedoch war der Unterschied zu Wildtyp-(WT) CTLs nicht signifikant. Der Grund für die verbesserte Immunantwort fand sich in der Effektorfunktion der CTLs. WT CTLs wiesen eine hohe Expression an koinhibitorischen Markern PD-1, TIM-3 und 2B4 auf. Während die Expression einzelner koinhibitorischer Rezeptoren auf eine Aktivierung der CTLs hindeutet, so korreliert die Koexpression von mehreren koinhibitorischen Rezeptoren mit der Dysfunktionalität von CTLs (Blackburn et al., 2009). Auch ihre zytotoxische IFN- $\gamma$ -Produktion war verringert. Durch das Bestimmen der IFN- $\gamma$ -Produktion kann man auf die zytotoxische Funktionalität der CTLs schließen. Eine verringerte IFN- $\gamma$ -Produktion zeigt, dass die CTLs ihre Zytotoxizität verringert haben. Zusammen mit einer geringen Expression der Transkriptionsfaktoren T-bet und einer erhöhten Expression von Eomes und TOX sind dies charakteristische Merkmale für dysfunktionale T-Zellen (McLane et al., 2019). Durch die Deletion des IL-18-Rezeptors hingegen wurde die Expression der koinhibitorischen Rezeptoren gesenkt und die Zellen behielten die Fähigkeit IFN- $\gamma$  zu produzieren und können ihrer zytotoxischen Immunantwort nachgehen. Auch die hohe Expression von T-bet mit gleichzeitiger niedriger Expression von Eomes und TOX sind charakteristisch für hochfunktionale T-Effektorzellen. Ein ähnliches Muster konnte durch die Deletion des IL-1-Rezeptors, wenn auch mit geringerer Effektstärke, erreicht werden.

Bei adoptivem Transfer von IL-18-Rezeptor-defizienten CTLs in PancOVA-tragende Mäuse wurde nicht nur die Dysfunktion der adoptiv transferierten CTLs reduziert. Die Deletion des IL-18-Rezeptors zeigte auch eine verringerte Dysfunktion bei den endogenen CTLs. Während in der Expression der mit intratumoraler Dysfunktion assoziierten Transkriptionsfaktoren kein Unterschied gezeigt werden konnte, so exprimierten sie jedoch weniger koinhibitorischer Rezeptoren. Da der Grad der Dysfunktion mit der Expression und der Anzahl an koinhibitorischen Rezeptoren korreliert (Blackburn et al., 2009) könnte eine verminderte Expression auf eine geringere Einschränkung der Effektorfunktion hindeuten, welche noch nicht auf transkriptioneller Ebene fest zu machen ist. Durch das Fehlen des IL-18-Rezeptors und der damit verringerten Dysfunktion in den adoptiv transferierten CTLs wird die Anzahl an zytotoxisch funktionalen CTLs im Tumor gesteigert, es kommt zu einer kompetenten Abstoßung der Tumore mit Apoptose der Tumorzellen in den T-Zell-infiltrierten Regionen, so dass der T-Zell-Rezeptor der endogenen CTLs nicht überstimuliert wird. Es resultiert eine verringerte Suppression der Effektorfunktion endogener CTLs. Auf diese Weise entsteht eine positive Rückkopplung die zur erfolgreichen Abstoßung des Tumors führt.

Hierbei ist wichtig, dass die von uns beobachteten Effekte in der Tumorperipherie stattfinden, also nicht in sekundär lymphatischen Organen. Es ist aus Vorarbeiten bekannt, dass aktivierende und supprimierende Signale von T-Zellen in Antigen-abhängiger Weise auf APCs übertragen werden (Bauer et al., 2014). So führen hochaktive Interaktionen von APCs mit *Il18r<sup>-/-</sup>* CTLs zu APCs, die ihrerseits non-tolerogen und aktivierend auf umliegende (endogene WT) CTLs wirken. In Übereinstimmung hiermit konnten kürzlich räumliche Verteilungsmuster der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Infiltration bestimmt werden (Carstens et al., 2017). Hierbei besteht Korrelation von einer erhöhten Überlebensrate und dem Vorliegen eng umschriebener T-Zell-Cluster von 20 µm Radius, in denen diese T-Zellen mit Krebszellen, aber auch myeloiden Zellen und Fibroblasten interagieren. Es kann spekuliert werden, dass die durchschlagend erhöhte Wirksamkeit der *Il18r<sup>-/-</sup>* CTL nicht nur in ihrer per se erhöhten Zytotoxizität, sondern vielmehr in der disinhibierten Interaktion mit anderen Zielzellen des tumoralen Stromas besteht.

## 5.2 Die Rolle von NF- $\kappa$ B und MAP-Kinasen während einer T-Zell-Dysfunktion

Die Signaltransduktion beider Zytokine wirkt sich in CTLs vornehmlich auf den *nuclear factor  $\kappa$ B* (NF- $\kappa$ B) und MAP-Kinasen-Signalwege aus. NF- $\kappa$ B ist ein Transkriptionsfaktor der durch die Stimulation des T-Zell-Rezeptors durch Antigenpräsentation von antigenpräsentierenden Zellen aktiviert wird. Zusätzlich benötigt er ein weiteres, kostimulatorisches Signal zur Aktivierung. Dabei kann es sich unter anderem um IL-1 $\beta$  und IL-18 handeln. Krishna et al. (2012) konnten zeigen, dass IKK $\beta$ , ein dem NF- $\kappa$ B vorgeschalteter Transkriptionsfaktor, bei einer anhaltenden Stimulation des T-Zell-Rezeptors durch bakterielle Infektionen die Effektorfunktion von CTLs inhibiert. Ein starker, stetig andauernder T-Zell-Rezeptorstimulus kennzeichnet die T-Zellantwort bei Tumorabstoßungsreaktionen. Da IL-1 $\beta$  und IL-18 die Aktivierung von NF- $\kappa$ B über IKK $\beta$  nochmals verstärken könnte die Signaltransduktion über ihre Rezeptoren in CTLs eine T-Zell-Dysfunktion fördern. In Makrophagen ist unter anderem NF- $\kappa$ B für die Expression von PD-1 verantwortlich (Bally et al., 2015). Es wäre möglich, dass dies auch für CTLs zutrifft und auf diese Weise IL-1 $\beta$  und IL-18 die Expression von koinhibitorischen Rezeptoren in CTLs verstärken. Neben NF- $\kappa$ B regulieren IL-1 $\beta$  und IL-18 auch die Signalwege von MAP-Kinasen. Eine Hemmung des Signalmoleküls *mitogen/extracellular signal regulated kinase* (MEK), einer Zwischenstufe des MAP-Kinase-Signalwegs, schützt intratumorale CTLs vor einer chronischen Stimulation und damit verbundenen Dysfunktion und Apoptose (Ebert et al., 2016).

Wie die RNA-Sequenzierung zeigte reguliert IL-18 den IL-2/STAT5-Signalweg. In NK-Zellen ist bekannt, dass IL-18 die Expression des IL-2R stimuliert (Stegmann et al., 2015). Die IL-18 abhängige Stimulation des IL-2Ra konnte in dieser Arbeit auch in intratumoralen CTLs nachgewiesen werden. Dies steht im Einklang mit Erkenntnissen zur T-Zell-Dysfunktion aus einem LMCV-Modell, wo gezeigt werden konnte, dass IL-2-Signaltransduktion über den IL-2R $\beta$  zu hoch dysfunktionalen CTLs führt (Beltra et al., 2016). IL-2 gilt als potenter Aktivator von STAT5 (Gilmour et al., 1995). STAT5 ist an der Expansion von CTLs und der Aufrechterhaltung ihrer Effektorfunktion beteiligt (Tripathi et al., 2010). In unserem Versuchsmodell könnte es durch die Deletion des IL-18-Rezeptors zu einer unterbundenen STAT5-Aktivierung über IL-2 gekommen sein. Die WT CTLs werden intratumoral nicht nur über den T-Zell-Rezeptor aktiviert,

sondern bekommen im Gegensatz zu den *Il18r<sup>-/-</sup>* CTLs neben dem durch IL-18 vermittelten IFN- $\gamma$  ein zusätzliches Aktivierungssignal durch STAT5. Diese Hyperstimulation könnte die CTLs als Schutzmechanismus in einen dysfunktionalen Zustand versetzen.

Durch die nur mäßige, aber stetige Aktivierung sind IL-18-Rezeptor-defiziente CTLs in der Lage eine effektive antitumorale Immunantwort zu leisten ohne dysfunktional zu werden. Sie werden so im Verlauf zu *stemness-like memory* T-Zellen. Aus ihnen können wiederum durch Proliferation neue CTLs entstehen, welche hoch spezifisch sind (Jansen et al., 2019; Pais Ferreira et al., 2020).

### 5.3 Unterschiede in der IL-1 und IL-18-Signaltransduktion in CTLs

Bei den Untersuchungen zur Rolle des IL-1- und des IL-18-Rezeptors wiesen zwar beide Zytokine einen Effekt auf die Funktionalität von intratumoralen CTLs auf. Jedoch zeigte sich, dass die Signaltransduktion über den IL-18-Rezeptor eine stärkere Dysfunktion induzierte. Dies könnte mehrere Ursachen haben. Sie gehören zwar beide der IL-1-Rezeptoren-Familie an und ihre Rezeptoren wirken auf den NF- $\kappa$ B-Signalweg und MAP-Kinasen-Signalweg. Dennoch besitzen sie unterschiedliche Funktionen. Zum einen ist IL-18 auch als *IFN- $\gamma$ -inducing factor* bekannt. IL-18, für sich alleine oder synergistisch mit IL-12, führt zu einer starken Produktion von IFN- $\gamma$  in CTLs. IL-1 $\beta$  kann zwar auch im Zusammenspiel mit IL-12 IFN- $\gamma$  produzieren, jedoch in einem viel geringeren Ausmaß (Tominaga et al., 2000). Durch das Fehlen des IL-18-Rezeptors können die CTLs nur noch eine begrenzte Menge an IFN- $\gamma$  produzieren; diese Begrenzung limitiert die rasche Erschöpfung der Effektorfunktion im Rahmen einer Immunantwort. Es kann spekuliert werden, dass die IL-18-Rezeptor-Defizienz die Wirkung der T-Effektorantwort ökonomisiert und somit einer T-Zell-Dysfunktion entgegenwirkt. Wie in den *in vitro* Kokulturen gezeigt besitzen *Il18r<sup>-/-</sup>* CTLs immer noch die grundsätzliche Fähigkeit IFN- $\gamma$  zu produzieren, was durch die Zugabe von IL-1 $\beta$  nochmals gesteigert werden kann. Dadurch können die intratumoralen Zellen schrittweise und unter Vermeidung einer kontraproduktiven überschießenden Aktivierung ihre Effektorfunktion ausführen und durch gleichzeitige Proliferation den Tumor abstoßen. Bei der IL-1-Rezeptordefizienz hingegen ist bei der IFN- $\gamma$ -Produktion nur der leichte IL-

IL-1-Effekt gehemmt und die Zellen können sofort ihrer vollen Effektorfunktion nachgehen, werden dadurch aber auch im Verlauf dysfunktional. Zudem stimuliert IL-18 neben der Produktion von IFN- $\gamma$  die Produktion von TNF und steigert so die zytotoxische Effektivität der CTLs (Netea et al., 2000). Des Weiteren besteht ein Unterschied bei der Prozessierung der beiden Zytokine. Während pro-IL-18 konstitutiv exprimiert wird, um bei Gefahrensignalen schnell freigesetzt werden zu können, so wird pro-IL-1 $\beta$  erst bei Bedarf produziert (Afonina et al., 2015). Somit kann es im Tumormilieu zu einer viel höheren lokalen Konzentration an IL-18 im Vergleich zu IL-1 $\beta$  kommen. Hinzukommt, dass während der IL-18-Rezeptor 10-20 ng/mL IL-18 benötigt um aktiviert zu werden beim IL-1-Rezeptor Mengen im pg/mL-Bereich reichen (Lee et al., 2004). Zum anderen wirkt IL-1 $\beta$  verstärkt auf den NF- $\kappa$ B-Signalweg, während IL-18 eher über MAP-Kinasen, wie p38, wirkt (Rex et al., 2020). Dies kann somit trotz Ähnlichkeiten in den grundlegenden Signalwegen den Einfluss auf die Induktion einer intratumoralen Dysfunktion beeinflussen.

#### 5.4 Die Rolle von NLRP3 für die Induktion eines suppressiven Tumormilieus

Die Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-18 werden typischerweise von antigenpräsentierenden Zellen und inflammatorischen Immunzellen gebildet; dies gilt auch für das intratumorale Zellmilieu. Zu den IL-1 $\beta$  und IL-18 produzierenden Zellen gehören Monozyten, Makrophagen, DCs und Neutrophile (Moossavi et al., 2018). Durch eine Deletion des NLRP3-Gens in den Empfängermäusen konnte keine verbesserte Immunantwort nach T-Zelltransfer gezeigt werden. Weder wurde im Vergleich zu WT-Empfängertieren der Tumor schneller angestoßen, noch zeigten die transferierten CTLs einen veränderten Phänotypen hinsichtlich koinhibitorischer Rezeptorexpression und Funktionalität. Hierfür kommen mehrere Gründe in Betracht.

Das NLRP3-Inflammasom ist für den größten Teil der IL-1 $\beta$ - und IL-18-Sekretion verantwortlich. Es ist jedoch zu beachten, dass IL-1 $\beta$  und IL-18 auch über alternative Prozessierungswege aktiviert und sezerniert werden können. So können sie auch über andere Inflammasome, wie dem NLRP12-Inflammasom, prozessiert werden (Wang et al., 2002). Auch kann das IL-1 $\beta$ - und IL-18-Vorläuferprotein durch Apoptose von Immunzellen in die extrazelluläre Matrix gelangen und dort durch Proteinase-3 prozessiert werden (Coeshott et al., 1999).

Zellen, wie Makrophagen und DCs, welche ein Apoptosesignal erhalten, können auch über Fas, einen Tumor-Nekrose-Faktor, und Caspase-8 zu einer nicht-kanonischen Aktivierung von pro-IL-1 $\beta$  und pro-IL-18 führen, welches durch Pyroptose induzierte apoptotische Zellen freigesetzt wird (Bossaller et al., 2012). Ähnlich kann auch Caspase-11 IL-1 $\beta$ , IL-18 und IL-1 $\alpha$  prozessieren (Viganò and Mortellaro, 2013). Durch die im Tumor apoptotisch werdenden Immunzellen können so auch ohne NLRP3-Expression IL-1 und IL-18 eine Rolle spielen.

Zudem wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass Tumorzellen selbst NLRP3, sowie IL-1 $\alpha$  und IL-18 exprimieren. PancOVA-Tumore aus NLRP3-defizienten Mäusen waren in der Lage *ex vivo* eine ähnliche Menge an IL-1 $\beta$  wie aus WT-Tieren zu sezernieren. Dies passt zu den Erkenntnissen von Das et al. (2020), die das Pankreaskarzinom als wichtigen IL-1 $\beta$ -Produzenten im Tumormilieu ausmachten.

Durch Deletion von NLRP3 werden in unserem Modellsystem nicht nur die endogenen und transferierten CTLs beeinflusst, sondern der Einfluss des durch NLRP3 vermittelten IL-1 und IL-18 auf alle Immun- und auf die Tumorzellen unterbunden. Dies hat wiederum indirekte Effekte auf die T-Zellen. So ist IL-18 essentiell für die IFN- $\gamma$ -Produktion in NK-Zellen und kann Th1- und Th2-Immunantworten regulieren (Chaix et al., 2016; Nakanishi et al., 2001). Vereinbar mit diesem Konzept, konnte in unseren Kokulturen die Induktion von IFN- $\gamma$  durch IL-18 in DCs gezeigt werden. IL-1 $\beta$  andererseits unterstützt die Polarisation von Th17-Zellen und inhibiert die Differenzierung zu Tregs (Ikeda et al., 2014).

Außerdem wirken IL-18 und IL-1 auch direkt auf die Tumorzellen. Wie hier gezeigt wurde regulieren sie die Produktion der MAP-Kinasen p38 und Erk hoch. Dies kann zu einer vermehrten Proliferation und Metastasierung führen (Kang et al., 2009; Lewis et al., 2006). Es wäre möglich, dass durch die Deletion von NLRP3 eine fehlende, beziehungsweise eine verminderte Signaltransduktion der IL-1- und IL-18-Rezeptoren in den transferierten CTLs eine ähnliche Wirkungsweise hat wie die Rezeptordeletion auf den CTLs. Durch die vollständige Deletion der IL-18- bzw. IL-1-Rezeptoren kann eine große Effektstärke bezüglich der T-Zell-Dysfunktion generiert werden. Dieser Effekt kann durch reine NLRP3-Deletion in den Empfänger-mäusen nicht nachvollzogen werden. Ursächlich hierfür könnten pleiotrope Effekte der NLRP3-Defizienz auf andere

Zellarten und die Tumorzellen sein. Zudem kommen alternative Wege IL-1 $\beta$ - und IL-18-Sezernierung in Betracht. Unklar ist auch in welchem Maße die (NLRP3-suffizienten) Tumorzellen als IL-1 $\beta$ -Produzenten in Betracht kommen und den Effekt der NLRP3-Defizienz überlagern. Zuletzt werden in NLRP3-defizienten Mäuse weitere Zytokine, wie IL-23 und IL-33, beeinflusst, die den Effekt der NLRP3-Defizienz per se überlagern (Chackerian et al., 2007; Ziblat et al., 2018).

#### 5.5 Signaltransduktion über NLRP3 vermittelte Zytokine als wichtiger Baustein der intratumoralen CTL-Aktivierung und CTL-Dysfunktion

Durch eine NLRP3-Deletion in den Empfängertieren konnte keine Verbesserung der T-Zell-Dysfunktion bei transferierten CTLs festgestellt werden. Es zeigte sich allerdings, dass sich die endogene CTL-Population von der in Wildtyp-tieren mit subkutanen Tumoren unterschied. Fehlte die Expression des NLRP3-Gens exprimierten endogene CD8<sup>+</sup> T-Zellen weniger der koinhibitorischen Rezeptoren PD-1, TIM-3, LAG-3 und 2B4. Dieser Befund für sich alleine würde auf eine verringerte Dysfunktion der CTLs sprechen. Jedoch zeigte sich keine verbesserte Tumorabstoßung. Auch die Expression der Transkriptionsfaktoren T-bet, Eomes und TOX, sowie die zytotoxische Funktion, zeigten keinen Unterschied zu den Wildtyp-tieren. Die RNA-Sequenzierung zeigte, dass die Unterschiede in der Genexpression der WT und NLRP3-defizienten CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zu einem Großteil in den mit T-Zell-Dysfunktion assoziierten Genen liegen. Jedoch konnte bei der RNA-Sequenzierung auch gezeigt werden, dass die NLRP3-defizienten CD8<sup>+</sup>-T-Zellen weniger aktiviert waren. Bei koinhibitorischen Rezeptoren handelt es sich beachtenswerter Weise zuvorderst auch um Aktivitätsmarker. Erst im Rahmen der protrahierten Expression sowie der Koexpression mehrerer koinhibitorischer Rezeptoren werden diese Rezeptoren zu Markern für dysfunktionale T-Zellen (Blackburn et al., 2009). Insofern ist die reduzierte Expression an koinhibitorischen Rezeptoren bei den endogenen T-Zellen in unserem subkutanen Tumormodell in NLRP3-defizienten Empfängermäusen vermutlich eher als reduzierte Aktivierung zu interpretieren. Gleiches gilt für die Expression von T-bet, Eomes und TOX.

Es kann spekuliert werden, dass ohne NLRP3-Signaltransduktion den endogenen CTLs eine ausreichende Aktivierung fehlt. Die naiven T-Zellen bekommen ihr kognates Antigen in den lymphatischen Organen über APCs präsentiert. Diese APCs sind die Hauptproduzenten von NLRP3-vermittelten Zytokinen. Restimuliert man sie mit einem starken Stimulus *ex vivo* sind sie zwar in der Lage ihrer Effektorfunktion nachzukommen. *In vivo* jedoch reicht die alleinige Aktivierung über den T-Zell-Rezeptor nicht aus, um eine ausreichende Immunantwort zu induzieren. Dies deutet darauf hin, dass die Zellen zwar nicht dysfunktional sind, jedoch – bedingt durch geringere Aktivierung - den Tumor nicht anders als die zwar voll aktivierten aber auch dysfunktionalen WT CTLs abstoßen. In der RNA-Sequenzierung zeigte sich neben der fehlenden Aktivierung auch die eine Expression von *Nrp1* und *Tcf7*. Liu et al. (2020) beschrieben Neuropilin als Kontrollgen für T-Gedächtniszellen. Wie auch unsere NLRP3-defizienten CTLs exprimieren sie zwar PD-1 und TCF7 aber kaum TIM-3. Es kann spekuliert werden, ob das Fehlen der NLRP3-Expression sowohl in den APCs als auch in den CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu einer direkten Ausbildung von T-Gedächtnis-Zellen führt, wobei die Phase der CD8<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen ausgelassen wird. Diese tumor-spezifischen Gedächtniszellen könnten bei einer sekundären Tumorerkrankung eine Immunantwort hervorrufen und so zu einem gewissen Grade Immunität verschaffen.

Der Befund ausbleibender Tumorabstoßung bei NLRP3-Defizienz widerspricht den Ergebnissen von Daley et al. (2017). Sie zeigten, dass NLRP3-Defizienz in T-Zellen in KPC-Mäusen zu aktiveren CTLs mit verbesserter Tumorantwort führt. Dies wäre basierend auf unseren Ergebnissen an *Il18r<sup>-/-</sup>* und *Il1r<sup>-/-</sup>* CTLs das erwartete Ergebnis unserer Experimente gewesen, konnte aber nicht bestätigt werden und spricht für eine komplexe Steuerung dieser teils redundanten Mechanismen. In unserem Modell beschränkte sich die NLRP3-Defizienz nicht nur auf die T-Zellen, sondern erstreckte sich auf das gesamte Tumormilieu. Ein weiterer Erklärungsansatz, warum NLRP3-Defizienz in endogenen T-Zellen nicht zu einer verbesserten Tumorantwort führte, könnte sein, dass in unserem Modellsystem die PancOVA-Tumorzellen – welche keine NLRP3-Defizienz aufweisen – den immunsuppressiven Effekt auf die CTLs aufrechterhalten. Unsere PancOVA-Tumorzellen sezernierten sowohl in WT als auch in NLRP3-defizienten Mäusen eine ähnliche Menge an IL-1 $\beta$ . Die IL-1 $\beta$ -Freisetzung in den NLRP3-defizienten Tieren war nur auf den Tumor beschränkt woraus auf eine IL-1 $\beta$ -Sekretion

der Tumorzellen geschlossen werden kann. IL-1 $\beta$  und IL-18 werden von Tumorzellen im Rahmen von *immune escape*-Mechanismen sezerniert, um ein hoch immunsuppressives Tumormilieu zu generieren. So rekrutiert IL-1 $\beta$  Fibroblasten und *myeloid derived suppressor cells* (MDSC) ins Tumorstroma (Pan et al., 2017; Zhang and Hwang, 2019). Auch IL-18 kann ein immunsuppressives Milieu fördern indem es beispielsweise NK-Zellen supprimiert (Terme et al., 2011). Dieses trotz NLRP3-Defizienz hoch immunsuppressive Tumormilieu könnte die T-Zell-Dysfunktion in den adoptiv transferierten WT CTLs hervorrufen. Die geringe Aktivierung der endogenen CTLs könnte ein weiterer Grund sein warum eine NLRP3-Defizienz im Tumormilieu keinen antitumoralen Effekt der transferierten CTLs hatte. Wir konnten zeigen, dass *Il18r<sup>-/-</sup>* CTLs nach adoptivem Transfer einen positiven, antitumoral wirksamen Effekt auf die endogenen T-Zellen hatte. Analog sind auch in NLRP3-defizienten Empfängertieren die adoptiv transferierten WT-CTLs auf die endogenen CTLs angewiesen. Da diese NLRP3-defizienten T-Zellen allerdings unzureichend aktiviert sind entfällt dieser Effekt. Möglicherweise wären die transferierten CTLs durch die fehlende Signaltransduktion über den IL-18- und IL-1-Rezeptor durchaus länger potent; durch die unzureichende, endogene Immunantwort resultierte hieraus aber keine suffiziente Tumorummunantwort, sodass WT-CTLs trotz NLRP3-Defizienz im Tumormilieu in einen dysfunktionalen Zustand übergingen.

Insofern bleiben die Mechanismen der NLRP3-Deletion in unserem Modellsystem des adoptiven T-Zell-Transfers spekulativ. Gleichwohl sind reproduzierbare Effekte der NLRP3-Defizienz auf T-Zellen, insbesondere die intratumoralen endogenen T-Zellen, festzuhalten, die in das Modell der IL-18R- und IL-1R-vermittelten T-Zell-Dysfunktion eingeordnet werden können.

## 5.6 Die Rolle von NLRP3-vermittelten IL-1 $\beta$ und IL-18 in der klinischen Anwendung

Das Pankreaskarzinom weist eine reduzierte Immunogenität, gepaart mit einer geringen Antigenität, auf (Beatty und Gladney, 2015). Das so entstehende immunsuppressive Tumormilieu lässt deshalb kaum eine Immunantwort durch T-Effektorzellen zu, weshalb bisherige Studien zur Immuntherapie nur wenig erfolgreich waren. So wurden in einer

klinische Studie Pankreaskarzinompatienten mit Anakinra, einer rekombinanten Form des humanen IL-1-Rezeptor-Antagonisten, behandelt (Becerra et al., 2018). Ein Grund für die geringe Wirkungsweise des Medikaments könnte sein, dass durch die Blockade des IL-1-Rezeptors zwar eine Reduktion der Dysfunktion intratumoraler CTLs und damit eine verbesserte Immunantwort erreicht wird. Nach unseren Ergebnissen müsste durch eine Blockade des IL-18-Rezeptors die Effektorfunktion von intratumoralen CTLs sogar noch stärker gesteigert werden. Jedoch blockiert der IL-1Ra nicht nur spezifisch die Rezeptoren der intratumoralen CTLs. NLRP3-vermittelte Zytokine und die damit verbundene Rezeptor-Signaltransduktion in CTLs werden auch für die Aktivierung der CTLs benötigt. Eine Inhibition des IL-1-Rezeptors, durch beispielsweise Anakinra, oder des IL-18-Rezeptors wird somit vermutlich keine verbesserte intratumorale Immunantwort durch CTLs zur Folge haben.

Vielmehr sollten im Hinblick auf die Zytokin-Signaltransduktion in CTLs bei der Entwicklung von zukünftigen CAR-T-Zelltherapien CTLs direkt verändert werden. So ist es seit kurzem möglich humane T-Zellen zu isolieren, mit Hilfe der Crispr/Cas-Methode Rezeptoren zu deletieren und diese Zellen zur Therapie adoptiv in Patienten zu transferieren (Kaeuferle et al., 2020). Dabei wird in der Ziel-DNA ein Doppelstrangbruch herbeigeführt, der über nicht-homologe Endverknüpfung wieder repariert wird und durch die so entstehenden Insertionen und Deletionen zur Ausschaltung des Zielgens führt. Dieser Crispr/Cas vermittelte Rezeptordefizienz könnte auch ein künftiger Ansatz bei der CAR-T-Zelltherapie von Pankreaskarzinompatienten sein, um durch Fehlen des IL-18-Rezeptors ein intratumorale Dysfunktion der adoptiv transferierten CAR-T-Zellen zu vermeiden und so die Effektivität der Immuntherapie zu steigern.

## 5.7 Ausblick und Schlussfolgerung

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die T-zelluläre Signaltransduktion über den IL-18-Rezeptor, und in einem geringeren Maße auch über den IL-1-Rezeptor, die Induktion eines dysfunktionalen Zustands intratumoraler CTLs, wie sie für die T-Zell-Exhaustion charakteristisch ist, bewirkt. Dabei wirkt die IL-18- und IL-1-

Rezeptorsignaltransduktion neben der Aktivierung des T-Zell-Rezeptors als zusätzlich stimulierender Faktor. Es wird angenommen, dass sich Mechanismen der T-Zell-Dysfunktion in der Evolution entwickelt haben um eine durch Überstimulation bewirkte Apoptoseinduktion im Rahmen eines *activation-induced cell death* zu vermeiden. Durch verstärkten Aktivierungsreiz über den IL-18- und IL-1-Rezeptor werden T-Zellen somit dysfunktional. Dies geschieht unter anderem durch die Aktivierung des IL-2/STAT-5-Signalwegs durch IL-18. Die verstärkte Aktivierung verhindert eine langsame und kontinuierliche Immunantwort mit anschließender Ausdifferenzierung zu *stemness-like memory* T-Zellen. Bei IL-1 $\beta$  und IL-18 handelt es sich um durch NLRP3 biologisch aktivierte Zytokine, jedoch konnte in dieser Arbeit keine Assoziation zwischen NLRP3-Expression in Empfängermäusen und einer Dysfunktion adoptiv transferierter T-Zellen hergestellt werden. Eine Deletion von NLRP3 in tumortragenden Empfängertieren veränderte die Funktionalität von transferierten CTLs im Vergleich zu WT-Empfängertieren nicht. Auch wirkte sich die fehlende NLRP3-Expression nicht steigernd auf die tumorabstoßende Wirkung der endogenen T-Zellen aus. Weitere Experimente sind notwendig, um die Rolle des IL-1- und IL-18-Rezeptors bei der intratumoralen Dysfunktion von CTLs besser zu verstehen und einordnen zu können. So müssen die der IL-18-Signaltransduktion nachgeschaltete Signalwege in den CTLs weiter charakterisiert und ihre Rolle bei der Dysfunktion untersucht werden. Eine Überexpression von STAT5 in intratumoralen *Il18r<sup>-/-</sup>* CTLs beispielsweise sollte die CTLs wieder in einen dysfunktionalen Zustand kommen lassen. Zudem muss auch die Funktion der IL-1- und IL-18-prozessierenden Zellen, vornehmlich der antigenpräsentierenden Zellen, verstanden und charakterisiert werden und wie sie über diese Zytokine mit den CTLs kommunizieren. Unsere Daten legen nahe, dass die intratumoralen APCs als zelluläre Plattformen zur Integration aktivierender und supprimierender (Zytokin-) Signale wirken. Da IL-1 $\beta$  und IL-18 auch eine wichtige Rolle bei der Differenzierung und Funktionalität von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen spielen sollten die hier durchgeführten Untersuchungen auch mit unterschiedlichen CD4<sup>+</sup>-Subpopulationen durchgeführt werden.

Zusammenfassend hat diese Arbeit gezeigt, dass eine IL-1R- und IL-18R-Signaltransduktion in intratumoralen CTLs einen immunsuppressiven Effekt hat. Die

durch NLRP3 vermittelte Zytokinfreisetzung wird zum einen für die Aktivierung von T-Zellen benötigt. Andererseits induziert das im Tumormilieu von APCs und Tumorzellen sezernierte IL-1 $\beta$  und IL-18 hingegen intratumorale T-Zell-Dysfunktion (Abb. 15). Dieser molekulare Mechanismus lässt die Wirkungsweise des Immunsystems bei der Bekämpfung von Krebserkrankung besser verstehen und kann helfen neue Ansätze für Immuntherapien zu finden.

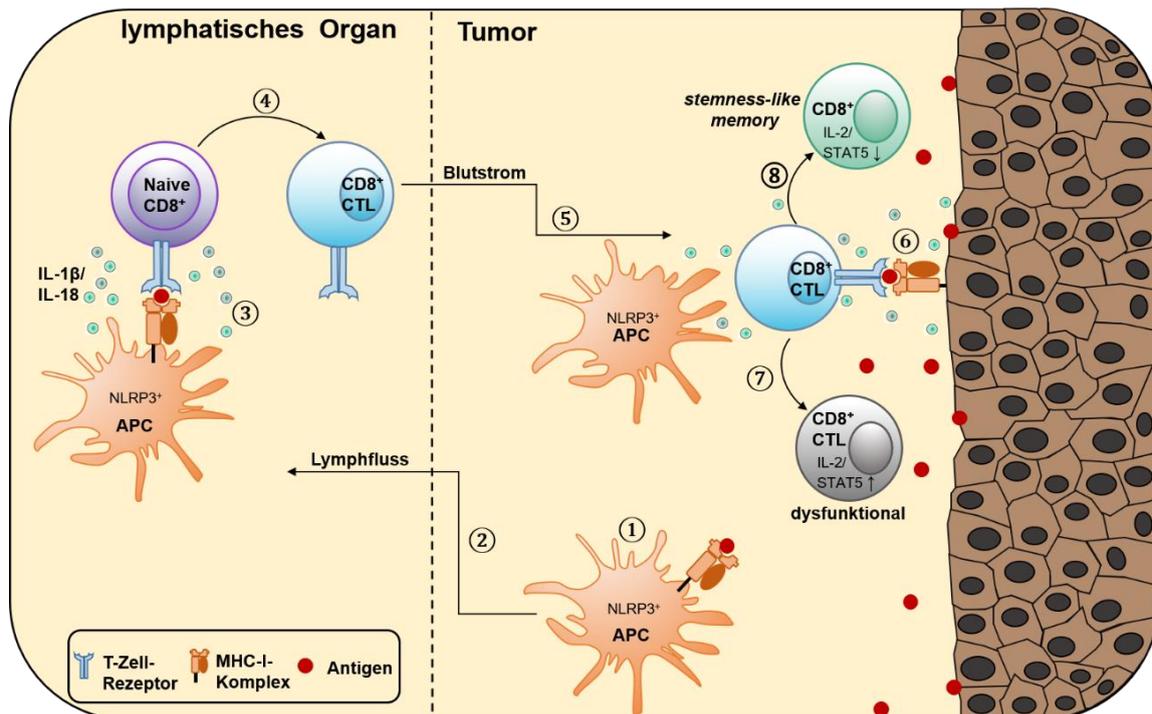


Abb. 15: Einfluss der IL-1- und IL-18-Rezeptor-Signaltransduktion auf die Dysfunktionalität von intratumoralen CTLs.

Schematische Darstellung der IL-1- und IL-18-Rezeptor-Signaltransduktion und ihre Auswirkung auf die Dysfunktion intratumoraler CTLs. (1) Antigenpräsentierende Zellen, wie DCs, Monozyten und Makrophagen, nehmen tumorspezifische Antigene auf und wandern (2) vom Tumorstroma über die Lymphgefäße in die tumordrainierenden Lymphknoten. Währenddessen werden die Tumorantigene prozessiert und die APCs präsentieren die Peptide im MHC-I-Kontext auf ihrer Oberfläche. (3) Dort wird der MHC-I-Peptid-Komplex vom kognaten T-Zell-Rezeptor auf erkannt. (4) Die naiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen differenzieren zu funktionalen CTLs. Die Aktivierung der CTLs wird durch die Sekretion von IL-1 $\beta$  und IL-18 durch die APCs unterstützt. (5) Aktivierte CTLs wandern über die Blutbahn in das Tumorstroma ein. (6) CTLs erkennen dort ihr kognates Antigen und beginnen mit ihrer zytotoxischen Immunantwort. (7) Hier kommt es durch Aktivierung des T-Zellrezeptors und durch gleichzeitige Stimulation der IL-1- und IL-18-Rezeptoren zur Überstimulation der CTLs. Dies aktiviert unter anderem den IL-2/STAT5-Signalweg und induziert einen dysfunktionalen Zustand der CTLs. Intratumorales IL-1 $\beta$  und IL-18 werden hierbei von APCs und den Pankreaskarzinomzellen selbst sekretiert. (8) Bei fehlender Überstimulation sind die CTLs in der Lage ihrer antitumoralen Effektorfunktion nachzugehen und werden nach Beseitigung der Tumormasse zu stemness-like memory T-Zellen.

## 6 Zusammenfassung

Das Pankreaskarzinom zeichnet sich durch geringe Immunogenität und geringe Antigenität aus. Aus diesem Grund haben sich Therapieansätze auf Basis immuntherapeutischer Strategien bisher nicht im klinischen Behandlungsalgorithmus durchsetzen können. Zwar ist die Infiltration mit zytotoxischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (CTLs) bei Pankreaskarzinompatienten prognostisch günstig, allerdings zeigen intratumorale CTLs reduzierte zytotoxische Effektorfunktionen sowie gesteigerte Expression koinhibitorischen Rezeptoren, wie PD-1 und TIM-3. Aufgrund dieser T-Zell-Dysfunktion sind die CTLs nicht in der Lage Pankreaskarzinomzellen adäquat zu bekämpfen. Die NLRP3-vermittelten Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-18 können auf die Plastizität der CTLs einwirken und die intratumorale Dysfunktion dieser Zellen steigern. Diese Arbeit untersucht die Rolle der NLRP3-vermittelten IL-1-Rezeptor (IL-1R)- und IL-18-Rezeptor (IL-18R)-Signaltransduktion für Plastizität und Effektorfunktion von zytotoxischen T-Zellen während der Immunantwort in einem murinen Pankreaskarzinommodell.

Das Ziel dieser Arbeit ist es a) den Einfluss von IL-1 $\beta$  und IL-18 auf Differenzierung und zytotoxische Effektorfunktion von CTLs zu untersuchen, b) die Rolle der IL-1R- und IL-18R-Signaltransduktion in intratumoralen CTLs und ihre Auswirkung auf deren Dysfunktion zu analysieren, c) den Einfluss von IL-1 $\beta$  und IL-18 auf Tumorzellen zu untersuchen sowie d) zu zeigen wie intratumorale NLRP3-Expression die Immunantwort adoptiv transferierter und endogener CTLs beeinflusst.

Diese Arbeit zeigt, dass IL-18R-Signaltransduktion, und in einem geringeren Maße die Signaltransduktion über IL-1R, einen immunsuppressiven Effekt auf intratumorale CTLs hat und die Entwicklung eines dysfunktionalen Zustands fördert. Die IL-18R-Signaltransduktion induziert den dysfunktionalen Zustand dabei über die Stimulation des IL-2-Rezeptors und dem damit verbundenen IL-2/Stat5-Signalweg. IL-18R-defiziente intratumorale T-Zellen zeigen hingegen im Vergleich zu intratumoralen Wildtyp (WT) T-Zellen eine verminderte Expression von *Pdcd1*, *Havcr2*, *Lag3*, *Tigit*, *Eomes* und *Prdm1* mit einer gleichzeitig gesteigerten Expression von *Tcf7* und *Lef1*, was auf eine erhöhte *stemness-like memory*-Funktion dieser Zellen hinweist. Des Weiteren

wird gezeigt, dass die Signaltransduktion NLR3-abgeleiteter Zytokine einerseits wichtig für die Aktivierung von CTLs ist, andererseits aber auch die Induktion eines dysfunktionalen Phänotyps befördert. Hierbei wirken pleiotrope Effekte auf die intratumoralen CTLs.

Zusammenfassend liefert diese Arbeit mechanistische Einblicke in die Induktion intratumoraler T-Zell-Dysfunktion durch IL-1R- und IL-18R-Signaltransduktion und ist daher relevant für die Entwicklung.

## 7 Abstract

Pancreatic cancer is characterized by low immunogenicity and low antigenicity, resulting in limited success of immunotherapy such as checkpoint inhibitor therapy in clinical trials. Intratumoral CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells (CTLs) exhibit a dysfunctional status (also known as exhaustion), characterized by impairment of cytokine production as well as upregulation of co-inhibitory receptors, such as PD-1 and TIM-3. This results in the loss of T cell effector function. Mechanistically, proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and IL-18 might influence intratumoral T cell plasticity. This project investigates the role of NLRP3-mediated IL-1 receptor and IL-18 receptor signalling on cytotoxic T cell responses in a murine model of pancreatic cancer.

The main aims of this project were: a) to investigate the role of IL-1 and IL-18 signaling in CTLs on their plasticity and cytotoxicity, b) investigate which role IL-1 and IL-18 signaling play in intratumoral CTL on their dysfunctional status in a murine pancreatic cancer model, c) characterize the influence of IL-1 and IL-18 on tumor cells and d) how does intratumoral NLRP3 signaling change the immunresponse of CTLs and which role does it play during exhaustion.

This study shows that IL-18R signalling, and to a lesser degree IL-1R signalling, has an immunosuppressive effect on intratumoral CTLs and causes an exhausted phenotype. IL-18R signalling induces this dysfunctional phenotype by IL-2 receptor stimulation, resulting in the activation of the IL-2/STAT5-pathway. IL-18R-deficient intratumoral T cells show reduced expression of *Pdcd1*, *Havcr2*, *Lag3*, *Tigit*, *Eomes* and *Prdm1* in comparison to WT T cells, with an upregulated expression *Tcf7* and *Lef1* at the same time. This indicates that *Il18r<sup>-/-</sup>* CTLs develop more easily into *stemness-like* memory cells, instead of exhausted effector CTLs. Furthermore, our study shows a pleiotropic effect of NLRP3 and its mediated cytokines on T-cell activation and exhaustion in the tumor stroma.

Thus, this work provides mechanistic insights into NLRP3-mediated IL-1 $\beta$  and IL-18 signalling in CTLs during intratumoral exhaustion and might prove relevant for the development of innovative immunotherapies.

## Literaturverzeichnis

- Afonina, I.S., Müller, C., Martin, S.J., und Beyaert, R. (2015). Proteolytic Processing of Interleukin-1 Family Cytokines: Variations on a Common Theme. *Immunity* 42, 991–1004.
- Apte, R.N., Krelin, Y., Song, X., Dotan, S., Recih, E., Elkabets, M., Carmi, Y., Dvorkin, T., White, R.M., Gayvoronsky, L., et al. (2006). Effects of micro-environment- and malignant cell-derived interleukin-1 in carcinogenesis, tumour invasiveness and tumour–host interactions. *Eur. J. Cancer* 42, 751–759.
- Bailey, S.R., Nelson, M.H., Himes, R.A., Li, Z., Mehrotra, S., und Paulos, C.M. (2014). Th17 Cells in Cancer: The Ultimate Identity Crisis. *Front. Immunol.* 5.
- Baker, K.J., Houston, A., und Brint, E. (2019). IL-1 Family Members in Cancer; Two Sides to Every Story. *Front. Immunol.* 10, 1197.
- Balli, D., Rech, A.J., Stanger, B.Z., und Vonderheide, R.H. (2017). Immune Cytolytic Activity Stratifies Molecular Subsets of Human Pancreatic Cancer. *Clin. Cancer Res.* 23, 3129–3138.
- Bally, A.P.R., Lu, P., Tang, Y., Austin, J.W., Scharer, C.D., Ahmed, R., und Boss, J.M. (2015). NF- $\kappa$ B Regulates PD-1 Expression in Macrophages. *J. Immunol.* 194, 4545–4554.
- Barber, D.L., Wherry, E.J., Masopust, D., Zhu, B., Allison, J.P., Sharpe, A.H., Freeman, G.J., und Ahmed, R. (2006). Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 439, 682–687.
- Bauer, C.A., Kim, E.Y., Marangoni, F., Carrizosa, E., Claudio, N.M., und Mempel, T.R. (2014). Dynamic Treg interactions with intratumoral APCs promote local CTL dysfunction. *J. Clin. Invest.* 124, 2425–2440.
- Bauernfeind, F.G., Horvath, G., Stutz, A., Alnemri, E.S., MacDonald, K., Speert, D., Fernandes-Alnemri, T., Wu, J., Monks, B.G., Fitzgerald, K.A., et al. (2009). Cutting Edge: NF- $\kappa$ B Activating Pattern Recognition and Cytokine Receptors License NLRP3 Inflammasome Activation by Regulating NLRP3 Expression. *J. Immunol.* 183, 787–791.
- Beatty, G.L., und Gladney, W.L. (2015). Immune Escape Mechanisms as a Guide for Cancer Immunotherapy. *Clin. Cancer Res.* 21, 687–692.
- Becerra, C., Paulson, A.S., Cavaness, K.M., und Celinski, S.A. (2018). Gemcitabine, nab-paclitaxel, cisplatin, and anakinra (AGAP) treatment in patients with localized pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). *J. Clin. Oncol.* 36, 449–449.
- Beltra, J.-C., Bourbonnais, S., Bédard, N., Charpentier, T., Boulangé, M., Michaud, E., Boufaied, I., Bruneau, J., Shoukry, N.H., Lamarre, A., et al. (2016). IL2R $\beta$ -dependent signals drive terminal exhaustion and suppress memory development during chronic viral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, E5444–E5453.

- Beltra, J.-C., Manne, S., Abdel-Hakeem, M.S., Kurachi, M., Giles, J.R., Chen, Z., Casella, V., Ngiow, S.F., Khan, O., Huang, Y.J., et al. (2020). Developmental Relationships of Four Exhausted CD8+ T Cell Subsets Reveals Underlying Transcriptional and Epigenetic Landscape Control Mechanisms. *Immunity* 52, 825-841.e8.
- Bengsch, B., Ohtani, T., Khan, O., Setty, M., Manne, S., O'Brien, S., Gherardini, P.F., Herati, R.S., Huang, A.C., Chang, K.-M., et al. (2018). Epigenomic-Guided Mass Cytometry Profiling Reveals Disease-Specific Features of Exhausted CD8 T Cells. *Immunity* 48, 1029-1045.e5.
- Blackburn, S.D., Shin, H., Haining, W.N., Zou, T., Workman, C.J., Polley, A., Betts, M.R., Freeman, G.J., Vignali, D.A.A., und Wherry, E.J. (2009). Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat. Immunol.* 10, 29–37.
- Carstens, J.L., Correa de Sampaio, P., Yang, D., Barua, S., Wang, H., Rao, A., Allison, J.P., LeBleu, V.S., und Kalluri, R. (2017). Spatial computation of intratumoral T cells correlates with survival of patients with pancreatic cancer. *Nat. Commun.* 8, 15095.
- Chackerian, A.A., Oldham, E.R., Murphy, E.E., Schmitz, J., Pflanz, S., und Kastelein, R.A. (2007). IL-1 Receptor Accessory Protein and ST2 Comprise the IL-33 Receptor Complex. *J. Immunol.* 179, 2551–2555.
- Chaix, J., Tessmer, M.S., Hoebe, K., Fuséri, N., Ryffel, B., Dalod, M., Alexopoulou, L., Beutler, B., Brossay, L., Vivier, E., et al. (2016). Priming of Natural Killer cells by Interleukin-18. 14.
- Coeshott, C., Ohnemus, C., Pilyavskaya, A., Ross, S., Wiczorek, M., Kroona, H., Leimer, A.H., und Cheronis, J. (1999). presence of activated neutrophils or purified proteinase 3. *Proc Natl Acad Sci USA* 6.
- Conroy, T., Hammel, P., Hebbar, M., Ben Abdelghani, M., Wei, A.C., Raoul, J.-L., Choné, L., Francois, E., Artru, P., Biagi, J.J., et al. (2018). FOLFIRINOX or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. *N. Engl. J. Med.* 379, 2395–2406.
- Corbett, T.H., Roberts, B.J., Leopold, W.R., Peckham, J.C., Wilkoff, L.J., und Griswold, D.P. (1984). Induction and Chemotherapeutic Response of Two Transplantable Ductal Adenocarcinomas of the Pancreas in C57BL/6 Mice. *Cancer Res.* 44, 717–726.
- Daley, D., Mani, V.R., Mohan, N., Akkad, N., Pandian, G.S.D.B., Savadkar, S., Lee, K.B., Torres-Hernandez, A., Aykut, B., Diskin, B., et al. (2017). NLRP3 signaling drives macrophage-induced adaptive immune suppression in pancreatic carcinoma. *J. Exp. Med.* 214, 1711–1724.
- Das, S., Shapiro, B., Vucic, E.A., Vogt, S., und Bar-Sagi, D. (2020). Tumor Cell-Derived IL1 $\beta$  Promotes Desmoplasia and Immune Suppression in Pancreatic Cancer. *Cancer Res.* 80, 1088–1101.

- Day, C.L., Kaufmann, D.E., Kiepiela, P., Brown, J.A., Moodley, E.S., Reddy, S., Mackey, E.W., Miller, J.D., Leslie, A.J., DePierres, C., et al. (2006). PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* 443, 350–354.
- Dinarello, C.A. (1984). Interleukin-1. *Rev. Infect. Dis.* 6, 51–95.
- Dinarello, C.A. (2009). Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 519–550.
- Dinarello, C.A., Novick, D., Kim, S., und Kaplanski, G. (2013). Interleukin-18 and IL-18 Binding Protein. *Front. Immunol.* 4.
- Doering, T.A., Crawford, A., Angelosanto, J.M., Paley, M.A., Ziegler, C.G., und Wherry, E.J. (2012). Network Analysis Reveals Centrally Connected Genes and Pathways Involved in CD8+ T Cell Exhaustion versus Memory. *Immunity* 37, 1130–1144.
- Dudley, J.C., Lin, M.-T., Le, D.T., und Eshleman, J.R. (2016). Microsatellite Instability as a Biomarker for PD-1 Blockade. *Clin. Cancer Res.* 22, 813–820.
- Duewell, P., Steger, A., Lohr, H., Bourhis, H., Hoelz, H., Kirchleitner, S.V., Stieg, M.R., Grassmann, S., Kobold, S., Siveke, J.T., et al. (2014). RIG-I-like helicases induce immunogenic cell death of pancreatic cancer cells and sensitize tumors toward killing by CD8+ T cells. *Cell Death Differ.* 21, 1825–1837.
- Ebert, P.J.R., Cheung, J., Yang, Y., McNamara, E., Hong, R., Moskalenko, M., Gould, S.E., Maecker, H., Irving, B.A., Kim, J.M., et al. (2016). MAP Kinase Inhibition Promotes T Cell and Anti-tumor Activity in Combination with PD-L1 Checkpoint Blockade. *Immunity* 44, 609–621.
- Eso, Y., Shimizu, T., Takeda, H., Takai, A., und Marusawa, H. (2020). Microsatellite instability and immune checkpoint inhibitors: toward precision medicine against gastrointestinal and hepatobiliary cancers. *J. Gastroenterol.* 55, 15–26.
- Gallimore, A., Glithero, A., Godkin, A., Tissot, A.C., Plückthun, A., Elliott, T., Hengartner, H., und Zinkernagel, R. (1998). Induction and Exhaustion of Lymphocytic Choriomeningitis Virus-specific Cytotoxic T Lymphocytes Visualized Using Soluble Tetrameric Major Histocompatibility Complex Class I–Peptide Complexes. *J. Exp. Med.* 187, 1383–1393.
- Garlanda, C., Dinarello, C.A., und Mantovani, A. (2013). The Interleukin-1 Family: Back to the Future. *Immunity* 39, 1003–1018.
- Gilmour, K.C., Pine, R., und Reich, N.C. (1995). Interleukin 2 activates STAT5 transcription factor (mammary gland factor) and specific gene expression in T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 10772–10776.
- Greten, F.R., und Grivnenkov, S.I. (2019). Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. *Immunity* 51, 27–41.

- Griffin, J.F., Poruk, K.E., und Wolfgang, C.L. (2015). Pancreatic cancer surgery: past, present, and future. *Chin J Cancer Res* 27, 17.
- Guillén-Ponce, C., Blázquez, J., González, I., de-Madaria, E., Montáns, J., und Carrato, A. (2017). Diagnosis and staging of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin. Transl. Oncol.* 19, 1205–1216.
- Halle, S., Halle, O., und Förster, R. (2017). Mechanisms and Dynamics of T Cell-Mediated Cytotoxicity In Vivo. *Trends Immunol.* 38, 432–443.
- Henriksen, A. (2019). Checkpoint inhibitors in pancreatic cancer. *Cancer Treat. Rev.* 14.
- Ikeda, S., Saijo, S., Murayama, M.A., Shimizu, K., Akitsu, A., und Iwakura, Y. (2014). Excess IL-1 Signaling Enhances the Development of Th17 Cells by Downregulating TGF- $\beta$ -Induced Foxp3 Expression. *J. Immunol.* 192, 1449–1458.
- Jacobs, C., Duewell, P., Heckelsmiller, K., Wei, J., Bauernfeind, F., Ellermeier, J., Kisser, U., Bauer, C.A., Dauer, M., Eigler, A., et al. (2011). An ISCOM vaccine combined with a TLR9 agonist breaks immune evasion mediated by regulatory T cells in an orthotopic model of pancreatic carcinoma. *Int. J. Cancer* 128, 897–907.
- Jansen, C.S., Prokhnjevskaja, N., Master, V.A., Sanda, M.G., Carlisle, J.W., Bilen, M.A., Cardenas, M., Wilkinson, S., Lake, R., Sowalsky, A.G., et al. (2019). An intra-tumoral niche maintains and differentiates stem-like CD8 T cells. *Nature* 576, 465–470.
- Kabacaoglu, D., Ciecieski, K.J., Ruess, D.A., und Algül, H. (2018). Immune Checkpoint Inhibition for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Current Limitations and Future Options. *Front. Immunol.* 9, 1878.
- Kaech, S.M., Wherry, E.J., und Ahmed, R. (2002). Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 251–262.
- Kaeuferle, T., Deisenberger, L., Jablonowski, L., Stief, T.A., Blaeschke, F., Willier, S., und Feuchtinger, T. (2020). CRISPR-Cas9-Mediated Glucocorticoid Resistance in Virus-Specific T Cells for Adoptive T Cell Therapy Posttransplantation. *Mol. Ther.* 28, 1965–1973.
- Kang, J.S., Y.Bae, S., R.Kim, H., Kim, Y.S., J.Kim, D., Cho, B.J., Yang, H.-K., Hwang, Y.-I., J.Kim, K., Park, H.S., et al. (2009). Interleukin-18 increases metastasis and immune escape of stomach cancer via the downregulation of CD70 and maintenance of CD44. *Carcinogenesis* 30, 1987–1996.
- Khan, O., Giles, J.R., McDonald, S., Manne, S., Ngiow, S.F., Patel, K.P., Werner, M.T., Huang, A.C., Alexander, K.A., Wu, J.E., et al. (2019). TOX transcriptionally and epigenetically programs CD8<sup>+</sup> T cell exhaustion. *Nature* 571, 211–218.
- Krishna, S., Xie, D., Gorentla, B., Shin, J., Gao, J., und Zhong, X.-P. (2012). Chronic Activation of the Kinase IKK $\beta$  Impairs T Cell Function and Survival. *J. Immunol.* 189, 1209–1219.

- Kumar, B.V., Connors, T.J., und Farber, D.L. (2018). Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. *Immunity* 48, 202–213.
- Lewis, A.M., Varghese, S., Xu, H., und Alexander, H.R. (2006). Interleukin-1 and cancer progression: the emerging role of interleukin-1 receptor antagonist as a novel therapeutic agent in cancer treatment. *J. Transl. Med.* 4, 48–48.
- Li, Z., Yu, X., Werner, J., Bazhin, A.V., und D’Haese, J.G. (2019). The role of interleukin-18 in pancreatitis and pancreatic cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 50, 1–12.
- Martinon, F., Mayor, A., und Tschopp, J. (2009). The Inflammasomes: Guardians of the Body. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 229–265.
- McLane, L.M., Abdel-Hakeem, M.S., und Wherry, E.J. (2019). CD8 T Cell Exhaustion During Chronic Viral Infection and Cancer. *Annu. Rev. Immunol.* 37, 457–495.
- Miller, A.L., Garcia, P.L., und Yoon, K.J. (2020). Developing effective combination therapy for pancreatic cancer: An overview. *Pharmacol. Res.* 155, 104740.
- Moossavi, M., Parsamanesh, N., Bahrami, A., Atkin, S.L., und Sahebkar, A. (2018). Role of the NLRP3 inflammasome in cancer. *Mol. Cancer* 17, 158.
- Morrison, A.H., Byrne, K.T., und Vonderheide, R.H. (2018). Immunotherapy and Prevention of Pancreatic Cancer. *Trends Cancer* 4, 418–428.
- Mucciolo, G., Roux, C., Scagliotti, A., Brugiapaglia, S., Novelli, F., und Cappello, P. (2020). The dark side of immunotherapy: pancreatic cancer. *Cancer Drug Resist.*
- Nakamura, K., Okamura, H., Nagata, K., Komatsu, T., und Tamura, T. (1993). Purification of a factor which provides a costimulatory signal for gamma interferon production. *Infect. Immun.* 61, 64–70.
- Nakanishi, K., Yoshimoto, T., Tsutsui, H., und Okamura, H. (2001). Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. *Cytokine Growth Factor Rev.* 12, 53–72.
- Neesse, A., Algül, H., Tuveson, D.A., und Gress, T.M. (2015). Stromal biology and therapy in pancreatic cancer: a changing paradigm. *Gut* 64, 1476–1484.
- Netea, M.G., Kullberg, B.J., Verschueren, I., und Van Der Meer, J.W. (2000). Interleukin-18 induces production of proinflammatory cytokines in mice: no intermediate role for the cytokines of the tumor necrosis factor family and interleukin-1beta. *Eur. J. Immunol.* 30, 3057–3060.
- Nomi, T., Sho, M., Akahori, T., Hamada, K., Kubo, A., Kanehiro, H., Nakamura, S., Enomoto, K., Yagita, H., Azuma, M., et al. (2007). Clinical Significance and Therapeutic Potential of the Programmed Death-1 Ligand/Programmed Death-1 Pathway in Human Pancreatic Cancer. *Clin. Cancer Res.* 13, 2151–2157.

Okamura, H., Nagata, K., Komatsu, T., Tanimoto, T., Nukata, Y., Tanabe, F., Akita, K., Torigoe, K., Okura, T., und Fukuda, S. (1995). A novel costimulatory factor for gamma interferon induction found in the livers of mice causes endotoxic shock. *Infect. Immun.* *63*, 3966–3972.

Pais Ferreira, D., Silva, J.G., Wyss, T., Fuertes Marraco, S.A., Scarpellino, L., Charmoy, M., Maas, R., Siddiqui, I., Tang, L., Joyce, J.A., et al. (2020). Central memory CD8<sup>+</sup> T cells derive from stem-like Tcf7<sup>hi</sup> effector cells in the absence of cytotoxic differentiation. *Immunity* *53*, 985-1000.e11.

Paley, M.A., Kroy, D.C., Odorizzi, P.M., Johnnidis, J.B., Dolfi, D.V., Barnett, B.E., Bikoff, E.K., Robertson, E.J., Lauer, G.M., Reiner, S.L., et al. (2012). Progenitor and Terminal Subsets of CD8<sup>+</sup> T Cells Cooperate to Contain Chronic Viral Infection. *Science* *338*, 1220–1225.

Palma, G., Barbieri, A., Bimonte, S., Palla, M., Zappavigna, S., Caraglia, M., Ascierio, P.A., Ciliberto, G., und Arra, C. (2013). Interleukin 18: Friend or foe in cancer. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* *1836*, 296–303.

Pan, W., Zhu, S., Qu, K., Meeth, K., Cheng, J., He, K., Ma, H., Liao, Y., Wen, X., Roden, C., et al. (2017). The DNA Methylcytosine Dioxygenase Tet2 Sustains Immunosuppressive Function of Tumor-Infiltrating Myeloid Cells to Promote Melanoma Progression. *Immunity* *47*, 284-297.e5.

Pang, I.K., Ichinohe, T., und Iwasaki, A. (2013). IL-1R signaling in dendritic cells replaces pattern-recognition receptors in promoting CD8<sup>+</sup> T cell responses to influenza A virus. *Nat. Immunol.* *14*, 246–253.

Pauken, K.E., und Wherry, E.J. (2015). Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer. *Trends Immunol.* *36*, 265–276.

Rex, D.A.B., Agarwal, N., Prasad, T.S.K., Kandasamy, R.K., Subbannayya, Y., und Pinto, S.M. (2020). A comprehensive pathway map of IL-18-mediated signalling. *J. Cell Commun. Signal.* *14*, 257–266.

Schroder, K., und Tschopp, J. (2010). The Inflammasomes. *Cell* *140*, 821–832.

Scott, A.C., Dündar, F., Zumbo, P., Chandran, S.S., Klebanoff, C.A., Shakiba, M., Trivedi, P., Menocal, L., Appleby, H., Camara, S., et al. (2019). TOX is a critical regulator of tumour-specific T cell differentiation. *Nature* *571*, 270–274.

Seidel, J.A., Otsuka, A., und Kabashima, K. (2018). Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 Therapies in Cancer: Mechanisms of Action, Efficacy, and Limitations. *Front. Oncol.* *8*, 86.

Siegel, R.L., Miller, K.D., und Jemal, A. (2020). Cancer statistics, 2020. *CA. Cancer J. Clin.* *70*, 7–30.

- Springfeld, C., Jäger, D., Büchler, M.W., Strobel, O., Hackert, T., Palmer, D.H., und Neoptolemos, J.P. (2019). Chemotherapy for pancreatic cancer. *Presse Médicale* 48, e159–e174.
- Stegmann, K.A., De Souza, J.B., und Riley, E.M. (2015). IL-18-induced expression of high-affinity IL-2R on murine NK cells is essential for NK-cell IFN- $\gamma$  production during murine *Plasmodium yoelii* infection. *Eur. J. Immunol.* 45, 3431–3440.
- Sunami, Y., und Kleeff, J. (2019). Immunotherapy of pancreatic cancer. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, (Elsevier), pp. 189–216.
- Szabo, P.A., Levitin, H.M., Miron, M., Snyder, M.E., Senda, T., Yuan, J., Cheng, Y.L., Bush, E.C., Dogra, P., Thapa, P., et al. (2019). Single-cell transcriptomics of human T cells reveals tissue and activation signatures in health and disease. *Nat. Commun.* 10, 4706.
- Tangkijvanich, P. (2007). Role of serum interleukin-18 as a prognostic factor in patients with hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* 13, 4345.
- Terme, M., Ullrich, E., Aymeric, L., Meinhardt, K., Desbois, M., Delahaye, N., Viaud, S., Ryffel, B., Yagita, H., Kaplanski, G., et al. (2011). IL-18 Induces PD-1-Dependent Immunosuppression in Cancer. *Cancer Res.* 71, 5393–5399.
- Tesmer, L.A., Lundy, S.K., Sarkar, S., und Fox, D.A. (2008). Th17 cells in human disease. *Immunol. Rev.* 223, 87–113.
- Togashi, Y., Shitara, K., und Nishikawa, H. (2019). Regulatory T cells in cancer immunosuppression – implications for anticancer therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 16, 356–371.
- Tominaga, K., Yoshimoto, T., Torigoe, K., Kurimoto, M., Matsui, K., Hada, T., Okamura, H., und Nakanishi, K. (2000). IL-12 synergizes with IL-18 or IL-1 $\beta$  for IFN- $\gamma$  production from human T cells. *Int. Immunol.* 12, 151–160.
- Tripathi, P., Kurtulus, S., Wojciechowski, S., Sholl, A., Hoebe, K., Morris, S.C., Finkelman, F.D., Grimes, H.L., und Hildeman, D.A. (2010). STAT5 Is Critical To Maintain Effector CD8<sup>+</sup>T Cell Responses. *J. Immunol.* 185, 2116–2124.
- Tsutsumi, N., Kimura, T., Arita, K., Ariyoshi, M., Ohnishi, H., Yamamoto, T., Zuo, X., Maenaka, K., Park, E.Y., Kondo, N., et al. (2014). The structural basis for receptor recognition of human interleukin-18. *Nat. Commun.* 5, 5340.
- Voronov, E., Shouval, D.S., Krelin, Y., Cagnano, E., Benharroch, D., Iwakura, Y., Dinarello, C.A., und Apte, R.N. (2003). IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 2645–2650.
- Wang, L., Manji, G.A., Grenier, J.M., Al-Garawi, A., Merriam, S., Lora, J.M., Geddes, B.J., Briskin, M., DiStefano, P.S., und Bertin, J. (2002). PYPAF7, a Novel PYRIN-containing Apaf1-like Protein That Regulates Activation of NF- $\kappa$ B and Caspase-1-dependent Cytokine Processing. *J. Biol. Chem.* 277, 29874–29880.

- Wherry, E.J. (2011). T cell exhaustion. *Nat. Immunol.* *12*, 492–499.
- Wherry, E.J., und Kurachi, M. (2015). Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat. Rev. Immunol.* *15*, 486–499.
- Yasuda, K., Nakanishi, K., und Tsutsui, H. (2019). Interleukin-18 in Health and Disease. *Int. J. Mol. Sci.* *20*, 649.
- Ye, B., Liu, X., Li, X., Kong, H., Tian, L., und Chen, Y. (2015). T-cell exhaustion in chronic hepatitis B infection: current knowledge and clinical significance. *Cell Death Dis.* *6*, e1694–e1694.
- Zajac, A.J., Blattman, J.N., Murali-Krishna, K., Sourdive, D.J.D., Suresh, M., Altman, J.D., und Ahmed, R. (1998). Viral Immune Evasion Due to Persistence of Activated T Cells Without Effector Function. *J. Exp. Med.* *188*, 2205–2213.
- Zarour, H.M. (2016). Reversing T-cell Dysfunction and Exhaustion in Cancer. *Clin. Cancer Res.* *22*, 1856–1864.
- Zhang, N., und Bevan, M.J. (2011). CD8+ T Cells: Foot Soldiers of the Immune System. *Immunity* *35*, 161–168.
- Zhang, X., und Hwang, Y. (2019). Cancer-associated fibroblast stimulates cancer cell invasion in an interleukin-1 receptor (IL-1R)-dependent manner. *Oncol. Lett.*
- Zhu, J., und Paul, W.E. (2008). CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* *112*, 1557–1569.
- Zhu, J., Yamane, H., Cote-Sierra, J., Guo, L., und Paul, W.E. (2006). GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. *Cell Res.* *16*, 3–10.
- Ziblat, A., Nuñez, S.Y., Raffo Iraolagoitia, X.L., Spallanzani, R.G., Torres, N.I., Sierra, J.M., Secchiari, F., Domaica, C.I., Fuertes, M.B., und Zwirner, N.W. (2018). Interleukin (IL)-23 Stimulates IFN- $\gamma$  Secretion by CD56bright Natural Killer Cells and Enhances IL-18-Driven Dendritic Cells Activation. *Front. Immunol.* *8*, 1959.

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Laborgeräte.....	14
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien.....	16
Tabelle 3: Software .....	17
Tabelle 4: Reagenzien und Chemikalien.....	18
Tabelle 5: Nährmedien und Zusätze .....	19
Tabelle 6: Puffer, Lösungen und Nährmedien.....	20
Tabelle 7: Antikörper .....	21
Tabelle 8: Kits.....	25
Tabelle 9: Zelllinien .....	26
Tabelle 10: Mauslinien .....	26
Tabelle 11: Primer Genotypisierung.....	27
Tabelle 12: Primer qRT-PCR .....	28
Tabelle 13: PCR-Ansatz zur Genotypisierung der $Il18r^{-/-}$ - und $Il1r^{-/-}$ -Mäuse.....	36
Tabelle 14: Geräteeinstellung für PCR.....	36
Tabelle 15: Zusammensetzung Mastermix der qPCR.....	38
Tabelle 16: Geräteeinstellung für qPCR .....	38
Tabelle 17: Zusammensetzung Polyacrylamidgele .....	41

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Charakterisierung der verschiedenen Stadien intratumoraler CTLs.....	5
Abb. 2: Phäno- und Genotypisierung der generierten Zuchtlinien <i>Il18r<sup>-/-</sup></i> OT-I und <i>Il1r<sup>-/-</sup></i> OT-I.....	44
Abb. 3: Die IL-1- und IL-18-Rezeptordefizienz beeinflusst nicht die Differenzierung zu antigenspezifischen CTLs.....	45
Abb. 4: IL-18-vermittelte Stimulation antigenpräsentierender DC bewirkt eine indirekte Steigerung der Zytotoxizität von CTLs in vitro.....	47
Abb. 5: T-zelluläre IL-18-Rezeptor-Signaltransduktion in intratumoralen CD8 <sup>+</sup> CTLs resultiert in reduzierter Potenz der Tumorabstoßung sowie einer verminderten Expression koinhibitorischer Moleküle.....	49
Abb. 6: IL-18-Rezeptor-Signaltransduktion in intratumoralen CD8 <sup>+</sup> CTLs führt zum Verlust der zytotoxischen Funktion von T-Zellen.....	50
Abb. 7: Die durch die IL-18-Signaltransduktion erhöhte Dysfunktion spiegelt sich in einer verringerten Infiltration bzw. Proliferation in lymphatischen Organen.....	52
Abb. 8: Die IL-18-Rezeptor-Defizienz in transferierten CTLs reduziert die intratumorale Dysfunktion endogener CTLs.....	54
Abb. 9: IL-18-Rezeptor-Signaltransduktion in intratumoralen CTLs induziert eine dysfunktionale Gensignatur durch Aktivierung des IL-2/STAT5-Signalwegs.....	56
Abb. 10: Reduktion der T-Zell-Dysfunktion in <i>Il1r<sup>-/-</sup></i> CTLs beschleunigt die Tumorabstoßung nicht signifikant.....	58
Abb. 11: Intratumorales IL-1 $\beta$ und IL-18 erhöht die Proliferation von pankreatischen Tumorzellen in vitro.....	61
Abb. 12: Durch NLRP3-vermittelte Zytokinproduktion beeinflusst nicht die Immunantwort von antigenspezifischen transferierten CTLs.....	62
Abb. 13: NLRP3-Defizienz resultiert in einer reduzierten Expression koinhibitorischer Rezeptoren auf endogenen CTLs.....	64
Abb. 14: NLRP3 fördert die Dysfunktion in endogenen CTLs, ist jedoch auch für deren Aktivierung verantwortlich.....	66
Abb. 15: Einfluss der IL-1- und IL-18-Rezeptor-Signaltransduktion auf die Dysfunktionalität von intratumoralen CTLs.....	80

Lebenslauf

## Verzeichnis akademischer Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Halle (Saale) waren die Damen und Herren:

Bacia, Baginsky, Bonas, Breunig, Bruehlheide, Ferenz, Fritzsche, Heilmann, Hensen, Humbeck, Jäger, Johanningmeier, Klösgen, Loppnow, Moritz, Moritz, Nies, Paxton, Reuter, Röser, Sawers, Schlote, Schmidt, Schmitt, Seliger, Weinert

## Danksagung

Mein Dank gilt allen voran PD Dr. Christian Bauer für die in jeder Hinsicht umfassende Betreuung meiner Dissertation. Trotz oft stressigen Klinikalltags nahm er sich immer die Zeit Daten zu diskutieren und in den wissenschaftlichen Kontext einzuordnen, meine Fragen zu beantworten und auftretende Probleme schnell zu lösen.

Zudem möchte ich mich bei Prof. Dr. Thomas Gress für die Möglichkeit bedanken in der Abteilung für Gastroenterologie meine Dissertation anfertigen zu können. Ebenso gilt mein Dank Prof. Dr. Malte Buchholz als Referent diese Arbeit zu betreuen und für seine Hilfsbereitschaft in wissenschaftlichen Fragen.

Besonders möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Magdalena Huber bedanken. Sie hatte stets ein offenes Ohr für mich, half mir in zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen mit meiner Arbeit den richtigen Weg einzuschlagen und bot mir die Möglichkeit mich mit Hilfe ihrer Arbeitsgruppe methodisch und fachlich weiterzuentwickeln. Dieses Engagement habe ich nie für selbstverständlich erachtet.

Ein herzliches Dankeschön gilt auch allen Kooperationspartnern, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Sowohl Dr. Matthias Klein aus Mainz sowie die Prof. Dr. Andre Menke aus Gießen haben mich während der Zeit in ihren Arbeitsgruppen wo auch immer möglich unterstützt und standen mit Rat und Tat zur Seite.

Des Weiteren möchte ich mich allen voran bei allen Mitgliedern der AG Bauer, aber auch bei der gesamten AG Huber, AG Buchholz und AG Gallmeier, für ihre Hilfsbereitschaft, Unterstützung und das gute Arbeitsklima bedanken.

Ein ganz besonderer Dank geht an Bettina Geißel, Emelie Landmann, Veronique Hellmund, Lisa-Maria Schmitt, Felix Picard und Hartmann Raifer. Neben der großen Hilfe bei meinen praktischen Arbeiten wart ihr bei Problemen immer eine große Stütze und habt mir mit viel Humor den Laboralltag verschönert und so meine Promotionszeit unvergesslich gemacht.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mich während des Studiums und der Promotion stets unterstützt haben und mich dazu ermutigt haben meinen Weg zu gehen. Danke!

Ehrenwörtliche Erklärung