

Evaluation der  
Proteinkinase CK2 als Zielmolekül  
für die Manipulation von  
intratumoralen  
regulatorischen T-Zellen

---

**Dissertation**

Zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“  
im Promotionsfach Biomedizinische Chemie

Am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Georg Bündgen**

Geb. am 08.03.1986 in Heilbronn

Mainz, 2022

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der mündlichen Prüfung: 29.09.2022

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Die zelluläre Zusammensetzung des Immunsystems.....	1
1.2	Einführung in die Tumorimmunologie .....	3
1.3	T-Zellen und ihre Rolle in der Tumorimmunologie.....	4
1.3.1	Allgemeines .....	4
1.3.2	Identifizierung von Tumorantigenen und Induktion einer T-Zellantwort.....	5
1.3.3	Aktivierung von T-Zellen .....	8
1.3.4	CD4 <sup>+</sup> T-Helferzellen und ihre Rolle in der Tumorimmunologie.....	9
1.3.5	Regulatorische T-Zellen und deren pro-tumorale Suppressionsmechanismen.....	12
1.4	Die Proteinkinase CK2.....	16
1.5	Zielsetzung der Arbeit.....	18
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>20</b>
2.1	Chemikalien .....	20
2.2	Geräte und Hilfsmittel.....	20
2.3	Verbrauchsmaterialien .....	21
2.4	Puffer; Zellkulturmedien und Reagenzien zu deren Herstellung .....	22
2.5	Kommerzielle Kits .....	26

---

2.6	Antikörper für die Durchflusszytometrie .....	27
2.7	Zelllinien .....	28
2.8	Versuchstiere.....	28
2.8.1	Generierung der <i>Foxp3</i> -Cre x <i>Csnk2b</i> <sup>fl/fl</sup> Mauslinie.....	29
2.8.2	Generierung der <i>Rosa26</i> -RFP x <i>Foxp3</i> -Cre x <i>Csnk2b</i> <sup>fl/fl</sup> Mauslinie .....	30
2.8.3	Genotypisierung von Versuchstieren.....	30
2.9	Methoden der Zellkultur .....	32
2.9.1	Kultivierung von B16F10 Melanomzellen .....	32
2.9.2	Bestimmung der Lebendzellzahl in Zellsuspensionen.....	32
2.10	B16F10 Melanommodell .....	33
2.10.1	Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen der B16 Tumorzelllinie und dem humanen malignen Melanom .....	33
2.10.2	Inokulation von B16F10 Melanomzellen .....	33
2.10.3	Messung der TumorgroÙe .....	34
2.10.4	Depletion von Eosinophilen Granulozyten im B16F10 Melanommodell .....	34
2.11	Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus Geweben und lymphatischen Organen.....	34
2.11.1	Einzelzellsuspensionen aus Tumorgewebe.....	34
2.11.2	Einzelzellsuspensionen aus der Milz .....	35
2.11.3	Einzelzellsuspensionen aus Lymphknoten .....	35

---

2.12	Isolation von Immunzellpopulationen aus Tumorgewebe mittels MACS ( <i>magnet activated cell sorting</i> ).....	36
2.13	Durchflusszytometrische Analyse.....	37
2.13.1	Färbung von Antigenen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern für die durchflusszytometrische Analyse von Zellsuspensionen.....	39
2.13.2	Restimulation von Zellsuspensionen für die durchflusszytometrische Analyse der Zytokinproduktion durch T-Zellen .....	39
2.13.3	Sortierung von konventionellen CD4 <sup>+</sup> T-Zellen mittels FACS ( <i>fluorescence-activated cell sorting</i> ).....	40
2.14	Next Generation Sequencing.....	40
2.15	Korrelations- und Überlebenszeitanalysen im humanen malignen Melanom.....	41
2.16	Erstellung von Graphen und Statistik .....	43
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>44</b>
3.1	Die Proteinkinase CK2 kontrolliert die Expression von ILT3 auf FOXP3-exprimierenden regulatorischen T-Zellen.....	44
3.2	Die Expression von <i>LILRB4</i> in humanen Melanombiopsien korreliert mit der <i>FOXP3</i> -Expression und einer höheren Überlebensrate.....	45
3.3	<i>Csnk2b</i> <sup>Treg<sup>-/-</sup></sup> Mäuse zeigen im B16F10 Melanommodell ein reduziertes Tumorwachstum.....	47
3.4	Die Frequenz an ILT3-exprimierenden regulatorischen T-Zellen ist in Tumoren von <i>Csnk2b</i> <sup>Treg<sup>-/-</sup></sup> Mäusen erhöht.....	48
3.5	In Tumoren von <i>Csnk2b</i> <sup>Treg<sup>-/-</sup></sup> Mäusen ist eine verstärkte Migration von Immunzellen zu beobachten .....	49
3.6	In Tumoren von <i>Csnk2b</i> <sup>Treg<sup>-/-</sup></sup> Mäusen ist eine verstärkte Migration von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen und konventionellen CD4 <sup>+</sup> T-Zellen zu beobachten .....	51

---

3.7	<i>Csnk2b</i> <sup>Treg-/-</sup> Mäuse zeigen eine anti-tumorale Immunantwort des Typ 2 .....	55
3.7.1	Konventionelle CD4 <sup>+</sup> T-Zellen aus Tumoren von <i>Csnk2b</i> <sup>Treg-/-</sup> Mäusen zeigen eine verstärkte Expression von Genen die mit T-Helferzellen vom Typ 2 assoziiert werden..	55
3.7.2	In Tumoren von <i>Csnk2b</i> <sup>Treg-/-</sup> Mäusen ist die Frequenz von konventionellen CD4 <sup>+</sup> T-Helferzellen des Typs 2 erhöht .....	56
3.7.3	Die Produktion Typ 2-assoziiierter Zytokine durch konventionelle CD4 <sup>+</sup> T-Zellen ist in Tumoren von <i>Csnk2b</i> <sup>Treg-/-</sup> Mäusen erhöht.....	58
3.7.4	Die Frequenz von Typ2-dirigierenden Dendritischen Zellen ist in Tumoren von <i>Csnk2b</i> <sup>Treg-/-</sup> Mäusen erhöht .....	61
3.7.5	Tumore aus <i>Csnk2b</i> <sup>Treg-/-</sup> Mäusen weisen eine höhere Frequenz an Eosinophilen Granulozyten auf.....	62
3.7.6	Eosinophile Granulozyten sind essenziell für das verminderte Tumorwachstum in <i>Csnk2b</i> <sup>Treg-/-</sup> Mäusen.....	65
3.8	Eine hohe Expression charakteristischer Marker von Typ2-Immunzellen scheint sich positiv auf den Krankheitsverlauf beim humanen malignen Melanom auszuwirken .....	68
3.9	Die pharmakologische Inhibition der CK2 führt zu einem verringerten Tumorwachstum im B16F10 Melanommodell .....	73
3.10	Die Expression pharmakologisch relevanter Oberflächenproteine ist auf tumor-infiltrierenden CK2-defizienten regulatorischen T-Zellen signifikant reduziert .....	77
3.11	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	80
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>84</b>
4.1	Therapien zur pharmakologischen Manipulation von intratumoralen regulatorischen T-Zellen	85
4.2	Die Bedeutung der ILT3-Expression für die suppressiven Fähigkeiten von regulatorischen T-Zellen gegenüber CD4 <sup>+</sup> T-Helferzellen der Typen 1 und 2 .....	95

---

4.3	Immunantworten vom Typ 2 im Kontext der Tumorimmunologie .....	100
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>105</b>
<b>6</b>	<b>Abstract.....</b>	<b>107</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>109</b>
<b>8</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>125</b>
<b>9</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>128</b>
<b>10</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>130</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>131</b>
<b>12</b>	<b>Curriculum Vitae.....</b>	<b>132</b>

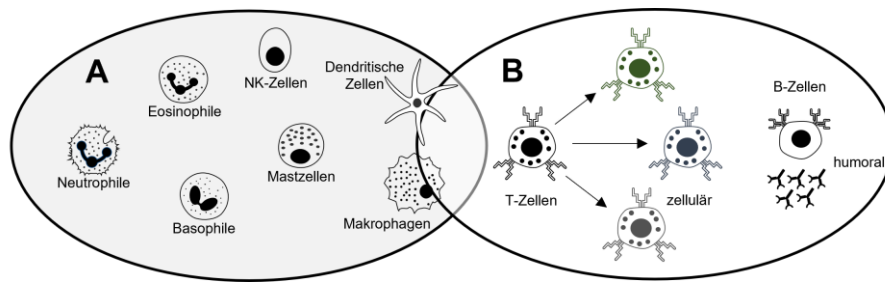
# 1 Einleitung

Die grundlegende Aufgabe des Immunsystems besteht in der Abwehr potenziell pathogener Mikroorganismen wie Viren, Bakterien oder Pilzen.<sup>1</sup> Immunologische Toleranzmechanismen, basierend auf der zellulären Zusammensetzung des Immunsystems, stellen dabei sicher, dass Strukturen (Antigene) in körpereigenen und körperfremd unterschieden werden.<sup>2</sup> Dies gewährleistet den Schutz vor unerwünschten Immunreaktionen gegenüber körpereigenen Antigenen und damit der Entstehung von Autoimmunerkrankungen.<sup>3</sup> Neben der Abwehr von Pathogenen ist das Immunsystem in der Lage, entartete Körperzellen (Tumorzellen) zu bekämpfen – wodurch das Immunsystem von elementarer Bedeutung für die Eliminierung von Tumoren ist.<sup>4</sup> Entartete Körperzellen können sich aber der Überwachung und Eliminierung durch das Immunsystem entziehen.<sup>5</sup> Dafür sind maßgeblich die gleichen immunsuppressiven Mechanismen und Zellen verantwortlich, die den Körper auch vor Autoimmunreaktionen schützen.<sup>6</sup> Hierbei sind regulatorische T-Zellen ( $T_{reg}$ -Zellen) als hochpotenter immunsuppressiver Zelltyp entscheidend beteiligt.<sup>7</sup> Ziel dieser Arbeit war es, Kinase-vermittelte Signalwege in  $T_{reg}$ -Zellen im Kontext der Tumorimmunologie zu untersuchen. Dabei wurde evaluiert, inwieweit sich diese Signalwege eignen, um  $T_{reg}$ -Zellen pharmakologisch zu manipulieren. Dies sollte zu einer Verminderung der suppressiven Fähigkeiten von  $T_{reg}$ -Zellen führen und damit eine effektivere Bekämpfung von Tumoren durch das Immunsystem ermöglichen. Um generelle Aufgaben von  $T_{reg}$ -Zellen im Immunsystem und insbesondere deren Bedeutung in der Tumorimmunologie bestmöglich einzuordnen, wird im nächsten Kapitel zunächst auf die zelluläre Zusammensetzung des Immunsystems eingegangen. Zusätzlich werden grundlegende immunologische Mechanismen sowie die dabei beteiligten Zellen im Rahmen der Tumorimmunologie erläutert.

## 1.1 Die zelluläre Zusammensetzung des Immunsystems

Das Immunsystem besteht aus zwei Teilen: dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem.<sup>8</sup> Neben proteinbasierten Bestandteilen, wie dem Komplementsystem und antimikrobielle Peptide, gehören dem angeborenen Immunsystem verschiedene Zelltypen wie Granulozyten, Makrophagen, natürliche Killerzellen (NK-Zellen) oder Dendritische Zellen (DCs) an (Abb. 1A).<sup>9</sup>





**Abbildung 1: Zelluläre Zusammensetzung des Immunsystems.** A Zellen des angeborenen Immunsystems. B Zellen des adaptiven Immunsystems und deren grundlegende Rolle innerhalb des adaptiven Immunsystems.

Sie erkennen pathogene Mikroorganismen (Pathogene) anhand evolutionär konservierter Strukturen (PAMPs; *pathogen associated molecular patterns*) durch Pathogen-assoziierte Erkennungsrezeptoren (PRR; *pattern recognition receptors*). Die Identifizierung von Pathogenen führt zur Aktivierung der Zellen des angeborenen Immunsystems, wodurch verschiedene Prozesse in Gang gesetzt werden, die zur Bekämpfung der Pathogene führen.<sup>10</sup> Dazu gehört unter anderem die Ausschüttung von Chemokinen und Zytokinen, die als Botenstoffe andere Immunzellen zum Ort der Infektion rekrutieren.<sup>11</sup> Zusätzlich besteht eine bedeutsame Aufgabe der Zellen des angeborenen Immunsystems darin, Pathogene zu lysieren und zu phagozytieren.<sup>12</sup> Professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APCs, *antigen presenting cells*) wie Makrophagen und DCs nutzen phagozytotische Mechanismen, um eine Verbindung zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem herzustellen.<sup>13</sup> Dafür werden die phagozytierten Pathogene verdaut und Pathogen-assoziierte Peptide auf Haupthistokompatibilitätskomplex-Molekülen (MHC; *major histocompatibility complex*) präsentiert.<sup>14</sup> T-Zellen können mit ihrem individuellen T-Zellrezeptor diese Peptid-MHC-Komplexe erkennen, was zu deren Aktivierung und damit zu einer Einleitung einer adaptiven Immunantwort führen kann.<sup>15</sup> Neben T-Zellen bilden B-Zellen den zweiten Zelltyp des adaptiven Immunsystems (Abb. 1B). Beiden Zelltypen ist gemein, dass jede einzelne Zelle nur einen individualisierten Rezeptor besitzt, über den die Zellen nur ein bestimmtes Antigen bzw. einen bestimmten Antigen-MHC-Komplex erkennen.<sup>16</sup> Diese Eigenschaft der Zellen des adaptiven Immunsystems gewährleistet, dass auch neuartige oder unbekannte Krankheitserreger bekämpft werden, die sich der Erkennung und Eliminierung durch Zellen des angeborenen Immunsystems entziehen. Neben der Antigen-spezifität unterscheidet sich das adaptive Immunsystem durch die Bildung eines immunologischen Gedächtnisses gegenüber dem angeborenen Immunsystem.<sup>17</sup> Wird eine Infektion bzw. das Eindringen eines Pathogens in den Organismus durch Zellen des adaptiven Immunsystems über ihre Rezeptoren erkannt, resultiert dies in einer starken Proliferation antigenspezifischer T- und B-Zellen. Diese differenzieren in Effektorzellen und bekämpfen das Pathogen durch verschiedene Effektorfunktionen. Während die überwiegende Mehrheit der Effektorzellen nach Abklingen der Infektion in den programmierten Zelltod (Apoptose) geht, durchläuft ein kleiner Teil der Effektorzellen eine weitere Differenzierung in Gedächtniszellen.<sup>18</sup> Diese verbleiben

im Organismus und gewährleisten bei erneutem Eindringen des gleichen Pathogens eine deutlich schnellere Immunantwort im Vergleich zur primären Immunantwort bei Erstinfektion. In dieser Arbeit steht die Immunreaktion gegenüber Tumoren im Mittelpunkt. Die folgenden Kapitel sollen deshalb dazu dienen, grundlegende Aspekte der Tumorentstehung und Tumorummunologie zu erörtern.

## 1.2 Einführung in die Tumorummunologie

Tumorerkrankungen stellen global ein ernstzunehmendes Gesundheitsproblem dar und sind einer der häufigsten Todesursachen in Industrieländern.<sup>19,20</sup> Dabei beruht die Letalität von Tumoren auf ihrem unkontrollierten Wachstum innerhalb gesunder Gewebe sowie der Bildung von Metastasen.<sup>21</sup> Dies führt zu irreparablen Schäden in Geweben und daraus folgend zu irreparablen Beeinträchtigungen der Gewebefunktionen. Tumorzellen bilden sich aufgrund von Mutationen in Genen, die häufig im Zusammenhang mit Zellwachstum, Zellteilung, Zelldifferenzierung oder Apoptose stehen.<sup>22</sup> Die Folge ist eine unkontrollierte Proliferation dieser Zellen. Der Organismus versucht, durch verschiedene Mechanismen die Entstehung von entarteten Körperzellen zu verhindern. Dazu gehören DNA-Reparaturmechanismen oder die Induktion der Apoptose sich unkontrolliert teilender Zellen.<sup>23,24</sup> Diese Mechanismen sind nicht fehlerfrei, wodurch inzwischen davon ausgegangen wird, dass ständig entartete Körperzellen entstehen.<sup>25</sup> Bei der Eliminierung dieser entarteten Körperzellen ist das Immunsystem von entscheidender Bedeutung. Bereits in den 1950er Jahren wurde durch MacFarlane Burnet postuliert, dass entartete Körperzellen einer immunologischen Überwachung (*immune surveillance*) unterliegen.<sup>26</sup> Basierend auf Tumorexperimenten mit immundefizienten Tieren und der Analyse von Tumorerkrankungen immundefizienter Patienten ist heutzutage zweifelsfrei akzeptiert, dass das Immunsystem die Entstehung und das Wachstum von Tumoren inhibieren kann. Die Bekämpfung von Tumorzellen durch das Immunsystem ist ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Immunzellen.<sup>25</sup> Dabei ist in vielen Fällen die Rolle bestimmter Immunzellen hinsichtlich ihrer pro- oder anti-tumoralen<sup>a</sup> Wirkung auf die immunologische Tumorantwort nicht vollständig aufgeklärt oder variiert in Abhängigkeit von der Tumorart.<sup>27,28</sup> Unbestritten ist in diesem Zusammenhang der Aspekt, dass T-Zellen von besonderer Bedeutung in der Tumorummunologie sind. Dabei können die verschiedenen Subtypen an T-Zellen dem Tumorwachstum entgegenwirken (CD8<sup>+</sup> T-Zellen und konventionelle CD4<sup>+</sup> T-Zellen)<sup>b</sup>, aber dieses auch beschleunigen (T<sub>reg</sub>-Zellen).<sup>29</sup> Als zentrale Forschungsobjekte dieser Arbeit wird im Folgenden auf T-Zellen und deren allgemeine Eigenschaften eingegangen, wobei der Schwerpunkt auf die Rolle von T-Zellen in der Tumorummunologie gesetzt wird.

---

<sup>a</sup> pro-tumoral = beschleunigt das Tumorwachstum; anti-tumoral = wirkt dem Tumorwachstum entgegen

<sup>b</sup> CD = *cluster of differentiation*

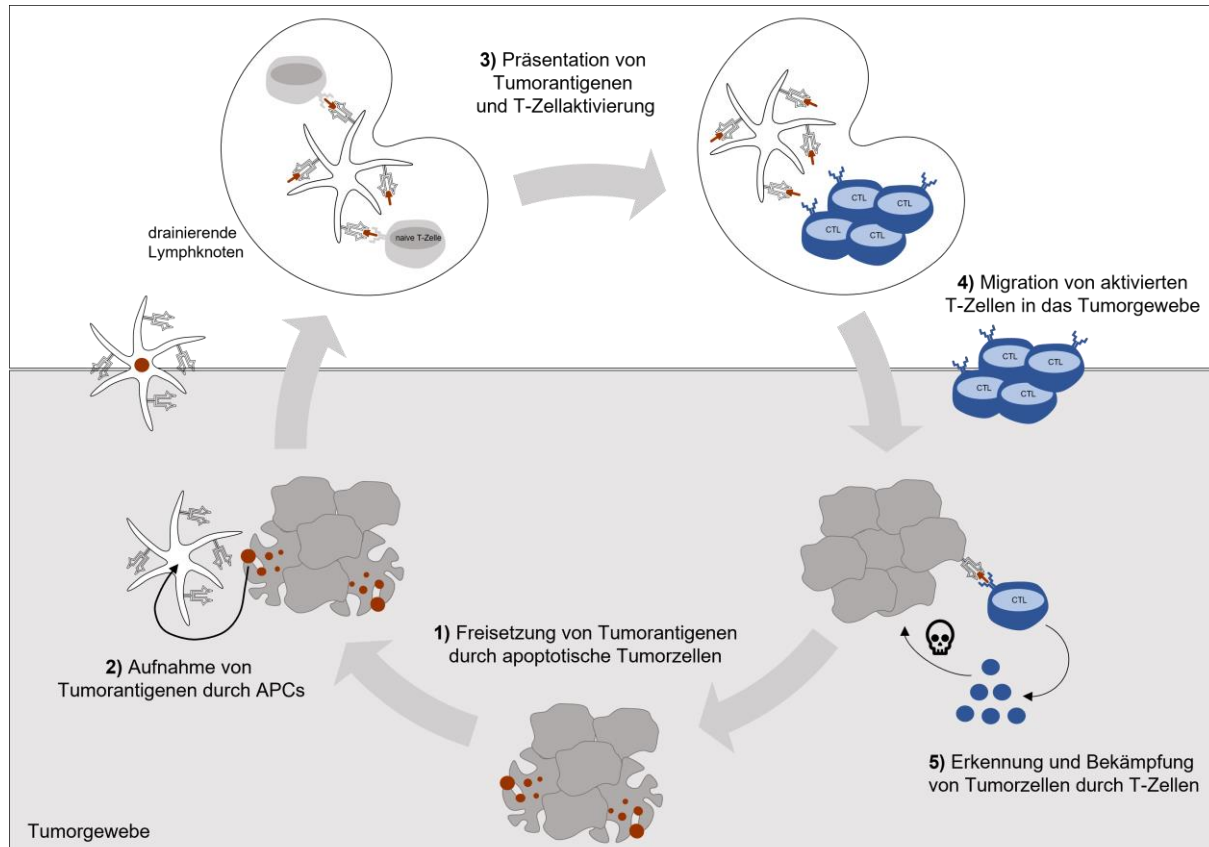
## 1.3 T-Zellen und ihre Rolle in der Tumorummunologie

### 1.3.1 Allgemeines

Zu den klassischen T-Zellen mit dem weitaus häufigsten vorkommenden alpha/beta T-Zellrezeptor (TZR) zählen zwei Arten von T-Zellen, die anhand ihrer Korezeptoren CD8 bzw. CD4 unterschieden werden. CD8<sup>+</sup> T-Zellen erkennen Antigene, die auf MHC-I-Komplexen präsentiert werden.<sup>30</sup> Sie sind essenziell für die Bekämpfung von entarteten Körperzellen und Virusinfektionen.<sup>30</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen identifizieren ihr Antigen über die Bindung an MHC-II-Peptidkomplexe.<sup>31</sup> Diese Gruppe der T-Zellen kann in verschiedene Subpopulationen differenzieren, die T-Helferzellen genannt werden.<sup>32</sup> Diese steuern, abhängig vom Pathogen, Immunreaktionen durch die Ausschüttung von verschiedenen Zytokinen, die dabei als Botenstoffe für andere Immunzellen fungieren.<sup>32</sup> T-Zellen entwickeln sich aus lymphoiden Vorläuferzellen, die im Knochenmark gebildet werden.<sup>33</sup> Diese wandern in den Thymus, wo deren Reifung zu naiven T-Zellen stattfindet (Thymopoese). Bei der Thymopoese durchlaufen zukünftige T-Zellen verschiedene Entwicklungsstadien, in denen sie neben ihren namensgebenden Korezeptoren CD4 und CD8 auch ihren antigenspezifischen TZR erhalten.<sup>34</sup> Für die hohe Diversität an Rezeptoren trägt maßgeblich der Vorgang der somatischen Rekombination (V(D)J-Rekombination) während der Zellreifung von T-Zellen bei.<sup>35</sup> Darauf basiert die enorme Vielfalt an T-Zellen mit verschiedenen Rezeptoren. Dabei werden allerdings auch T-Zellen gebildet, die körpereigene Antigene erkennen und damit das Potential besitzen, körpereigene Strukturen anzugreifen.<sup>36</sup> Während der Thymopoese stellen zentrale Toleranzmechanismen sicher, dass unerwünschte T-Zellen, die körpereigene Antigene erkennen, über Selektionsschritte aussortiert werden.<sup>36</sup> Diese Selektionsschritte sind nicht fehlerfrei, wodurch eine gewisse Anzahl an autoreaktiven T-Zellen den Thymus verlässt. Autoreaktive T-Zellen, die nicht durch zentrale Toleranzmechanismen aussortiert wurden, sind prinzipiell in der Lage, Autoimmunreaktionen auszulösen. Um deren Aktivierung in der Peripherie zu unterdrücken, werden im Thymus natürliche regulatorische T-Zellen (nT<sub>reg</sub>-Zellen) gebildet. Sie besitzen – wie auto-reaktive T-Zellen – vornehmlich TZRs, die spezifisch für körpereigene Antigene sind.<sup>37</sup> Als suppressive Immunzellen sind sie dadurch in der Lage, Immunreaktionen von auto-reaktiven T-Zellen gegen körpereigene Strukturen zu unterbinden.<sup>34</sup> Im Gegensatz dazu führen die immunsuppressiven Eigenschaften von nT<sub>reg</sub>-Zellen in der Tumorummunologie zu einem unerwünschten Effekt – der Suppression der Immunantwort gegenüber dem Tumor (Kap. 1.3.5). Nach vollständiger Differenzierung wandern die naiven T-Zellen über das Lymphsystem in sekundär lymphatische Organe wie den Lymphknoten oder die Milz.<sup>38</sup> In diesen Kompartimenten können T-Zellen bei Präsentation ihres spezifischen Antigen-MHC-Komplexes durch APCs aktiviert werden.<sup>39</sup> Dies stellt auch den Ausgangspunkt für die Einleitung einer T-Zell-basierten Immunantwort gegenüber Tumoren dar. Im folgenden Kapitel soll dieser Prozess näher erläutert werden. Dabei werden Voraussetzungen und Vorgänge thematisiert, die die Qualität der T-Zellantwort gegenüber Tumoren im Positiven wie im Negativen beeinflussen.

### 1.3.2 Identifizierung von Tumorantigenen und Induktion einer T-Zellantwort

Die grundlegenden Abläufe der protektiven T-Zell-basierten Immunantwort gegenüber Tumoren können anhand des Krebsimmunitätszyklus (*cancer immunity cycle*) veranschaulicht werden (Abb. 2).<sup>40</sup>



**Abbildung 2: Der Krebsimmunitätszyklus** (*cancer immunity cycle*; veränderte Abbildung nach Chen et al.)<sup>40</sup> Zur Vereinfachung ist nur die Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen abgebildet. Erläuterungen im Fließtext.

Schritt 1: Der Zyklus beginnt mit der Freisetzung von Tumorantigenen durch apoptotische oder nekrotische Tumorzellen.

Schritt 2: APCs wandern in das Tumorgewebe ein und nehmen die Tumorantigene auf. Dies führt zur Aktivierung der APCs, was die Antigenprozessierung und Beladung von MHC-Molekülen mit den resultierenden Peptidbruchstücken zur Folge hat. Gleichzeitig wandern die APCs aus dem Tumorgewebe in sekundär lymphatische Organe wie den drainierenden Lymphknoten, in denen sich eine Vielzahl von naiven T-Zellen befinden.

Schritt 3: Erkennt eine T-Zelle ihr spezifisches Antigen bzw. den spezifischen Peptid-MHC-Komplex, führt dies zur Aktivierung der T-Zelle und einhergehend damit zu deren starker Proliferation (Kap. 1.3.3).

Schritt 4: Die aktivierten T-Zellen wandern über Blut- und Lymphgefäße zum Tumor und dringen in das Tumorgewebe ein.

Schritt 5: T-Zellen identifizieren ihre Zielzellen (Tumorzellen) über MHC-Peptid-Komplexe. Dies hat die Ausschüttung von Zytokinen und zytotoxischen Substanzen zur Folge, wodurch Tumorzellen abgetötet werden. Dadurch werden wiederum Tumorantigene freigesetzt, wodurch der Zyklus aufrechterhalten wird.

Für eine effektive Immunantwort gegenüber Tumoren und damit auch von anti-tumoralen Immuntherapien sind gewisse Faktoren essenziell bzw. von großem Vorteil. Die Infiltration von T-Zellen, insbesondere von CD8<sup>+</sup> T-Zellen, in das Tumorgewebe und damit deren Frequenz ist dabei von entscheidender Bedeutung und wird im Allgemeinen als positiver prognostischer Marker für den Verlauf von Tumorerkrankungen angesehen.<sup>41</sup> Tumore mit einer starken Infiltration an T-Zellen werden als „heiße“ Tumore (*hot tumors*) bezeichnet. Im Gegensatz dazu sind „kalte“ Tumore (*cold tumors*) durch eine niedrige Infiltration an T-Zellen gekennzeichnet.<sup>42</sup> Der Tumor wird deshalb nur ungenügend durch das Immunsystem bekämpft. Dies hat unter anderem zur Folge, dass gängige Immuntherapien bei kalten Tumoren niedrigere Ansprechraten zeigen.<sup>43</sup>

Ein elementares Problem bei der Erkennung von Tumorzellen durch T-Zellen besteht jedoch darin, dass sich Tumorzellen aus körpereigenen Zellen entwickeln und resultierende Antigene, die auf deren Oberfläche exprimiert werden, damit nicht zwangsläufig als „fremd“ erkannt werden.<sup>44</sup> Tumorantigene können prinzipiell in zwei Klassen eingeteilt werden.<sup>45</sup> Tumorassoziierte Antigene sind Selbst-Antigene, die in hoher Zahl auf Tumorzellen, aber auch auf gesunden Zellen exprimiert werden. Dies führt dazu, dass grundlegende Toleranzmechanismen für Immunreaktionen gegen Selbst-Antigene greifen und tumorassoziierte Antigene vergleichsweise schwache Immunreaktionen hervorrufen.<sup>46</sup> Im Gegensatz dazu sind tumorspezifische Antigene oder Neoantigene eine heterogene Gruppe von Tumorantigenen, die im Vergleich stärkere T-Zellantworten hervorrufen.<sup>47</sup> Neoantigene basieren auf mutierten Genen, deren korrespondierende Proteine sich stark von den ursprünglichen Proteinen unterscheiden, die von gesunden Zellen exprimiert werden. Häufig stammen diese Antigene von mutierten Proto-Onkogenen (Bsp.: *Ras*-Mutationen) oder Tumorsuppressorgenen (Bsp.: p53).<sup>c,48</sup> Zusätzlich gehören zu den Neoantigenen auch Proteine, die von Tumorzellen, aber nicht von den umgebenden gesunden Zellen des betroffenen Gewebes exprimiert werden. Als Beispiel hierfür können Tumor-Hoden-Antigene (*Cancer/Testis antigens*) genannt werden, die nur in Keimzellen, aber auch in Melanomzellen exprimiert werden.<sup>49</sup> Als Maß für die Frequenz der Expression von Neoantigenen kann

---

<sup>c</sup> *Ras*: rat sarcoma; p53: cellular tumor antigen p53

die Tumormutationslast (TMB; *tumor mutation burden*) angesehen werden.<sup>50</sup> Tumore mit einer hohen TMB exprimieren eine höhere Anzahl der besonders immunogenen Neoantigene und sind somit im Prinzip leichter durch T-Zellen zu bekämpfen. Die TMB variiert dabei in Abhängigkeit von der Tumorart. Das Nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom (NSCLC; *non-small lung cancer*) oder das maligne Melanom werden als genetisch instabile Tumorarten mit einer vergleichsweise hohen Mutationslast beschrieben, wohingegen Pankreas- und Prostatakarzinome eine niedrige TMB aufweisen.<sup>51</sup> Tumore mit einer hohen TMB und einer tendenziell höheren Frequenz an Neoantigen-spezifischen T-Zellen bzw. verschiedenen Neoantigen-spezifischen T-Zellklonen gelten als sensitiver gegenüber der Bekämpfung durch das Immunsystem.<sup>52,42</sup> Dies verursacht einen Selektionsdruck auf die Tumorzellen, dem sie sich durch verschiedene Mechanismen zu entziehen versuchen.<sup>53</sup> Dabei wirkt sich die Eigenschaft der schnellen Zellteilung positiv auf diese sogenannten Evasionsmechanismen von Tumoren aus. In Tabelle 1 ist eine Auswahl passiver und aktiver Evasionsmechanismen von Tumorzellen aufgelistet, die eine verminderte T-Zellantwort zur Folge haben.

**Tabelle 1: Evasionsmechanismen von Tumoren<sup>5,54</sup>**

<b>passive Evasionsmechanismen</b>	<b>Folge</b>
Verlust der Expression tumor-spezifischer Antigene	Reduktion der Bildung spezifischer T-Zellen
Verlust der MHC-I-Expression	Reduktion der Erkennung durch T-Zellen
<b>aktive Evasionsmechanismen</b>	<b>Folge</b>
Expression inhibitorischer Oberflächenrezeptoren (CTLA-4; PD-L1) <sup>d</sup>	Inhibition der Effektormechanismen von T-Zellen
Sezernierung immunsuppressiver Metabolite	Inhibition der Effektormechanismen von T-Zellen Rekrutierung von suppressiven Immunzellen

Die aufgeführten Evasionsmechanismen ziehen dabei drei entscheidende Konsequenzen nach sich:

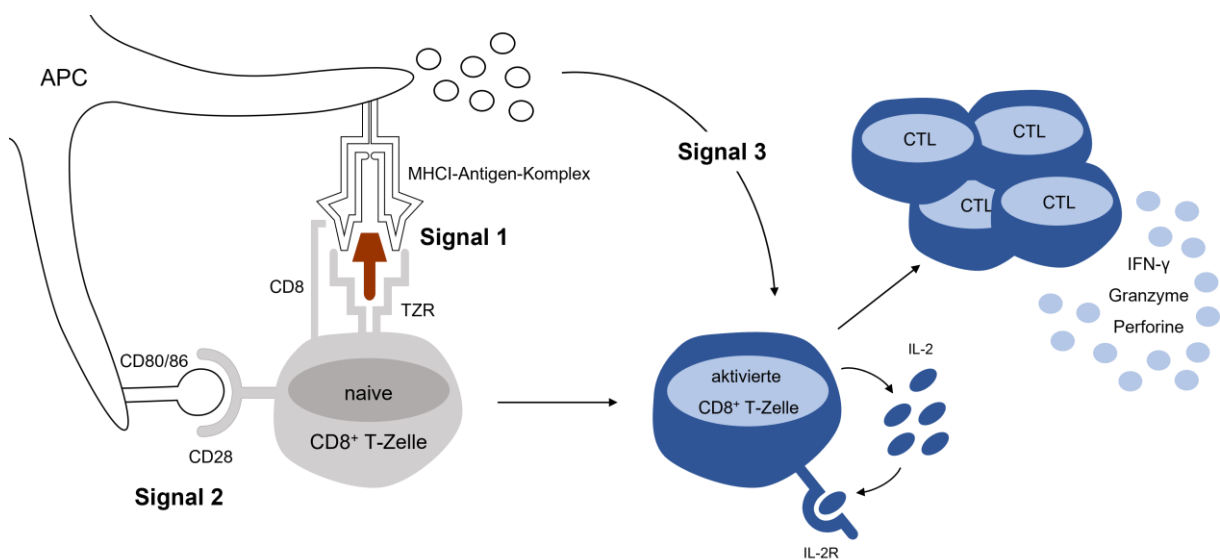
1. Es werden weniger Tumorantigen-spezifische T-Zellen gebildet.
2. Tumorzellen entziehen sich der Erkennung und Bekämpfung durch T-Zellen.
3. Die Rekrutierung suppressiver Immunzellen verstärkt Punkt 1 und 2.

Ein entscheidendes Kriterium für eine effektive T-Zell-vermittelte Immunantwort ist demnach eine ausreichend hohe Expression tumorspezifischer Antigene auf Tumorzellen, sodass diese durch T-Zellen erkannt und eliminiert werden können. Dafür ist als initialer Schritt die Aktivierung der T-Zellen notwendig, auf die im folgenden Abschnitt eingegangen werden soll.

<sup>d</sup> CTLA-4: *Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4*, PD-L1: *Programmed cell death 1 ligand 1*

### 1.3.3 Aktivierung von T-Zellen

In Abb. 3 sind die grundlegenden Abläufe der T-Zellaktivierung am Beispiel einer naiven  $CD8^+$  T-Zelle abgebildet.<sup>16</sup> Erkennt eine naive T-Zelle mit ihrem spezifischen Rezeptor ihren korrespondierenden MHC-I-Antigen-Komplex, bindet die naive T-Zelle über ihren TZR und den CD8-Korezeptor an den MHC-I-Antigen-Komplex der APC. Dadurch wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, die die Aktivierung verschiedener Signalwege (Ras- und Akt-Signalweg) und Transkriptionsfaktoren (NF- $\kappa$ B; NFAT) zur Folge hat.<sup>e,55</sup> Dies ist das erste Signal für die Aktivierung der T-Zelle. Für eine vollständige Aktivierung benötigen naive T-Zellen aber noch weitere Signale. Das zweite Signal erhalten sie durch die Bindung von CD28 an die kostimulatorischen Oberflächenmoleküle CD80/CD86 der APCs. Dies hat unter anderem zur Folge, dass die Expression der  $\alpha$ -Kette des Interleukin-2-Rezeptors (IL-2R $\alpha$ , CD25) auf der Oberfläche der T-Zellen induziert wird und in Kombination mit der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Kette zur Bildung einer hochaffinen Form des IL-2-Rezeptors führt.<sup>56</sup> Gleichzeitig wird auch die Produktion und Sezernierung von IL-2 induziert, das wiederum umgehend an den IL-2-Rezeptor bindet.<sup>57</sup> Dieser autokrine Mechanismus verstärkt die Proliferation der T-Zellen.



**Abbildung 3: Mechanismen der T-Zellaktivierung am Beispiel von  $CD8^+$  T-Zellen:** Signal 1: Naive  $CD8^+$  T-Zellen erkennen und binden über ihren spezifischen TZR und den Korezeptor CD8 an den MHC-I-Antigen-Komplex auf einer APC. 2. Signal: Die Bindung von CD28 an die Oberflächenmoleküle CD80/CD86 vermittelt notwendige kostimulatorische Signale an die T-Zelle. Signal 3: Das Zytokinmilieu trägt zu Mechanismen bei, die die Differenzierung von T-Zellen unterstützen.

Zytokine in der Umgebung (Zytokinmilieu) stellen das dritte Signal dar, das T-Zellen für ihre Differenzierung benötigen.<sup>58</sup> Diese werden unter anderem von der APC produziert, die in direktem

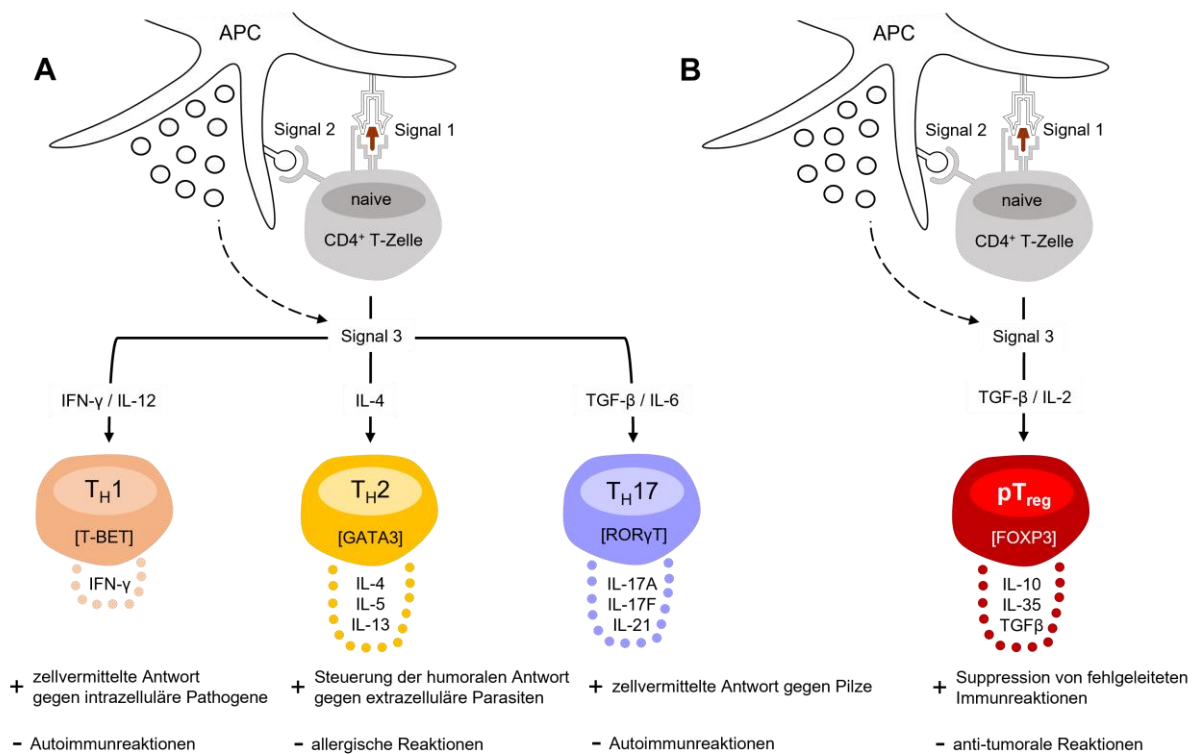
<sup>e</sup> NF- $\kappa$ B: *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*; NFAT: *nuclear factor of activated T-cells*

Kontakt zur T-Zelle steht.<sup>59</sup> Zusätzlich wird das Zytokinmilieu auch durch andere Immunzellen in räumlicher Nähe beeinflusst. Diese sezernieren Zytokine, die die Differenzierung der T-Zellen positiv beeinflussen, indem sie die Expression spezifischer Transkriptionsfaktoren induzieren. Im Fall der CD8<sup>+</sup> T-Zelldifferenzierung ist unter anderem die Sezernierung von Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) durch CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen bedeutend.<sup>60</sup> IFN- $\gamma$  induziert die Expression der Transkriptionsfaktoren EOMES (*Eomesodermin*) und T-BET (*T-box transcription factor*), die wiederum die Expression verschiedener Effektormoleküle von CD8<sup>+</sup> T-Zellen steuern.<sup>61</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen gehören zu den potentesten anti-tumoralen Immunzellen.<sup>62</sup> Zu ihren anti-tumoralen Effektormechanismen zählen die Ausschüttung von Zytokinen wie IFN- $\gamma$  und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) sowie die gezielte Sezernierung zytotoxischer Enzyme (Granzyme und Perforine).<sup>30</sup> Im Vergleich zu CD8<sup>+</sup> T-Zellen gestaltet sich die Differenzierung von CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen deutlich komplexer. Daher soll im nächsten Abschnitt speziell auf die Differenzierung und unterschiedlichen Funktionen von CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen eingegangen werden. Zusätzlich werden pro- und anti-tumorale Eigenschaften der einzelnen T-Helferzellpopulationen erläutert.

#### 1.3.4 CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen und ihre Rolle in der Tumorimmunologie

Generell ist bei der Differenzierung von naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen in die verschiedenen Typen von CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen (T<sub>H</sub>-Zellen) das Zytokinmilieu als drittes Signal von entscheidender Bedeutung.<sup>58</sup> Es wird maßgeblich durch die Zytokine beeinflusst, die durch APCs gebildet werden.<sup>63</sup> Dies ist wiederum stark von der Art des eindringenden Pathogens abhängig. Auf diese Weise wird gewährleistet, dass sich CD4<sup>+</sup> naive T-Zellen vorwiegend in T<sub>H</sub>-Subpopulationen differenzieren, die auf die Organisation der Immunantwort gegen den eindringenden Erreger spezialisiert sind. Bereits differenzierte CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>-Zellen produzieren wiederum Zytokine, die die Differenzierung in andere T<sub>H</sub>-Zellen hemmen und gleichzeitig die Differenzierung in den gleichen Typ an T<sub>H</sub>-Zellen begünstigen.<sup>64</sup> Auf molekularer Ebene induzieren bestimmte Zytokinkombinationen verschiedene Transkriptionsfaktor-gesteuerte Differenzierungsprogramme, die zur Entwicklung der entsprechenden T<sub>H</sub>-Zellen führen.<sup>65</sup> Die Transkriptionsfaktoren induzieren wiederum die Produktion entsprechender (Leit-)Zytokine, die ein charakteristisches Merkmal der jeweiligen T<sub>H</sub>-Subpopulationen sind.<sup>32</sup> Abb. 4A bietet eine Übersicht über die notwendigen Zytokine, die für die Differenzierung der einzelnen T<sub>H</sub>-Zellpopulationen benötigt werden. Des Weiteren sind die Haupttranskriptionsfaktoren und Leitzytokine der einzelnen T<sub>H</sub>-Zellpopulationen abgebildet. Zusätzlich werden die Hauptaufgaben der T<sub>H</sub>-Zellen im Falle einer Infektion sowie negative Aspekte einer unkontrollierten bzw. überschießenden Immunantwort durch die einzelnen T<sub>H</sub>-Zellpopulationen aufgeführt.





**Abbildung 4: Die Differenzierung und Aufgaben von CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen.** Aufgeführt sind die für die Differenzierung in die einzelnen T-Helferzellpopulationen notwendigen Zytokine und die Haupttranskriptionsfaktoren sowie Leitzytokine der jeweiligen T-Helferzellpopulationen. Zusätzlich ist die Art der Pathogene aufgelistet, die die Bildung der jeweiligen T-Helferzellpopulation induzieren. Außerdem sind immunologischen Prozesse aufgeführt, in denen die jeweiligen T-Helferzellpopulation im negativen Sinne eine Rolle spielen. **A:** Schematische Darstellung der Differenzierung von naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen in T<sub>H</sub>1-, T<sub>H</sub>2- und T<sub>H</sub>17-Zellen. **B** Schematische Darstellung der Differenzierung von naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen in periphere T<sub>reg</sub>-Zellen.

T<sub>H</sub>1-Zellen unterstützen zelluläre Immunantworten gegen intrazelluläre Erreger wie z. B. Viren.<sup>32</sup> Im Kontext der Immunreaktion gegen Tumore besitzen sie starke anti-tumorale Eigenschaften, die zum großen Teil auf deren starker IFN-γ Produktion basieren.<sup>66</sup> IFN-γ wirkt sich in verschiedener Weise negativ auf das Tumorwachstum aus.<sup>67,68</sup>

- Förderung der Aktivierung, Differenzierung und Proliferation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen,
- Rekrutierung von anti-tumoralen Immunzellen in das Tumorgewebe (APCs; NK-Zellen; M1 Makrophagen),
- Induktion der Apoptose in Tumorzellen sowie
- Inhibition der Metastasierung.

Die mit T<sub>H</sub>1-Zellen verwandten zytotoxischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen besitzen in weiten Teilen die gleichen Effektormechanismen wie CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Neben IFN-γ sind diese Zellen in der Lage, Granzyme und Perforine zu produzieren, wodurch Tumorzellen direkt abgetötet werden können.<sup>69</sup>

T<sub>H</sub>2 Zellen leisten Hilfe für Antikörper-produzierende B-Zellen und sind entscheidend an der Immunreaktion gegen extrazelluläre Erreger wie Würmer oder Bakterien beteiligt.<sup>32</sup> In der Tumorimmunologie werden T<sub>H</sub>2-Zellen sowohl pro- als auch anti-tumorale Eigenschaften zugeschrieben.<sup>70</sup> Dabei beruhen die anti-tumoralen Effekte nicht auf klassischen Effektormechanismen, die direkt auf Tumorzellen wirken oder die CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort unterstützen, wie es bei T<sub>H</sub>1-/CD4<sup>+</sup> CTL-Zellen der Fall ist. Vielmehr vermitteln Zytokine, die unter anderem von T<sub>H</sub>2-Zellen sezerniert werden (T<sub>H</sub>2-assoziierte Zytokine), die Rekrutierung von anti-tumoralen Zellen des angeborenen Immunsystems in das Tumorgewebe.<sup>71,72</sup>

- Rekrutierung von Eosinophilen Granulozyten (IL-4 und IL-5),
- Rekrutierung von Makrophagen (IL-4 und IL-13),
- Rekrutierung von Neutrophilen Granulozyten (IL-13).

Neueste Erkenntnisse weisen zudem darauf hin, dass T<sub>H</sub>2-assoziierte Zytokine einen negativen Einfluss auf die Blutversorgung des Tumorgewebes haben und damit das Tumorstadium negativ beeinflussen.<sup>73</sup> Die Tatsache, dass T<sub>H</sub>2-Zellen ursprünglich als pro-tumorale Immunzellen angesehen wurden, basiert teilweise auf der umstrittenen Klassifizierung von IL-10 als T<sub>H</sub>2-assoziiertes Zytokin. IL-10 als immunsuppressives Zytokin hat diverse negative Auswirkungen auf die Immunantwort gegenüber Tumoren.<sup>70</sup> Dazu gehören die Aktivierung von pro-tumoralen T<sub>reg</sub>-Zellen oder die Inhibition der Antigenprozessierung durch APCs.<sup>74</sup> Allerdings können auch den klassischen T<sub>H</sub>2-Zytokinen pro-tumorale Eigenschaften zugeordnet werden. So wurde gezeigt, dass IL-4 und IL-13 die Differenzierung von anti-tumoralen M2 Makrophagen begünstigen.<sup>75</sup> M2 Makrophagen sezernieren vorwiegend immunsuppressive Zytokine wie IL-10 und TGF- $\beta$  (*Transforming growth factor beta*) und können dadurch einer effektiven anti-tumoralen Immunantwort entgegenwirken.<sup>76</sup>

T<sub>H</sub>17-Zellen sind essenziell für die Eliminierung von Pilzinfektionen und sind darüber hinaus an der Bekämpfung von bakteriellen Infektionen beteiligt.<sup>32</sup> Bei T<sub>H</sub>17-Zellen kann keine eindeutige Aussage über ihre Rolle in der Tumorimmunologie getroffen werden. Dies basiert in Teilen auf ihrer Plastizität.<sup>77</sup> Im Gegensatz zu T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen, die als ausdifferenziert und damit stabile T<sub>H</sub>-Zellen gelten, sind T<sub>H</sub>17-Zellen in der Lage, einen ähnlichen Phänotyp wie die anderen T<sub>H</sub>-Zellen zu entwickeln oder gar vollständig in andere T<sub>H</sub>-Zellen zu transdifferenzieren. Dies kann anti-tumorale Effekte haben, wenn T<sub>H</sub>17-Zellen in T<sub>H</sub>17/T<sub>H</sub>1-Zellen transdifferenzieren. Durch die damit einhergehende Produktion von IFN- $\gamma$  unterstützen diese Hybridzellen die T<sub>H</sub>1-vermittelte anti-tumorale Immunantwort.<sup>78</sup> Die Transdifferenzierung von T<sub>H</sub>17-Zellen in T<sub>H</sub>17/T<sub>reg</sub>-Zellen in Tumoren ist experimentell nicht eindeutig bewiesen. Die Existenz von anti-tumoralen IL-17-produzierenden FOXP3- (*Forkhead box P3*)-exprimierenden T<sub>reg</sub>-Zellen in Tumoren ist verifiziert, allerdings wird postuliert, dass sich diese aus

klassischen  $T_{reg}$ -Zellen entwickelt haben.<sup>77</sup> IL-17, dem Leitzytokin von  $T_H17$ -Zellen, werden vorwiegend anti-tumorale Eigenschaften zugeschrieben, die auf der Förderung der Tumor-Angiogenese basieren sollen.<sup>79</sup> Da IL-17 aber auch von anderen Immunzellen gebildet wird, ist dieser anti-tumorale Effekt nicht zwangsläufig auf  $T_H17$ -Zellen zurückzuführen. Vielmehr offenbarten retrospektive Studien, dass bei bestimmten Tumorarten eine hohe Frequenz an  $T_H17$ -Zellen einen positiv-prognostischen Marker darstellt, während sich eine hohe Expression von IL-17 negativ auf den Verlauf der Tumorerkrankung auswirkt.<sup>80</sup>

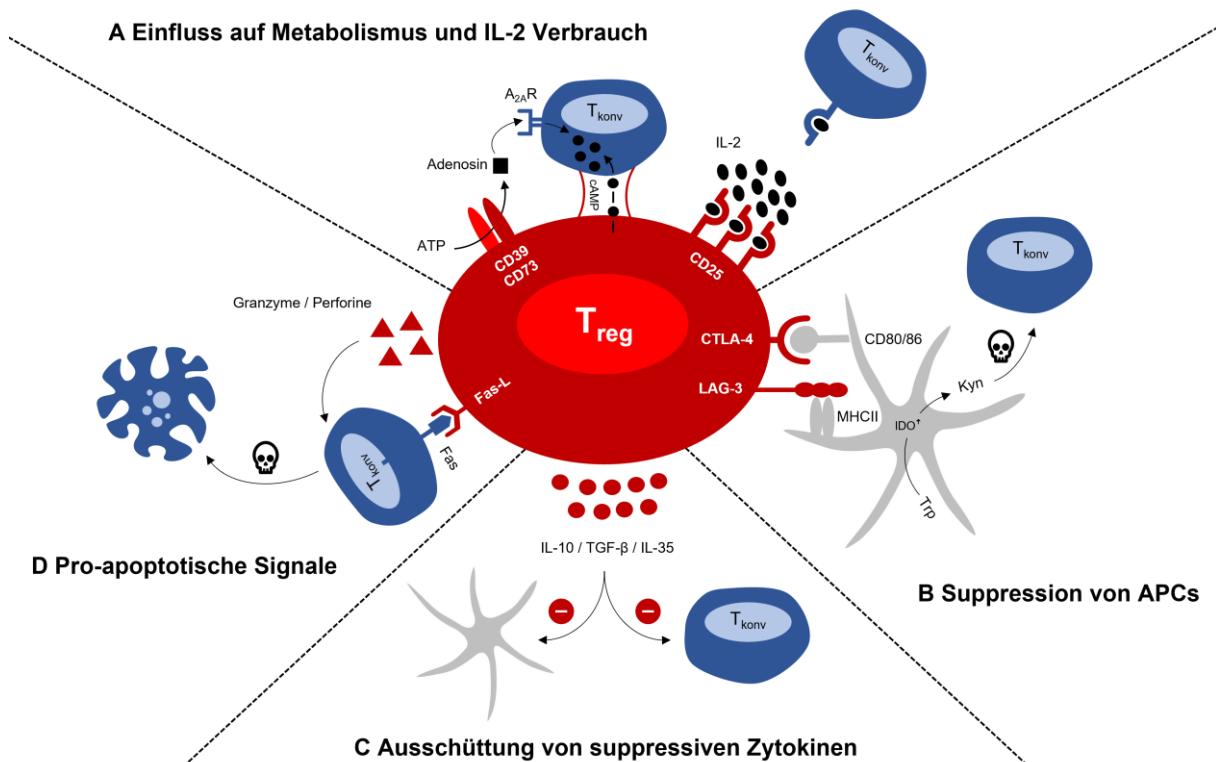
Werden harmlose Fremd-Antigene oder körpereigene Antigene durch schwach aktivierte APCs in Abwesenheit stark pro-inflammatorischer Signale (bspw. IL-12 oder IL-6) und gleichzeitiger Anwesenheit anti-inflammatorischer Zytokine wie TGF- $\beta$  präsentiert, differenzieren naive  $CD4^+$  T-Zellen in periphere  $T_{reg}$ -Zellen ( $pT_{reg}$ -Zellen) (siehe Abb. 4B).<sup>81</sup> Ein Unterschied zu den im Thymus generierten natürlichen  $T_{reg}$ -Zellen ( $nT_{reg}$ -Zellen) besteht in der Art der Antigene, die von den zwei  $T_{reg}$ -Subpopulationen erkannt werden.<sup>82</sup>  $nT_{reg}$ -Zellen realisieren ausschließlich körpereigene Antigene, während  $pT_{reg}$ -Zellen hauptsächlich harmlose Fremdartigene, in gewissem Ausmaß aber auch körpereigene Antigene, erkennen.<sup>83</sup> Die Entwicklung von  $T_{reg}$ -Zellen wird über den Haupttranskriptionsfaktor FOXP3 gesteuert.<sup>84,85</sup>  $T_{reg}$ -Zellen unterscheiden sich grundlegend von den zuvor beschriebenen  $T_H$ -Zellpopulationen. Sie produzieren immunsuppressive Zytokine wie IL-10, IL-35 oder TGF- $\beta$ .<sup>81</sup> Die Aufgabe von  $pT_{reg}$ -Zellen besteht daher nicht in der Bekämpfung von Pathogenen, sondern in der Suppression überschießender und fehlgeleiteter Immunreaktionen und damit der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz.<sup>86</sup>

Die Rolle von  $T_{reg}$ -Zellen in der Tumorimmunologie ist klar definiert. Sie werden nahezu ausschließlich als pro-tumorale Immunzellen angesehen.<sup>87</sup>  $T_{reg}$ -Zellen nehmen in dieser Arbeit eine Schlüsselrolle ein. Deswegen werden im folgenden Kapitel die Eigenschaften von  $T_{reg}$ -Zellen sowie deren immunsuppressive Effektormechanismen ausführlich erläutert.

### 1.3.5 Regulatorische T-Zellen und deren pro-tumorale Suppressionsmechanismen

Bereits in den 70er Jahren wurde das Prinzip der Suppression von T-Zellen durch eine T-Zellsubpopulation postuliert.<sup>88</sup> Aufgrund der methodischen Einschränkungen zu dieser Zeit gelang es jedoch nicht, diese Zellen genauer zu charakterisieren. In den 1990er Jahren konnten erste Fortschritte bei der Charakterisierung dieser suppressiven T-Zellen gemacht werden. Es konnte nachgewiesen werden, dass sie eine erhöhte Expression der  $\alpha$ -Kette des IL2-Rezeptors (CD25) aufweisen, wodurch ein nützlicher Marker für die Charakterisierung von  $T_{reg}$ -Zellen etabliert werden konnte.<sup>88</sup> Allerdings ist die Expression von CD25 kein Alleinstellungsmerkmal von  $T_{reg}$ -Zellen, da auch aktivierte  $CD8^+$  T-

Zellen und aktivierte konventionelle  $CD4^+ FOXP3^-$  T-Zellen ( $T_{konv}$ -Zellen)  $CD25$  exprimieren. Ein Meilenstein in der Historie der  $T_{reg}$ -Zell-Forschung war die Entdeckung von FOXP3 als zentraler Transkriptionsfaktor der  $T_{reg}$ -Zellen im Jahr 2003.<sup>85,84</sup> Dies war der Beweis einer eigenständigen T-Zellsubpopulation mit suppressiven Eigenschaften, die über die Expression von  $CD4$  und  $CD25$  sowie die Expression des Transkriptionsfaktors FOXP3 identifiziert und charakterisiert werden kann. Die suppressiven Eigenschaften von  $T_{reg}$ -Zellen können aber auch negative Einflüsse auf den Verlauf von Krankheiten haben. Im Falle von Tumorerkrankungen können  $T_{reg}$ -Zellen die mutierten Tumorzellen als körpereigen fehlinterpretieren.<sup>7</sup>  $T_{reg}$ -Zellen akkumulieren daraufhin im Tumorgewebe und verhindern durch ihre suppressiven Eigenschaften eine effektive Bekämpfung des Tumors durch das Immunsystem.<sup>87</sup> Im Wesentlichen sind für die Suppression unerwünschter Immunreaktionen sowie die Suppression einer erstrebenswerten anti-tumoralen Immunantwort die gleichen  $T_{reg}$ -Zell-vermittelten Mechanismen verantwortlich.<sup>7,89</sup> Diese sind in Abb. 5 graphisch zusammengefasst.



**Abbildung 5: Suppressionsmechanismen von regulatorischen T-Zellen** (veränderte Abbildung nach Vignali et al. und Safinia et al.)<sup>89,90</sup> **A** Störung des Metabolismus von  $T_{konv}$ -Zellen: Direkte (cAMP-Transfer via gap junctions) und indirekte Erhöhung (durch die Umwandlung von ATP in Adenosin und resultierende Bindung an Adenosin- $A_2$ -Rezeptor ( $A_2A$ R)) der cAMP-Konzentration in  $T_{konv}$ -Zellen. Exzessiver Verbrauch des proliferationsfördernden Zytokins IL-2 und damit reduzierte Proliferation von  $T_{konv}$ -Zellen. **B** Suppression und Blockade von Antigen-präsentierenden Zellen (APCs): Über verschiedene Oberflächenrezeptoren (CTLA-4, LAG-3) binden  $T_{reg}$ -Zellen an kostimulatorische Rezeptoren (CD80/CD86) oder MHC-Moleküle. Über Transendocytose werden diese ins Innere der  $T_{reg}$ -Zelle aufgenommen. Zusätzlich werden Signal- oder Stoffwechselwege (Umwandlung von Tryptophan (Trp) in Kynurenin durch IDO (Indolamin-2,3-Dioxygenase)) den APCs induziert, die wiederum pro-apoptische Signale induzieren **C** Die Ausschüttung von anti-inflammatorischen Zytokinen hat suppressive Auswirkungen auf die Effektorfunktionen von APCs und  $T_{konv}$ -Zellen. **D** Über direkte Interaktion via Fas/Fas-L oder die Ausschüttung von Granzymen und Perforinen können  $T_{reg}$ -Zellen  $T_{konv}$ -Zellen gezielt zerstören.

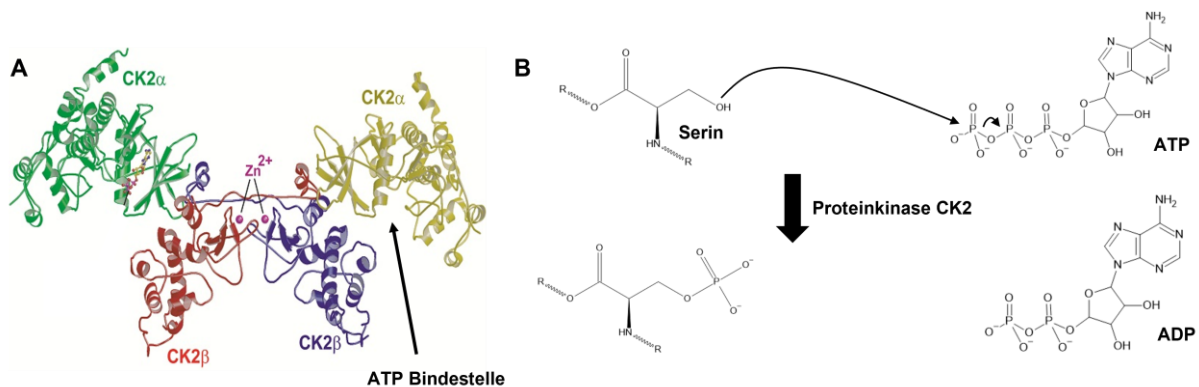
$T_{reg}$ -Zellen supprimieren den Metabolismus, die Proliferation und Effektorfunktionen von  $CD8^+$  T-Zellen und  $T_{konv}$ -Zellen.<sup>89</sup> Über die Ecto-Nukleotidasen CD39 und CD73 sind  $T_{reg}$ -Zellen in der Lage, ATP (Adenosinriphosphat) zu Adenosin zu dephosphorylieren.<sup>91</sup> Adenosin ist ein immunsuppressives Molekül, das über die Bindung an seinen Rezeptor ( $A_{2A}R$ ; Adenosin A2 Rezeptor) die Produktion von cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) in  $T_{konv}$ -Zellen induziert.<sup>91</sup> Zusätzlich können  $T_{reg}$ -Zellen cAMP auch direkt über den Transfer durch Zellkanäle (*gap junctions*) in das Zytosol von  $T_{konv}$ -Zellen übertragen.<sup>92</sup> Über die Induktion der Expression des Transkriptionsfaktors ICER (*Inducible cAMP early repressor*) haben erhöhte Konzentrationen von cAMP einen negativen Einfluss auf die Produktion von Zytokinen, wobei insbesondere  $T_H1$ -Zellen und deren assoziierte Zytokine betroffen sind.<sup>93</sup> Zusätzlich hat cAMP einen Einfluss auf die Produktion von IL-2. Dies hat zur Folge, dass der (autokrine) Effekt von IL-2 auf die Proliferation von  $T_{konv}$ -Zellen abgeschwächt wird.<sup>94</sup> Ähnliche Auswirkungen hat die starke Expression von CD25 auf der Oberfläche von  $T_{reg}$ -Zellen. Über den hochaffinen IL-2 Rezeptor wird das proliferationsfördernde Zytokin durch  $T_{reg}$ -Zellen in großen Mengen konsumiert.<sup>89</sup> Durch die resultierende Reduktion von IL-2 steht dies  $T_{konv}$ -Zellen nur noch in geringerer Konzentration zur Verfügung, wodurch wiederum deren Proliferation vermindert wird. Ein weiterer grundsätzlicher Suppressionsmechanismus von  $T_{reg}$ -Zellen stellt die Bindung an DCs über inhibitorische Oberflächenrezeptoren dar.  $T_{reg}$ -Zellen exprimieren in hohem Maße den Oberflächenrezeptor CTLA-4.<sup>95</sup> Über CTLA-4 binden  $T_{reg}$ -Zellen an die kostimulatorischen Oberflächenmoleküle CD80/CD86 auf DCs.<sup>96</sup> Mittels Transendocytose nehmen  $T_{reg}$ -Zellen CD80/CD86 in ihr Zellinneres auf und bauen die Moleküle ab. Dies hat unter anderem eine Reduzierung der CD80/CD86-Expression auf der Oberfläche der DCs zur Folge, was sich wiederum negativ auf die Aktivierung und Differenzierung von  $T_{konv}$ -Zellen auswirkt (Kap. 1.3.2).<sup>97</sup> Zusätzlich induziert die Bindung von CTLA-4 an CD80/CD86 die Expression des Enzyms Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO), das die Umwandlung von Tryptophan in Kynurenin katalysiert.<sup>98</sup> Hohe Konzentrationen an Kynurenin wirken apoptotisch auf T-Zellen, wobei  $T_H1$ -Zellen besonders sensitiv gegenüber Kynurenin sind.<sup>98</sup> Ein weiterer relevanter inhibitorischer Rezeptor von  $T_{reg}$ -Zellen ist LAG-3 (*Lymphocyte-activation gene 3*), der mit hoher Affinität an MHC-II-Moleküle bindet.<sup>99</sup> Zum einen induziert die Bindung von LAG-3 an MHC-II die Aktivierung von Signalwegen, die die Reifung von DCs verhindern und somit deren immunstimulatorische Fähigkeiten bei der T-Zell-Aktivierung herabsetzen.<sup>99</sup> Zum anderen blockieren  $T_{reg}$ -Zellen durch die Bindung von LAG-3 an MHCII potenzielle Bindungsstellen für  $T_{konv}$ -Zellen.<sup>100</sup> Das Prinzip der räumlichen Konkurrenz wird durch weitere Oberflächenrezeptoren wie LFA-1 (*Lymphocyte function-associated antigen 1*) verstärkt.<sup>101,102</sup> Neben inhibitorischen Signalen, die durch direkten Zell-Zell-Kontakt übermittelt werden, führt die Ausschüttung von immunsuppressiven Zytokinen durch  $T_{reg}$ -Zellen zu einem anti-inflammatorischen Milieu.<sup>89</sup> Zu diesen immunsuppressiven Zytokinen gehört IL-10, das einen suppressiven Einfluss auf verschiedene Immunzellen hat.<sup>103</sup> Bei APCs wirkt es sich auf deren Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-12 oder TNF- $\alpha$  aus. Zusätzlich reduziert IL-10 die Expression von CD80/CD86 und MHCII-Molekülen auf APCs.<sup>104</sup> Dadurch wird wiederum die

Aktivierung von T-Zellen, insbesondere von T<sub>H</sub>1-Zellen, beeinflusst. IL-10 hat auch direkten Einfluss auf T-Zellen, indem es die Phosphorylierung der intrazellulären Domäne von CD28 reduziert und damit das zweite Signal für die T-Zellaktivierung abschwächt.<sup>105</sup> Durch T<sub>reg</sub>-Zellen produziertes TGF- $\beta$  hat gleichermaßen multiple Effekte auf verschiedene Zellen des Immunsystems. Es supprimiert die Proliferation und Effektormechanismen von CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie von natürlichen Killerzellen.<sup>106</sup> Bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen induziert es die Differenzierung von naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen in T<sub>reg</sub>-Zellen (in Abwesenheit von IL-6) und verhindert damit die Generierung von T<sub>H</sub>1-Zellen oder T<sub>H</sub>2-Zellen.<sup>107</sup> IL-35 besitzt vornehmlich einen Effekt auf die CD4<sup>+</sup> T-Zelldifferenzierung. Es fördert die Differenzierung in T<sub>reg</sub>-Zellen und wirkt sich negativ auf die Entwicklung von T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>17-Zellen aus.<sup>108</sup> Daneben hat IL-35 suppressive Effekte auf die Effektormechanismen von CD8<sup>+</sup> T-Zellen.<sup>109</sup> Neben Rezeptorvermittelten und indirekten Suppressionsmechanismen können T<sub>reg</sub>-Zellen Immunreaktionen abschwächen, indem sie Zielzellen zerstören. Dazu können T<sub>reg</sub>-Zellen unter anderem Granzyme und Perforine sezernieren, die Zielzellen lysieren.<sup>110</sup>

Zusammengefasst besitzen T<sub>reg</sub>-Zellen eine Vielzahl potenter inhibitorischer Effektormechanismen. Diese Suppressionsmechanismen bieten einen effektiven Schutz gegen die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen und Allergien. Tumore machen sich diese suppressiven Eigenschaften jedoch zu Nutze, indem sie T<sub>reg</sub>-Zellen im Tumorgewebe akkumulieren und sich so einer Erkennung durch das Immunsystem entziehen.<sup>7</sup> Aus diesem Grund sind T<sub>reg</sub>-Zellen zu einem interessanten therapeutischen Ziel innerhalb der Tumorummuntherapien geworden. Dabei werden vielfältige Ansätze verfolgt, wie z. B. die Blockierung von inhibitorischen Oberflächenrezeptoren oder die Neutralisation von immunsuppressiven Metaboliten durch monoklonale Antikörper.<sup>111</sup> Diese vielversprechenden Therapien sind dabei nicht ohne Nachteile.<sup>112</sup> So wird durch die Spezifität der monoklonalen Antikörper bei den entsprechenden Therapien meist nur ein bestimmter Suppressionsmechanismus adressiert, während andere Effektormechanismen weitgehend unbeeinträchtigt bleiben. Zusätzlich sind die Entwicklung und der Einsatz von Therapien mit monoklonalen Antikörpern vergleichsweise aufwendig und teuer.<sup>113</sup> Alternativen könnten Zielmoleküle sein, die eine hohe Spezifität bezüglich ihrer Expression und Aktivität in T<sub>reg</sub>-Zellen zeigen. Kinasen als zentraler Vermittler von zellulären Signalübertragungen könnten sich als solch alternative Zielmoleküle eignen.<sup>114</sup> In einer bereits veröffentlichten Studie zeigte sich, dass die Proteinkinase CK2 (CK2) eine der aktivsten Kinasen in T<sub>reg</sub>-Zellen ist.<sup>115</sup> Der Vergleich zwischen T<sub>reg</sub>-Zellen und T<sub>konv</sub>-Zellen offenbarte, dass insbesondere nach sekundärer TZR-Stimulation die CK2-Aktivität in T<sub>reg</sub>-Zellen um ein Vielfaches höher ist als in T<sub>konv</sub>-Zellen. Die CK2 könnte deshalb ein geeignetes Zielmolekül darstellen, um T<sub>reg</sub>-Zellen und deren Effektormechanismen zu beeinflussen. Im folgenden Kapitel wird daher näher auf die Funktionen und Eigenschaften der CK2 – insbesondere in Immunzellen – eingegangen.

## 1.4 Die Proteinkinase CK2

Die Proteinkinase CK2<sup>f</sup> (CK2) wurde im Jahr 1954 von George Burnett und Eugene Kennedy als eine der ersten Proteinkinasen beschrieben.<sup>g,116</sup> Das tetramere Holoenzym setzt sich aus zwei katalytischen  $\alpha$ -Untereinheiten (CK2 $\alpha$ -UE/CK2 $\alpha'$ -UE) und zwei regulatorischen  $\beta$ -Untereinheiten (CK2 $\beta$ -UE/CK2 $\beta'$ -UE) zusammen (siehe Abb. 6A).<sup>117</sup> Es ist bekannt, dass die  $\alpha$ -UEs auch ohne die  $\beta$ -UEs katalytisch aktiv sein können, allerdings erhöhen die  $\beta$ -UEs in der Regel die Substratspezifität des Enzyms drastisch, indem sie als Bindungsstellen für Substrate dienen.<sup>118</sup> Zusätzlich erhöhen die  $\beta$ -UEs die Stabilität der  $\alpha$ -UEs gegenüber thermischen und chemischen Einflüssen.<sup>117</sup>



**Abbildung 6: Die Proteinkinase CK2.** A Die Kristallstruktur der Proteinkinase CK2.<sup>119</sup> B Beispielhafte Reaktion (Phosphorylierung der Hydroxylgruppe), die durch die Proteinkinase CK2 katalysiert wird.

Die CK2 besitzt in vielerlei Hinsicht besondere Eigenschaften. Die CK2 ist eine Serin/Threonin-Kinase (Abb. 6B), die zur CMGC-Familie der eukaryontischen Proteinkinasen (CAPK-ähnlichen Kinasen) gehört.<sup>120</sup> Sie besitzt eine duale Substratspezifität, da sie neben Serin/Threonin-Resten unter bestimmten Voraussetzungen auch Tyrosin-Reste phosphorylieren kann.<sup>121</sup> Als Phosphat-Donor dienen der CK2 sowohl Adenosintriphosphat (ATP) als auch Guanosintriphosphat (GTP).<sup>122</sup> Eine weitere bemerkenswerte Eigenschaft der CK2 ist die hohe Zahl an Zielmolekülen. Es wurden mehr als 300 Substrate identifiziert, die von der CK2 phosphoryliert werden.<sup>123</sup> Darauf basiert die enorme Diversität an grundlegenden zellulären Prozessen, an denen die CK2 beteiligt ist. Dazu gehören der Zellzyklus, Zellproliferation, Apoptose oder DNA-Reparatur.<sup>122</sup> Die bedeutende Rolle der CK2 für Zellwachstum und Zellüberleben ist auch an der Überexpression der CK2 in vielen Tumorarten zu beobachten.<sup>124</sup>

<sup>f</sup> Die Proteinkinase CK2 wurde lange Zeit auch Casein Kinase CK2 genannt.

<sup>g</sup> In der Originalarbeit wurden ausschließlich Proteine identifiziert, die Casein phosphorylieren. In späteren Arbeiten konnten diese Proteine als die Kinasen CK1 und CK2 identifiziert sowie charakterisiert werden.

Die CK2 wird als konstitutiv aktiv beschrieben, da in allen eukaryontischen Zellen, in denen die CK2 exprimiert wird, eine CK2-Aktivität detektiert werden kann.<sup>123</sup> Zusätzlich sind unter physiologischen Bedingungen keine gängigen Regulationsmechanismen wie sekundäre Botenstoffe (*second messenger*), Regulation über Phosphorylierung (Auto- oder Fremdphosphorylierung) oder Strukturänderungen durch Bindung von Untereinheiten bekannt, die die Aktivität des Holoenzym beeinflussen.<sup>125</sup> Es konnten aber physiologische Substanzen identifiziert werden, die Auswirkungen auf die Aktivität der CK2 zeigen können. Als physiologische Inhibitoren wurden Heparin und 2,3-Diphosphoglycerat identifiziert.<sup>126</sup> Zusätzlich konnten Inhibitoren pflanzlichen Ursprungs wie Flavonoide entdeckt werden.<sup>127</sup> Auf deren struktureller Basis konnten synthetische Inhibitoren wie DMAT (2-Dimethylamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazole) oder CX4945 (Silmitasertib) für die CK2 entwickelt werden, die teilweise in klinischen Studien für die Behandlung von Tumoren erprobt werden.<sup>128</sup> Als nicht essenzielle CK2-Aktivatoren konnten Polyamine (Spermin, Spermidin und Putrescin) identifiziert werden, wobei es Hinweise gibt, dass deren aktivierende Wirkung auf der Erhöhung der CK2-Expression basiert.<sup>129,130</sup>

Inzwischen gibt es Erkenntnisse, dass die CK2 an Signalwegen beteiligt ist, die die Differenzierung und Effektorfunktionen von Immunzellen entscheidend beeinflussen.<sup>131</sup> Dabei wurde die Rolle der CK2 in verschiedenen Zellen des Immunsystems untersucht. In Monozyten konnte gezeigt werden, dass die CK2 die Produktion des Zytokins IL-1 $\beta$  über die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren IRF4 und NF- $\kappa$ B steuert.<sup>132</sup> Eine Studie identifizierte die CK2 als Regulator des Aktivierungsstatus in humanen DCs. Im Kontext von allergischen Hautreaktionen konnten die Autoren der Studie zeigen, dass durch pharmakologische Inhibition der CK2 die Aktivierung von DCs durch Hautallergene deutlich reduziert werden konnte. Zusätzlich hatte dies eine Änderung des Zytokinprofils der DCs zur Folge.<sup>133</sup> Darauf basierend änderte sich auch die Polarisierung der T-Zellantwort von pro-inflammatorischen T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>17-Zellen zu anti-inflammatorischen T<sub>H</sub>2-Zellen. Die höchste Datendichte bezüglich der Rolle der CK2 in Immunzellen ist hinsichtlich CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu finden. Mehrere Publikationen zeigen dabei, dass die CK2 eine entscheidende Bedeutung für die Differenzierung von naiven T-Zellen zu T<sub>reg</sub>-Zellen und T<sub>H</sub>17-Zellen besitzt.<sup>134,135</sup> Die pharmakologische Inhibition der CK2 in *in vitro* Differenzierungskulturen von humanen naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen führte zu einer starken Reduktion der T<sub>H</sub>17-Differenzierung und im Gegenzug zu einer gesteigerten Differenzierung in T<sub>reg</sub>-Zellen.<sup>135</sup> In Übereinstimmung zeigten murine Daten anhand eines genetisch veränderten Mausmodells, in dem die CK $\beta$ -UE spezifisch in CD4<sup>+</sup> T-Zellen depletiert wurde<sup>h</sup>, ähnliche Ergebnisse.<sup>134</sup> Die *ex vivo* Analyse der T<sub>H</sub>-Zellpopulationen offenbarte, dass auch hier die Entwicklung von T<sub>reg</sub>-Zellen begünstigt ist und die Differenzierung von T<sub>H</sub>17-Zellen stark reduziert war. Dies hatte unter anderem zur Folge, dass die genetisch veränderten Mäuse eine deutlich niedrigere Inzidenz in einem Mausmodell<sup>i</sup> für Multiple Sklerose zeigten. In beiden Studien konnte gezeigt werden, dass die pharmakologische oder genetische Inhibition der CK2 die

<sup>h</sup> CD4-Cre-ERT2 x *Csnk2b*<sup>fl/fl</sup>

<sup>i</sup> murines Mausmodell für Multiple Sklerose = Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE)



Phosphorylierung von STAT3 (Y705) reduziert.<sup>j</sup> Daher scheint die CK2 die Differenzierung von naiven T-Zellen in T<sub>reg</sub>- bzw. T<sub>H</sub>17-Zellen über den JAK/STAT-Signalweg zu beeinflussen.<sup>k</sup> Eine weitere Studie bezieht sich auf die Rolle der CK2 in T<sub>reg</sub>-Zellen. Dabei untersuchten die Autoren der Studie eine Mauslinie mit einem spezifischen *knock-out* (KO) der CK2 in T<sub>reg</sub>-Zellen (*Foxp3*-Cre x *Cskn2b*<sup>fl/fl</sup>), die auch in dieser Arbeit verwendet wurde.<sup>115</sup> Es konnte gezeigt werden, dass die CK2 die Expression des Oberflächenrezeptors ILT3 (*Immunoglobulin-like transcript 3*) auf T<sub>reg</sub>-Zellen negativ beeinflusst. Der KO hatte zur Folge, dass die ILT3-Expression auf T<sub>reg</sub>-Zellen signifikant erhöht war. Des Weiteren offenbarte die Studie, dass ILT3-exprimierende T<sub>reg</sub>-Zellen (ILT3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen) eine eigenständige Subpopulation an T<sub>reg</sub>-Zellen darstellen, die nicht mehr in der Lage sind, T<sub>H</sub>2-vermittelte Immunantworten zu supprimieren. Dies hatte unter anderem zur Folge, dass die Mäuse T<sub>H</sub>2-vermittelte asthmatische Entzündungsreaktionen in der Lunge entwickelten. Auf molekularer Ebene konnten Hinweise gesammelt werden, dass die CK2 die ILT3-Expression über den  $\beta$ -Catenin/Wnt-Signalweg kontrolliert, da CK2-defiziente T<sub>reg</sub>-Zellen in *ex vivo* Analysen eine vergleichsweise niedrige  $\beta$ -Catenin Expression zeigten. Aus dieser Studie kann geschlossen werden, dass CK2-defiziente T<sub>reg</sub>-Zellen in ihren suppressiven Fähigkeiten eingeschränkt sind. Inwieweit die CK2-Defizienz eine Verminderung der suppressiven Fähigkeiten von T<sub>reg</sub>-Zellen im Kontext der Tumorummunologie zur Folge hat, wird in dieser Arbeit untersucht. Die Zielsetzung dieser Arbeit wird in Kapitel 1.5 genauer definiert.

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Regulatorische T-Zellen (T<sub>reg</sub>-Zellen) sind essenziell für die Suppression unerwünschter Immunreaktionen und verhindern dadurch die Entwicklung von Autoimmunreaktionen.<sup>89</sup> Gleichzeitig supprimieren T<sub>reg</sub>-Zellen aber auch Immunreaktionen gegenüber Tumoren.<sup>136</sup> Die pharmakologische Inhibition von T<sub>reg</sub>-Zellen und deren suppressiven Fähigkeiten stellt daher einen vielversprechenden Ansatzpunkt für zukünftige Tumorummuntherapien dar. Als potentiell geeignetes Zielmolekül konnte die Proteinkinase CK2 (CK2) identifiziert werden, da sie eine hohe Aktivität in T<sub>reg</sub>-Zellen zeigt und gleichzeitig die suppressiven Fähigkeiten von T<sub>reg</sub>-Zellen negativ beeinflussen kann.<sup>115,l</sup> Ob dies auch für T<sub>reg</sub>-Zellen und deren suppressive Fähigkeiten im Rahmen der Tumorummunologie gilt, wurde bis zu diesem Zeitpunkt nicht untersucht. Auf dieser Grundlage wurde in dieser Arbeit der Frage nachgegangen, ob die genetische und pharmakologische Inhibition der CK2 und die damit einhergehende Reduktion der suppressiven Fähigkeiten von T<sub>reg</sub>-Zellen zu einer gesteigerten Immunantwort gegenüber Tumoren und damit zu einem verlangsamten Tumorwachstum führt. Dafür wurde das murine B16F10 Melanommodell verwendet. Des Weiteren sollte der Frage nachgegangen werden, inwieweit der Charakter der Immunantwort gegenüber Tumoren durch die CK2-Inhibition in T<sub>reg</sub>-Zellen beeinflusst wird. Dazu wurde eine Analyse der Zusammensetzung der Immunzellpopulation

<sup>j</sup> STAT: *Signal transducers and activators of transcription*

<sup>k</sup> JAK: *Janus kinases*

<sup>l</sup> Im Vergleich zur CK2-Aktivität in konventionellen FOXP3<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen

in den Tumoren durchgeführt. Dabei wurden Unterschiede in der Zusammensetzung der tumorinfiltrierenden Immunzellpopulation detektiert und charakterisiert. Ein Schwerpunkt der Analyse lag dabei auf der Bestimmung der Frequenz und der Charakterisierung der Eigenschaften von tumorinfiltrierenden T-Zellen. Abschließend sollte anhand humaner Datensätze untersucht werden, ob die gewonnenen Erkenntnisse aus dem prä-klinischen B16F10 Melanommodell auf das humane maligne Melanom übertragbar sind.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Standardchemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von folgenden Unternehmen bezogen:

- Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
- Roth (Karlsruhe, Deutschland)

### 2.2 Geräte und Hilfsmittel

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte und Hilfsmittel sind in Tabelle 2 aufgelistet.

**Tabelle 2: Geräte und Hilfsmittel**

Gerät	Hersteller
Analysewaage CP64	Sartorius (Göttingen; Deutschland)
Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies (Santa Clara; USA)
CO <sub>2</sub> Inkubator	Sanyo (München; Deutschland)
Durchflusszytometer (AriaII; LSRII; LSRFortessa)	BD Biosciences (Heidelberg; Deutschland)
Geldokumentationssystem Gel Doc XR	Bio-Rad (München; Deutschland)
Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad (München; Deutschland)
gentleMACS Octo Dissociator (mit Heizfunktion)	Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach; Deutschland)
Glaspipetten (5ml; 10ml)	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt; Deutschland)
Heizblock (MHR23)	HLC (Eschborn, Deutschland)
Langhaarschneider	Panasonic (Hamburg; Deutschland)
MACS-Magnet (Midi MACS; Quattro MACS)	Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach; Deutschland)
Messschieber	Fisher Scientific (Schwerte; Deutschland)
Mikroskop Axio Vert.A1	Zeiss (Oberkochen; Deutschland)
Mikroskop IDO3	Zeiss (Oberkochen; Deutschland)
Neubauerzählkammer	Roth (Karlsruhe; Deutschland)
PCR-Cycler T3 Thermocycler	Biometra (Göttingen; Deutschland)
pH-Meter, CG 840	Schott (Mainz; Deutschland)
Pipetten (1-10µl; 10-100µl; 20-200µl; 100-1000µl)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Pipettierhilfen (Pipetgirl/Pipetboy)	Integra Biosciences (Biebertal; Deutschland)
Qubit® 2.0 Fluorometer	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt; Deutschland)
Sterilbank (MSC Advantage)	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt; Deutschland)
Thermocycler PeqStar 96X	VWR (Darmstadt; Deutschland)

Wasserbad	Julabo (Seelbach; Deutschland)
Zentrifugen	
Tischzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus (Hanau; Deutschland)
Megafuge 40R	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt; Deutschland)
Multifuge 3L-R	Heraeus (Hanau; Deutschland)
Megafuge 10	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt; Deutschland)
Tischzentrifuge Z 216 MK	Hermle (Wehingen; Deutschland)

## 2.3 Verbrauchsmaterialien

Alle verwendeten Verbrauchsmaterialien (Tab.3) wurden steril bezogen und verwendet.

**Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien**

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Hersteller</b>
96 Well Mikroplatten (U-Boden; V-Boden)	Greiner (Frickenhausen; Deutschland)
gentle MACS® C Tubes	Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach; Deutschland)
Gewebekulturplatten (24-; 48-; 96-well)	Greiner (Frickenhausen; Deutschland)
High Sensitivity DNA Chips	Agilent Technologies (Santa Clara; USA)
Kanülen	BD Bioscience (Heidelberg; Deutschland)
Kanülen	B.Braun (Melsungen; Deutschland)
Kryo-Röhrchen (2ml)	Sarstedt (Nürnberg; Deutschland)
Latexhandschuhe	Starlab (Hamburg; Deutschland)
MACS® Zellsiebe (70µM)	Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach; Deutschland)
Objektträger	Diagonal (Münster; Deutschland)
PCR-Reaktionsgefäß (0,2ml)	Nerbe Plus (Winsen/Luhe; Deutschland)
Petrischalen	Greiner (Frickenhausen; Deutschland)
Pipettenspitzen (10µl; 100µl; 1000µl)	Starlab (Hamburg; Deutschland)
Reaktionsgefäße (0,5ml; 1,5ml; 2ml)	Greiner (Frickenhausen; Deutschland)
Reaktionsgefäße (0,5ml; 1,5ml; 2ml)	Eppendorf (Hamburg; Deutschland)
Reaktionsgefäße (15ml; 50ml)	Greiner (Frickenhausen; Deutschland)
RNA Pico Chips	Agilent Technologies (Santa Clara; USA)
Rundbodenröhrchen für Durchflusszytometrie (1ml)	Micronic (Lelystadt; Niederlande)
Rundbodenröhrchen für Durchflusszytometrie (5ml)	Sarstedt (Nürnberg; Deutschland)
Seperationssäulen (MS; LS)	Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach; Deutschland)
Serologische Pipetten	Greiner (Frickenhausen; Deutschland)
Skalpelle	Feather (Osaka, Japan)
Spritzen (1ml; 2ml; 10ml)	B.Braun (Melsungen; Deutschland)
Zellkulturflaschen (25cm <sup>2</sup> ; 75cm <sup>2</sup> ; 175cm <sup>2</sup> )	Greiner (Frickenhausen; Deutschland)
Zellsiebe (40µm; 70µm)	Greiner (Frickenhausen; Deutschland)

## 2.4 Puffer; Zellkulturmedien und Reagenzien zu deren Herstellung

Tabelle 4 listet die in dieser Arbeit verwendeten kommerziellen Zellkulturmedien, Puffer und Reagenzien auf.

**Tabelle 4: Reagenzien**

<b>Reagenz</b>	<b>Hersteller</b>
Accutase	Gibco (Darmstadt; Deutschland)
Bovines Serumalbumin (BSA)	PAN Biotech (Aidenbach; Deutschland)
Collagenase D	Sigma-Aldrich (Steinheim; Deutschland)
DMAT	MedChemExpress (Sollentuna; Schweden)
DMEM	Gibco (Darmstadt; Deutschland)
DMEM (Glucosefrei)	Gibco (Darmstadt; Deutschland)
DMEM (Trockenpulver)	PAN Biotech (Aidenbach; Deutschland)
DreamTaq Puffer, 10x	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt; Deutschland)
DreamTaq, DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt; Deutschland)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth (Karlsruhe; Deutschland)
Fetales Kälberserum (FCS)	Life Technologies (Darmstadt; Deutschland)
GeneRuler™ 100bp DNA Leiter	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt; Deutschland)
Geneticin® G418 Sulfat	Gibco (Darmstadt; Deutschland)
HEPES	Roth (Karlsruhe; Deutschland)
Ionomycin	Sigma-Aldrich (Steinheim; Deutschland)
Ketaminhydrochlorid	Inresa (Freiburg; Deutschland)
MEM Trockenpulver	PAN Biotech (Aidenbach; Deutschland)
Monensin (1000x)	eBioscience (Frankfurt a.M.; Deutschland)
Natriumpyruvat	Serva (Tübingen; Deutschland)
NEAA (100x)	Gibco (Darmstadt; Deutschland)
Phenolrot	Sigma-Aldrich (Steinheim; Deutschland)
Phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich (Steinheim; Deutschland)
RPMI 1640	Gibco (Darmstadt; Deutschland)
Trypanblau	Callbiochem (Darmstadt; Deutschland)
Xylazinhydrochlorid (Rompun 2%)	Bayer (Leverkusen; Deutschland)
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Steinheim; Deutschland)

Alle Puffer und Reagenzien wurden vor Benutzung autoklaviert und unter sterilen Bedingungen verwendet. Die Lagerung erfolgte bei 4°C

**Aminosäure-Lösung:**

- 32mM Alanin
- 17mM Asparagin
- 26mM Asparaginsäure
- 58mM Glutaminsäure
- 40mM Prolin
- 114mM Natriumpyruvat
- in VE-Wasser auf pH 7,4 eingestellt

Die AS-Mischung wurde 3 h bei 40°C inkubiert. Im Verhältnis von  $1/185$  wurde eine angesäuerte Biotin/Vitamin B12 Lösung (1mM Biotin; 184µM Vitamin B12 in 1M Salzsäure (HCL)) beigefügt.

**Cystein Lösung:**

- 0,25M HCL-Lösung
- 58µM Cystein
- in VE-Wasser

**Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)- Lösung:**

- 0,5M EDTA
- in VE-Wasser auf pH 8 eingestellt

**Basischer Lysepuffer:**

- 25mM Natriumhydroxid (NaOH)
- 0,2mM EDTA
- in VE-Wasser auf pH 12 eingestellt

### **Neutralisationspuffer**

- 40mM Tris HCL
- in VE-Wasser auf pH 5 eingestellt

### **Fetales Kälberserum (FCS):**

Zur Inaktivierung von Komplementfaktoren wurde kommerzielles FCS für 45 min bei 56°C erhitzt. Vor Verwendung wurde das hitzeinaktivierte FCS bei 1100 g für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und verwendet.

### **Gey's Lysepuffer:**

- 16mM Ammoniumchlorid (NH<sub>4</sub>Cl)
- 10mM Kaliumhydrogencarbonat (KHCO<sub>3</sub>)
- 126µM EDTA
- in VE-Wasser auf pH 7,4 eingestellt

### **1x PBS (Phosphate Buffered Saline):**

- 1,4M Natriumchlorid (NaCl)
- 0,1M Natriumhydrogenphosphat (NaHPO<sub>4</sub>)

### **Penicilin/Streptomycin-Lösung:**

- 172µM Penicillin
- 137µM Streptomycin
- in VE-Wasser auf pH 7,4 eingestellt

### **Rinderserumalbumin (BSA):**

- 10% (w/v) BSA
- in 1x PBS

**Natriumazid-Lösung (NaN<sub>3</sub>-Lösung):**

- 1% (w/v) NaN<sub>3</sub>
- in VE-Wasser

**Trypanblaulösung**

- 0,5% (w/v) Trypanblau
- 0,02 % (v/v) Natriumazid (NaN<sub>3</sub>)
- in PBS auf pH 7,4 eingestellt

Zur Herstellung der Arbeitslösung wurde die Trypanblaulösung  $\frac{1}{5}$  in PBS verdünnt.

**GM-Puffer (Großer MACS-Puffer):**

- 0,5% (w/v) BSA (mit 10% BSA-Lösung)
- 5 mM EDTA (mit 0,5 M EDTA-Lösung)
- 0,01% NaN<sub>3</sub> (mit 0,1% NaN<sub>3</sub>-Lösung)
- in 1x PBS

**Ketamin-Rompun-Narkoselösung:**

- 2ml Ketamin
- 800µl Rompun

Aufbewahrung bei 4°C für max. 12 Wochen. Zur Herstellung der Arbeitslösung wurde die Ketamin-Rompun-Narkoselösung  $\frac{1}{5}$  in PBS verdünnt.

**B16F10 Kulturmedium:**

- 1‰ (v/v) Penicillin/Streptomycin Lösung.; Herstellung siehe Penicillin/Streptomycin Lösung)
- 10% (v/v) FCS
- 1% (v/v) NEAA
- 1% (v/v) Glutamin (200 mM)
- 50µM β-Mercaptoethanol
- in RPMI 1640 Medium



**ISCOVEs Medium:**

- 44mM Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )
- 12,5mM Hepes
- 1:100 Aminosäurelösung
- 1:2500 58 $\mu\text{M}$  Cystein-Lösung (in 0,25 M HCL)
- 128 $\mu\text{M}$  Natrium-Selenit ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ )
- 1‰ (v/v) Penicillin/Streptomycin-Lösung
- 50 $\mu\text{M}$   $\beta$ -Mercaptoethanol
- DMEM Trockenpulver (17,67 g/L) in VE-Wasser.

**Testmedium 5% / 10% FCS (TM5/TM10)**

- 5 % (v/v) FCS / 10 % (v/v) FCS
- 1mM Natrium-Pyruvat
- 2mM Glutamin
- in ISCOVES

**2.5 Kommerzielle Kits**

Tabelle 5 führt die kommerziell erhältlichen Kits auf, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

**Tabelle 5: Verwendete kommerzielle Kits**

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
CD4/CD8 TIL MicroBeads (Maus)	Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach; Deutschland)
CD45 TIL MicroBeads (Maus)	Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach; Deutschland)
High Sensitivity DNA Kit	Agilent (Santa Clara; USA)
Nextera XT DNA Library Preparation Kit	Illumina (Eindhoven; Niederlande)
Qubit <sup>®</sup> dsDNA BR Assay Kit	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt; Deutschland)
RNA 6000 Pico Kit	Agilent (Santa Clara; USA)
SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA Kit for Sequencing	TaKaRa Clontech (Saint-Germain-en-Laye; Frankreich)
Transcription Factor Fixation/Permeabilization Kit	eBioscience (Frankfurt a.M.; Deutschland)
Tumor Dissociation Kit (Maus)	Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach; Deutschland)

## 2.6 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Die zur durchflusszytometrischen Analyse verwendeten Antikörper sind in Tabelle 6 aufgelistet. Zusätzlich sind die Klone, Konzentration, das gekoppelte Fluorophor und die verwendete Arbeitskonzentration angegeben. Die Antikörper wurden von folgenden Firmen bezogen:

- BioLegend (Koblenz; Deutschland)
- Fisher Scientific (eBioscience; Invitrogen) (Darmstadt; Deutschland)
- BDBiosciences (Heidelberg; Deutschland)

**Tabelle 6: Antikörper für die Durchflusszytometrie**

Antigen	Klon	Fluorochrom	Arbeitskonzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ]
B220	RA3-6B2	Pe/Cy5	0,40
CD11b	M1/70	Pe/Cy7	0,40
CD11c	N418	APC-R700	1,00
CD3	145-2C11	Pe/Cy5	0,40
CD4	RM4-5	BV510	0,40
		BV711	0,40
		Pe/Cy5	0,40
		Pe/Cy7	0,40
CD44	IM7	BV605	0,40
		Pe/Cy7	0,40
		APR-R700	0,40
CD45pan	30-F11	BV421	0,40
		BV785	0,40
CD49b	DX5	BV421	1,00
CD8	53-6.7	BV510	0,40
		BV711	0,40
		APC-R700	0,40
F4/80	BM8	Pe/Cy7	1,00
		BV711	1,00
		Pe/Cy5	1,00
Fixable Viability dye	-	APC-Cy7	Einsatz: 1/1000
FOXP3	FJK-16s	Fitc	2,50
		eFluor®450	2,00
GATA3	TWAJ	AlexaFluor®488	0,25
		eFluor®660	0,25
		Pe	0,25

GR-1	RB6-8C5	Fitc	1,00
IFN- $\gamma$	XMG1.2	Fitc	0,50
		BV605	0,50
IL-13	eBio13A	APC	4,00
IL-4	11B11	Pe/Cy7	4,00
		BV421	4,00
IL-5	TRFK5	Pe	4,00
ILT3	H1.1	Pe	4,00
		AlexaFluor®647	4,00
IRF4	3E4	Pe	2,00
Lag-3	eBioC9B7W	PerCp-eFluor®710	1,00
MHCII	M5/114.15.2	BV510	0,20
NK1.1	PK136	Fitc	1,00
Nkp46	29A1.4	APC	2,00
PD-1	RMP1-30	Pe/Cy7	1,00
PD-L2	122	Fitc	5,00
ROR $\gamma$ T	B2D	APC	4,00
		PerCp-eFluor®710	4,00
SIGLEC-F	E50-2440	Pe	0,67
T-BET	eBio4B10	Pe/Cy7	2,00
TCR $\beta$	H57-597	Fitc	0,50
		BV605	0,50
TNF- $\alpha$	MP6-XT22	BV510	0,67
		Pe/Cy7	0,67

## 2.7 Zelllinien

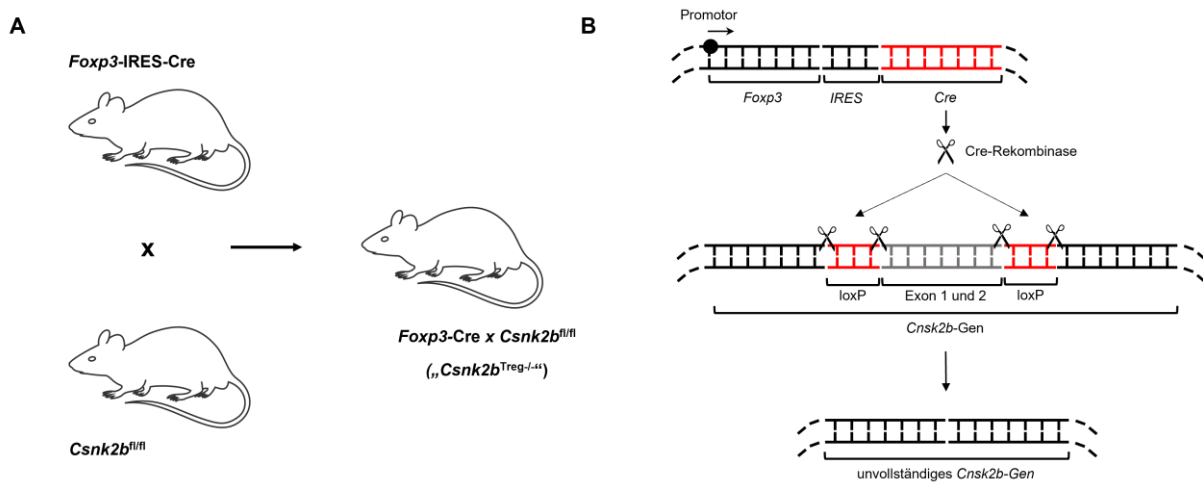
Die in dieser Arbeit verwendete B16F10 Zelllinie wurde von (TRON, Mainz) zur Verfügung gestellt.

## 2.8 Versuchstiere

Alle für die Arbeit verwendeten Tiere hatten einen genetischen C57BL/6J Hintergrund und wurden in der zentralen Versuchstiereinrichtung Mainz unter keimfreien Bedingungen gehalten. Das Alter der Versuchstiere betrug 10–16 Wochen. Es wurden Mäuse verwendet, die unter Verwendung des *Cre-loxP* Systems einen konditionellen Knockout der Proteinkinase CK2 (CK2) in T<sub>reg</sub>-Zellen besitzen. Auf das Prinzip des *Cre-loxP*-Systems und die Generierung des verwendeten Mausstamms wird im nächsten Abschnitt eingegangen.

### 2.8.1 Generierung der *Foxp3*-Cre x *Csnk2b*<sup>fl/fl</sup> Mauslinie

Um die Funktion der CK2 für die suppressiven Fähigkeiten von regulatorischen T-Zellen (T<sub>reg</sub>-Zellen) im Kontext der Tumorummunologie zu charakterisieren, wurden Mäuse mit einem konditionellen Knockout der Proteinkinase CK2 (CK2) in T<sub>reg</sub>-Zellen verwendet. Dazu wurden 2 Mauslinien miteinander gekreuzt. Der erste Mausstamm (*Foxp3*-IRES-Cre) besitzt einen *knockin* bei dem das Gen für die Cre-Rekombinase (*cyclization recombinase*), unter der Kontrolle des *Foxp3*-Gens bzw. dessen Promotors steht.<sup>95</sup> Als Folge wird in allen *Foxp3*-exprimierenden Zellen auch die Cre-Rekombinase exprimiert. Bei dem zweiten Mausstamm (*Csnk2b*<sup>fl/fl</sup>) ist Exon 1 und 2 des Zielgens *Csnk2b* (codiert für die  $\beta$ -Untereinheit der CK2; CK2 $\beta$ -UE) von zwei sogenannten loxP- (*locus of X over P1*) Erkennungssequenzen (*loxP sites*) flankiert (Abb. 7A).<sup>137</sup> Die aus der Kreuzung resultierende Mauslinie (*Foxp3*-Cre x *Csnk2b*<sup>fl/fl</sup>) besitzt die genetische Ausstattung beider Ausgangs-Mauslinien und demnach einen spezifischen konditionellen KO der CK2 $\beta$ -UE in T<sub>reg</sub>-Zellen. Die Spezifität beruht auf der Expressionskontrolle der Cre-Rekombinase durch das Gen für den Transkriptionsfaktor FOXP3, der im murinen System nahezu exklusiv in T<sub>reg</sub>-Zellen exprimiert wird.<sup>84,85,138</sup> Dadurch werden nur in T<sub>reg</sub>-Zellen die Exons 1 und 2 des *Csnk2b*-Gens zwischen den *loxP sites* durch die Cre-Rekombinase entfernt. Da sich in Exon 2 der Transkriptionsstart des *Csnk2b*-Gens befindet, wird in T<sub>reg</sub>-Zellen keine CK2 $\beta$ -UE exprimiert. Dies wurde auf transkriptioneller und Proteinebene verifiziert.<sup>115,139</sup> In Abbildung 7 ist die Generierung der Mauslinie *Foxp3*-Cre x *Csnk2b*<sup>fl/fl</sup> schematisch dargestellt.

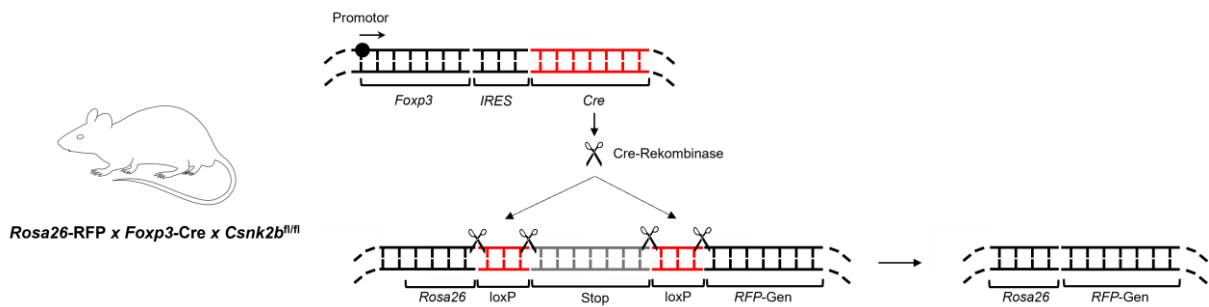


**Abbildung 7: Generierung des Mausstammes *Foxp3*-Cre x *Csnk2b*<sup>fl/fl</sup> mit einer konditionellen Deletion der Proteinkinase CK2  $\beta$ -Untereinheit in regulatorischen T-Zellen.** **A** Verpaarung von *Foxp3*-IRES-Cre Mäusen und *Csnk2b*<sup>fl/fl</sup> Mäusen führte Generierung des *Foxp3*-Cre x *Csnk2b*<sup>fl/fl</sup> Mausstammes. **B** Mechanismus der spezifischen konditionellen Deletion der CK2 $\beta$ -UE in T<sub>reg</sub>-Zellen. Unter der Kontrolle des T<sub>reg</sub>-Zell-spezifischen *Foxp3*-Promotors wird die Cre-Rekombinase exprimiert. Diese erkennt *loxP*-Erkennungssequenzen, die Exon 1 und 2 des *Csnk2b*-Gens flankieren, welche durch die Cre-Rekombinase entfernt werden. Daraus resultiert ein unvollständiges *Csnk2b*-Gen, wodurch dessen Transkription verhindert wird.

Im Folgenden werden wildtypische Mäuse in dieser Arbeit als *Csnk2b*<sup>fl/fl</sup> Mäuse und konditionelle KO-Mäuse als *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäuse bezeichnet.

### 2.8.2 Generierung der *Rosa26-RFP x Foxp3-Cre x Csnk2b*<sup>fl/fl</sup> Mauslinie

Zur durchflusszytometrischen Zellsortierung von konventionellen CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Kap. 2.13.1 und 3.7.1) wurde die *Foxp3-Cre x Csnk2b*<sup>fl/fl</sup> Mauslinie mit einer *Rosa26-RFP* Reportermaus gekreuzt. Diese Reporter-Mauslinie trägt einen „knock-in“ bei dem das Gen für ein rot-fluoreszierendes Protein (*red fluorescent protein*; RFP) unter der Kontrolle des *Rosa26*-Locus steht. Dieser ist oder war in allen murinen hämatopoetischen Zellen aktiv.<sup>140</sup> Strangaufwärts ist dem *RFP*-Gen eine Stopkassette vorgeschaltet, welche von zwei loxP-sites flankiert wird. Wird in Zellen die Cre-Rekombinase exprimiert, führt dies dazu, dass die Stopkassette entfernt wird und das RFP-Gen transkribiert und die entsprechende RNA translatiert wird. Dies kann zur durchflusszytometrischen Charakterisierung von RFP-exprimierenden Zellen und deren durchflusszytometrischen Zellsortierung genutzt werden. In dieser Mauslinie steht die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des *Foxp3*-Gens. Dadurch wird RFP ausschließlich in *Foxp3*-exprimierenden Zellen und demnach T<sub>reg</sub>-Zellen exprimiert. Dadurch sind T<sub>reg</sub>-Zellen ohne vorherige Fixierung und intrazelluläre Färbung des Transkriptionsfaktors FOXP3 eindeutig zu identifizieren. Abbildung 8 illustriert den molekulargenetischen Mechanismus der RFP-Expression in *Rosa26-RFP x Foxp3-Cre x Csnk2b*<sup>fl/fl</sup> Mäusen.



**Abbildung 8: Mechanismus der RFP-Expression in regulatorischen T-Zellen innerhalb der *Rosa26-RFP x Foxp3-Cre x Csnk2b*<sup>fl/fl</sup> Mauslinie.** Unter der Kontrolle des *Foxp3*-Gens wird die Cre-Rekombinase ausschließlich in T<sub>reg</sub>-Zellen gebildet. Die Cre-Rekombinase entfernt die von zwei loxP sites flankierte Stopkassette, wodurch das *RFP*-Gen transkribiert werden kann.

### 2.8.3 Genotypisierung von Versuchstieren

Zur Gewinnung von DNA, wurden Ohrbiopsien von Versuchstieren in 40µl basischem Lysepuffer für 30min bei 95°C inkubiert. Die Neutralisation erfolgte mit 40µl Neutralisationspuffer. Zur

Genotypisierung wurde die Lösung in verschiedenen Polymerase Kettenreaktionen (PCR) eingesetzt. Der generelle PCR-Ansatz ist in Tabelle 7 aufgelistet.

**Tabelle 7: Genereller PCR-Ansatz für die Typisierung von Versuchstieren**

Reagenz	Volumen [ $\mu$ l]
dH <sub>2</sub> O	17,25
10x Dream Taq Puffer	2,5
dNTPs [10 $\mu$ M]	1
Primer (Arbeitslösung [5pmol])	1
Dream Taq Polymerase	0,25
Probe	3

Diese Ansätze durchliefen spezifische PCR-Programme für die jeweiligen Transgene. Die in dieser Arbeit verwendeten PCR-Programme sind in Tabelle 8 aufgelistet.

**Tabelle 8: PCR-Programme zur Genotypisierung von Versuchstieren**

	<i>Csnk2b</i>		<i>Foxp3</i> (WT/Neo)		<i>Rosa26-RFP</i> (WT/Mut)	
Initiale Denaturierung	94°C; 5min		94°C; 2min		94°C; 3min	
Denaturierung	94°C; 0,5min	40x	94°C; 0,5min	35x	94°C; 0,5min	35x
Annealing	55°C; 0,5min		58°C; 0,5min		58°C; 1min	
Elongation	72°C; 2min		72°C; 1min		72°C; 1min	
Finale Elongation	72°C; 8min		72°C; 5min		72°C; 2min	

Folgende Primerpaare wurden dabei verwendet:

- *Csnk2b*.for: 5'- CTA GCT CGA GAT GAG TAG CTC TGA GGA GGT G-3'
- *Csnk2b*.rev: 5'- GGA TAG CAA ACT CTC TGA G-3'
- *Foxp3* WT.for 5'- TGT GTG ATA GTG CCC GTG GTT C-3'
- *Foxp3* WT.rev 5'- TTC GCA AGA GGA GCC AAC G-3'
- *Foxp3* Neo.for 5'- CTG CTT CCT TCA CGA CAT TCA AC-3'
- *Foxp3* Neo.rev 5'- AAG TGC TTT GTG CGA GTG GAG AGC-3'
- RosaRFP.com 5'-AAA GTC GCT CTG AGT TGT TAT -3'
- RosaRFP.WT 5'-GGA GCG GGA GAA ATG GAT ATG -3'
- RosaRFP.mut 5'-CAT CAA GGA AAC CCT GGA CTA CTG -3'

Die Proben mit den DNA-Amplifikaten wurden anschließend gelelektrophoretisch für ca. 30 min bei 150V aufgetrennt. Dafür wurden 20  $\mu$ l der DNA-Proben auf ein 1,5% Agarose-Gel aufgetragen.

## 2.9 Methoden der Zellkultur

Alle Arbeiten zur Kultivierung von Zellen wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Es wurden ausschließlich sterile Glas- und Plastikmaterialien verwendet. Die Kultivierung erfolgte in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator bei einer Temperatur von 37°C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5%.

### 2.9.1 Kultivierung von B16F10 Melanomzellen

Die Lagerung von B16F10 Melanomzellen erfolgte in Dimethylsulfoxid (DMSO) in flüssigem Stickstoff (-196°C). 7 Tage vor Inokulation (Kap. 2.10.2) wurden die Zellen im Wasserbad aufgetaut und schnellstmöglich in ISCOVES-Medium resuspendiert. Nach Zentrifugation (1700rpm; 8min) wurden die Zellen in B16F10 Kulturmedium resuspendiert und in eine 75cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche überführt. Die Kultivierung erfolgte in Anwesenheit des Antibiotikums G418 (300µg/ml) um einen Selektionsdruck für OVA-exprimierende B16F10 Zellen zu schaffen, da diese eine Neomycin-Resistenz besitzen. Bei einer Konfluenz von 70-80% war es notwendig die Zellen zu splitten, um eine zu große Zelldichte in der Zellkulturflasche zu vermeiden. Dazu wurden die Zellen mit Accutase (0,2ml/cm<sup>2</sup>) von der Oberfläche der Zellkulturflasche abgelöst und in 1xPBS resuspendiert. Nach Zentrifugation und Bestimmung der Lebendzellzahl (Kap. 2.9.2) wurden die Zellen wieder in B16F10 Kulturmedium aufgenommen und 0,5-1x10<sup>6</sup> B16F10 Melanomzellen für 24-48h kultiviert, wobei die Konfluenz täglich kontrolliert wurde. 24h vor Inokulation wurden 1-1,5x10<sup>6</sup> Zellen pro Zellkulturflasche ohne G418 kultiviert.

### 2.9.2 Bestimmung der Lebendzellzahl in Zellsuspensionen

Um die Zahl an lebenden Zellen in Zellsuspensionen zu bestimmen, wurden die Zellsuspension in physiologischer Trypanblaulösung resuspendiert. Trypanblau ist in der Lage die Zellmembran von toten Zellen zu durchdringen, wodurch diese blau angefärbt werden. Lebende Zellen werden aufgrund ihrer intakten Membran nicht angefärbt. Die Zellsuspension in Trypanblau wurde auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen und lebende (farblose) Zellen von 4 Großquadraten gezählt. Die Zahl lebender Zellen  $Z$  wurde mit nachfolgender Formel aus der ermittelten Zahl lebender Zellen von 4 Großquadraten ( $N$ ) unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors ( $Vf$ ) sowie des Kammerfaktors ( $Kf$ ) berechnet.

$$\text{Zahl lebender Zellen } Z = \frac{N}{4} \times Vf \times Kf$$

## 2.10 B16F10 Melanommodell

### 2.10.1 Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen der B16 Tumorzelllinie und dem humanen malignen Melanom

Das murine B16 Melanommodell ist ein weit verbreitetes und in weiten Teilen akzeptiertes Tiermodell, um (immun-)onkologische Hypothesen hinsichtlich des humanen malignen Melanoms zu überprüfen.<sup>141</sup> Die B16 Zelllinie stammt ursprünglich von chemisch-induzierten Tumoren aus C57BL/6 Mäusen ab, wobei heutzutage zahlreiche Subtypen dieser Zelllinie existieren und verwendet werden.<sup>142</sup> Die in dieser Arbeit verwendete B16F10 Zelllinie gilt als sehr aggressive Zelllinie und kann als Lungenmetastasenmodell (bei intravenöser Injektion) oder als klassisches Melanommodell (bei subkutaner Injektion) verwendet werden.<sup>143</sup> Um aussagekräftige wissenschaftliche Erkenntnisse zu generieren, die auch in das humane System übertragbar sind, sollten Tiermodelle Gemeinsamkeiten mit der entsprechenden humanen Erkrankung zeigen. Folgende Gemeinsamkeiten (Tabelle 9) und Unterschiede existieren zwischen dem B16F10 Melanommodell und dem humanen malignen Melanom.

**Tabelle 9: Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen dem B16F10 Melanommodell und dem humanen malignen Melanom<sup>141</sup>**

Gemeinsamkeiten	Unterschiede
Expression gleicher tumor-spezifischer Antigene wie gp100; Tyrosinase; TRP-1 und -2	Die Expression von MHC I auf Tumorzellen (Melanom <sup>+</sup> B16F10 <sup>+</sup> )
Adoptiver Transfer von gp100-spezifischen T-Zellen verringert die Tumorlast <sup>m</sup>	Frequenz an tumorspezifischen T-Zellen in Gewebekulturen (Zusatz von IL-2) beträgt beim Melanom 50%, während sie in B16F10 Gewebekulturen kaum zu finden sind
Vitiligo (Autoimmunerkrankung) ist ein positiv prognostischer Marker	Menschen können über lange Zeiträume mit einem malignen Melanom leben; während Mäuse innerhalb von Wochen am B16F10 Tumor sterben.

Zusätzlich sollte beachtet werden, dass humane Melanome sehr divers hinsichtlich der Expression von Tumorantigenen oder Dysregulation von Signalwegen sind. Dies kann im murinen System nicht wiedergespiegelt werden. Nichtsdestotrotz ist das B16F10 Melanommodell, aufgrund der zahlreichen Gemeinsamkeiten, ein gut charakterisiertes und oft verwendetes Tiermodell für das humane maligne Melanom.

### 2.10.2 Inokulation von B16F10 Melanomzellen

Bei einer Konfluenz von max. 70-80% wurden die Zellen mit Accutase (0,2mg/ml) von der Oberfläche der Zellkulturflasche abgelöst und in dem 4-fachen Volumen B16F10 Kulturmedium aufgenommen.

<sup>m</sup> eingeschränkte Gemeinsamkeit, da im murinen System nur die Lungenmetastasierung verringert wird



Nach Bestimmung der Lebendzellzahl und einem Waschschrift mit 1xPBS wurde die Konzentration der Zellsuspension auf  $2 \times 10^6$  Zellen/ml in 1xPBS eingestellt. Vor Injektion der Zellen wurden die Mäuse mit einer Ketamin-Rompun-Lösung narkotisiert und das Fell an der rechten Flanke rasiert. Anschließend erfolgte die Injektion von  $2 \times 10^5$  B16F10 Zellen (100 $\mu$ l Zellsuspension) unter die Haut (*subcutan*; s.c.).

### 2.10.3 Messung der Tumorgröße

Ab Tag 7 nach der Inokulation wurde die Tumorgröße alle 2 Tage gemessen. Dazu wurden die Tiere in einer Narkoseanlage mit einem Gemisch aus Sauerstoff und Isofluran kurzzeitig narkotisiert. Waren die Tumore aufgrund zu starken Haarwuchses nicht eindeutig zu erkennen, wurde die rechte Flanke nochmals rasiert. Die Messung erfolgte mit einer Schieblehre in zwei Dimensionen (Breite und Länge). Waren die Tumore sichtbar aber noch nicht eindeutig zu messen, wurde diesen ein konstantes Volumen von 2,5mm<sup>2</sup> zugewiesen. Die Berechnung des Tumorumfanges erfolgte mit nachfolgender Formel.

$$\text{Tumorumfang } V [\text{mm}^3] = \frac{1}{2} \times (\text{Breite}^2 \times \text{Länge})$$

### 2.10.4 Depletion von Eosinophilen Granulozyten im B16F10 Melanommodell

Für die Depletion von SIGLEC-F exprimierenden Eosinophilen Granulozyten wurde ein anti-Maus SIGLEC-F Antikörper der Firma R&D Systems (Minneapolis; USA; Klon: 238047) verwendet. Vor Verwendung wurde dieser in 1x PBS gelöst (150 $\mu$ g/ml). An Tag 6,8,10,13,15 und 17 nach Inokulation der B16F10 Zellen wurden den Mäusen 100 $\mu$ l der Antikörperlösung intraperitoneal (i.p.) injiziert (entspricht einer Dosis von 15 $\mu$ g).

## 2.11 Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus Geweben und lymphatischen Organen

Vor der Isolation von Geweben und/oder lymphatischen Organen wurden die Versuchstiere durch Begasung mit CO<sub>2</sub> euthanasiert.

### 2.11.1 Einzelzellsuspensionen aus Tumorgewebe

Nach Euthanasierung der Versuchstiere wurde der Tumor mithilfe eines spitzen Skalpell von der Haut gelöst und eine Petrischale überführt. Anschließend erfolgte ein enzymatischer Verdau des Tumorgewebes der im Rahmen dieser Arbeit in 2 Varianten durchgeführt wurde.

#### Variante 1: Verdau mit Collagenase D

1 ml einer Collagenase D-Lösung (1mg/ml) wurde in verschiedene Stellen des Tumorgewebes injiziert. Nach einer 1 min Inkubationszeit wurde das Tumorgewebe mit einer Schere zerkleinert und ein 15ml Reaktionsgefäß (15ml Falcon) mit 1ml Collagenase D-Lösung (1mg/ml) überführt. Es erfolgte eine Inkubation des Tumorgewebes im Wasserbad für 30min bei 37°C. Die verdaute Zellsuspension wurde mithilfe eines Spritzenstempels über ein 70µm Sieb zerrieben. Nach einem Waschschrift mit 1xPBS (Zentrifugation: 1700rpm, 8min, 4°C) erfolgte eine Filtration über einen 40µm Sieb. Die so erhaltene Einzelzellsuspension wurde für die durchflusszytometrische Analyse tumor-infiltrierender Immunzellpopulationen verwendet (Kap. 2.13).

#### Variante 2: Verdau mit Tumor Dissociation Kit (Miltenyi)

Die Herstellung der Enzymlösung in gentleMACS™ C Tubes erfolgte nach Herstellerangaben. Das Tumorgewebe wurde mithilfe einer Schere zerkleinert und in die Enzymlösung überführt. Die C Tubes wurden anschließend in den gentleMACS™ Octo Dissociator in die dafür vorgesehenen Gefäßhalter gespannt und das Programm für den Verdau von weichen murinen Tumoren (m\_Tdk\_1) gestartet. Nach Ablauf des Programms erfolgte eine kurze Zentrifugation, um die komplette Zellsuspension und evtl. verbliebene Gewebereste am Boden der C-Tubes zu sammeln. Nach Zugabe von 5ml DMEM und gründlicher Resuspendierung wurde die Zellsuspension mit einem 70µm Sieb filtriert. Anschließend erfolgte ein Waschschrift mit DMEM (Zentrifugation:1700rpm, 8min, 4°C) und eine erneute Filtration über einen 40µm Sieb. Die so erhaltene Einzelzellsuspension wurde für die Anreinigung von tumor-infiltrierenden Immunzellen mittels magnetischer Zellsortierung (Kap. 2.13.2) verwendet.

#### 2.11.2 Einzelzellsuspensionen aus der Milz

Unter sterilen Bedingungen wurde die Bauchhöhle der Versuchstiere mittels einer Schere eröffnet und die Milz mithilfe einer Pinzette und Schere entfernt. Die Milz wurde auf einen angefeuchteten (DMEM+2%FCS) 40µm Filter zerrieben und durch zweimaliges Spülen mit DMEM+2%FCS in ein 50ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation (600g; 8min; 4°C) wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen in 2ml Geys'schem Lysepuffer resuspendiert. Dies diente zur Lyse von Erythrozyten durch osmotischen Schock. Nach Zugabe von 8ml DMEM+2%FCS und gründlicher Resuspendierung wurde die Zellsuspension nochmals über einen 40µm Sieb gegeben. Abschließend erfolgte die Bestimmung der Lebendzellzahl (Kap. 2.9.2).

#### 2.11.3 Einzelzellsuspensionen aus Lymphknoten

Die Lymphknoten wurden unter sterilen Bedingungen entnommen und in eine mit DMEM+2%FCS gefüllte 6-Well Platte überführt. Anschließend wurden die rauen Seiten von Objektträgern mit

DMEM+2%FCS angefeuchtet. Zwischen den rauen Seiten der Objektträger wurden die Lymphknoten gründlich zerrieben und evtl. anfallende Tropfen aufgefangen. Die Objektträger wurden zweimal mit DMEM+2%FCS gespült, wobei die Zellen im Well aufgefangen wurde. Die Zellsuspension wurde über ein 40µm Sieb filtriert und zentrifugiert (600g; 8min; 4°C). Abschließend erfolgte die Bestimmung der Lebendzellzahl (Kap. 2.9.2).

## 2.12 Isolation von Immunzellpopulationen aus Tumorgewebe mittels MACS (*magnet activated cell sorting*)

Einzelzellsuspensionen die aus Tumoren gewonnen werden (Kap. 2.11.1) eignen sich, aufgrund der hohen Anzahl an Tumorzellen und anderweitigen Verunreinigungen, nur bedingt zur direkten durchflusszytometrischen Analyse oder Sortierung von tumor-infiltrierenden Immunzellpopulationen. Um die Qualität der durchflusszytometrischen Analyse von tumor-infiltrierenden Immunzellen zu steigern bzw. die erforderliche Zeit zur Sortierung von bestimmten tumor-infiltrierenden Immunzellen zu minimieren wurde die Technik der Magnet-aktivierten Zellsortierung (*magnet- activated cell sorting*; MACS) angewendet. Die Technik wurde im Rahmen dieser Arbeit für die Isolation aller tumor-infiltrierenden Immunzellen (mittels CD45 (TIL) MicroBeads) sowie zur Isolation von tumor-infiltrierenden T-Zellen (CD4/CD8 (TIL) MicroBeads) genutzt. Beide Verfahren wurden nach dem gleichen Protokoll durchgeführt, dass im Folgenden näher erläutert wird.

Nach Gewinnung der Einzelzellsuspensionen und Bestimmung der Lebendzellzahl (Kap. 2.9.2) wurden die Zellen auf eine Konzentration von  $1,1 \times 10^8$  Zellen/ml in GM-Puffer eingestellt. Es erfolgte die Zugabe von Microbeads (CD45 (TIL); CD4/CD8 (TIL)) im Verhältnis von  $1/10$  zum Gesamtvolumen, wodurch die endgültige Konzentration  $1 \times 10^8$  Zellen/ml erreicht wurde. Nach gründlicher Resuspendierung wurden die Zellen 15min bei 4°C mit den Beads inkubiert. Durch Zugabe von 10ml GM-Puffer pro  $10^8$  Zellen und anschließender Zentrifugation (600g; 8min; 4°C) wurden ungebundene Beads aus der Zellsuspension entfernt. Die Vorbereitung der Separationssäulen (LS columns; Miltenyi) erfolgte durch Spülen mit 3ml GM-Puffer. Nach dem Waschschrift wurden die Zellen in 2ml GM-Puffer resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension milliliterweise auf die Säule aufgetragen. Die Säulen wurden dreimal mit 1ml GM-Puffer gewaschen und die Zellen mit 5ml GM-Puffer aus den Säulen eluiert. Abschließend erfolgte die Bestimmung der Lebendzellzahl (Kap. 2.9.2).

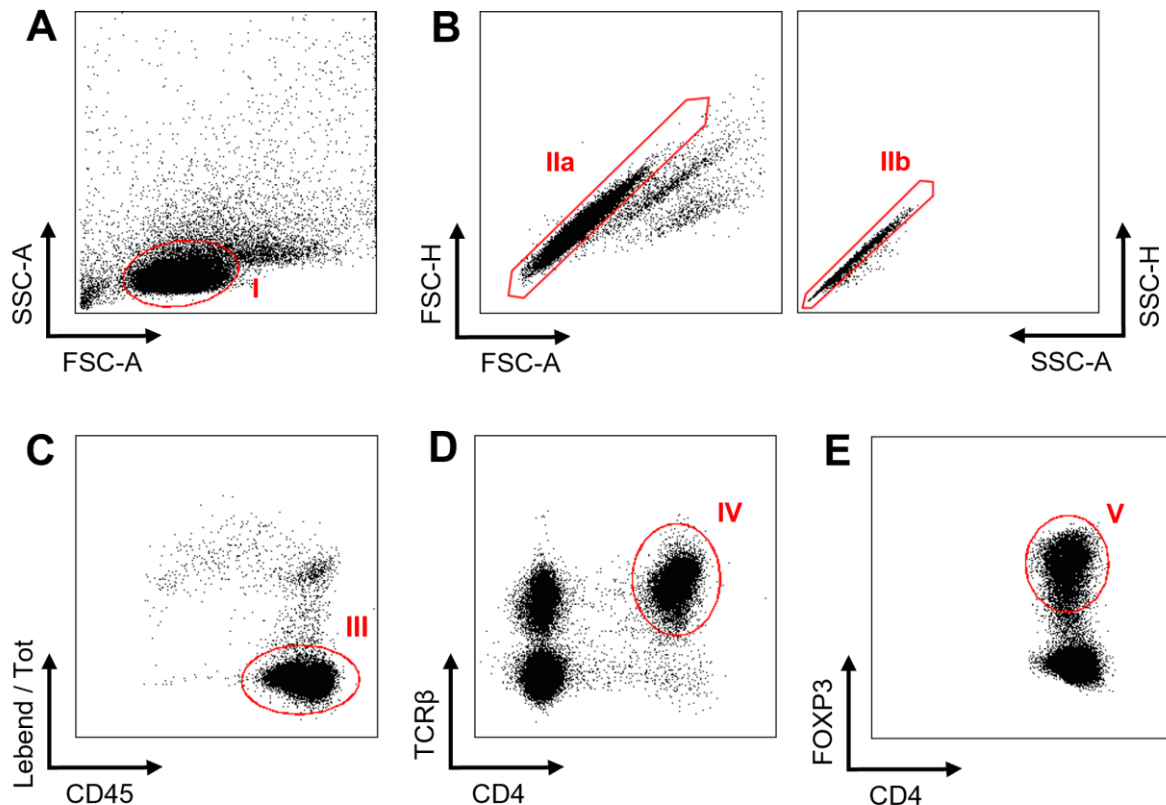
Zellsuspensionen die mittels CD45 (TIL) MicroBeads gewonnen wurden, wurden im Folgenden durchflusszytometrisch analysiert (Kap. 2.13). Zellsuspensionen die mit CD4/CD8 (TIL) Microbeads aufgereinigt wurden dienten zum einen zur durchflusszytometrischen Sortierung von konventionellen CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Kap. 2.13.2). Zum anderen wurden diese Zellsuspensionen zur Restimulation

verwendet um anschließend die Produktion von Zytokinen mittels durchflusszytometrischer Analyse zu bestimmen.

### 2.13 Durchflusszytometrische Analyse

Die Technik der durchflusszytometrischen Analyse wurde in dieser Arbeit zur Charakterisierung verschiedener Immunzellen in Einzelzellsuspensionen aus Tumorgeweben und lymphatischen Organen verwendet. Dabei wurde der Fokus auf die Bestimmung der Frequenz von Immunzellpopulationen sowie deren Charakterisierung anhand bestimmter Oberflächenmarker oder intrazellulärer Proteine wie beispielsweise Zytokine gelegt. Die Identifizierung von Immunzellpopulationen erfolgte anhand ihrer Größe und Granularität, sowie der Expression verschiedener Oberflächenproteine, welche für den jeweiligen Typ von Immunzellen spezifisch sind. Die Unterscheidung von Zellen anhand ihrer Größe und Granularität erfolgte durch Detektion der Lichtstreuung. Nach Einsaugen und Vereinzeln der Zellen durch eine dünne Kapillare passieren die Zellen nacheinander einen Laserstrahl, dessen emittiertes Licht durch die Zellen verschieden stark gestreut wird. Durch die Detektion des vorwärts gestreuten Lichts (FCS, *forward scatter*) kann die Größe der Zellen bestimmt werden, wobei die Stärke der Streuung mit der Zellgröße korreliert. Die Granularität der Zellen kann anhand der Detektion des seitwärts gestreuten Lichts (SSC, *side scatter*) beobachtet werden. Hier bedingt eine höhere Granularität ein stärkeres Seitwärtsstreulicht. Die jeweilige Streuung wird dabei durch bestimmte Sensoren detektiert, die im 180° (FSC) bzw. 90° Winkel (SSC) zum ausgesendeten Laserstrahl verortet sind. Größe und Granularität sind nützliche Parameter, um die Güte der durchflusszytometrischen Analyse von Einzelzellsuspensionen zu steigern. Immunzellen können dadurch von toten Zellen, Zellen von geringem Interesse (z. B. Tumorzellen) oder Verunreinigungen (Zelldebris) unterschieden werden. Auch unspezifisch gebundene fluoreszenzmarkierte Antikörper, die z. B. an Zelldebris gebunden sind, fließen dadurch nicht in die Analyse ein. Zusätzlich können anhand der FSC- und SSC-Parameter, Dubletten und Zellaggregate erkannt werden, wodurch eventuell auftretende falsch positive Signale aus der Analyse ausgeschlossen werden. Um sicherzustellen, dass nur lebende Zellen (zum Zeitpunkt der Färbung) analysiert werden, wurde bei allen Färbungen ein Lebend-Tot Farbstoff verwendet. Die eigentliche Unterscheidung verschiedener Immunzellen erfolgte nachfolgend anhand spezifischer Oberflächenproteine. Dazu werden die Oberflächenproteine mit Antikörpern markiert, die an einen Fluoreszenzfarbstoff (Fluorophor) gekoppelt sind. Diese unterscheiden sich in ihren Absorptions- und Emissionsspektren. Innerhalb des Durchflusszytometers passieren die Zellen verschiedene Laser, die jeweils Licht einer bestimmten Wellenlänge emittieren, wobei die Fluorophore abhängig von ihrem jeweiligen Absorptionsspektrum angeregt werden. Durch verschiedene Filter und Detektoren wird anschließend das Licht unterschiedlicher Wellenlänge detektiert, welches die Fluorophore emittieren, wenn sie wieder in ihren physikochemischen Grundzustand zurückkehren. Mithilfe einer Software werden die detektierten Lichtsignale optisch aufbereitet, wodurch die fluoreszenzmarkierten Antikörper

und damit auch die Zellen, die das entsprechende Oberflächenprotein exprimieren, identifiziert werden können. Dazu wurden die FACSDiva™ Software sowie die FlowJo™ Software verwendet. Die grundlegende Vorgehensweise (Gating-Strategie) zur Identifikation eines bestimmten Typs an Immunzellen wird in Abb. 9 anhand der Identifizierung von T<sub>reg</sub>-Zellen exemplarisch dargestellt. T<sub>reg</sub>-Zellen können anhand der Expression von CD45, TCRβ, CD4 und FOXP3 hinreichend identifiziert werden.



**Abbildung 9: Gating-Strategie zur Identifikation von regulatorischen T-Zellen.** Ab Abbildung B sind jeweils die Zellpopulation abgebildet, die sich im vorherigen Bild innerhalb der roten Markierung befindet. **A** Anhand der Größe (FSC) und Granularität (SSC) können Lymphozyten (I) von toten Zellen und Zelldebris sowie größeren Zellen oder Aggregaten unterschieden werden. **B** Anhand Größe und Granularität wird sichergestellt das folgend einzelne Zellen (IIb) analysiert werden, indem Dubletten aus der Analyse ausgeschlossen werden. **C** Identifizierung von lebenden CD45<sup>+</sup> Immunzellen (III). **D** Identifizierung von TCRβ<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen (IV). **E** Identifizierung von FOXP3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen.

Zusätzlich wurden in dieser Arbeit intrazelluläre Färbungen durchgeführt, wodurch die Expression von Transkriptionsfaktoren oder die Produktion von Zytokinen analysiert werden konnte, wobei vor der intrazellulären Färbung ein Fixierungs- und Permeabilisierungsschritt durchgeführt werden musste. Im folgenden Abschnitt werden die notwendigen Schritte zur Färbung von Oberflächenantigenen und intrazellulären Antigenen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern näher erläutert.

### 2.13.1 Färbung von Antigenen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern für die durchflusszytometrische Analyse von Zellsuspensionen

Vor der Färbung von Oberflächenantigenen wurde sichergestellt, dass die Zellsuspension keine sichtbaren Verunreinigungen, wie z. B. Gewebereste enthielt. Waren Verunreinigungen sichtbar, wurde die Zellsuspension nochmals filtriert (40µm Filter). Anschließend wurden maximal  $3 \times 10^6$  Zellen (in einem Maximalvolumen von 200µl) in eine 96-Well Spitzbodenplatte überführt. Es folgten 2 Waschschriffe, die aus Zentrifugation (2min; 600g), Ausklopfen des Überstandes auf Zellstoffpapier und Resuspendierung in 150µl GM-Puffer bestand (folgend vereinfacht als Waschschriff bezeichnet). Zur Färbung von Oberflächenantigenen wurden die Zellsuspensionen in 50µl einer Antikörperlösung (beinhaltet auch den Lebend-Tot Farbstoff) resuspendiert und für 30min bei 4°C inkubiert. Abschließend wurden die Zellen zweimal gewaschen (s. o.) um ungebundene Antikörper aus der Zellsuspension zu entfernen. War keine intrazelluläre Färbung nötig, wurden die Zellsuspensionen in GM-Puffer resuspendiert und in Rundbodenröhrchen überführt, um folgend durchflusszytometrisch analysiert zu werden. Für die Färbung von intrazellulären Antigenen musste vor der eigentlichen Färbung ein Fixierungsschriff durchgeführt werden. Hierfür wurde das FOXP3/Transkriptionsfaktor Färbepufferset (eBioscience™) verwendet. Nach dem letzten Waschschriff der Oberflächenfärbung wurde die Zellsuspension in 50µl Fixierungspuffer resuspendiert und für 30min bei 4°C inkubiert. Folgend wurden die Zellen zweimal mit 1xPermeabilisierungspuffer gewaschen. Für die intrazelluläre Färbung wurden die Zellsuspensionen in 1xPermeabilisierungspuffer, dem die entsprechenden fluoreszenzmarkierten Antikörper beigefügt wurden, resuspendiert und für 30min bei 4°C inkubiert. Es erfolgten anschließend ein Waschschriff mit 1xPermeabilisierungspuffer und zwei Waschschriffe mit GM-Puffer. Für die durchflusszytometrische Analyse wurden die Zellsuspensionen abschließend in geeignete Rundbodenröhrchen überführt.

### 2.13.2 Restimulation von Zellsuspensionen für die durchflusszytometrische Analyse der Zytokinproduktion durch T-Zellen

In dieser Arbeit wurde die durchflusszytometrische Analyse zum Nachweis der Zytokinproduktion von T-Zellen verwendet. Dafür wurden maximal  $3 \times 10^6$  Zellen in einer 48-Well Platte mit dem Calcium-Ionophor Ionomycin (1 µM), dem Protein-Kinase C Aktivator Phorbol-12-Myristat-13-acetat (PMA) (40 ng/ml) und dem Golgi-Apparat-Inhibitor Monensin (1x) für 4h bei 37°C kultiviert. Ionomycin und PMA dienen zur starken Aktivierung der Zellen. Der Einsatz von Monensin ist notwendig, da es die Sezernierung von Zytokinen aus der Zelle verhindert. Dadurch kommt es zu einer Akkumulation der Zytokine im Inneren der Zelle, wodurch deren durchflusszytometrische Analyse möglich gemacht wird.

### 2.13.3 Sortierung von konventionellen CD4<sup>+</sup> T-Zellen mittels FACS (*fluorescence-activated cell sorting*)

Neben Identifizierung und Charakterisierung, kann das Prinzip der fluoreszenzbasierten Markierung von Zellen auch zu deren Sortierung genutzt werden, wodurch hochreine Suspensionen eines bestimmten Zelltyps generiert werden können. Das Prinzip dieser Methode basiert auf der beschriebenen Identifizierung einer bestimmten Zellpopulation durch fluoreszenzmarkierte Antikörper (Kap. 2.13). Die Sortierung der gewünschten Zellpopulation ist durch die Vereinzelung des Flüssigkeitsstrahls möglich. Als Folge passieren einzelne Tropfen perlenschnurartig zwei Plattenkondensatoren. Ist eine Zelle mit den erforderlichen fluoreszenzmarkierten Antikörpern in dem Tropfen enthalten, wird dieser polarisiert und in eine bestimmte Richtung abgelenkt, wo er in einem Reaktionsgefäß aufgefangen wird. In dieser Arbeit wurde die FACS-Technik zur Isolierung von tumor-infiltrierenden konventionellen CD4<sup>+</sup> T-Zellen verwendet. Dazu wurde eine Oberflächenfärbung mit Antikörpern gegen TCR $\beta$  und CD4, sowie einem Lebend-Tot Farbstoff, durchgeführt (Kap. 2.13.1). Da für die weitere Prozessierung der Zellen (NGS Sequenzierung; Kap. 2.14), RNA von höchster Qualität erforderlich war, konnte keine intrazelluläre Färbung und damit auch keine Färbung von FOXP3 durchgeführt werden, da dies den Tod der Zellen und damit eine rapide Abnahme der RNA-Qualität zur Folge gehabt hätte. Die Unterscheidung von T<sub>konv</sub>-Zellen von T<sub>reg</sub>-Zellen erfolgte deswegen anhand der Expression von RFP (*red fluorescent protein*) (Kap. 2.8.2). Es wurden demnach lebende TCR $\beta$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> RFP<sup>+</sup> T-Zellen sortiert.

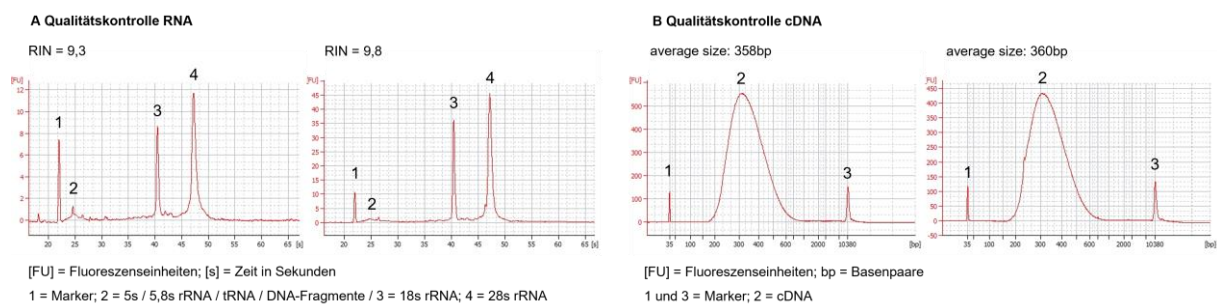
## 2.14 Next Generation Sequencing

Für die Durchführung des Next Generation Sequencing wurden tumor-infiltrierende T-Zellen mittels MACS-Aufreinigung angereichert (Kap. 2.12). Anschließend erfolgte eine Sortierung von konventionellen CD4<sup>+</sup> T-Zellen mittels FACS (Kap. 2.13). Für die RNA-Präparation wurden jeweils 5 Proben von wildtypischen *Csnk2b*<sup>fl/fl</sup>-Mäusen (WT) und *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup>-Mäuse (KO) verwendet. Nach Isolation der RNA mit dem RNeasy Micro Kit (Qiagen) wurden die Proben einer elektrophoretischen Qualitätskontrolle unterzogen. Dies erfolgte mit dem RNA 600 Pico Kit (Agilent) und dem Bioanalyzer 2100 (Agilent). Für die cDNA-Synthese wurde das SMART-Seqv4 Ultra Low Input RNA Kit (TaKaRa Clontech) verwendet. Die Präparation der cDNA-Bibliotheken erfolgte dem Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina). Die abschließende Qualitätskontrolle der cDNA (*complementary DNA*)-Bibliotheken wurde mit dem High Sensitivity DNA Kit (Clontech) auf dem Bioanalyzer 2100 (Agilent) durchgeführt. Tabelle 10 listet die Ausgangszellzahlen vor der RNA-Präparation, den RIN-Wert (*RNA Integrity Number*) nach RNA-Präparation und die durchschnittliche Größe der cDNA-Fragmente nach Präparation der cDNA-Bibliotheken (*cDNA libraries*) auf.

**Tabelle 10: Initiale Zellzahlen vor RNA-Präparation und RIN-Werte nach RNA-Präparation (NGS Sequencing)**

	Zellzahl	RIN-Wert	average size (cDNA)		Zellzahl	RIN-Werte (RNA)	average size (cDNA)
WT 2	18200	10	372bp	KO 1	10100	10	363bp
WT 3	10900	9,3	367bp	KO 3	30000	9,8	360bp
WT 4	10400	9,1	369bp	KO 5	43000	9,7	359bp
WT 7	10300	9,3	358bp	KO 6	20000	9,5	356bp
WT8	11800	10	364bp	KO 7	16300	10	370bp

Abb. 10 zeigt beispielhafte Gelelektrophogramme, anhand derer die Qualität der RNA und cDNA kontrolliert wurde.



**Abbildung 10: Qualitätskontrolle für NGS Sequencing.** **A** Qualitätskontrolle der RNA nach Isolation. **B** Qualitätskontrolle der cDNA Bibliotheken (*cDNA Libraries*)

Die Sequenzierung der Proben erfolgte am Institut für Molekulargenetik der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz durch die NGC Core Unit mit einem Illumina HiSeq2500. Dafür wurden folgende Kits und Materialien der Firma Illumina verwendet:

- HiSeq® Rapid SR SBS Kit v2“ (50 Zyklen)
- HiSeq® Rapid SR Cluster Kit v2
- Rapid SR v2 Flow cell

Die bioinformatische Auswertung erfolgte in Kooperation mit Herrn. (Forschungszentrum für Immuntherapie; Universitätsklinikum Mainz).

## 2.15 Korrelations- und Überlebenszeitanalysen im humanen malignen Melanom

Für die Korrelations- und Überlebenszeitanalysen wurde die internetgestützte Analyseplattform *TIMER2.0* (*Tumor Immune Estimation Resource*) verwendet.<sup>144,145</sup> *TIMER2.0* basiert auf der Datenbank des *Cancer Genome Atlas* des National Cancer Institute (NHI, USA).



**Genkorrelationsanalysen:**

TIMER2.0 ist unter der Internetadresse <http://timer.cistrome.org/> zu erreichen.

Die Graphen zu den Genkorrelationsanalysen wurden folgendermaßen erstellt:

Gene\_Corr: correlation between genes (Linksklick) → Interested gene (Eingabe von Genname 1) → Gene expression (Eingabe von Genname 2) → submit (Linksklick) → SKCM (Linksklick auf Spearman-Korrelationseffizient neben dem Namen der Krebsart)

Die statistischen Kenndaten zu den entsprechenden Graphen lauten.

Spearman-Korrelationskoeffizient  $\rho$  (cor): Rangkorrelationseffizient, welcher die Beziehung zwischen zwei Variablen statistisch erfasst. Dabei reicht die Skala von -1 (perfekte negative Korrelation) bis 1 (perfekte positive Korrelation). Die Ausprägungen der Korrelationen wurden anhand des Spearman-Korrelationseffizienten folgendermaßen eingeteilt:

- $\rho$  (cor)  $> 0,8$  → sehr starke Korrelation
- $\rho$  (cor)  $0,8 - 0,7$  → starke Korrelation
- $\rho$  (cor)  $0,7 - 0,6$  → ausgeprägte Korrelation
- $\rho$  (cor)  $0,6 - 0,5$  → erhöhte Korrelation
- $\rho$  (cor)  $< 0,5$  → keine relevante Korrelation

p-Wert: Der p-Wert gibt die statistische Signifikanz der beobachteten Korrelation an. Ein p-Wert von  $\leq 0,05$  gibt an, dass der Korrelationseffizient von 0 abweicht und die Korrelation als statistisch signifikant ist.

**Überlebenszeitanalysen**

Die Überlebenszeitanalysen wurden folgendermaßen erstellt:

Gene\_Outcome → Genes expression (Eingabe von Genname) → submit (Linksklick) → SKCM (Linksklick auf Z-Wert neben dem Namen der Krebsart)

Die statistischen Kenndaten auf Basis des Cox-Regressionsmodell zu den entsprechenden Graphen lauten.

Hazard-Ratio (HR): Quotient aus den Hazardfunktionen ( $h_x(t)$ ) der betrachteten Gruppen 1 und 2.

$$\text{Hazard - Ratio} = \frac{h_2(t)}{h_1(t)}$$

(in dieser Arbeit: Gruppe 1: niedrige Genexpression; Gruppe 2: hohe Genexpression). Gibt in diesem Zusammenhang das Maß an wie groß das Risiko von Gruppe 2 (niedrige Gen-Expression) gegenüber Gruppe 1 (hohe Genexpression) ist, zum einem Zeitpunkt  $t$  am malignen Melanom zu versterben.<sup>146</sup>

- $HR > 1 \rightarrow$  höheres Risiko in Gruppe 2
- $HR < 1 \rightarrow$  niedrigeres Risiko in Gruppe 2

p-Wert des Log-rank-Tests (statistische Signifikanz  $p$ ): Gibt an, ob ein signifikant unterschiedlicher Überlebenszeitraum zwischen beiden Gruppen besteht. Ein  $p$ -Wert  $\leq 0,05$  wird als signifikant angesehen.

## 2.16 Erstellung von Graphen und Statistik

Die Erstellung der Punkt-, Balken und Liniendiagramme sowie die statistische Auswertung aller experimentellen Daten erfolgte mit der Statistiksoftware Prism 8.0 (GraphPad, La Jolla, CA, USA) Die Signifikanz von statistischen Unterschieden wurde durch einen ungepaarten zweiseitigen Student T-Test überprüft. Ermittelte Signifikanzwerte ( $p$ -Werte) wurden dabei in folgende Kategorien eingeordnet:

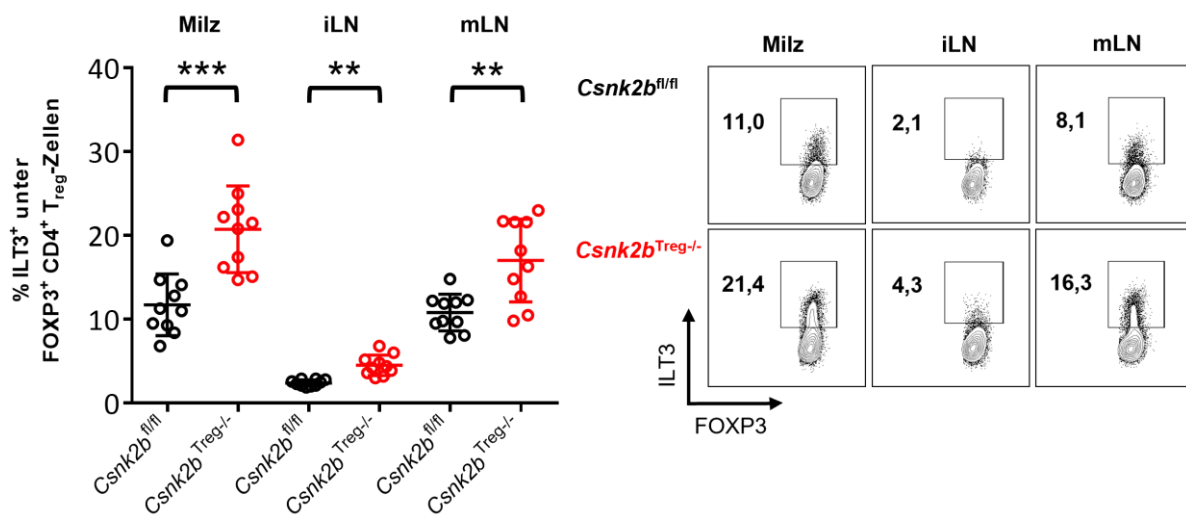
- $p \geq 0,05 \rightarrow$  nicht signifikant (n.s.)
- $p < 0,05 \rightarrow$  signifikant (\*)
- $p < 0,01 \rightarrow$  stark signifikant (\*\*)
- $p < 0,001 \rightarrow$  sehr stark signifikant (\*\*\*)

Im Fließtext wird ab einem  $p$ -Wert  $< 0,05$  lediglich von einem signifikanten Unterschied gesprochen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Die Proteinkinase CK2 kontrolliert die Expression von ILT3 auf FOXP3-exprimierenden regulatorischen T-Zellen

Im Jahr 2015 konnten Ulges et al. zeigen, dass transgene *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäuse mit einer spezifischen genetischen Deletion der Proteinkinase CK2 (CK2) in regulatorischen T-Zellen (T<sub>reg</sub>-Zellen) spontane Entzündungsreaktion in der Lunge entwickeln.<sup>115</sup> Verantwortlich dafür zeigte sich eine massiv gesteigerte Produktion von Zytokinen wie Interleukin- (IL-) 4, IL-5 und IL-13, deren Produktion mit Typ-2-T-Helferzellen (T<sub>H</sub>2-Zellen) assoziiert wird.<sup>115,147</sup> Im Laufe der Studie konnten die Autoren belegen, dass die genetische Deletion der CK2 zu einer gesteigerten Expression des Oberflächenrezeptors ILT3 (*Immunoglobulin-like transcript 3*) auf FOXP3- (*Forkhead Box P3*) exprimierenden T<sub>reg</sub>-Zellen führt und ILT3-exprimierende T<sub>reg</sub>-Zellen (ILT3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen) nicht in der Lage sind, die Differenzierung von T<sub>H</sub>2-Zellen und die damit verbundene Produktion von T<sub>H</sub>2-assoziierten Proteinen zu kontrollieren.<sup>115</sup> Zur Verifizierung der oben genannten Studie sollte zunächst die Expression von ILT3 auf T<sub>reg</sub>-Zellen in verschiedenen sekundär lymphatischen Organen von wildtypischen *Csnk2b*<sup>fl/fl</sup> und CK2-defizienten *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen untersucht werden. Dazu wurden Einzelzellsuspensionen gewonnen und diese durchflusszytometrisch hinsichtlich der Frequenz an ILT3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen analysiert (Abb. 11).



**Abbildung 11: Die Proteinkinase CK2 kontrolliert die Expression von ILT3 auf T<sub>reg</sub>-Zellen.** Aus Milzen, inguinalen Lymphknoten (iLN) und mesenterialen Lymphknoten (mLN) wurden Einzelzellsuspensionen gewonnen (Kap. 2.11). Diese wurden, wie in Kap. 2.13 beschrieben, mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen die Antigene TCR $\beta$ , CD4, ILT3 und FOXP3 (intrazellulär) gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Das Punktdiagramm mit Mittelwert  $\bar{x}$  und Standardabweichung *SD* (*standard deviation*) illustriert den prozentualen Anteil an ILT3<sup>+</sup> unter TCR $\beta$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen in den jeweiligen sekundär lymphatischen Organen aus zwei unabhängigen Experimenten (Milz (n=10): *Csnk2b*<sup>fl/fl</sup> = 11,73  $\pm$  3,67 %; *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> = 20,74  $\pm$  5,16 %; iLN (n=10): *Csnk2b*<sup>fl/fl</sup> = 2,41  $\pm$  0,38 %; *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> = 4,51  $\pm$  1,21 %; mLN (n=10): *Csnk2b*<sup>fl/fl</sup> = 10,81  $\pm$  2,18 %; *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> = 17,02  $\pm$  4,93 %; \*\*\*p $\leq$ 0,001, \*\*p $\leq$ 0,01). Jeder Datenpunkt repräsentiert die Daten einer einzelnen Maus. Nebenstehend sind für beide Maustypen repräsentative Abbildungen der durchflusszytometrischen Analyse mit der entsprechenden Prozentzahl der Zielpopulation abgebildet.

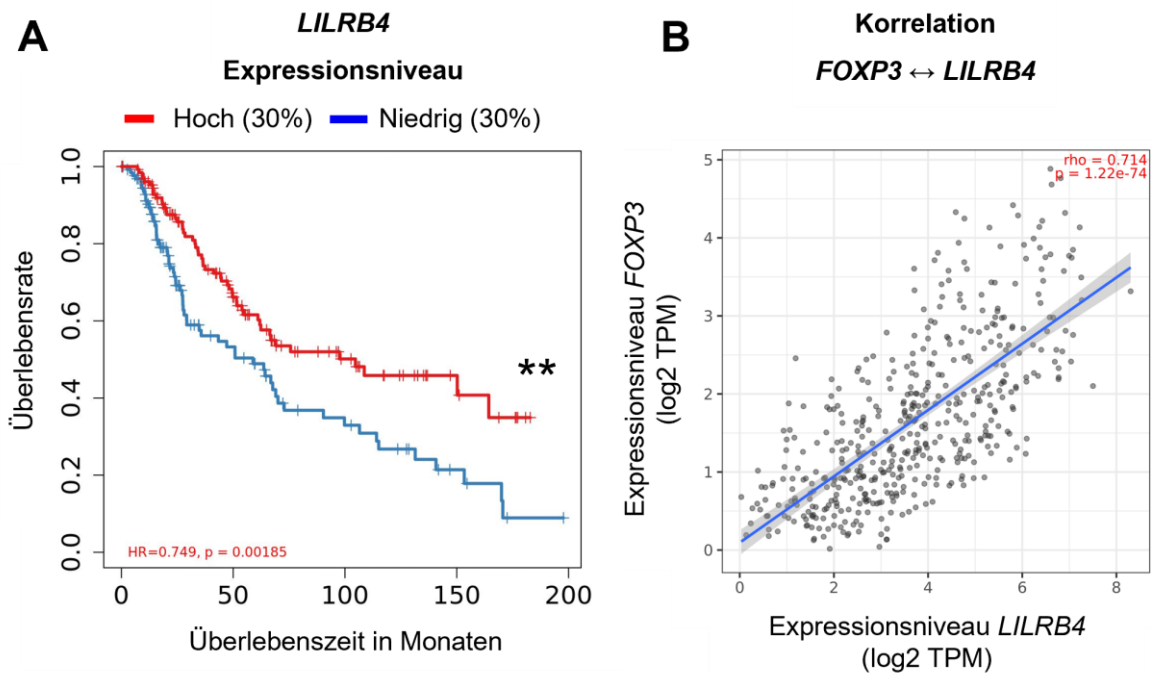
Die Bestimmung der Frequenz an  $ILT3^+$   $T_{reg}$ -Zellen zeigt, dass die Deletion der CK2 zu einer gesteigerten Expression von ILT3 auf  $T_{reg}$ -Zellen führt (Abb. 11). Unabhängig vom untersuchten Kompartiment konnte in  $Csnk2b^{Treg-/-}$  Mäusen im Vergleich zu wildtypischen  $Csnk2b^{fl/fl}$  Mäusen eine signifikant erhöhte Frequenz an  $ILT3^+$   $T_{reg}$ -Zellen detektiert werden.

$T_{reg}$ -Zellen tragen durch verschiedene immunsuppressive Mechanismen zur Immunevasion von Tumoren bei (siehe Kap. 1.3.5).<sup>87</sup> Aufgrund der Erkenntnis, dass CK2-defiziente  $T_{reg}$ -Zellen bzw.  $ILT3^+$   $T_{reg}$ -Zellen verminderte immunsuppressive Fähigkeiten aufweisen, stellte sich die Frage, ob diese möglicherweise einen positiven Effekt auf die anti-tumorale Immunantwort haben. Um diese Fragestellung zu erörtern, sollte zunächst überprüft werden, ob es Hinweise für die Relevanz von  $ILT3^+$   $T_{reg}$ -Zellen in humanen Tumorbiopsien gibt.

### 3.2 Die Expression von *LILRB4* in humanen Melanombiopsien korreliert mit der *FOXP3*-Expression und einer höheren Überlebensrate

Ob ILT3 im humanen System möglicherweise auf tumor-infiltrierenden  $T_{reg}$ -Zellen (ti $T_{reg}$ -Zellen) exprimiert wird und somit einen Einfluss auf deren Eigenschaften im Kontext der Tumorummunologie besitzen könnte, wurde anhand der Expression der charakteristischen Gene *LILRB4* (codiert für ILT3) und *FOXP3* in humanen Tumorbiopsien untersucht. *FOXP3* gilt als determinierender Transkriptionsfaktor von  $T_{reg}$ -Zellen und die Expression des codierenden Genes (*FOXP3*) wurde daher als Surrogat-Marker für das Ausmaß der Infiltration von  $T_{reg}$ -Zellen angesehen.<sup>85,84</sup> Die Expression von *LILRB4* wurde in der Überlebenszeitanalyse als Surrogat-Marker für die ILT3-Expression im gesamten Gewebe und in der Korrelationsanalyse mit der *FOXP3*-Expression als Surrogat-Marker für die ILT3-Expression auf  $T_{reg}$ -Zellen verwendet. Zunächst wurde analysiert, ob eine starke *LILRB4*-Expression einen Einfluss auf die Überlebensrate im humanen Melanom besitzt. Darüber hinaus sollten durch eine Korrelationsanalyse der Expressionsstärke der genannten Gene Hinweise generiert werden, ob im humanen malignen Melanom ti $T_{reg}$ -Zellen ILT3 exprimieren.

Dazu wurde die internetgestützte Analyseplattform TIMER2.0 (*Tumor Immune Estimation Resource*) verwendet (Kap. 2.15).



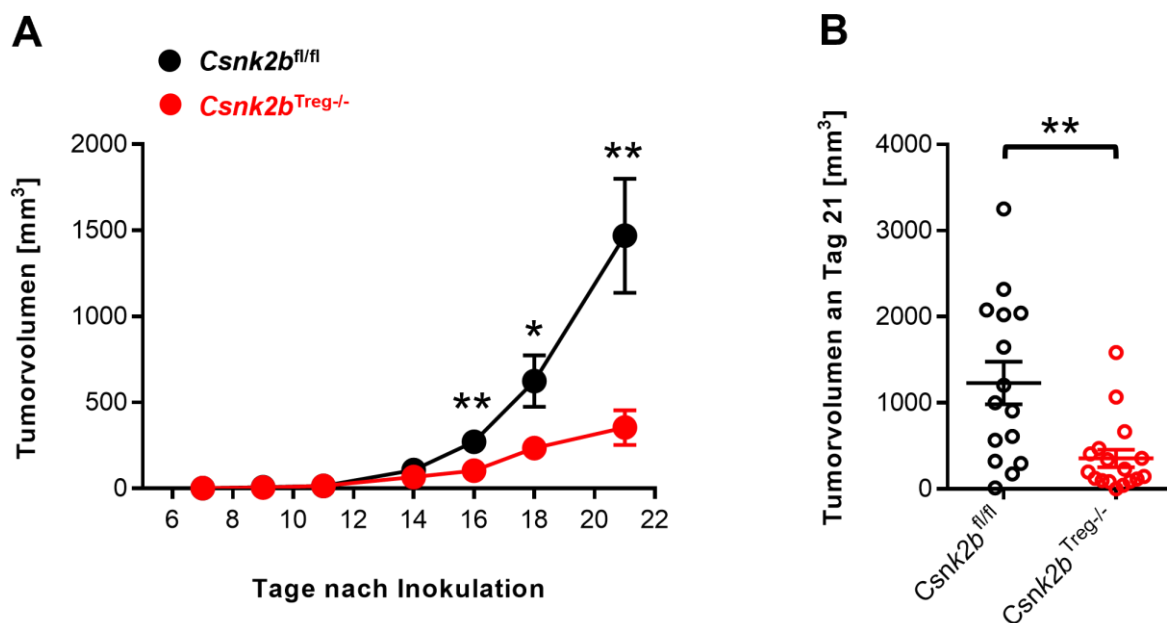
**Abbildung 12: Im humanen malignen Melanom korreliert die *LILRB4*-Expression mit einer längeren Überlebenszeit und der *FOXP3*-Expression.** Die Daten wurden mit der internetgestützten Analyseplattform TIMER2.0 erhoben. **A** Die Kaplan-Meier-Kurve zeigt den Zusammenhang der gesamten *LILRB4*-Expression mit der Überlebensrate im humanen malignen Melanom (SKCM = *skin cutaneous melanoma*). Die Daten basieren auf Tumorbiopsien von 471 Patienten, wobei in dieser Grafik die Überlebensrate von jeweils 30 % der Patienten mit der höchsten (rot) bzw. niedrigsten (blau) *LILRB4*-Expression verglichen wird. Die wichtigsten statistischen Kenndaten auf Basis des Cox-Regressionsmodells lauten: HR (Hazard ratio) = 0,75; statistische Signifikanz  $**p \leq 0,01$  **B** Das Streudiagramm visualisiert die Korrelationsanalyse zwischen der *LILRB4*- und *FOXP3*-Expression in humanen malignen Melanombiopsien (n = 471). Die statistischen Kenndaten lauten:  $\rho$  (Spearman-Korrelationskoeffizient) = 0,714; statistische Signifikanz  $***p \leq 0,001$

Für die Analyse der Überlebenszeitdaten wurden 471 Patienten, anhand des *LILRB4*-Expressionsniveaus in den Tumoren, in zwei Gruppen eingeteilt (Abb. 12A). Dabei wurden 30 % der Patienten mit der höchsten (rote Kurve) bzw. niedrigsten (blaue Kurve) *LILRB4*-Expression berücksichtigt. Die Analyse zeigt deutlich, dass beim humanen malignen Melanom eine hohe *LILRB4*-Expression mit einer signifikant höheren Überlebensrate einhergeht. Dabei ist zu erwähnen, dass in dieser Analyse die *LILRB4*-Expression im gesamten Tumorgewebe quantifiziert wurde und daraus keine Rückschlüsse gezogen werden können, welche Zellen *LILRB4* exprimieren und damit zum positiven Effekt auf die Überlebensrate beitragen. Diesbezüglich konnte in einer Korrelationsanalyse ein starker Zusammenhang zwischen der *FOXP3*- und *LILRB4*-Expression im humanen malignen Melanom beobachtet werden (Abb. 12B). Diese Korrelation deutet darauf hin, dass *LILRB4* von  $\text{tiT}_{\text{reg}}$ -Zellen exprimiert wird. Um diese Hypothese zu untermauern, wurden zusätzliche Korrelationsanalysen zwischen der Expression von *LILRB4* bzw. *FOXP3* mit der *CD3E*-Expression durchgeführt, da *CD3E* einen hochspezifischen Marker für T-Zellen darstellt.<sup>148</sup> Beide Analysen ergaben eine sehr starke Korrelation ( $LILRB4 \leftrightarrow CD3E$   $\text{cor} = 0,82$ ;  $***p \leq 0,001$ ;  $FOXP3 \leftrightarrow CD3E$   $\text{cor} = 0,84$ ;  $***p \leq 0,001$ ). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass im humanen malignen Melanom eine erhöhte *ILT3*-Expression einen potenziell anti-tumoralen Effekt besitzt. Zudem lässt die positive Korrelation der

Genexpression von *LILRB4* und *FOXP3* die Hypothese zu, dass ILT3 von  $\text{tiT}_{\text{reg}}$ -Zellen exprimiert wird und  $\text{ILT3}^+$   $\text{T}_{\text{reg}}$ -Zellen einen positiven Einfluss auf eine anti-tumorale Immunantwort im humanen malignen Melanom haben.

### 3.3 *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäuse zeigen im B16F10 Melanommodell ein reduziertes Tumorwachstum

Um die Erkenntnisse aus Kapitel 3.2 in einem präklinischen Mausmodell zu verifizieren, wurden *in vivo* Tumorexperimente in wildtypischen *Csnk2b*<sup>fl/fl</sup> Kontrollmäusen und CK2-defizienten *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen durchgeführt. Aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse aus Melanombiopsien wurde hierfür das präklinische B16F10 Melanommodell gewählt (Kap. 2.10), das als klassisches murines Melanommodell in der immunologischen Forschung weit verbreitet und etabliert ist. Dazu wurden den Mäusen  $2 \times 10^5$  B16F10 Zellen *subcutan* (s.c.) in die rechte Flanke injiziert und das Tumorwachstum über 21 Tage kontrolliert. Der Verlauf des Tumorwachstums ist in Abb. 13 dargestellt.

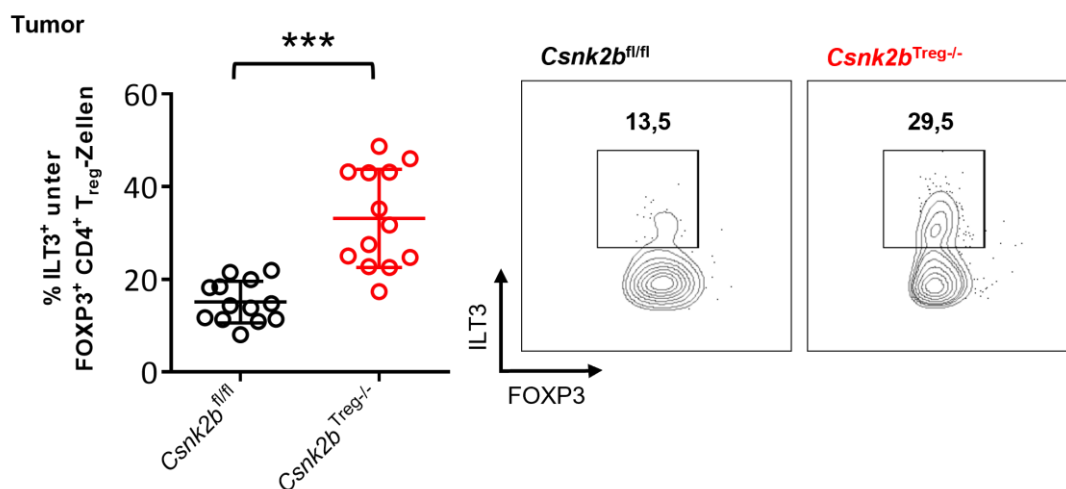


**Abbildung 13:** *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäuse zeigen im B16F10 Melanommodell ein stark verringertes Tumorwachstum.  $2 \times 10^5$  B16F10 Melanomzellen wurden s.c. in die rechte Flanke von *Csnk2b*<sup>fl/fl</sup> Kontrollmäusen (schwarz) und *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen (rot) injiziert. Ab Tag 7 nach der Inokulation wurde die Tumorgröße alle zwei Tage mit einer Schieblehre in zwei Dimensionen bestimmt. Das Tumorvolumen wurde mit nachfolgender Formel berechnet:  $\text{Breite}^2 \times \text{Länge} \times 0,5$ . Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mit einem zweiseitigen studentischen T-Test. (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ). **A** Verlauf des Tumorwachstums (mit Mittelwert  $\bar{x}$  und Standardfehler,  $SEM = \text{standard error of the mean}$ ) aus Daten zweier unabhängiger Experimente ( $n(\text{Csnk2b}^{\text{fl/fl}}) = 15$ ;  $n(\text{Csnk2b}^{\text{Treg-/-}}) = 17$ ). **B** Punktdiagramm mit  $\bar{x} \pm SEM$  illustriert das mittlere Tumorvolumen an Tag 21 ( $\text{Csnk2b}^{\text{fl/fl}} = 1230 \pm 246 \text{ mm}^3$ ;  $\text{Csnk2b}^{\text{Treg-/-}} = 354 \pm 100 \text{ mm}^3$ ) derselben zwei Experimente wie in A. Jeder Datenpunkt repräsentiert dabei die Daten einer einzelnen Maus.

Die Analyse des B16F10 Melanommodells zeigt, dass das Tumorwachstum in *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen gegenüber wildtypischen Kontrollmäusen signifikant reduziert ist. Einhergehend mit dem verlangsamten Tumorwachstum ist in Abb. 13B zu erkennen, dass an Tag 21 die durchschnittliche Tumorgöße bei *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen ( $354 \pm 100 \text{ mm}^3$ ) gegenüber *Csnk2b*<sup>fl/fl</sup> Kontrollmäusen ( $1230 \pm 246 \text{ mm}^3$ ) um den Faktor 3 verringert ist. Als nächstes sollte überprüft werden, ob die spezifische Depletion der CK2 in T<sub>reg</sub>-Zellen einen Einfluss auf die Expression von ILT3 auf tiT<sub>reg</sub>-Zellen besitzt.

### 3.4 Die Frequenz an ILT3-exprimierenden regulatorischen T-Zellen ist in Tumoren von *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen erhöht

Die in Kapitel 3.3 beschriebenen Differenzen im Tumorwachstum und damit der Tumorgöße können aufgrund der konditionellen Deletion der CK2 $\beta$ -Untereinheit in FOXP3-exprimierenden Zellen allein auf Veränderungen von Funktionen oder Eigenschaften von T<sub>reg</sub>-Zellen zurückgeführt werden. Wie in Kap. 3.1 beschrieben, ist dabei die erhöhte Expression von ILT3 eine der markantesten Folgen der T<sub>reg</sub>-spezifischen CK2-Deletion. Zusätzlich konnte im humanen malignen Melanom ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten ILT3-Expression in Tumorbiopsien und einer höheren Überlebensrate hergestellt werden (Abb. 12A). Dabei deutet die positive Korrelation der Genexpression von *FOXP3* (Marker für T<sub>reg</sub>-Zellen) und *LILRB4* (codierend für ILT3) darauf hin, dass im humanen System ILT3 von tiT<sub>reg</sub>-Zellen exprimiert wird (Abb. 12B). Um zu überprüfen, ob dies im präklinischen B16F10 Melanommodell ebenfalls zu beobachten ist, wurde die Frequenz an ILT3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen in den Tumoren von wildtypischen *Csnk2b*<sup>fl/fl</sup> und *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen durchflusszytometrisch bestimmt (Abb. 14).



**Abbildung 14:** Die Frequenz an ILT3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen ist in Tumoren von *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen erhöht. Beschreibung auf der folgenden Seite.

Die Tumore wurden an Tag 21 isoliert, enzymatisch verdaut (Kap. 2.11.1) und die tumor-infiltrierenden Immunzellen mittels CD45 TIL Beads angereichert (siehe Kap. 2.12). Die resultierenden Einzelzellsuspensionen wurden wie in Kap. 2.13 beschrieben mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen die Antigene TCR $\beta$ , CD4, ILT3 und FOXP3 (intrazellulär) gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Das Punktdiagramm mit Mittelwert  $\bar{x} \pm SD$  illustriert den prozentualen Anteil an ILT3<sup>+</sup> unter TCR $\beta$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen in den Tumoren aus zwei unabhängigen Experimenten (*Csnk2b*<sup>fl/fl</sup> (n = 13) = 15,08  $\pm$  4,48 %; *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> (n = 13) = 33,12  $\pm$  10,62 %; \*\*\*p $\leq$ 0,001). Jeder Datenpunkt repräsentiert die Daten einer einzelnen Maus. Nebenstehend sind für beide Maustypen repräsentative Abbildungen der durchflusszytometrischen Analyse mit der entsprechenden Prozentzahl der Zielpopulation abgebildet

Die Analyse zeigt, dass die Frequenz an ILT3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen in Tumoren von *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen gegenüber Tumoren von wildtypischen *Csnk2b*<sup>fl/fl</sup> Mäusen signifikant erhöht ist. Dabei konnte im Vergleich zu wildtypischen Mäusen die 2-fache Frequenz an ILT3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen in den Tumoren von *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen beobachtet werden. In Kombination mit dem beobachteten verringerten Tumorwachstum in *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen deutet diese Beobachtung darauf hin, dass im murinen Melanommodell eine hohe Frequenz an ILT3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen einen positiven Einfluss auf den Verlauf des Tumorwachstums besitzt.

Im Vergleich zu sekundären lymphatischen Organen oder Geweben ist die Frequenz an ILT3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen in Tumoren vergleichsweise hoch (vergleiche Abb. 11 und Abb. 14). Unter der Annahme, dass die Frequenz eines Zelltyps mit dessen Relevanz für gewebspezifische Immunreaktionen einhergeht, unterstreicht die hohe Frequenz an ILT3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen die potenzielle Bedeutung dieses Zelltyps für die intratumorale Immunantwort. Aufgrund dessen sollten im Folgenden die Auswirkungen der T<sub>reg</sub>-spezifischen CK2-Deletion und die damit verbundene hohe Frequenz an ILT3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen auf die Immunantwort gegenüber dem Tumor untersucht werden. Dabei lag der Fokus der Analyse auf tumor-infiltrierenden T-Zellen. Durch ihre zytotoxischen (hauptsächlich CD8<sup>+</sup> T-Zellen) und immunkoordinativen Eigenschaften (vornehmlich konventionelle CD4<sup>+</sup> FOXP3<sup>-</sup> T-Zellen) sind sie von zentraler Bedeutung für die Bekämpfung von Tumoren durch das Immunsystem.<sup>149,41</sup> Zusätzlich sind sie vorrangige Ziele von immunsuppressiven T<sub>reg</sub>-Zellen.<sup>81</sup>

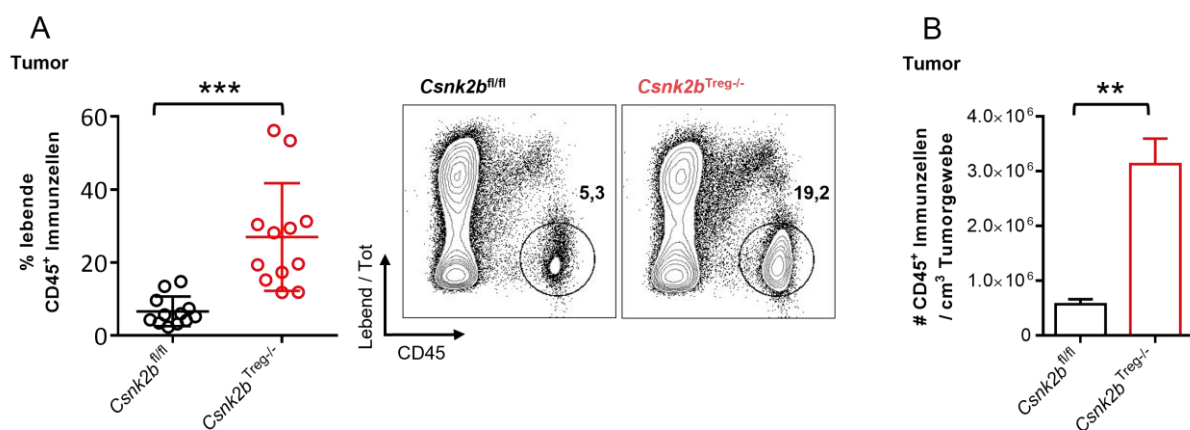
### 3.5 In Tumoren von *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen ist eine verstärkte Migration von Immunzellen zu beobachten

Wie in Kapitel 1.3.5 beschrieben, besitzen T<sub>reg</sub>-Zellen immunsuppressive Eigenschaften und werden im Allgemeinen mit einem stärkeren Tumorwachstum in Verbindung gebracht.<sup>7</sup> Die Ergebnisse aus den vorherigen Kapiteln weisen jedoch darauf hin, dass CK2-defiziente T<sub>reg</sub>-Zellen bzw. ILT3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen in gewissem Ausmaß ihre tumor-protektiven Eigenschaften verloren haben und damit zu einer effektiven Immunantwort gegenüber Tumoren beitragen können. Um den Einfluss der CK2-Defizienz in T<sub>reg</sub>-Zellen und der damit verbundenen erhöhten Frequenz an ILT3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen auf die Immunantwort gegenüber dem Tumor besser zu verstehen, wurden im Folgenden die Zusammensetzung der Immunzellpopulation und die Eigenschaften von Immunzellen in den Tumoren wildtypischer



*Csnk2b*<sup>fl/fl</sup>-Mäuse und *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup>-Mäuse durchflusszytometrisch analysiert, die in der Tumorimmunologie von besonderer Bedeutung sind.

Um die Frequenz an tumor-infiltrierenden Immunzellen zu bestimmen, wurde das Tumorgewebe enzymatisch verdaut und die resultierende Einzelzellsuspension nach Färbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern durchflusszytometrisch analysiert (Abschnitt 2.10). Hierbei wurde neben einem Lebend-Tot-Farbstoff zum Ausschluss von toten Zellen der Pan-Lymphozyten-Marker CD45 verwendet.<sup>150</sup> Zur Bestimmung der absoluten Zahl an Immunzellen wurden diese mittels magnetischer Zellisolation (MACS; *magnetic cell separation*) aus den Einzelzellsuspensionen isoliert und die Zellzahl mikroskopisch bestimmt. Anhand der durchflusszytometrischen Daten konnte anschließend die absolute Zahl an lebenden CD45<sup>+</sup> Immunzellen innerhalb der Einzelzellsuspension bestimmt werden. Aufgrund der Unterschiede in der TumorgroÙe zwischen wildtypischen und *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup>-Mäusen, wurde die Zellzahl von lebenden CD45<sup>+</sup> Immunzellen in Relation zum Tumolvolumen gesetzt.



**Abbildung 15: Die erhöhte Frequenz an CD45<sup>+</sup> Immunzellen in Tumoren von *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen deutet auf eine verstärkte anti-Tumorimmunantwort hin.** Die Tumore wurden an Tag 21 isoliert, enzymatisch verdaut (siehe Kap. 2.11.1) und die resultierenden Einzelzellsuspensionen wurden wie in Kap. 2.13 mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen das Antigen CD45 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. **A** Das Punktdiagramm mit  $\bar{x} \pm SD$  illustriert den prozentualen Anteil an lebenden CD45<sup>+</sup> Immunzellen im Tumorgewebe aus zwei unabhängigen Experimenten (*Csnk2b*<sup>fl/fl</sup> (n = 12) = 6,63 ± 4,03 %; *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> (n = 12) = 27,01 ± 14,75 %; \*\*\*p < 0,001). Jeder Datenpunkt repräsentiert die Daten einer einzelnen Maus. Nebenstehend sind für beide Maustypen repräsentative Abbildungen der durchflusszytometrischen Analyse mit der entsprechenden Prozentzahl der Zielpopulation abgebildet. **B** Das Balkendiagramm mit SEM illustriert die absolute Zahl an lebenden CD45<sup>+</sup> Immunzellen pro cm<sup>3</sup> Tumorgewebe aus einem repräsentativen Experiment (*Csnk2b*<sup>fl/fl</sup> (n = 7) = 5,7x10<sup>5</sup> ± 9,0x10<sup>4</sup>; *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> (n = 7) = 2,5x10<sup>6</sup> ± 4,7x10<sup>5</sup>; \*\*p < 0,01).

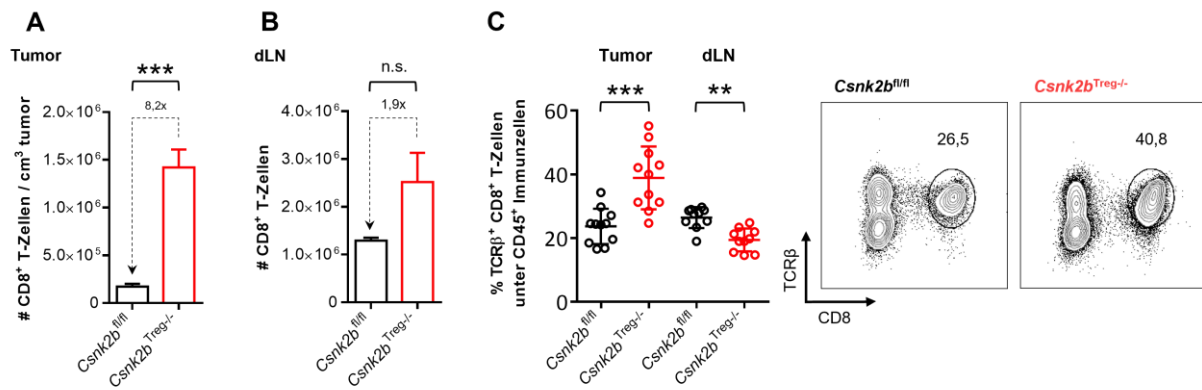
Sowohl die Frequenz (Abb. 15A) als auch die absolute Zellzahl von CD45<sup>+</sup> Immunzellen bezogen auf das gleiche Tumolvolumen (Abb. 15B) sind in Tumoren von *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu Tumoren aus wildtypischen Mäusen um den Faktor 4 erhöht. Da keine Unterschiede in der Frequenz an CD45<sup>+</sup> Immunzellen in den drainierenden Lymphknoten zwischen beiden Maustypen besteht (Daten nicht gezeigt), kann von einer verstärkten Migration von CD45<sup>+</sup> Immunzellen in das Tumorgewebe von

*Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen ausgegangen werden. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass die T<sub>reg</sub>-Zell-spezifische Depletion der CK2 zu einer massiv gesteigerten Immunreaktion gegenüber Tumoren führt.

### 3.6 In Tumoren von *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen ist eine verstärkte Migration von CD8<sup>+</sup> T-Zellen und konventionellen CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu beobachten

Die in Abb. 15 gezeigten Daten werfen die Frage auf, welcher Typ von Immunzellen verstärkt in das Tumorgewebe einwandert. T-Zellen nehmen im Kontext der Tumorimmunologie eine herausragende Rolle ein (siehe Kap. 1.3). Insbesondere CD8<sup>+</sup> T-Zellen (*cytotoxic lymphocytes*, CTL) sind durch ihre direkten zytotoxischen Eigenschaften gegenüber Tumorzellen von zentraler Bedeutung für die immunologische Tumorabwehr.<sup>151</sup> Bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen muss zwischen FOXP3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen und tumorinfiltrierenden konventionellen CD4<sup>+</sup> FOXP3<sup>-</sup> T-Helferzellen (T<sub>konv</sub>-Zellen) differenziert werden. Die Bedeutung von T<sub>reg</sub>-Zellen in der Tumorimmunologie wurde bereits ausführlich in Kap. 1.3.5 beschrieben. CD4<sup>+</sup> T<sub>konv</sub>-Zellen nehmen eine kritische Rolle in der Bekämpfung von Tumoren durch das Immunsystem ein. Sie besitzen immunkoordinative Eigenschaften, durch die sie die Rekrutierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen, aber auch von Zellen des angeborenen Immunsystems in das Tumorgewebe fördern.<sup>152</sup> Darüber hinaus unterstützen T<sub>konv</sub>-Zellen direkt und indirekt CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei der Bekämpfung von Tumorzellen.<sup>153</sup>

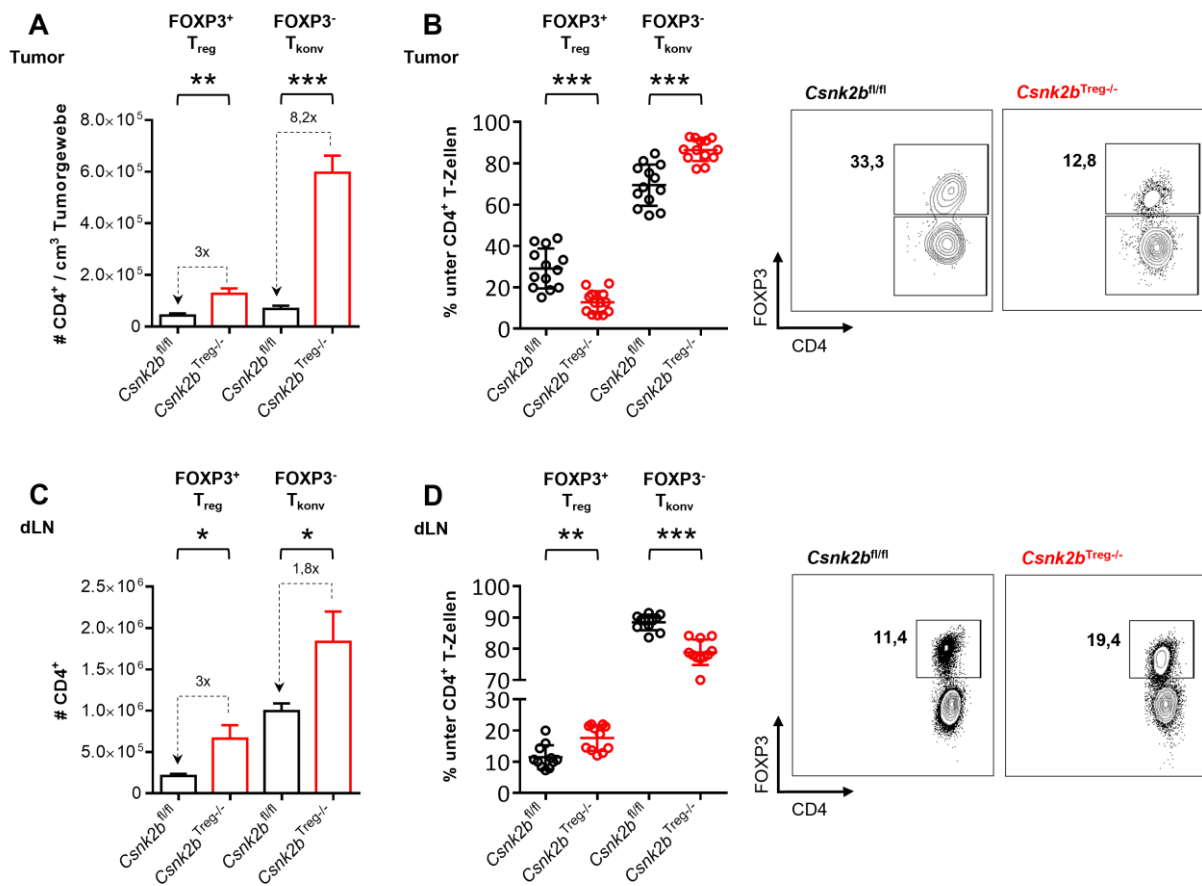
Um zu analysieren, ob die T<sub>reg</sub>-spezifische Depletion der CK2 einen Einfluss auf die Zusammensetzung der T-Zell-Population im Tumorgewebe hat, wurde die absolute Zahl und die Frequenz von CD8<sup>+</sup> T-Zellen, FOXP3<sup>-</sup> T<sub>konv</sub>-Zellen und FOXP3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen im Tumorgewebe bestimmt. Dazu wurden Immunzellen per MACS aus Einzelzellsuspensionen von Tumorgeweben angereinigt und diese durchflusszytometrisch analysiert. Als spezifische Oberflächenmarker dienten dabei TCRβ als Pan-T-Zell-Marker (für α/β-T-Zellen).<sup>154</sup> CD4 und CD8 dienten als Differenzierungsmerkmal für CD4<sup>+</sup> T-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Zur Unterscheidung von T<sub>konv</sub>-Zellen und T<sub>reg</sub>-Zellen wurde zusätzlich eine intrazelluläre Färbung gegen FOXP3 durchgeführt. Aufgrund der Unterschiede in der Tumorgroße zwischen wildtypischen und *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup>-Mäusen, wurde die Zellzahl in Relation zum Tumolvolumen gesetzt. Um zu analysieren, ob die T<sub>reg</sub>-spezifische Depletion der CK2 die Migration von T-Zellen aus den drainierenden Lymphknoten (dLN) in das Tumorgewebe beeinflusst, wurde die beschriebenen Analysen zusätzlich in dLN durchgeführt. Die Resultate der Analyse der CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind in Abb. 16 dargestellt.



**Abbildung 16: Die spezifische CK2-Defizienz in T<sub>reg</sub>-Zellen begünstigt die Migration von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus den drainierenden Lymphknoten in das Tumorgewebe.** Die Tumore und drainierenden Lymphknoten (dLN) wurden an Tag 21 isoliert, enzymatisch verdaut (siehe Kap. 2.11) und die tumor-infiltrierenden Immunzellen mittels CD45 TIL Beads angereichert (siehe Kap. 2.12). Die resultierenden Einzelzellsuspensionen wurden, wie in Kap. 2.13 beschrieben, mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen die Antigene CD45, TCRβ, CD4 und CD8 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. **A** Das Balkendiagramm mit SEM illustriert die absolute Zahl an TCRβ<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen pro cm<sup>3</sup> Tumorgewebe aus einem repräsentativen Experiment (*Csnk2b<sup>fl/fl</sup>* (n = 6) = 1,7\*10<sup>5</sup> ± 2,9\*10<sup>4</sup>; *Csnk2b<sup>Treg-/-</sup>* (n = 6) = 1,4\*10<sup>6</sup> ± 1,8\*10<sup>5</sup>; \*\*\*p<0,001). Die Pfeile illustrieren das Verhältnis des jeweiligen Zelltyps in den Tumoren von *Csnk2b<sup>Treg-/-</sup>* zu *Csnk2b<sup>fl/fl</sup>* Mäusen. **B** Das Balkendiagramm mit SEM illustriert die absolute Zahl an TCRβ<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen in den dLN aus einem repräsentativen Experiment (*Csnk2b<sup>fl/fl</sup>* (n = 6) = 1,2\*10<sup>6</sup> ± 6,0\*10<sup>4</sup>; *Csnk2b<sup>Treg-/-</sup>* (n = 5) = 2,5\*10<sup>6</sup> ± 6,1\*10<sup>5</sup>; n.s.p>0,05). Die Pfeile illustrieren das Verhältnis des jeweiligen Zelltyps in den dLN von *Csnk2b<sup>Treg-/-</sup>* zu *Csnk2b<sup>fl/fl</sup>* Mäusen. **C** Das Punktdiagramm mit  $\bar{x} \pm SD$  illustriert den prozentualen Anteil an TCRβ<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>-T-Zellen unter lebenden CD45<sup>+</sup> Immunzellen im Tumorgewebe und den dLN aus zwei unabhängigen Experimenten (*Csnk2b<sup>fl/fl</sup>*: Tumor (n = 11) = 23,6 ± 5,5 %; dLN (n = 10) = 26,4 ± 3,2 %; *Csnk2b<sup>Treg-/-</sup>*: Tumor (n = 11) = 38,9 ± 9,8 %; dLN (n = 10) = 19,4 ± 3,5 %; \*\*\*p<0,001; \*\*p<0,01). Jeder Datenpunkt repräsentiert die Daten einer einzelnen Maus. Nebenstehend sind für beide Maustypen repräsentative Abbildungen der durchflusszytometrischen Analyse der CD8<sup>+</sup>-T-Zellbestimmung in den Tumoren mit der entsprechenden Prozentzahl der Zielpopulation abgebildet.

Die Analyse zeigt, dass in Tumoren von *Csnk2b<sup>Treg-/-</sup>* Mäusen sowohl die absolute Zahl als auch die Frequenz an CD8<sup>+</sup>-T-Zellen signifikant erhöht ist. Bezogen auf das gleiche Tumolvolumen sind in Tumoren von *Csnk2b<sup>Treg-/-</sup>* Mäusen mehr als die 8-fache Zahl an CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu detektieren als in Tumoren von wildtypischen Mäusen (Abb. 16A). Dies spiegelt sich im signifikant erhöhten prozentualen Anteil an CD8<sup>+</sup> T-Zellen innerhalb der tumor-infiltrierenden CD45<sup>+</sup> Immunzellen wider. Hier ist die doppelte Frequenz in den Tumoren von *Csnk2b<sup>Treg-/-</sup>* Mäusen zu beobachten (Abb. 16C). Im Vergleich zum Tumorgewebe ergibt die Analyse der absoluten Zellzahlen in den dLN ein ähnliches Bild. Wiederum war die Zahl an CD8<sup>+</sup> T-Zellen in den *Csnk2b<sup>Treg-/-</sup>* Mäusen erhöht (Abb. 16B). Der wesentliche Unterschied zeigt sich im Verhältnis ( $\# Csnk2b<sup>Treg-/-</sup> / \# Csnk2b<sup>fl/fl</sup>$ ) der absoluten Zahl an CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Das Verhältnis beträgt im Tumor 8,4 und in den dLN 1,8. Daraus kann geschlossen werden, dass es im Vergleich zu wildtypischen Mäusen in *Csnk2b<sup>Treg-/-</sup>* Mäusen zu einer massiven Migration von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus den dLN in das Tumorgewebe kommt. Dies könnte auch die Unterschiede in den Frequenzen von CD8<sup>+</sup> T-Zellen zwischen dem Tumorgewebe und den dLN erklären. In den dLN ist der prozentuale Anteil in den wildtypischen Mäusen erhöht (Abb. 16C). In den Tumoren dagegen ist die Frequenz in den *Csnk2b<sup>Treg-/-</sup>* Mäusen höher.

Um die vergleichende Charakterisierung der T-Zellpopulation zu vervollständigen, wurden die absolute Zahl und die Frequenzen der CD4<sup>+</sup> T-Zellen analysiert. Dabei wurde wie bereits erwähnt eine Unterscheidung zwischen FOXP3<sup>-</sup> T<sub>konv</sub>-Zellen und FOXP3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen vorgenommen. Die Ergebnisse der Analyse sind in Abb. 17 dargestellt.



**Abbildung 17: Die spezifische CK2-Defizienz reduziert die Frequenz von T<sub>reg</sub>-Zellen im Tumorgewebe, aber nicht in den drainierenden Lymphknoten.** Die Tumore wurden an Tag 21 isoliert, enzymatisch verdaut (Kap. 2.11.1) und die resultierenden Einzelzell suspensionen wurden wie in Kap. 2.13 beschrieben mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen die Antigene TCRβ, CD4 und FOXP3 (intrazellulär) gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. **A** Das Balkendiagramm mit SEM illustriert die absolute Zahl an CD4<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen und FOXP3<sup>-</sup> T<sub>konv</sub>-Zellen pro cm<sup>3</sup> Tumorgewebe aus einem repräsentativen Experiment (*Csnk2b*<sup>fl/fl</sup> (n = 6): FOXP3<sup>+</sup> = 4,3\*10<sup>4</sup> ± 8,2\*10<sup>3</sup>; FOXP3<sup>-</sup> = 6,9\*10<sup>4</sup> ± 1,2\*10<sup>4</sup>; *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> (n = 6): FOXP3<sup>+</sup> = 1,2\*10<sup>5</sup> ± 2,1\*10<sup>4</sup>; FOXP3<sup>-</sup> = 5,9\*10<sup>5</sup> ± 6,5\*10<sup>4</sup>; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001). Die Pfeile illustrieren das Verhältnis des jeweiligen Zelltyps in den Tumoren von *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> zu *Csnk2b*<sup>fl/fl</sup> Mäusen. **B** Das Punktdiagramm mit  $\bar{x} \pm SD$  illustriert den prozentualen Anteil an FOXP3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen und FOXP3<sup>-</sup> T<sub>konv</sub>-Zellen innerhalb TCRβ<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-T-Zellen im Tumorgewebe aus zwei unabhängigen Experimenten (*Csnk2b*<sup>fl/fl</sup> (n = 13): FOXP3<sup>+</sup> = 29,0 ± 9,6 %; FOXP3<sup>-</sup> = 69,4 ± 9,9 %; *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> (n = 13): FOXP3<sup>+</sup> = 12,7 ± 5,3 %; FOXP3<sup>-</sup> = 86,4 ± 5,3 %; \*\*\*p<0,001). Jeder Datenpunkt repräsentiert die Daten einer einzelnen Maus. Nebenstehend sind für beide Maustypen repräsentative Abbildungen der durchflusszytometrischen Analyse mit der entsprechenden Prozentzahl der FOXP3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellpopulation abgebildet. **C** Das Balkendiagramm mit SEM illustriert die absolute Zahl an CD4<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen und FOXP3<sup>-</sup> T<sub>konv</sub>-Zellen in den dLN aus einem repräsentativen Experiment (*Csnk2b*<sup>fl/fl</sup> (n = 6): FOXP3<sup>+</sup> = 2,1\*10<sup>5</sup> ± 2,5\*10<sup>4</sup>; FOXP3<sup>-</sup> = 9,9\*10<sup>5</sup> ± 9,3\*10<sup>4</sup>; *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> (n = 6): FOXP3<sup>+</sup> = 6,6\*10<sup>5</sup> ± 1,6\*10<sup>5</sup>; FOXP3<sup>-</sup> = 1,8\*10<sup>6</sup> ± 3,6\*10<sup>5</sup>; \*p<0,05). Die Pfeile illustrieren das Verhältnis des jeweiligen Zelltyps in den Tumoren von *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> zu *Csnk2b*<sup>fl/fl</sup> Mäusen. **D** Das Punktdiagramm mit  $\bar{x} \pm SD$  illustriert den prozentualen Anteil an FOXP3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen und FOXP3<sup>-</sup> T<sub>konv</sub>-Zellen innerhalb TCRβ<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in den dLN aus zwei unabhängigen Experimenten (*Csnk2b*<sup>fl/fl</sup> (n = 11): FOXP3<sup>+</sup> = 11,4 ± 3,8 %; FOXP3<sup>-</sup> = 88,4 ± 2,4 %; *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> (n = 11): FOXP3<sup>+</sup> = 17,6 ± 4,0 %; FOXP3<sup>-</sup> = 78,8 ± 4,0 %; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001)). Jeder Datenpunkt repräsentiert die Daten einer einzelnen Maus. Nebenstehend sind für beide Maustypen repräsentative Abbildungen der durchflusszytometrischen Analyse mit der entsprechenden Prozentzahl der FOXP3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellpopulation abgebildet.

Die Resultate der Analyse zeigen, dass in Tumoren von *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen die absolute Zahl und die Frequenz an T<sub>konv</sub>-Zellen signifikant erhöht sind (Abb. 17A und B). Bei T<sub>reg</sub>-Zellen ist in den Tumoren von *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen eine erhöhte absolute Zahl zu detektieren. Dagegen ist die Frequenz an T<sub>reg</sub>-Zellen in den Tumoren von *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen signifikant reduziert (Abb. 17A und B). Werden die Frequenzen beider Zelltypen in den dLN betrachtet, so ist ein umgekehrtes Bild zu beobachten (Abb. 17D). Hier ist der prozentuale Anteil an T<sub>konv</sub>-Zellen in den wildtypischen Mäusen signifikant erhöht und die Frequenz an T<sub>reg</sub>-Zellen reduziert. Die Umkehrung der prozentualen Verhältnisse in den dLN im Vergleich zum Tumorgewebe basiert möglicherweise auf einer unterschiedlich starken Migration der Zelltypen aus den dLN in das Tumorgewebe. Werden die absoluten Zahlen von T<sub>konv</sub>-Zellen und T<sub>reg</sub>-Zellen in den dLN und dem Tumorgewebe bzw. deren Verhältnis zwischen *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen und wildtypischen Mäusen (# *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup>/# *Csnk2b*<sup>fl/fl</sup>) in dem jeweiligen Kompartiment verglichen, so zeigt sich, dass sich ausschließlich das Verhältnis der T<sub>konv</sub>-Zellen ändert. Bei den T<sub>reg</sub>-Zellen sind in beiden Kompartimenten 3-mal so viele T<sub>reg</sub>-Zellen in den dLN und dem Tumorgewebe von *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen zu beobachten. Bei den T<sub>konv</sub>-Zellen hingegen steigert sich das Verhältnis von 1,8 (dLN) auf 8,2 (Tumor). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass im Vergleich zu wildtypischen Mäusen, T<sub>konv</sub>-Zellen in *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen verstärkt aus den dLN in das Tumorgewebe migrieren.

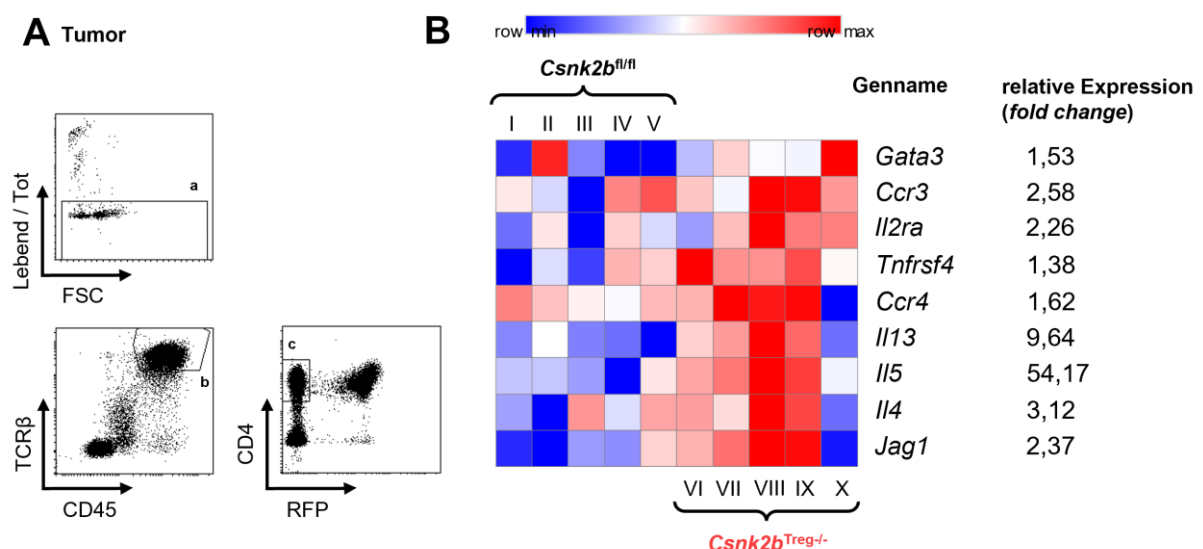
Die T<sub>reg</sub>-spezifische Depletion der CK2β-UE scheint demnach keinen Einfluss auf die Migration von pro-tumoralen T<sub>reg</sub>-Zellen aus den dLN in das Tumorgewebe zu besitzen. Im Gegensatz dazu ist ein starker indirekter Einfluss auf die Migration von anti-tumoralen Effektor-T-Zellen (CD8<sup>+</sup> T-Zellen und T<sub>konv</sub>-Zellen) aus den dLN in das Tumorgewebe zu beobachten. Zwar ist die absolute Zahl an T<sub>reg</sub>-Zellen in den Tumoren von *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> signifikant höher als deren Zahl in Tumoren von wildtypischen Mäusen. Allerdings ist das Verhältnis in von anti-tumoralen Effektor-T-Zellen zu pro-tumoralen T<sub>reg</sub>-Zellen in den Tumoren von *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> im Vergleich zu wildtypischen Mäusen stark erhöht. Das CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu T<sub>reg</sub>-Zellen-Verhältnis beträgt in wildtypischen Mäusen 2,9 und in *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen 11,8. Das Verhältnis von T<sub>konv</sub>- zu T<sub>reg</sub>-Zellen beträgt in wildtypischen Mäusen 1,6 und in *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen 4,6. Zusammenfassend könnte das reduzierte Tumorstadium in *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen auf der stark erhöhten Migration von Effektor-T-Zellen aus den dLN in das Tumorgewebe beruhen, da eine gesteigerte Zahl an Effektor-T-Zellen eine effektivere Immunantwort vermuten lässt.

Aufgrund ihrer immunkoordinativen Eigenschaften geraten tiT<sub>konv</sub>-Zellen immer mehr in den Fokus der aktuellen Forschung.<sup>67</sup> Innerhalb der Analyse der T-Zellpopulation kann eine erhöhte Frequenz an T<sub>konv</sub>-Zellen in den Tumoren von *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen beobachtet werden, die aber keine Rückschlüsse auf die Polarisierung der tiT<sub>konv</sub>-Zellen zulässt. Aus diesem Grund wurden folgend die Eigenschaften von tiT<sub>konv</sub>-Zellen eingehend analysiert.

### 3.7 *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäuse zeigen eine anti-tumorale Immunantwort des Typ 2

#### 3.7.1 Konventionelle CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus Tumoren von *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen zeigen eine verstärkte Expression von Genen, die mit T-Helferzellen vom Typ 2 assoziiert werden

ILT3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen sind in einer erhöhten Frequenz in den Tumoren von *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen zu finden und besitzen die Eigenschaft, dass sie Typ2-vermittelte Immunantworten, insbesondere T<sub>H</sub>2-Zellen, nicht supprimieren können.<sup>115</sup> Die Bedeutung Typ2-vermittelter Immunreaktionen bzw. von T<sub>H</sub>2-Zellen im Kontext der Tumorimmunologie ist nicht unumstritten, allerdings wird in zahlreichen Publikation beschrieben, dass T<sub>H</sub>2-Zellen einen positiven Einfluss auf die Immunreaktion gegenüber Tumoren besitzen.<sup>70</sup> Inwieweit die T<sub>H</sub>2-vermittelnden Eigenschaften von CK2-defizienten T<sub>reg</sub>-Zellen bzw. ILT3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen dazu beitragen, die erhöhte immunologische Tumorabwehr in *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen zu unterstützen, wurde zunächst durch eine Transkriptomanalyse von tiT<sub>konv</sub>-Zellen untersucht. Dazu wurden, nach MACS-Anreicherung, tiT<sub>konv</sub>-Zellen mithilfe eines durchflusszytometrischen Zell-Sortierers isoliert. Hierzu wurden RFP-Reporterermäuse (RFP; *red fluorescent protein*) verwendet, in denen CD4<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen anhand ihrer RFP-Expression von CD4<sup>+</sup> FOXP3<sup>-</sup> T<sub>konv</sub>-Zellen unterschieden werden können (Abb. 18A). Nach Aufreinigung der RNA und Synthese der cDNA wurden die Transkriptome mittels NGS (*Next Generation Sequencing*) analysiert (Kap. 2.14). Dabei wurde unter anderem die kommerzielle Analysesoftware (*Ingenuity pathway analysis*; [www.qiagenbioinformatics.com](http://www.qiagenbioinformatics.com)) verwendet, mit der eine Signalweg- und Netzwerkanalyse der erhobenen Rohdaten durchgeführt wurde.



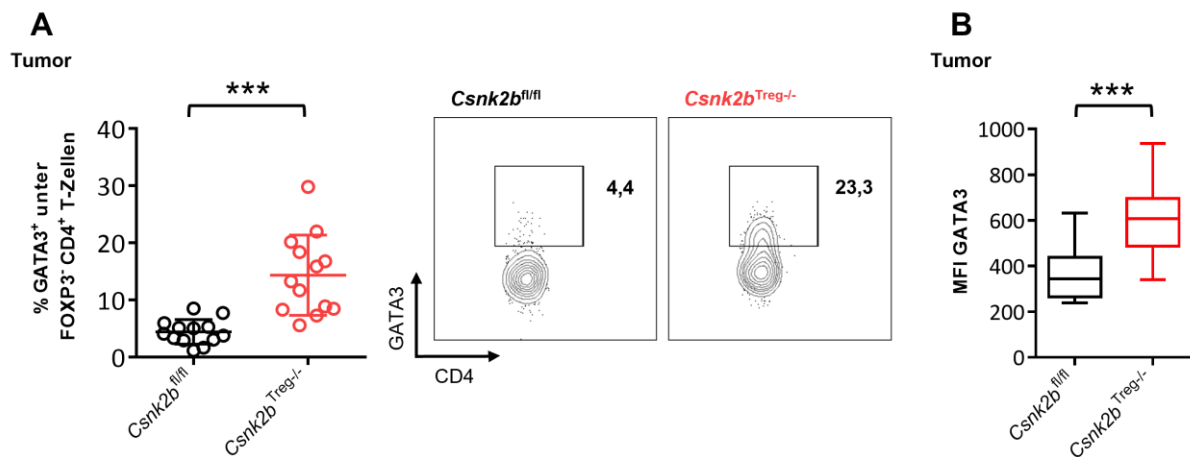
**Abbildung 18: T<sub>H</sub>2-assoziierte Gene sind in konventionellen FOXP3<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus Tumoren von *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen verstärkt exprimiert.** Die Tumore wurden an Tag 21 isoliert und enzymatisch verdaut (Kap. 2.11.1). A Unter der Verwendung einer RFP-Reportermaus (siehe Kap. 2.8.2) wurden konventionelle CD4<sup>+</sup> T-Zellen zur Zell-Sortierung (Aria III; BD) (siehe Kap. 2.13.3) folgendermaßen charakterisiert. a: lebend, b: CD45<sup>+</sup> TCRβ<sup>+</sup> c: CD4<sup>+</sup> RFP<sup>+</sup>. Anschließend erfolgte die Aufreinigung der RNA und Synthese der

cDNA (siehe Kap. 2.14). Die Sequenzierung erfolgte mit einem HiSeq2500 (Illumina). Die Analyse der Rohdaten und die Signalweg- und Netzwerkanalyse (IPA; *Ingenuity pathway analysis*; www.qiagenbioinformatics.com) erfolgten mit der Software CLCGenomics Work Bench. **B** Heatmap ausgewählter T<sub>H</sub>2-assoziiierter Gene exprimiert in tumor-infiltrierenden konventionellen CD4<sup>+</sup> T<sub>konv</sub>-Zellen (I-V; *Csnk2b*<sup>fl/fl</sup> (n = 5) VI-X *Csnk2b*<sup>Treg<sup>-/-</sup></sup> (n = 5)). Eine Reihe repräsentiert dabei die Expression eines Gens, wobei die Expressionsstärke eines Gens innerhalb der Reihe von Blau zu Rot zunimmt. Jedes Quadrat steht für die Expression des jeweiligen Gens in tumor-infiltrierenden CD4<sup>+</sup> T<sub>konv</sub>-Zellen einer Maus. Zusätzlich ist für jedes Gen die relative Expression in CD4<sup>+</sup> T<sub>konv</sub>-Zellen von *Csnk2b*<sup>fl/fl</sup> Mäusen gegenüber CD4<sup>+</sup> T<sub>konv</sub>-Zellen wildtypischer Mäuse angegeben.

Die Signalweg- und Netzwerkanalyse zeigt, dass insbesondere der T<sub>H</sub>2-Signalweg bzw. damit assoziierte Gene in CD4<sup>+</sup> T<sub>konv</sub>-Zellen aus Tumoren von *Csnk2b*<sup>Treg<sup>-/-</sup></sup> Mäusen stärker exprimiert werden (Abb. 18B). Dazu gehören *Ccr3* (*C-C chemokine receptor type 3*) und *Ccr4* (*C-C chemokine receptor type 4*), die für charakteristische T<sub>H</sub>2-Chemokinrezeptoren codieren, sowie Gene für wichtige Oberflächenrezeptoren wie *Tnfrsf4* (*Tumor necrosis factor receptor superfamily member 4*) und *Il2ra* (*Interleukin 2 receptor alpha*; CD25), die unter anderem die Differenzierung und Proliferation von T<sub>H</sub>2-Zellen fördern.<sup>155,156,157,158,159,160</sup> Zusätzlich konnte eine verstärkte Expression des *GATA3* (*GATA Binding Protein 3*) Gens beobachtet werden, wobei GATA3 als determinierender Transkriptionsfaktor von T<sub>H</sub>2-Zellen gilt.<sup>161</sup> Hervorzuheben ist außerdem die im Vergleich stark erhöhte Expression der Gene *Il4*, *Il13* und *Il5* in tiT<sub>konv</sub>-Zellen aus *Csnk2b*<sup>Treg<sup>-/-</sup></sup> Mäusen. Diese codieren für die gleichnamigen Leitzytokine IL-4, -5 und -13, die durch T<sub>H</sub>2-Zellen gebildet werden.<sup>147</sup> Die Transkriptomdaten deuten demnach darauf hin, dass in Tumoren von *Csnk2b*<sup>Treg<sup>-/-</sup></sup> Mäusen eine erhöhte Frequenz an T<sub>H</sub>2-Zellen zu detektieren ist und diese verstärkt T<sub>H</sub>2-assoziierte Zytokine produzieren. Dies sollte im Folgenden auf Proteinebene verifiziert werden.

### 3.7.2 In Tumoren von *Csnk2b*<sup>Treg<sup>-/-</sup></sup> Mäusen ist die Frequenz von konventionellen CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen des Typs 2 erhöht

Ob eine höhere Frequenz an T<sub>H</sub>2-Zellen in den Tumoren von *Csnk2b*<sup>Treg<sup>-/-</sup></sup> Mäusen zu detektieren ist, sollte im Folgenden durchflusszytometrisch bestimmt werden. Zur Identifizierung von T<sub>H</sub>2-Zellen kann unter anderem deren Haupttranskriptionsfaktor GATA3 verwendet werden.<sup>31</sup> Zur Bestimmung der Frequenz an T<sub>H</sub>2-Zellen in den Tumoren wurden per MACS-angereicherte Einzelzellsuspensionen mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gegen die Oberflächenantigene TCRβ und CD4 gefärbt. Zusätzlich wurde anschließend eine intrazelluläre Färbung gegen den T<sub>H</sub>2-Haupttranskriptionsfaktor GATA3 durchgeführt. Die Ergebnisse der Analyse sind in Abb. 19 visualisiert.



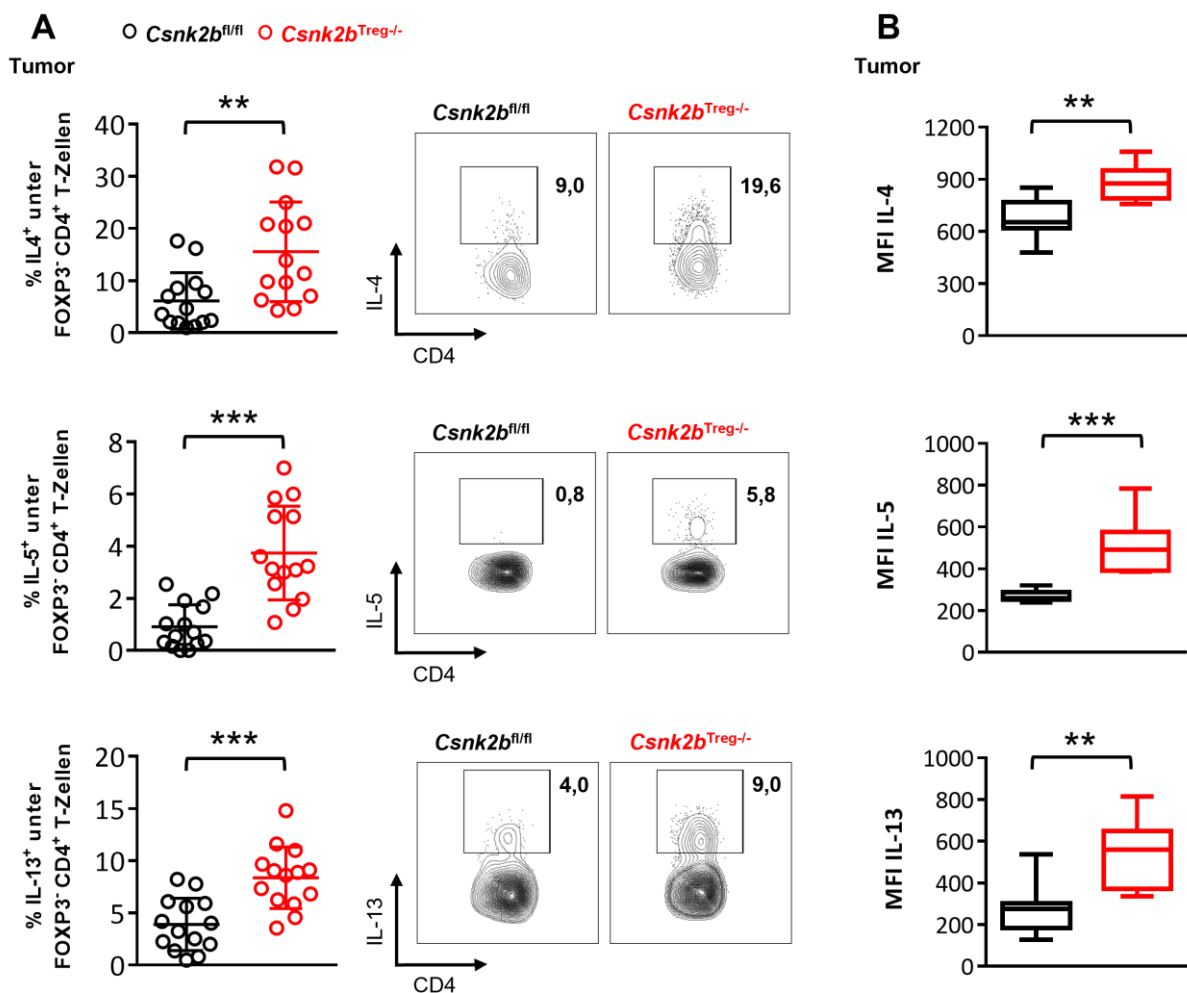
**Abbildung 19: Die Frequenz GATA3-exprimierender TH2-Zellen ist in Tumoren von *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen signifikant erhöht.** Die Tumore wurden an Tag 21 isoliert, enzymatisch verdaut (Kap. 2.11.1) und die resultierenden Einzelzellsuspensionen wurden, wie in Kapitel 2.13 beschrieben, mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen die Antigene TCR $\beta$ , CD4 und GATA3 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. **A** Das Punktdiagramm mit  $\bar{x} \pm SD$  illustriert den prozentualen Anteil an GATA3<sup>+</sup> innerhalb der TCR $\beta$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> T<sub>konv</sub>-Zellpopulation im Tumorgewebe aus zwei unabhängigen Experimenten (*Csnk2b*<sup>fl/fl</sup> (n = 13) = 4,45  $\pm$  2,15 %; *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> (n = 13) = 14,36  $\pm$  7,02 %; \*\*\*p $\leq$ 0,001). Jeder Datenpunkt repräsentiert die Daten einer einzelnen Maus. Nebenstehend sind für beide Maustypen repräsentative Abbildungen der durchflusszytometrischen Analyse mit der entsprechenden Prozentzahl der Zielpopulation abgebildet. **B** Die Kastengrafik mit Median *M* und Spannweite *Sp* illustriert die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI; *mean fluorescence intensity*) der GATA3-Färbung innerhalb TCR $\beta$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> T<sub>konv</sub>-Zellen im Tumorgewebe aus zwei unabhängigen Experimenten (*Csnk2b*<sup>fl/fl</sup> (n = 13) *M* = 346,8; *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> (n = 13) *M* = 594,8; \*\*\*p $\leq$ 0,001).

Die Analyse der GATA3-Expression verdeutlicht, dass die Frequenz an GATA3-exprimierenden CD4<sup>+</sup> T<sub>konv</sub>-Zellen in Tumoren von *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen signifikant erhöht ist. Im Vergleich zu Tumoren aus wildtypischen Mäusen kann durchschnittlich die dreifache Frequenz an GATA3-exprimierenden T<sub>konv</sub>-Zellen in Tumoren aus *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen identifiziert werden. Zusätzlich zur prozentualen Bestimmung der GATA3-exprimierenden T<sub>konv</sub>-Zellen wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI, *mean fluorescence intensity*) der GATA3-Färbung in T<sub>konv</sub>-Zellen bestimmt (Abb. 19B). Über die MFI können Rückschlüsse auf das relative Expressionsniveau des Zielproteins gezogen werden, da sie als quantitatives Maß für die Menge an gebundenen Antikörper interpretiert werden kann.<sup>162</sup> Die Analyse der MFI bestätigt die Ergebnisse der prozentualen Bestimmung. Die MFI von GATA3 in T<sub>konv</sub>-Zellen aus *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen mit einem Wert von 594 übersteigt jene von wildtypischen Mäusen um nahezu das Doppelte. Diese Ergebnisse untermauern die in Kap. 3.7.1 gezogenen Rückschlüsse, wodurch angenommen werden kann, dass die Frequenz von TH2-Zellen in Tumoren von *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen deutlich erhöht ist. Ob damit auch eine gesteigerte Produktion von TH2-assoziierten Zytokinen einhergeht, wird im nächsten Kapitel analysiert.



### 3.7.3 Die Produktion Typ 2-assoziierter Zytokine durch konventionelle CD4<sup>+</sup> T-Zellen ist in Tumoren von *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen erhöht.

Die stärkere Expression von T<sub>H</sub>2-assozierten Genen, die für T<sub>H</sub>2-Leitzytokine codieren, bedingt nicht automatisch, dass auch die korrespondierenden Proteine stärker exprimiert werden. Zur Analyse der Produktion der T<sub>H</sub>2-assozierten Proteine wurden CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus Einzelzellsuspensionen von Tumoren per MACS isoliert und anschließend für 4 h mit Ionomycin, Phorbol-12-Myristat-13-acetat (PMA) und Monensin stimuliert (Kap. 2.13.2). Vor der durchflusszytometrischen Analyse wurden die Zellen gegen die Oberflächenproteine TCRβ und CD4 und intrazellulär gegen FOXP3, sowie die T<sub>H</sub>2-assozierten Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 gefärbt. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse sind in Abb. 20 dargestellt.

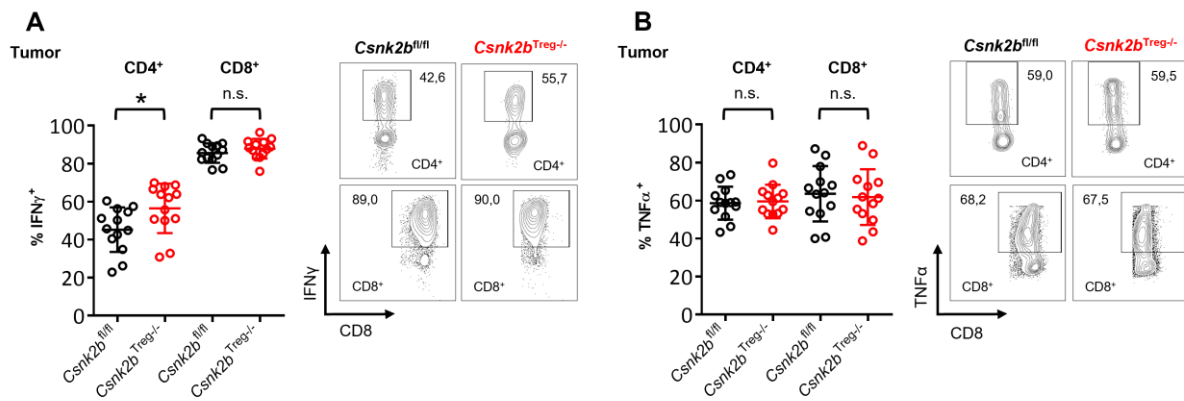


**Abbildung 20: Die Produktion T<sub>H</sub>2-assoziierter Zytokine durch CD4<sup>+</sup> T<sub>konv</sub>-Zellen ist in Tumoren von *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen signifikant erhöht.** Die Tumore wurden an Tag 21 isoliert und enzymatisch verdaut (Kap. 2.11.1). Tumor-infiltrierende T-Zellen wurden mit CD4/CD8 TIL Beads angereinigt (Kap. 2.12) mit Ionomycin (1 μM), PMA (40 ng/ml) und Monensin (1x) für 4 h stimuliert (Kap. 2.13.2). Die Zellen wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen die Antigene TCRβ und CD4 sowie intrazellulär gegen FOXP3, IL-4, IL-5 und IL-13 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (Kap. 2.13). A Die Punktdiagramme mit  $\bar{x} \pm SD$  illustrieren den

prozentualen Anteil an IL-4, IL-5 und IL13-produzierenden Zellen innerhalb TCR $\beta^+$  CD4 $^+$  FOXP3 $^-$  T<sub>konv</sub>-Zellen im Tumorgewebe aus zwei unabhängigen Experimenten (*Csnk2b*<sup>fl/n</sup>; (n=13): IL-4 $^+$  = 6,10  $\pm$  5,39 %; IL-5 $^+$  = 0,90  $\pm$  0,84 %; IL-13 $^+$  = 3,88  $\pm$  2,50 %; *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> (n = 13): IL-4 $^+$  = 15,54  $\pm$  9,54 %; IL-5 $^+$  = 3,77  $\pm$  1,87 %; IL-13 $^+$  = 8,36  $\pm$  2,95; \*\*p $\leq$ 0,01, \*\*\*p $\leq$ 0,001). Jeder Datenpunkt repräsentiert die Daten einer einzelnen Maus. Nebenstehend sind für beide Maustypen repräsentative Abbildungen der durchflusszytometrischen Analyse mit der entsprechenden Prozentzahl der Zielpopulation abgebildet. **B** Die Kastengrafik mit *M* + *Sp* illustriert die mittlere Fluoreszenzintensität der IL-4, IL-5 und IL13-Färbung innerhalb der TCR $\beta^+$  CD4 $^+$  FOXP3 $^-$  T<sub>konv</sub>-Zellpopulation im Tumorgewebe aus einem repräsentativen Experiment (*Csnk2b*<sup>fl/n</sup>; (n = 6): *M* (IL-4) = 666,6; *M* (IL-5) = 266,7 *M* (IL-13) = 275,9; *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> (n = 6): *M* (IL-4) = 877,4; *M* (IL-5) = 509,0; *M* (IL-13) = 550,3; \*\*p $\leq$ 0,01, \*\*\*p $\leq$ 0,001).

Die Analyse der Zytokin-Produktion zeigt, dass T<sub>konv</sub>-Zellen aus Tumoren von *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen signifikant mehr T<sub>H2</sub>-assoziierte Proteine produzieren als tiT<sub>konv</sub>-Zellen aus wildtypischen Mäusen. So ist die Frequenz IL-4 produzierender T<sub>konv</sub>-Zellen um mehr als das Doppelte erhöht (Abb. 20A). Dieses Ergebnis konnte anhand der MFI-Analyse der IL-4 Färbung bestätigt werden. Bei der Analyse von IL-5 ergibt sich ein deckungsgleiches Bild (Abb. 20B). Auch hier sind sowohl die Frequenz an IL-5 produzierenden T<sub>konv</sub>-Zellen als auch die MFI der IL-5-Färbung um mehr als das Doppelte erhöht. Die Bestimmung der Frequenz IL-13 produzierender T<sub>konv</sub>-Zellen bestätigt das einheitliche Bild der gesteigerten T<sub>H2</sub>-Immunantwort in Tumoren von *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen (Abb. 20C). Auch bei diesem Zytokin konnte eine zweifach erhöhte Frequenz IL-13 produzierender T<sub>konv</sub>-Zellen wie auch eine doppelt so hohe MFI detektiert werden. Somit ist nicht nur die Expression der codierenden Gene für T<sub>H2</sub>-assoziierte Gene signifikant erhöht (Kap. 3.7.1), sondern auch die Produktion der entsprechenden Proteine. Dadurch kann von erhöhten Konzentrationen dieser Botenstoffe in den Tumoren von *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen ausgegangen werden.

Um das gesamte Spektrum der T-Zellantwort im Tumor zu charakterisieren und zu untersuchen, wurde zusätzlich die Produktion T<sub>H1</sub>- bzw. Typ1-assoziiierter Zytokine durch tiT<sub>konv</sub>-Zellen und tumorinfiltrierende CD8 $^+$  T-Zellen (CD8 $^+$  tiT-Zellen) untersucht. Dazu wurde der prozentuale Anteil an T<sub>konv</sub>-Zellen bzw. CD8 $^+$  T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt, die die Zytokine Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) oder den Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) produzieren. Beide Botenstoffe gelten dabei als klassische Typ1-Zytokine, denen vorwiegend anti-tumorale Eigenschaften zugewiesen werden.<sup>163,164</sup> Für die Analyse der Produktion von T<sub>H1</sub>-assoziierten Zytokinen wurden wiederum CD4 $^+$ - und CD8 $^+$  T-Zellen per MACS aus den Tumor-Einzelzellsuspensionen angereichert. Anschließend erfolgte die Stimulation für 4 h mit Ionomycin, PMA und Monensin. Vor der durchflusszytometrischen Analyse wurden die Zellen gegen die Oberflächenproteine TCR $\beta$ , CD4, CD8 und intrazellulär gegen FOXP3, sowie die T<sub>H1</sub>-assoziierten Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  gefärbt. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse sind in Abb. 21 dargestellt.



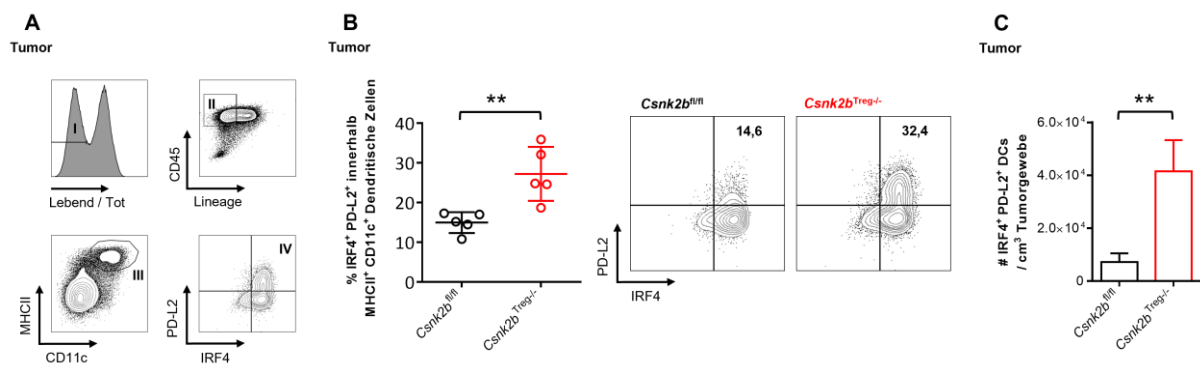
**Abbildung 21: Die Produktion Typ1-assoziiertes Zytokine durch T-Zellen ist in Tumoren von *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen und wildtypischen Mäusen annähernd identisch.** Die Tumore wurden an Tag 21 isoliert und enzymatisch verdaut (Kap. 2.11.1). Tumor-infiltrierende T-Zellen wurden mit CD4/CD8 TIL Beads angereinigt (Kap. 2.12) mit Ionomycin (1  $\mu$ M), PMA (40 ng/ml) und Monensin (1x) für 4 h stimuliert (siehe Kap. 2.13.2). Die Zellen wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen die Antigene TCR $\beta$ , CD4 und CD8 sowie intrazellulär gegen FOXP3, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (Kap. 2.13). **A** Das Punktdiagramm mit  $\bar{x} \pm SD$  illustriert den prozentualen Anteil an IFN- $\gamma$ -produzierenden Zellen innerhalb TCR $\beta$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> FOXP3<sup>-</sup> T<sub>konv</sub>-Zellen und TCR $\beta$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Tumorgewebe aus zwei unabhängigen Experimenten (*Csnk2b*<sup>fl/fl</sup>; (n=13): CD4<sup>+</sup> = 45,22  $\pm$  11,73 %; CD8<sup>+</sup> = 85,56  $\pm$  5,11 %; *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> (n = 13): CD4<sup>+</sup> = 56,48  $\pm$  13,01 %; CD8<sup>+</sup> = 87,87  $\pm$  5,16 %; \*p $\leq$ 0,05, n.s.p $\geq$ 0,05). Jeder Datenpunkt repräsentiert die Daten einer einzelnen Maus. Nebstehend sind für beide Maustypen repräsentative Abbildungen der durchflusszytometrischen Analyse mit der entsprechenden Prozentzahl der Zielpopulation abgebildet. **B** Das Punktdiagramm mit  $\bar{x} \pm SD$  illustriert den prozentualen Anteil an TNF $\alpha$ -produzierenden Zellen innerhalb TCR $\beta$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> FOXP3<sup>-</sup> T<sub>konv</sub>-Zellen und TCR $\beta$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>-T-Zellen im Tumorgewebe aus zwei unabhängigen Experimenten (*Csnk2b*<sup>fl/fl</sup>; (n=13): CD4<sup>+</sup> = 58,62  $\pm$  8,66 %; CD8<sup>+</sup> = 63,68  $\pm$  14,57 %; *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> (n = 13): CD4<sup>+</sup> = 59,52  $\pm$  8,82 %; CD8<sup>+</sup> = 61,83  $\pm$  14,65 %; n.s.p $\geq$ 0,05). Jeder Datenpunkt repräsentiert die Daten einer einzelnen Maus. Nebstehend sind für beide Maustypen repräsentative Abbildungen der durchflusszytometrischen Analyse mit der entsprechenden Prozentzahl der Zielpopulation abgebildet.

Generell ist zu beobachten, dass in Tumoren beider Maustypen ein hoher Prozentsatz der T-Zellen Typ1-assoziierte Zytokine produziert. Dies ist nicht weiter überraschend, da Immunantworten gegenüber Tumoren in weiten Teilen durch Typ1-Immunantworten dominiert werden. Dabei sind nur geringe Unterschiede zwischen den beiden Maustypen zu erkennen. So zeigt sich lediglich die Frequenz IFN- $\gamma$ -produzierender CD4<sup>+</sup> T<sub>konv</sub>-Zellen in Tumoren aus *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen signifikant erhöht, während die Frequenz IFN- $\gamma$ -produzierender CD8<sup>+</sup> T-Zellen keine Unterschiede aufweist (Abb. 21A). Bei der Frequenz TNF- $\alpha$ -produzierender T-Zellen können zwischen *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen und wildtypischen Mäusen ebenfalls keine Unterschiede beobachtet werden (Abb. 21B).

Auf Grundlage dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass die T<sub>reg</sub>-spezifische Depletion der CK2 zu einer erhöhten T<sub>H2</sub>-Antwort in den Tumoren führt, die mit einer verstärkten Infiltration CD8<sup>+</sup> zytotoxischer T-Zellen und CD4<sup>+</sup> T<sub>konv</sub>-Zellen einhergeht. Daraus resultiert die Frage, welche Mechanismen der gesteigerten T<sub>H2</sub>-Antwort in den Tumoren von *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen zugrunde liegen.

### 3.7.4 Die Frequenz von Typ2-dirigierenden Dendritischen Zellen ist in Tumoren von *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen erhöht

Dendritische Zellen (DCs; *dendritic cells*) sind maßgeblich an der Differenzierung von T-Zellen – insbesondere von CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen – beteiligt (Kap. 1.3).<sup>31</sup> Die Differenzierung von T<sub>H</sub>2-Zellen wird dabei von einem DC-Subtyp gefördert, der das Oberflächenprotein PD-L2 (*Programmed cell death 1 ligand 2*) und den Transkriptionsfaktor IRF4 (*Interferon regulatory factor 4*) exprimiert (IRF4<sup>+</sup> PD-L2<sup>+</sup> DCs).<sup>165,166</sup> Zusätzlich ist bekannt, dass ILT3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen die Differenzierung bzw. den Reifeprozess dieser DC-Subpopulation in lymphatischen Organen fördern können.<sup>115</sup> Aufgrund der erhöhten Frequenz an ILT3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen in den Tumoren von *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen stellte sich die Frage, ob diese möglicherweise auf einer erhöhten Frequenz an IRF4<sup>+</sup> PD-L2<sup>+</sup> DCs im Tumorgewebe beruht. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurde die Frequenz an IRF4<sup>+</sup> PD-L2<sup>+</sup> DCs im Tumorgewebe bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 22 abgebildet.



**Abbildung 22: Frequenz an T<sub>H</sub>2-dirigierenden IRF4<sup>+</sup> PD-L2<sup>+</sup> Dendritischen Zellen ist in Tumoren von *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen erhöht.** Die Tumore wurden an Tag 21 isoliert, enzymatisch verdaut (siehe Kap. 2.11.1) und die resultierenden Einzelzellensuspensionen wurden wie in Kap. 2.13 beschrieben mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen die Antigene CD45, Lineage (CD3, NK1.1, B220, F4/80; CD64), MHCII, CD11c, PD-L2 und IRF4 gefärbt. **A** IRF4<sup>+</sup> PD-L2<sup>+</sup> Dendritische Zellen wurden durchflusszytometrisch folgendermaßen charakterisiert: I: lebend; II: CD45<sup>+</sup> Lineage<sup>-</sup> (Ausschluss von potentiell störenden Zelltypen) III: MHCII<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> IV: PD-L2<sup>+</sup> IRF4<sup>+</sup>. **B** Das Punktdiagramm mit  $\bar{x} \pm SD$  illustriert den prozentualen Anteil an IRF4<sup>+</sup> PD-L2<sup>+</sup> innerhalb der Population MHCII<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> DCs im Tumorgewebe aus einem repräsentativen Experiment (*Csnk2b*<sup>fl/fl</sup> (n = 5) = 14,96 ± 2,60 %; *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> (n = 5) = 27,22 ± 6,79 %; \*\*p<0,01). Jeder Datenpunkt repräsentiert die Daten einer einzelnen Maus. Nebenstehend sind für beide Maustypen repräsentative Abbildungen der durchflusszytometrischen Analyse mit der entsprechenden Prozentzahl der Zielpopulation abgebildet. **C** Das Balkendiagramm mit SEM illustriert die absolute Zahl an IRF4<sup>+</sup> PD-L2<sup>+</sup> DCs pro cm<sup>3</sup> in den Tumoren aus einem repräsentativen Experiment (*Csnk2b*<sup>fl/fl</sup> (n = 6):  $7,2 \cdot 10^3 \pm 3,2 \cdot 10^3$ ; *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> (n = 6):  $4,1 \cdot 10^4 \pm 1,1 \cdot 10^4$ , \*\*p<0,01).

Die Untersuchung der tumor-infiltrierenden DC-Subpopulationen demonstriert, dass die Frequenz an IRF4<sup>+</sup> PD-L2<sup>+</sup> DCs in den Tumoren von *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen signifikant erhöht ist. Der prozentuale Anteil dieses Subtyps an der Gesamtheit aller DCs in den Tumoren von *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen ist dabei nahezu doppelt so hoch wie in den Tumoren von wildtypischen Mäusen.

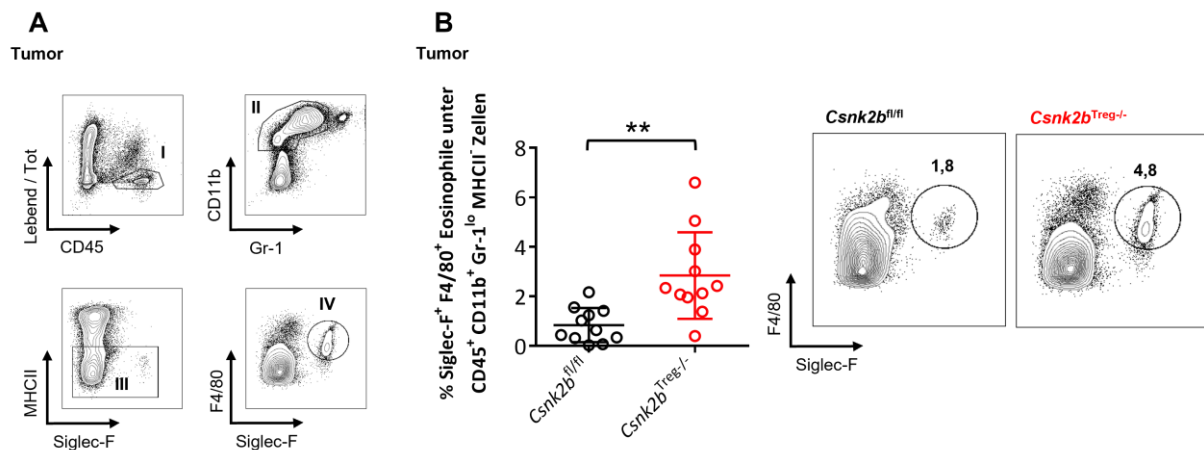
Die Beobachtungen deuten darauf hin, dass CK2-defiziente T<sub>reg</sub>-Zellen die Entwicklung bzw. den Reifeprozess von IRF4<sup>+</sup> PD-L2<sup>+</sup> DCs auch im B16F10 Melanommodell begünstigen. Der Grund hierfür, könnte die erhöhte Expression von ILT3 auf T<sub>reg</sub>-Zellen in den Tumoren von *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen sein. Diese Schlussfolgerung basiert auf den bereits erwähnten Arbeiten von Ulges et al., die zeigen konnten, dass explizit ILT3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen in der Lage sind, die Expression von IRF4 und PD-L2 in DCs zu induzieren.<sup>115</sup>

T<sub>H2</sub>-Zellen und deren assoziierte Zytokine sind nicht direkt an der Bekämpfung von Tumorzellen beteiligt. Der anti-tumorale Effekt wird vielmehr über die Rekrutierung anderer Immunzellen in das Tumorgewebe vermittelt.<sup>70</sup> Ob die erhöhte Produktion von T<sub>H2</sub>-assoziierten Zytokinen zu einer verstärkten Migration anderer Immunzellen in das Tumorgewebe führt, soll daher im nächsten Kapitel untersucht werden.

### 3.7.5 Tumore aus *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen weisen eine höhere Frequenz an Eosinophilen Granulozyten auf

Wie bereits erwähnt, wird die Rolle von T<sub>H2</sub>-Zellen bzw. T<sub>H2</sub>-assoziierten Zytokine teils kontrovers diskutiert. Einige Publikationen weisen T<sub>H2</sub>-assoziierten Zytokinen aber potente anti-tumorale Eigenschaften zu.<sup>70</sup> So wurde beschrieben, dass IL-4 die Migration von Zellen des angeborenen Immunsystems wie Eosinophile Granulozyten (im Folgenden: Eosinophile), Makrophagen oder Neutrophile Granulozyten in das Tumorgewebe fördert.<sup>71,167</sup> Hohe Konzentrationen an IL-5 sollen die Migration von Eosinophilen in die entsprechenden Gewebe verstärken, wobei dies auch für Tumorgewebe beschrieben wurde.<sup>167,168</sup> Für IL-13 wiederum wurde ein anti-tumoraler Effekt beschrieben, der auf der Rekrutierung von Makrophagen und Neutrophilen Granulozyten in das Tumorgewebe beruht.<sup>169,72</sup> Eosinophile Granulozyten (Eosinophile) gelten neben Mastzellen oder lymphoiden Zellen des angeborenen Immunsystems Typ 2 (ILC2, *Innate lymphoid cells*) als klassische Vertreter der Typ2-Immunzellen.<sup>170</sup> Eine hohe Frequenz von Eosinophilen im Tumorgewebe wird dabei in einigen Tumorarten als positiver prognostischer Marker angesehen.<sup>171</sup> Zusätzlich wurde in prä-klinischen Mausmodellen ein anti-tumoraler Effekt durch Eosinophile belegt.<sup>172</sup>

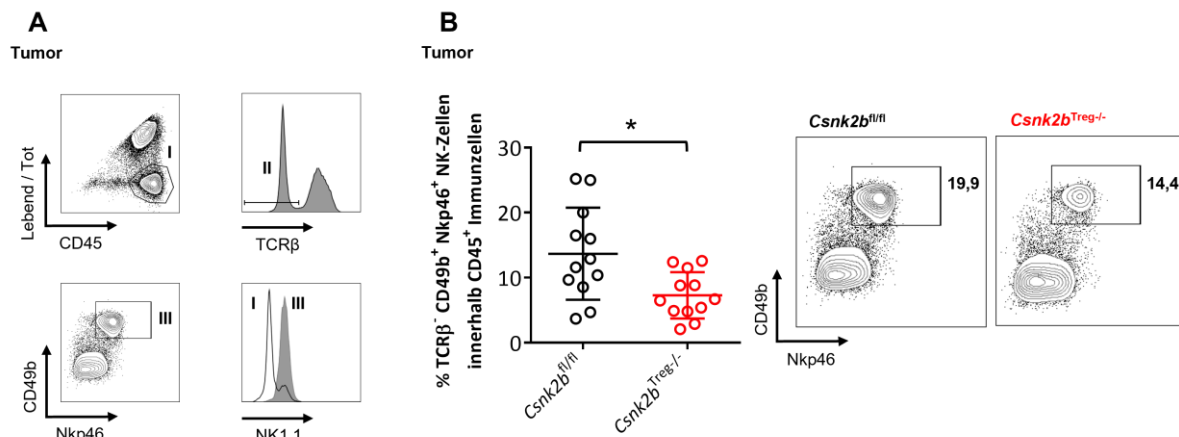
Aus diesen Gründen wurde bei der Charakterisierung der Frequenz von Typ2-Zellen des angeborenen Immunsystems der Fokus auf die Frequenz von Eosinophilen gelegt. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse sind in Abb. 23 dargestellt.



**Abbildung 23: Die Frequenz an Eosinophilen ist in Tumoren von *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen erhöht.** Die Tumore wurden an Tag 21 isoliert, enzymatisch verdaut (siehe Kap. 2.11.1) und die resultierenden Einzelzell suspensionen wurden wie in Kap. 2.13 beschrieben mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen die Antigene CD45, CD11b, GR-1, MHCII und SIGLEC-F gefärbt. **A** SIGLEC-F<sup>+</sup> Eosinophile wurden durchflusszytometrisch folgendermaßen charakterisiert: I: lebend CD45<sup>+</sup> II: CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>lo</sup>, III: MHCII<sup>-</sup> IV: F4/80<sup>+</sup> SIGLEC-F<sup>+</sup>. **B** Das Punktdiagramm mit  $\bar{x} \pm SD$  illustriert den prozentualen Anteil an SIGLEC-F<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup> Eosinophilen innerhalb CD45<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>lo</sup> MHCII<sup>-</sup> Zellen im Tumorgewebe aus zwei repräsentativen Experimenten (*Csnk2b*<sup>fl/fl</sup> (n = 11) = 0,84 ± 0,69 %; *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> (n = 11) = 2,82 ± 1,74 %; \*\*p<0,01). Jeder Datenpunkt repräsentiert die Daten einer einzelnen Maus. Nebstehend sind für beide Maustypen repräsentative Abbildungen der durchflusszytometrischen Analyse mit der entsprechenden Prozentzahl der Zielpopulation abgebildet.

Die Untersuchung zeigt, dass die Frequenz an Eosinophilen im Tumorgewebe von *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen signifikant erhöht ist. Bezogen auf die Population an CD45<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>lo</sup> MHCII<sup>-</sup> Immunzellen beträgt der prozentuale Anteil in den Tumoren von *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen durchschnittlich 2,8 % und ist damit mehr als dreimal so hoch als deren Frequenz in Tumoren von wildtypischen Mäusen.

Aufgrund der vergleichsweise hohen Frequenz an tumor-infiltrierenden T-Zellen, die Typ1-assoziierte Zytokine produzieren, und der Beobachtung, dass die Frequenz an IFN- $\gamma$ -produzierenden CD4<sup>+</sup> T<sub>konv</sub>-Zellen in den Tumoren von *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen erhöht ist, wurde auch die Frequenz von Typ1-Zellen des angeborenen Immunsystems untersucht. Ein prominenter Vertreter dieser Klasse sind natürliche Killerzellen (NK-Zellen), die positiv zur immunologischen anti-Tumorantwort beitragen können und deren Rekrutierung in das Tumorgewebe von Typ1-assoziierten Zytokinen gefördert wird.<sup>173,174</sup> Die durchflusszytometrische Analyse der Frequenz an NK-Zellen ist in Abb. 24 abgebildet.



**Abbildung 24: Die Frequenz an NK-Zellen ist in Tumoren von *Csnk2b<sup>Treg-/-</sup>* Mäusen verringert.** Die Tumore wurden an Tag 21 isoliert, enzymatisch verdaut (Kap. 2.11) und die resultierenden Einzelzellensuspensionen wurden wie in Kap. 2.13 beschrieben, mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen die Antigene CD45, TCR $\beta$ , CD49b, NKP46 und NK1.1 gefärbt. **A** NK-Zellen wurden durchflusszytometrisch folgendermaßen charakterisiert: I: lebend CD45<sup>+</sup> II: TCR $\beta$  III: CD49b<sup>+</sup> NKP46<sup>+</sup>. Um sicherzustellen, dass es sich bei den Zielzellen um NK-Zellen handelt, wurde zudem deren NK1.1-Expression überprüft (im Vergleich zu Fraktion I, der Gesamtheit an CD45<sup>+</sup> Immunzellen). Nahezu alle Zellen in Fraktion III exprimieren NK1.1. **B** Das Punktdiagramm mit  $\bar{x} \pm SD$  illustriert den prozentualen Anteil an CD49b<sup>+</sup> Nkp46<sup>+</sup> NK-Zellen innerhalb lebender CD45<sup>+</sup> Immunzellen im Tumorgewebe aus zwei repräsentativen Experimenten (*Csnk2b<sup>fl/fl</sup>* (n = 12) = 13,68  $\pm$  7,08 %; *Csnk2b<sup>Treg-/-</sup>* (n = 12) = 7,28  $\pm$  3,55 %; \*p $\leq$ 0,05). Jeder Datenpunkt repräsentiert die Daten einer einzelnen Maus. Nebenstehend sind für beide Maustypen repräsentative Abbildungen der durchflusszytometrischen Analyse mit der entsprechenden Prozentzahl der Zielpopulation abgebildet.

Die Analyse offenbart, dass die Frequenz an NK-Zellen in den Tumoren wildtypischer Mäuse signifikant erhöht ist. Dies steht in gewissem Maße im Widerspruch zum erhöhten Tumorwachstum in wildtypischen Mäusen, da wie bereits erwähnt NK-Zellen im Allgemeinen als anti-tumorale Immunzellen beschrieben werden. Es ist zu vermuten, dass die reduzierte Frequenz an NK-Zellen für das verminderte Tumorwachstum in *Csnk2b<sup>Treg-/-</sup>* Mäusen von nachrangiger Bedeutung ist. Die massive gesteigerte Migration von T<sub>konv</sub>-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen und die damit verbundene erhöhte anti-tumorale Immunantwort kompensiert bzw. überlagert möglicherweise die erniedrigte Frequenz an NK-Zellen und die damit einhergehenden negativen Auswirkungen auf das Tumorwachstum.

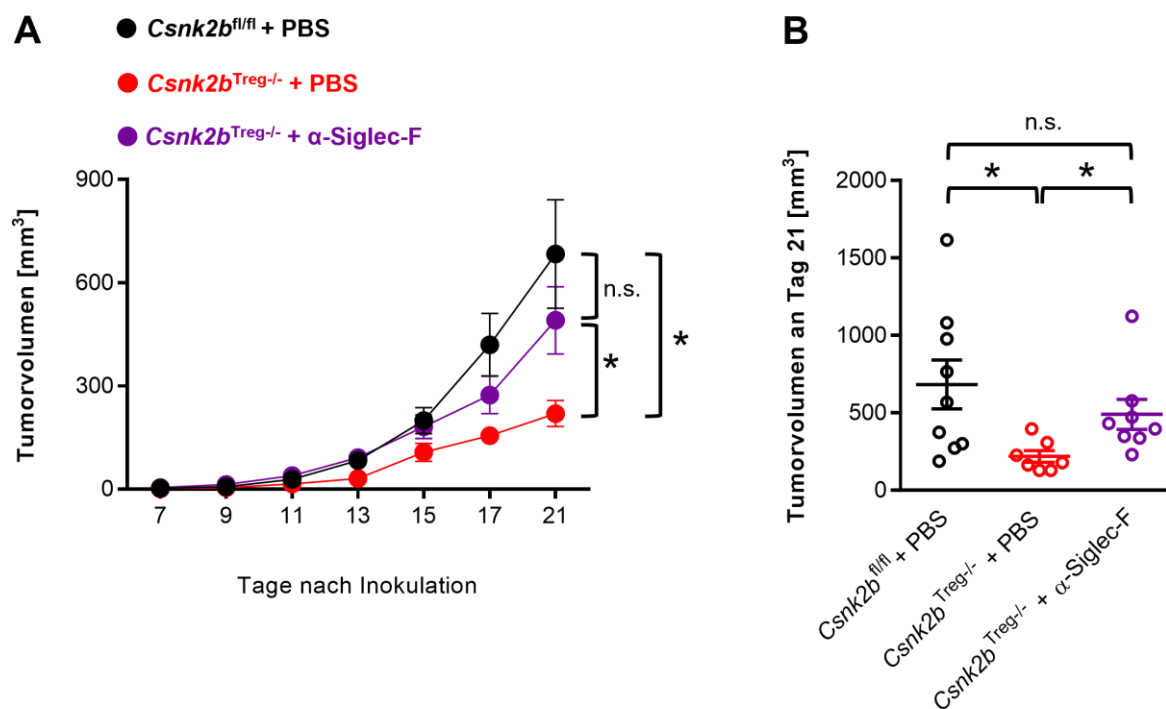
In Gänze betrachtet deuten die Ergebnisse darauf hin, dass klassische Aspekte einer Typ1-vermittelten Immunantwort nicht bzw. nur in geringem Ausmaß von der T<sub>reg</sub>-spezifischen Depletion der CK2 beeinflusst werden. Im Gegensatz dazu können zahlreiche Merkmale einer gesteigerten Typ2-vermittelten Immunantwort beobachtet werden. Dazu zählt ein erhöhter prozentualer Anteil IRF4<sup>+</sup> PD-L2<sup>+</sup> DCs in den Tumoren von *Csnk2b<sup>Treg-/-</sup>* Mäusen, da dieser DC-Subtyp die Differenzierung von T<sub>H2</sub>-Zellen fördert. Korrespondierend zu dieser Beobachtung konnten erhöhte Frequenzen an GATA3-exprimierenden T<sub>H2</sub>-Zellen und damit verbunden eine erhöhte Produktion von T<sub>H2</sub>-assoziierten Zytokinen detektiert werden. Die erhöhten Konzentrationen T<sub>H2</sub>-assoziiierter Zytokine sind möglicherweise der Grund für die erhöhte Infiltration von Eosinophilen in die Tumore von *Csnk2b<sup>Treg-/-</sup>* Mäusen. In humanen Studien zur Überlebensrate im malignen Melanom und Kolonkarzinom wurde nachgewiesen, dass Eosinophile einen positiven prognostischen Marker darstellen.<sup>175,176</sup> Zusätzlich

konnten in prä-klinischen Mausmodellen anti-tumorale Eigenschaften von Eosinophilen beobachtet werden.<sup>171</sup> Aus diesen Gründen sollte im Folgenden die Bedeutung von Eosinophilen für das reduzierte Tumorwachstum in *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen näher untersucht werden.

### 3.7.6 Eosinophile Granulozyten sind essenziell für das verminderte Tumorwachstum in *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen

Wie bereits erwähnt, können anti-tumorale Eigenschaften durch Eosinophile vermittelt werden. Mehrere Merkmale von Eosinophilen tragen zu deren anti-tumoralen Eigenschaften bei. Dazu zählen direkte zytotoxische Eigenschaften, aber auch indirekte Effekte wie die Normalisierung der tumorversorgenden Blutgefäße und der damit verbundenen erhöhten Migration von CD8<sup>+</sup> T-Zellen in das Tumorgewebe.<sup>177,172</sup> Im nächsten Schritt dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, ob die erhöhte Frequenz an Eosinophilen einen entscheidenden Einfluss auf das verminderte Tumorwachstum in *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen hat. Dazu wurden, im Rahmen des bereits beschriebenen B16F10 Melanommodells (Kap. 2.10), *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäuse mit einem  $\alpha$ -SIGLEC-F (*Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin F*) Antikörper behandelt (Kap. 2.10.4). Eosinophile exprimieren das Oberflächenprotein SIGLEC-F, das als charakteristischer Marker für Eosinophile gilt.<sup>178</sup> Eine starke Aktivierung dieses Oberflächenrezeptors führt zu einem Apoptose-induzierten Zelltod, sodass sich ein  $\alpha$ -SIGLEC-F Antikörper zur selektiven Depletion von Eosinophilen eignet.<sup>179</sup> Bei diesem Experiment wurde auf die Behandlung von wildtypischen *Csnk2b*<sup>fl/fl</sup> Mäusen verzichtet. Der anti-tumorale Effekt von  $\alpha$ -SIGLEC-F auf das Tumorwachstum in wildtypischen Mäusen in einem B16F10 Melanommodell wurde in Studien von Carratero et al. bereits ausführlich beschrieben.<sup>172</sup> Die Auswirkungen der Depletion von Eosinophilen auf das Tumorwachstum in *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen sind in Abb. 25 einzusehen.



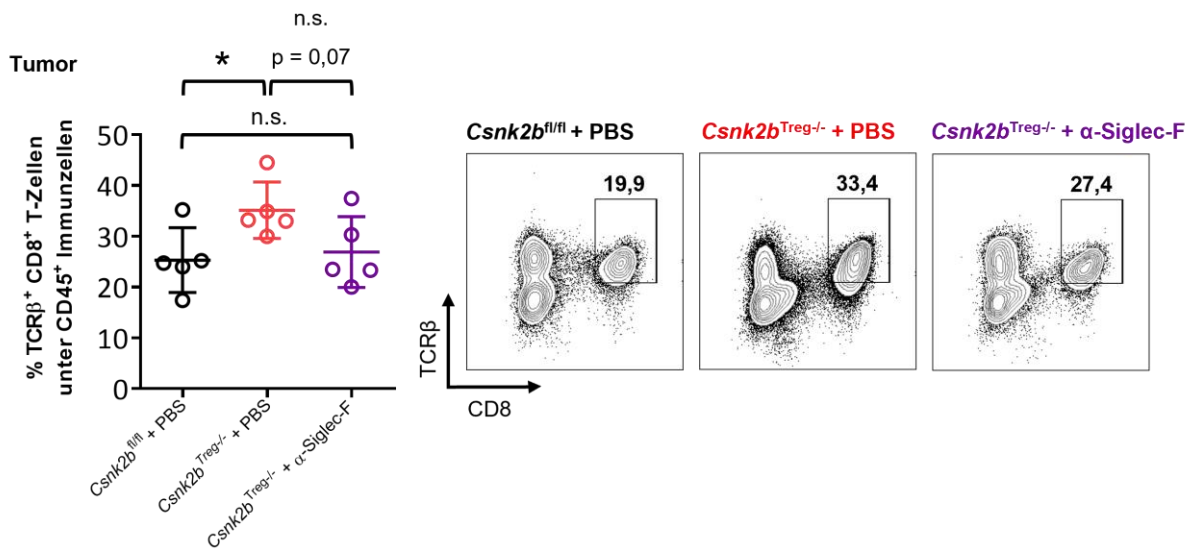


**Abbildung 25: Die selektive Depletion von Eosinophilen im B16F10 Melanommodell erhöht das Tumorwachstum in *Csnk2b<sup>Treg-/-</sup>* Mäusen signifikant.**  $2 \times 10^5$  B16F10 Melanomzellen wurden *s.c.* in die rechte Flanke von *Csnk2b<sup>fl/fl</sup>* Kontrollmäusen und transgenen *Csnk2b<sup>Treg-/-</sup>* Mäusen injiziert. An Tag 7, 10, 14 und 17 wurde *Csnk2b<sup>Treg-/-</sup>* Mäusen  $15 \mu\text{g}$   $\alpha$ -SIGLEC-F (238047; R&D Systems) i.p. injiziert (violett). Den Kontrollgruppen (schwarz: *Csnk2b<sup>fl/fl</sup>* + PBS, rot: *Csnk2b<sup>Treg-/-</sup>* + PBS) wurden  $100 \mu\text{l}$  des Lösungsmittels PBS i.p. injiziert. Ab Tag 7 nach der Inokulation, wurde das Tumorwachstum alle zwei Tage mit einer Schieblehre in zwei Dimensionen gemessen. Das Tumorvolumen wurde mit nachfolgender Formel berechnet:  $\text{Breite}^2 \times \text{Länge} \times 0,5$ . **A** Verlauf des Tumorwachstums mit  $\bar{x} \pm SEM$  aus Daten eines repräsentativen Experiments ( $n(\text{Csnk2b}^{\text{fl/fl}} + \text{PBS}) = 9$ ,  $n(\text{Csnk2b}^{\text{Treg-/-}} + \text{PBS}) = 7$ ;  $n(\text{Csnk2b}^{\text{Treg-/-}} + \alpha\text{-SIGLEC-F}) = 8$ ;  $*p \leq 0,05$ ;  $n.s.p \geq 0,05$ ). **B** Punktdiagramm mit  $\bar{x} \pm SEM$  illustriert das mittlere Tumorvolumen an Tag 21 (*Csnk2b<sup>fl/fl</sup>* + PBS =  $683 \pm 157 \text{ mm}^3$ ; *Csnk2b<sup>Treg-/-</sup>* =  $219 \pm 37 \text{ mm}^3$ ; *Csnk2b<sup>Treg-/-</sup>* +  $\alpha$ -SIGLEC-F =  $490 \pm 97$ ;  $*p \leq 0,05$ ;  $n.s.p \geq 0,05$ ). Jeder Datenpunkt repräsentiert dabei die Daten einer einzelnen Maus.

In Abb. 25 ist zu erkennen, dass in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus Kap. 3.3 die  $T_{\text{reg}}$ -spezifische Depletion der CK2 zu einem verlangsamten Tumorwachstum führt. Dieser Effekt wird durch die Depletion von Eosinophilen teilweise wieder aufgehoben. Im Vergleich zu unbehandelten *Csnk2b<sup>Treg-/-</sup>* Mäusen ( $219 \text{ mm}^3$ ) ist die durchschnittliche Tumorgöße (Tag 21)  $\alpha$ -SIGLEC-F-behandelter *Csnk2b<sup>Treg-/-</sup>* Mäuse ( $490 \text{ mm}^3$ ) um mehr als den Faktor 2 erhöht. Betrachtet man die Tumorgöße wildtypischer Mäuse ( $683 \text{ mm}^3$ ), so ist diese im Vergleich zu  $\alpha$ -SIGLEC-F-behandelten *Csnk2b<sup>Treg-/-</sup>* Mäusen erhöht, allerdings ist dieser Unterschied nicht signifikant.

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass Eosinophile bedeutsam für das erniedrigte Tumorwachstum in *Csnk2b<sup>Treg-/-</sup>* Mäuse sind. Dass hierfür direkte zytotoxische Eigenschaften von Eosinophilen verantwortlich sind, ist eher unwahrscheinlich. Dagegen spricht der niedrige prozentuale Anteil an Eosinophilen an der Gesamtheit aller tumor-infiltrierenden Immunzellen. Bedeutender scheinen in diesem Zusammenhang indirekte Effekte wie die Normalisierung der tumorversorgenden Blutgefäße und der damit verbundenen erhöhten Migration von  $\text{CD8}^+$  T-Zellen in das Tumorgewebe zu

sein.<sup>177,172</sup> In Kap. 3.6 wurde beschrieben, dass die Frequenz an CD8<sup>+</sup> T-Zellen in den Tumoren von *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen stark erhöht ist. Daraus resultiert die Frage, ob durch die Depletion von Eosinophilen die Infiltration von CD8<sup>+</sup> T-Zellen in den Tumoren von *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen verringert wird. Deshalb wurde die Frequenz an CD8<sup>+</sup> T-Zellen in den Tumoren von  $\alpha$ -SIGLEC-F behandelten *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen, unbehandelten *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen und wildtypischen *Csnk2b*<sup>fl/fl</sup> Mäusen untersucht. Die Ergebnisse der Analyse sind in Abb. 26 dargestellt.



**Abbildung 26: Die selektive Depletion von Eosinophilen reduziert die Frequenz an CD8<sup>+</sup> T-Zellen in den Tumoren von *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen.** Die Tumore wurden an Tag 21 isoliert, enzymatisch verdaut (Kap. 2.11.1) und die resultierenden Einzelzelluspensionen wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen die Antigene CD45, TCRβ und CD8 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (Kap. 2.13). A Das Punktdiagramm mit  $\bar{x} \pm SD$  illustriert den prozentualen Anteil an TCRβ<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen innerhalb CD45<sup>+</sup> Immunzellen im Tumorgewebe aus einem repräsentativen Experiment (*Csnk2b*<sup>fl/fl</sup> + PBS (n = 5) = 25,30 ± 6,37 %; *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> + PBS (n = 5) = 35,12 ± 5,53 %; *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> +  $\alpha$ -SIGLEC-F (n = 5) = 26,90 ± 6,93 % \*p < 0,05; n.s. p ≥ 0,05). Jeder Datenpunkt repräsentiert die Daten einer einzelnen Maus. Nebenstehend sind für beide Maustypen repräsentative Abbildungen der durchflusszytometrischen Analyse mit der entsprechenden Prozentzahl der Zielpopulation abgebildet.

Die Analyse der CD8<sup>+</sup> T-Zellfrequenz offenbart, dass die Depletion von Eosinophilen in *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen zu einer leichten Reduktion der Frequenz an tumor-infiltrierenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen führt. Der prozentuale Anteil an CD8<sup>+</sup> T-Zellen in den Tumoren von  $\alpha$ -SIGLEC-F-behandelten *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen bewegt sich dabei in der Größenordnung wildtypischer Mäuse, die im Vergleich zu unbehandelten *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen eine signifikant niedrigere Frequenz an CD8<sup>+</sup> T-Zellen in ihren Tumoren zeigen.

Basierend auf den Ergebnissen dieses Kapitels sind Eosinophile bedeutsam für das verminderte Tumorwachstum in *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen. Die Depletion von Eosinophilen in *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen hat zur Konsequenz, dass im Vergleich zu unbehandelten *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> das Tumorwachstum signifikant

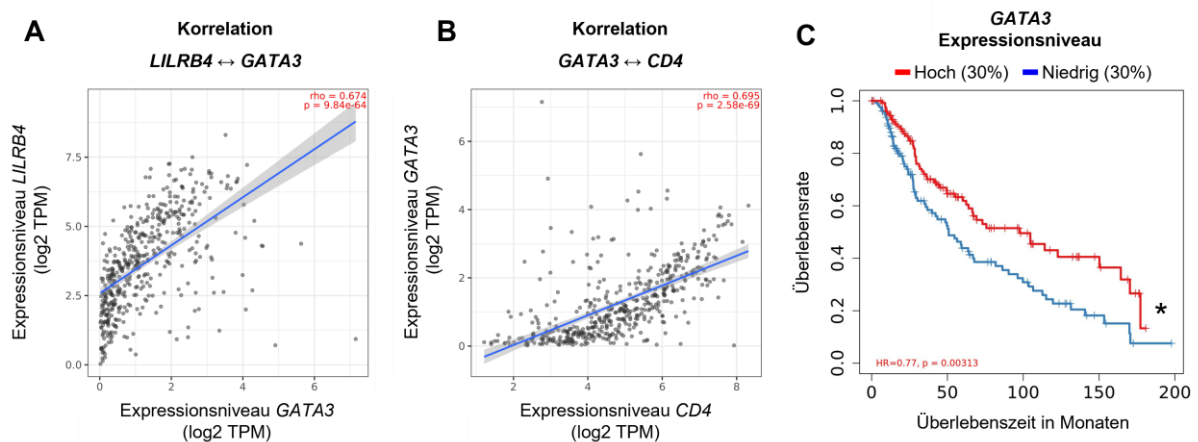
erhöht ist. Als Folge der Depletion von Eosinophilen kann zusätzlich eine Reduzierung der Frequenz an CD8<sup>+</sup> T-Zellen beobachtet werden, wobei zu erwähnen ist, dass der Unterschied in Anbetracht der aktuellen Datenlage statistisch nicht signifikant ist.

### 3.8 Eine hohe Expression charakteristischer Marker von Typ2-Immunzellen scheint sich positiv auf den Krankheitsverlauf beim humanen malignen Melanom auszuwirken

In den vorherigen Kapiteln konnte festgestellt werden, dass das verminderte Tumorwachstum in *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen durch Typ2-Immunzellen vermittelt wird. Im nächsten Schritt dieser Arbeit soll daher untersucht werden, ob Parallelen zwischen den Erkenntnissen aus dem prä-klinischen B16F10 Melanommodell und humanen Melanombiopsien zu beobachten sind. Dafür wurde die internetgestützte Analyseplattform TIMER verwendet (Kap. 2.15). Der Fokus der Analyse lag dabei auf der Expression von Oberflächenproteinen bzw. deren codierenden Genen, die charakteristische Marker für Typ2-Immunzellen darstellen, bei denen im B16F10 Melanommodell Unterschiede in der Frequenz zwischen *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen und wildtypischen Mäusen zu detektieren sind. Dabei ist zu betonen, dass die Genexpression der charakteristischen Zellmarker als Surrogat-Marker für die Präsenz entsprechender Typ2-Immunzellen gewertet wurde. Die Expression der entsprechenden Gene wurde anschließend verglichen, um festzustellen, ob Korrelationen zwischen der Genexpression bestimmter Marker von Typ2-Immunzellen in den Tumorbiopsien bestehen. Daraus sollen Rückschlüsse gezogen werden, ob eine erhöhte Frequenz eines Zelltyps möglicherweise die Frequenz eines anderen Zelltyps bedingt. Zusätzlich wurde untersucht, ob die Expression charakteristischer Marker von Typ2-Immunzellen mit einer höheren Überlebensrate in Verbindung steht.

In Kap. 3.2 konnte bereits festgestellt werden, dass die Expression von *LILRB4* (codiert für ILT3) und *FOXP3* in humanen Melanombiopsien stark korreliert und eine hohe *LILRB4*-Expression mit einer höheren Überlebensrate einhergeht. Im murinen B16F10 Melanommodell konnten in *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen ebenfalls Zusammenhänge zwischen einer erhöhten Frequenz an ILT3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen und einem geringeren Tumorwachstum hergestellt werden (Kap. 3.3 und 3.4). Eine mögliche Folge der T<sub>reg</sub>-spezifischen Depletion der CK2 und der darauf basierenden erhöhten Frequenz an ILT3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen ist eine erhöhte Frequenz an tumor-infiltrierenden GATA3<sup>+</sup> T<sub>konv</sub>-Zellen, da CK2-defiziente T<sub>reg</sub>-Zellen bzw. ILT3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen nicht in der Lage sind, die Differenzierung von T<sub>H2</sub> Zellen zu supprimieren.<sup>115</sup> Um mögliche Parallelen in humanen Melanombiopsien aufzuklären, wurden Korrelationsanalysen hinsichtlich der Genexpression von *LILRB4* (codiert für ILT3) und *GATA3* (Haupttranskriptionsfaktor von T<sub>H2</sub>-Zellen) durchgeführt. Die Expression von *GATA3* und *CD4* wurde dabei als Surrogat-Marker für die Präsenz GATA3-exprimierender T<sub>H2</sub>-Zellen in den humanen Tumorbiopsien gewertet.

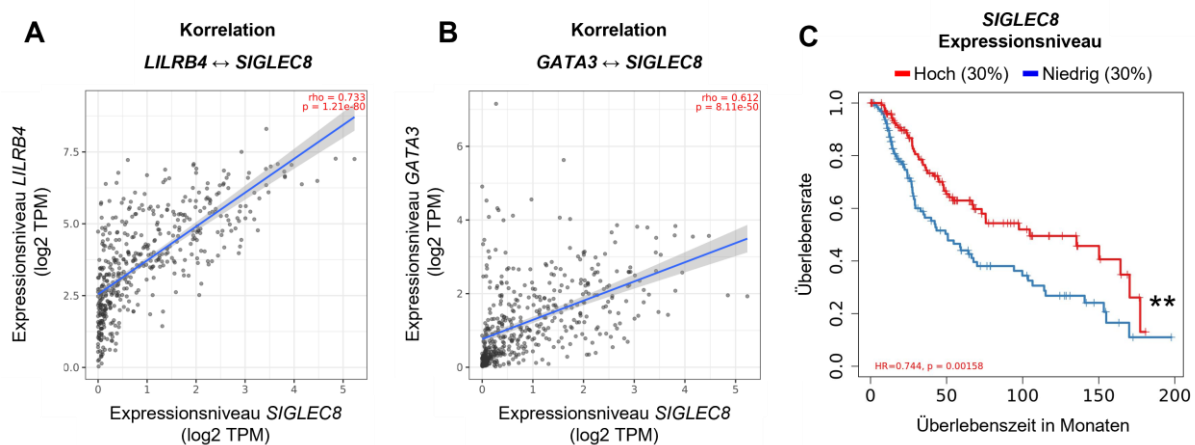
Zusätzlich wurde der Einfluss einer hohen *GATA3*-Expression auf die Überlebensrate untersucht. Die Ergebnisse der Analyse sind in Abb. 27 dargestellt.



**Abbildung 27: In humanen Melanombiopsien korreliert die Expression von *LILRB4* mit dem  $T_H2$ -Marker *GATA3*, der mit einer höheren Überlebensrate korrelieren.** Die Daten wurden mit der internetgestützten Analyseplattform TIMER2.0 erhoben. **A** Das Streudiagramm visualisiert die Korrelationsanalyse zwischen der *LILRB4*- und *GATA3*-Expression in humanen malignen Melanombiopsien ( $n = 471$ ). Die statistischen Kenndaten lauten:  $\rho$  (Spearman-Korrelationskoeffizient) = 0,674; statistische Signifikanz  $***p \leq 0,001$ . **B** Das Streudiagramm visualisiert die Korrelationsanalyse zwischen der *GATA3*- und *CD4*-Expression in humanen malignen Melanombiopsien ( $n = 471$ ). Die statistischen Kenndaten lauten:  $\rho$  (Spearman-Korrelationskoeffizient) = 0,695; statistische Signifikanz  $***p \leq 0,001$ . **C** Die Kaplan-Meier-Kurve zeigt den Zusammenhang der gesamten *GATA3*-Expression mit der Überlebensrate im humanen malignen Melanom (SKCM = *skin cutaneous melanoma*). Die Daten basieren auf Tumorbiopsien von 471 Patienten, wobei in dieser Grafik die Überlebensrate von jeweils 30 % der Patienten mit der höchsten (rot) bzw. niedrigsten (blau) *GATA3*-Expression verglichen wird. Die wichtigsten statistischen Kenndaten auf Basis des Cox-Regressionsmodells lauten: HR (Hazard ratio) = 0,77; statistische Signifikanz  $*p \leq 0,05$ .

Aus Abb. 27A ist ersichtlich, dass in humanen Melanombiopsien eine ausgeprägte positive Korrelation, zwischen der *LILRB4*- und der *GATA3*-Expression besteht. So lässt sich bei einer erhöhten *LILRB4*-Genexpression eine gleichfalls erhöhte Expression von *GATA3* feststellen. Zusätzlich ist eine ausgeprägt positive Korrelation zwischen der *GATA3*- und *CD4*-Expression zu beobachten (Abb. 27B). Die Expression von *CD4* ist kein exklusiver Marker von T-Zellen, da es auch von anderen Zellen des Immunsystems exprimiert wird. Um zusätzliche Hinweise zu generieren, dass es sich bei den *GATA3*-exprimierenden Zellen in den Tumorbiopsien um  $CD4^+$  T-Zellen handelt, wurden zusätzliche Korrelationsanalysen der Genexpression von *CD4* bzw. *GATA3* und *CD3E* durchgeführt. Die Expression der untersuchten Gene korrelierte dabei sehr stark ( $CD4 \leftrightarrow CD3E$  cor = 0,84;  $***p \leq 0,001$ ;  $GATA3 \leftrightarrow CD3E$  cor = 0,80;  $***p \leq 0,001$ ). In Kombination mit den Ergebnissen aus Kap. 3.2 unterstützen diese Beobachtungen die Hypothese, dass auch im humanen malignen Melanom hohe Frequenzen an  $ILT3^+$   $T_{reg}$ -Zellen die Differenzierung und damit auch die Frequenz von  $T_H2$ -Zellen begünstigen. Darüber hinaus zeigt die Überlebenszeitanalyse, dass eine hohe *GATA3*-Expression mit einer höheren Überlebensrate korreliert. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob im humanen Melanom zudem ein Zusammenhang zwischen der Frequenz an  $ILT3^+$   $T_{reg}$ -Zellen,  $T_H2$ -Zellen und Eosinophilen besteht. Dazu wurden wiederum Korrelationsanalysen zwischen der Expression der Gene

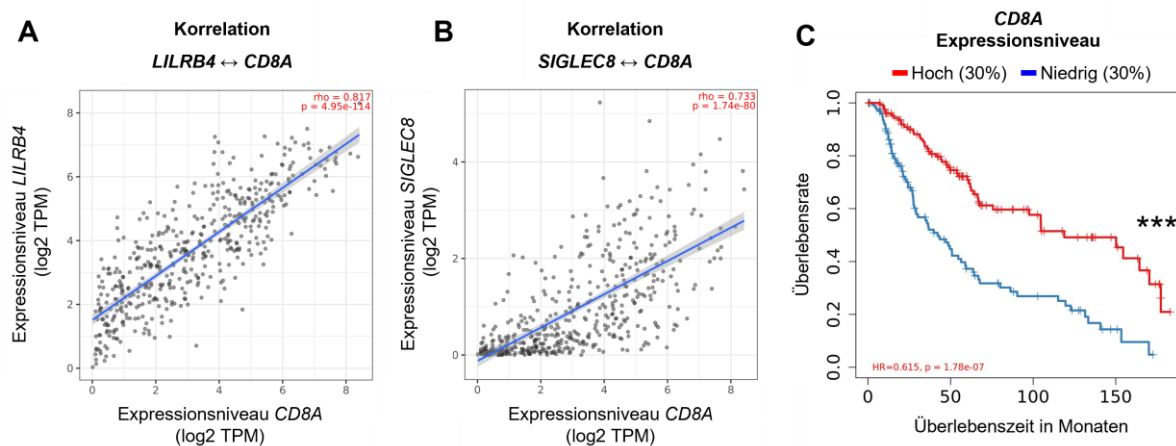
*LILRB4*, *GATA3* und *SIGLEC8* (*Sialic Acid Binding Ig Like Lectin 8*) durchgeführt. Die Genexpression wird dabei als Surrogat-Marker für die Präsenz der entsprechenden Immunzellen innerhalb der humanen Tumorbiospien angesehen. *SIGLEC8* codiert dabei für das gleichnamige Oberflächenprotein, dass das humane Gegenstück zum murinen Marker für Eosinophile (*SIGLEC-F*) darstellt.<sup>180</sup> Die Ergebnisse der Analyse sind in Abb. 28 dargestellt.



**Abbildung 28: In humanen Melanombiospien korreliert die Expression von *LILRB4* mit dem humanen Marker für Eosinophile *SIGLEC8*, der mit einer höheren Überlebensrate korreliert.** Die Daten wurden mit der internetgestützten Analyseplattform TIMER2.0 erhoben. **A** Das Streudiagramm visualisiert die Korrelationsanalyse zwischen der *LILRB4*- (als Marker für  $ILT3^+$   $T_{reg}$ -Zellen) und *SIGLEC8*-Expression (als Marker für Eosinophile) in humanen malignen Melanombiospien ( $n = 471$ ). Die statistischen Kenndaten lauten:  $\rho$  (Spearman-Korrelationskoeffizient) = 0,733; statistische Signifikanz  $***p \leq 0,001$ . **B** Das Streudiagramm visualisiert die Korrelationsanalyse zwischen der *GATA3*- (als Marker für  $T_H2$  Zellen) und *SIGLEC8*-Expression in humanen malignen Melanombiospien ( $n = 471$ ). Die statistischen Kenndaten lauten:  $\rho$  (Spearman-Korrelationskoeffizient) = 0,612; statistische Signifikanz  $***p \leq 0,001$ . **C** Die Kaplan-Meier-Kurve zeigt den Zusammenhang der gesamten *SIGLEC8*-Expression mit der Überlebensrate im humanen malignen Melanom (SKCM = *skin cutaneous melanoma*). Die Daten basieren auf Tumorbiospien von 471 Patienten, wobei in dieser Grafik die Überlebensrate von jeweils 30 % der Patienten mit der höchsten (rot) bzw. niedrigsten (blau) *SIGLEC8*-Expression verglichen wird. Die wichtigsten statistischen Kenndaten auf Basis des Cox-Regressionsmodells lauten: HR (Hazard ratio) = 0,744; statistische Signifikanz  $**p \leq 0,01$ .

Aus Abb. 28A geht hervor, dass in humanen Melanombiospien ein starker Zusammenhang zwischen der *LILRB4*- und *SIGLEC8*-Expression besteht. Ergänzend kann eine ausgeprägte Korrelation zwischen der Expression von *GATA3* und *SIGLEC8* beobachtet werden (Abb. 28B). Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass im humanen Melanom eine hohe Infiltration von  $ILT3^+$   $T_{reg}$ -Zellen und damit verbunden eine hohe Frequenz an  $GATA3^+$   $T_H2$ -Zellen die Migration von Eosinophilen in das Tumorgewebe begünstigt. Eine hohe Expression von *SIGLEC8* und darauf basierend eine starke Infiltration an Eosinophilen haben darüber hinaus einen signifikant positiven Einfluss auf die Überlebensrate von Melanompatienten (Abb. 28C). Die Ergebnisse dieser Analyse gehen erneut konform mit den Daten aus dem murinen B16F10 Melanommodell. Auch hier zeigt sich eine signifikant erhöhte Frequenz an Eosinophilen in den Tumoren von *Csnk2b* <sup>$T_{reg}^{-/-}$</sup>  Mäusen (Kap. 3.7.5), die von immenser Bedeutung für das verminderte Tumorstadium sind (Kap. 3.7.6). Wie bereits erwähnt, besteht ein wesentlicher anti-tumoraler Effekt von Eosinophilen darin, dass sie die Migration von  $CD8^+$  T-Zellen in das Tumorgewebe fördern.<sup>172</sup> Auf dieser Grundlage sollte in weiteren

Genkorrelationsanalysen untersucht werden, ob auch im humanen malignen Melanom Zusammenhänge zwischen der Frequenz beider Zelltypen bestehen. Ergänzend wurde analysiert, ob auch  $ILT3^+$   $T_{reg}$ -Zellen möglicherweise einen Einfluss auf die Gegenwart von tumor-infiltrierenden  $CD8^+$  T-Zellen besitzen. Die Analyse der Daten ist in Abb. 29 einzusehen.



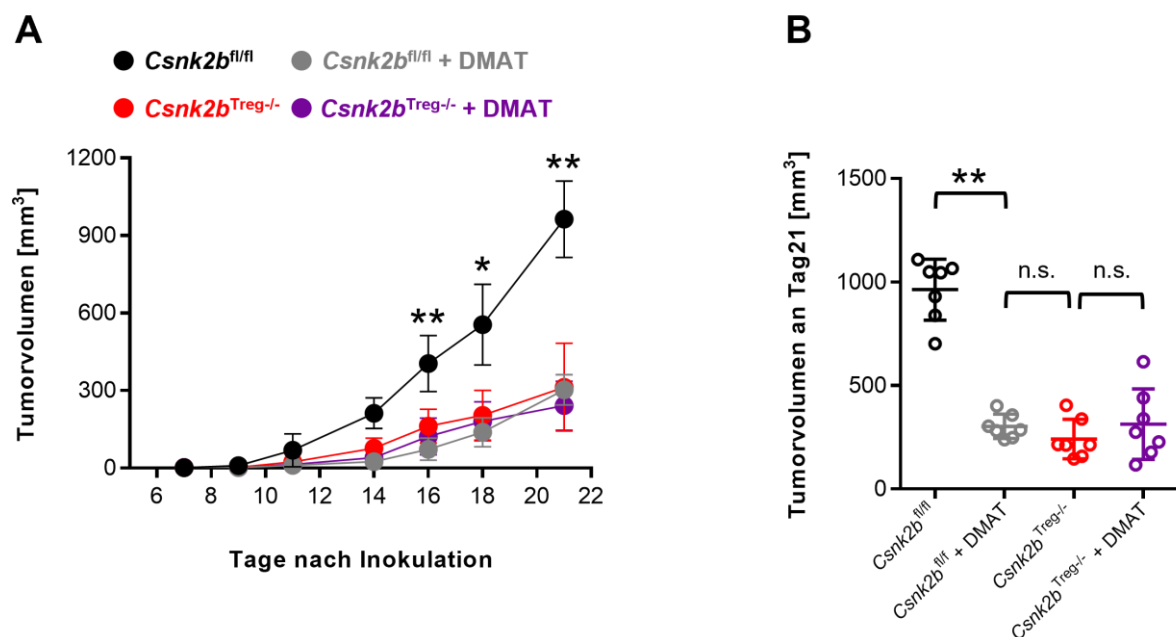
**Abbildung 29: In humanen Melanombiopsien korreliert die Expression von *LILRB4* mit dem humanen T-Zellmarker *CD8A*, der mit einer höheren korreliert.** Die Daten wurden mit der internetgestützten Analyseplattform TIMER2.0 erhoben. **A** Das Streudiagramm visualisiert die Korrelationsanalyse zwischen der *LILRB4*- und *CD8A*-Expression in humanen malignen Melanombiopsien ( $n = 471$ ). Die statistischen Kenndaten lauten:  $\rho$  (Spearman-Korrelationskoeffizient) = 0,817; statistische Signifikanz  $***p \leq 0,001$ . **B** Das Streudiagramm visualisiert die Korrelationsanalyse zwischen der *SIGLEC8*- und *CD8A*-Expression in humanen malignen Melanombiopsien ( $n = 471$ ). Die statistischen Kenndaten lauten:  $\rho$  (Spearman-Korrelationskoeffizient) = 0,733; statistische Signifikanz  $***p \leq 0,001$ . **C** Die Kaplan-Meier-Kurve zeigt den Zusammenhang der gesamten *CD8A*-Expression mit der Überlebensrate im humanen malignen Melanom (SKCM = *skin cutaneous melanoma*). Die Daten basieren auf Tumorbiopsien von 471 Patienten, wobei in dieser Grafik die Überlebensrate von jeweils 30 % der Patienten mit der höchsten (rot) bzw. niedrigsten (blau) *CD8A*-Expression verglichen wird. Die wichtigsten statistischen Kenndaten auf Basis des Cox-Regressionsmodells lauten: HR (Hazard ratio) = 0,62; statistische Signifikanz  $***p \leq 0,001$ .

Abb. 29A zeigt, dass eine sehr starke Korrelation zwischen der Expression von *LILRB4* und *CD8A* besteht. Wie auch bei *CD4* ist die Expression von *CD8A* kein Alleinstellungsmerkmal von T-Zellen. Um Anhaltspunkte zu generieren, ob im humanen Melanom *CD8A* vorwiegend von T-Zellen exprimiert wird, wurde wiederum eine Korrelationsanalyse mit *CD3E* durchgeführt, wobei ein sehr starker Zusammenhang detektiert werden konnte ( $cor = 0,93$ ;  $***p \leq 0,001$ ). Aus Abb. 29B ist ersichtlich, dass auch die Genexpression von *SIGLEC8* mit der *CD8A*-Expression stark korreliert, wobei deren hohe Expression wiederum einen positiven Einfluss auf die Überlebensrate besitzt (Abb. 29C).  $CD8^+$  T-Zellen gelten als eine der wichtigsten Effektorzellen in der Tumorummunologie.<sup>151</sup> Aus der gegenseitigen Korrelation der Genexpression von *LILRB4*, *SIGLEC8* und *CD8A* wird die Hypothese untermauert, dass im humanen Melanom die Präsenz von  $CD8^+$  T-Zellen im Tumorgewebe durch  $ILT3^+$   $T_{reg}$ -Zellen und Eosinophile positiv beeinflusst wird. Wiederum decken sich die Beobachtungen mit den Ergebnissen aus dem prä-klinischen B16F10 Melanommodell. In diesem zeigen *Csnk2b* <sup>$T_{reg}/-$</sup>  Mäuse ein geringeres Tumorstadium, einhergehend mit einer erhöhten Frequenz an  $ILT3^+$   $T_{reg}$ -Zellen und Eosinophilen. Dies führt zu einer erhöhten Infiltration tumor-reaktiver  $CD8^+$  T-Zellen, die wiederum das Wachstum des Tumors eindämmen. Die weitreichenden Parallelen zwischen vorteilhaften

Immuninfiltraten in Tumoren von *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup>-Mäusen im prä-klinischen B16F10 Melanommodell und humanen Melanombiopsien untermauern die Bedeutung funktioneller T<sub>reg</sub>-Zellen für die Tumorprotektion. Zudem offenbaren sie das Potenzial der klinischen Anwendung von CK2-Inhibitoren, um die Funktion von T<sub>reg</sub>-Zellen im Sinne einer effektiven Behandlung des humanen Melanoms zu manipulieren. Aufgrund dessen wurden im Folgenden die Auswirkungen der pharmakologischen CK2-Inhibition auf das Tumorstadium im B16F10 Melanommodell und speziell auf T<sub>reg</sub>-Zellen untersucht.

### 3.9 Die pharmakologische Inhibition der CK2 führt zu einem verringerten Tumorwachstum im B16F10 Melanommodell

In den vorherigen Kapiteln konnte veranschaulicht werden, dass im präklinischen B16F10 Melanommodell eine T<sub>reg</sub>-spezifische Depletion der CK2 zu einem verringerten Tumorwachstum führt. Zusätzlich konnten Parallelen zwischen der Immunantwort bzw. den Immuninfiltraten im murinen B16F10 Melanommodell und humanen Melanombiopsien beobachtet werden. Daraus resultiert die Frage, inwieweit die pharmakologische Inhibition der CK2 in T<sub>reg</sub>-Zellen das Tumorwachstum beeinflusst. Um diese Fragestellungen zu beantworten, wurden im Rahmen des beschriebenen B16F10 Melanommodells (Kap. 2.10) *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> und wildtypische Mäuse mit dem pharmakologischen CK2-Inhibitor DMAT (2-Dimethylamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-Benzimidazol) behandelt. Dessen Wirksamkeit auf die CK2 in Immunzellen wurde bereits *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen.<sup>115,134</sup> Die Auswirkungen der pharmakologischen Inhibition der CK2 auf das Tumorwachstum sind in Abb. 30 zu sehen.

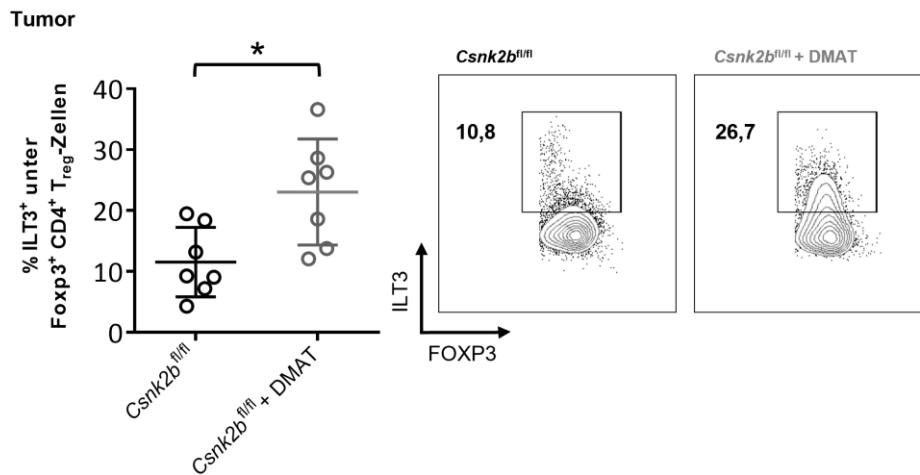


**Abbildung 30: Die pharmakologische Inhibition der CK2 verringert im B16F10 Melanommodell das Tumorwachstum signifikant.**  $2 \times 10^5$  B16F10 Melanomzellen wurden *s.c.* in die rechte Flanke von *Csnk2b*<sup>fl/fl</sup> Kontrollmäusen und transgenen *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen injiziert. An Tag 9, 11, 14, 17 und 20 wurde *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> (violett) und *Csnk2b*<sup>fl/fl</sup>-Mäusen 10 mg/kg Körpergewicht DMAT (gelöst in DMSO/Ethanol; V = 100µl) *s.c.* neben den Tumor injiziert. Den Kontrollgruppen (schwarz: *Csnk2b*<sup>fl/fl</sup>, rot: *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> + PBS) wurden 100 µl des Lösungsmittels *s.c.* injiziert. Ab Tag 7 nach der Inokulation wurde das Tumorwachstum alle zwei Tage mit einer Schieblehre in zwei Dimensionen gemessen. Das Tumolvolumen wurde mit nachfolgender Formel berechnet:  $Breite^2 \times Länge \times 0,5$ . **A** Verlauf des Tumorwachstums mit  $\bar{x} \pm SEM$  aus Daten eines repräsentativen Experiments (alle Gruppen n = 7; \*p < 0,05; \*\*p < 0,01). **B** Punktdiagramm mit  $\bar{x} \pm SEM$  illustriert das mittlere Tumolvolumen an Tag 21 (*Csnk2b*<sup>fl/fl</sup> =  $1045 \pm 147$  mm<sup>3</sup>; *Csnk2b*<sup>fl/fl</sup> + DMAT =  $303 \pm 58,55$  mm<sup>3</sup>; *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> =  $241,5 \pm 94$  mm<sup>3</sup>; *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> + DMAT =  $313 \pm 170$ ; \*\*p < 0,01; n.s. p > 0,05). Jeder Datenpunkt repräsentiert dabei die Daten einer einzelnen Maus.



Die Analyse des Tumorwachstums verdeutlicht, dass die pharmakologische Inhibition einen reduzierenden Einfluss auf den Verlauf des Tumorwachstums besitzt (Abb. 30A). So kann bereits an Tag 14 eine signifikante Reduktion des Tumolvolumens aufgrund der Behandlung mit dem CK2-Inhibitor DMAT beobachtet werden. Abschließend (Tag 21) unterscheiden sich die Tumorgößen von DMAT-behandelten *Csnk2b<sup>fl/fl</sup>* Mäusen im Vergleich zu unbehandelten wildtypischen Mäusen um den Faktor 3, wobei das Tumolvolumen von DMAT-behandelten wildtypischen *Csnk2b<sup>fl/fl</sup>* Mäusen vergleichbar mit dem Tumolvolumen von unbehandelten transgenen *Csnk2b<sup>Treg-/-</sup>* Mäusen ist (Abb. 30B). Zwischen den Tumorumfängen von behandelten und unbehandelten *Csnk2b<sup>Treg-/-</sup>* Mäusen können keine nennenswerten Unterschiede festgestellt werden, wobei in diesem Fall der Effekt von DMAT auf das Tumorwachstum, unabhängig von dessen Wirkung auf T<sub>reg</sub>-Zellen, zu beobachten ist. Demnach scheint die tumor-reduzierende Wirkung der pharmakologischen CK2-Inhibition in dieser Konzentration durch den direkten Effekt auf die CK2 in T<sub>reg</sub>-Zellen vermittelt zu werden.

Wie in Kap. 1.4 ausgeführt ist, wird die CK2 als eine konstitutiv aktive Proteinkinase beschrieben, die in allen eukaryotischen Zellen exprimiert wird.<sup>117,122</sup> Weiterhin gilt sie als potentes Onkogen und ist in vielen Tumorzellen überexprimiert, was auch in B16F10 Zellen der Fall ist.<sup>181,182</sup> Demnach ist nicht auszuschließen, dass durch die pharmakologische Inhibition der CK2 nicht nur Immunzellen beeinflusst werden, sondern dass DMAT auch direkt auf Tumorzellen wirkt und somit einen reduzierenden Effekt auf das Tumorwachstum besitzt.<sup>183</sup> Allerdings ist bereits in prä-klinischen Tumormodellen nachgewiesen worden, dass auch Immunzellen bzw. deren Eigenschaften durch eine pharmakologische CK2-Inhibition beeinflusst werden.<sup>184</sup> Dabei konnten bis dato keine direkten Effekte auf T<sub>reg</sub>-Zellen nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurden Eigenschaften von tiT<sub>reg</sub>-Zellen aus DMAT-behandelten und unbehandelten *Csnk2b<sup>fl/fl</sup>* Mäusen untersucht, die nachweislich mit der CK2 bzw. deren Aktivität in Verbindung stehen. Dafür wurde zunächst die Frequenz an ILT3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen untersucht, da die Expression von ILT3 nachweislich von der CK2 beeinflusst wird (Kap. 3.1 und Kap. 3.4). Das Ergebnis der Analyse ist in Abb. 31 dargestellt.

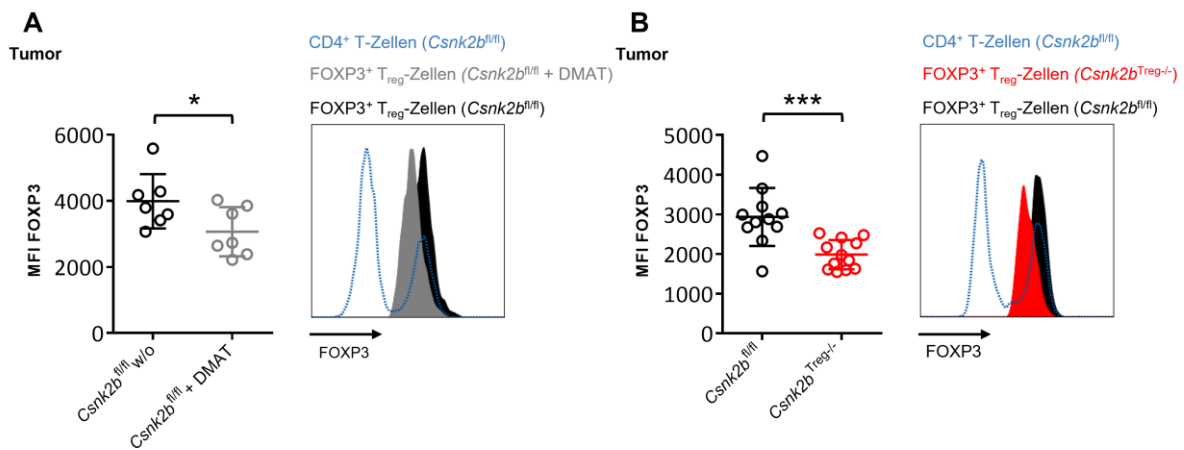


**Abbildung 31: Die pharmakologische Inhibition der CK2 erhöht im Tumorgewebe die Frequenz an ILT3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen.**

Die Tumore von unbehandelten (schwarz) und DMAT-behandelten *Csnk2b<sup>fl/fl</sup>* Mäusen (grau) wurden an Tag 21 isoliert, enzymatisch verdaut (siehe Kap. 2.11.1) und die tumor-infiltrierenden Immunzellen mittels CD45TIL Beads angereinigt (siehe Kap. 2.12). Die resultierenden Einzelzellsuspensionen wurden wie in Kap. 2.13 beschrieben mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen die Antigene TCR $\beta$ , CD4, ILT3 und FOXP3 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. A Das Punktdiagramm mit  $\bar{x} \pm SD$  illustriert den prozentualen Anteil an ILT3<sup>+</sup> unter TCR $\beta$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen in den Tumoren aus einem repräsentativen Experiment (*Csnk2b<sup>fl/fl</sup>* (n=7) = 11,56  $\pm$  5,71 %; *Csnk2b<sup>fl/fl</sup>* + DMAT (n = 7) = 23,06  $\pm$  8,71 %; \*p $\leq$ 0,05). Jeder Datenpunkt repräsentiert die Daten einer einzelnen Maus Nebenstehend sind für beide Maustypen repräsentative Abbildungen der durchflusszytometrischen Analyse mit der entsprechenden Prozentzahl der Zielpopulation abgebildet.

Aus Abb. 31 ist ersichtlich, dass die pharmakologische Inhibition der CK2 die Frequenz an ILT3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen signifikant erhöht. Im Vergleich zu Tumoren von unbehandelten *Csnk2b<sup>fl/fl</sup>* Mäusen konnte eine mehr als doppelt so hohe Frequenz in den Tumoren von DMAT-behandelten *Csnk2b<sup>fl/fl</sup>* Mäusen detektiert werden. Im Vergleich mit vorherigen Experimenten (Kap. 3.4; *Csnk2b<sup>fl/fl</sup>* = 13,00  $\pm$  5,27%; *Csnk2b<sup>Treg-/-</sup>* = 26,27  $\pm$  10,29%) wurde die Frequenz an ILT3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen durch die CK2-Inhibition auf das Niveau in Tumoren von *Csnk2b<sup>Treg-/-</sup>* Mäusen angehoben. *In vitro* Experimente belegen, dass die pharmakologische Inhibition der CK2 die ILT3-Expression auf T<sub>reg</sub>-Zellen beeinflussen kann.<sup>115</sup> In Kombination mit der Analyse der ILT3-Expression auf tiT<sub>reg</sub>-Zellen nach DMAT-Behandlung ist anzunehmen, dass auch *in vivo* die pharmakologische Inhibition der CK2 einen Einfluss auf die CK2 in T<sub>reg</sub>-Zellen besitzt und damit deren Eigenschaften bzw. Phänotyp modulieren kann.

Eine weitere Eigenschaft von CK2-defizienten T<sub>reg</sub>-Zellen ist deren reduzierte FOXP3-Expression.<sup>139</sup> Dabei handelt es sich jedoch nicht um eine Reduzierung der absoluten oder relativen Zahl an T<sub>reg</sub>-Zellen. Vielmehr zeigen diese Zellen innerhalb der FOXP3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellpopulation eine vergleichsweise verminderte FOXP3-Expression, wodurch diese als Surrogat-Marker für die CK2-Aktivität in T<sub>reg</sub>-Zellen herangezogen werden kann. Dies ist dahingehend von Interesse, da die FOXP3-Expression nicht nur für die Differenzierung von T<sub>reg</sub>-Zellen essenziell ist, sondern auch für deren Stabilität und Effektorfunktionen.<sup>185,186</sup> Ob die Gabe von DMAT einen Einfluss auf die FOXP3-Expression in T<sub>reg</sub>-Zellen nimmt, ist in Abb. 32 dargestellt.



**Abbildung 32: Die pharmakologische Inhibition der CK2 vermindert die Expression des Transkriptionsfaktors FOXP3 in tumor-infiltrierenden Treg-Zellen.** Die Tumore wurden an Tag 21 isoliert, enzymatisch verdaut (Kap. 2.11.1) und die resultierenden Einzelzellensuspensionen wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen die Antigene CD45, TCR $\beta$ , CD4 und FOXP3 (intrazellulär) gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (Kap. 2.13). Die Ergebnisse aus Abb. A und Abb. B resultieren dabei aus unterschiedlichen Experimenten. **A** Das Punktdiagramm  $\bar{x} \pm SD$  illustriert die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von FOXP3 innerhalb TCR $\beta^+$  CD4 $^+$  FOXP3 $^+$  Treg-Zellen im Tumorgewebe aus einem repräsentativen Experiment (*Csnk2b<sup>fl/fl</sup>* (n = 7) = 3986  $\pm$  821; *Csnk2b<sup>fl/fl</sup>* + DMAT (n = 7) = 3066  $\pm$  742; \*p $\leq$ 0,05). Jeder Datenpunkt repräsentiert die Daten einer einzelnen Maus. Nebenstehend sind repräsentative Überlagerungsgrafiken dargestellt. Die blaue Linie stellt dabei die FOXP3-Expression aller tumor-infiltrierenden CD4 $^+$  T-Zellen dar. **B** Das Punktdiagramm  $\bar{x} \pm SD$  illustriert die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von FOXP3 innerhalb TCR $\beta^+$  CD4 $^+$  FOXP3 $^+$  Treg-Zellen im Tumorgewebe aus zwei unabhängigen Experimenten (*Csnk2b<sup>fl/fl</sup>* (n = 11) = 2934  $\pm$  730; *Csnk2b<sup>fl/fl</sup>* + DMAT (n = 7) = 1984  $\pm$  371; \*\*\*p $\leq$ 0,001). Jeder Datenpunkt repräsentiert die Daten einer einzelnen Maus. Nebenstehend sind repräsentative Überlagerungsgrafiken dargestellt. Die blaue Linie stellt dabei die FOXP3-Expression aller tumor-infiltrierenden CD4 $^+$  T-Zellen dar.

Die pharmakologische Inhibition der CK2 führt zu einer signifikanten Reduzierung der FOXP3-Expression in tiTreg-Zellen. Im Vergleich zu Treg-Zellen aus Tumoren von unbehandelten Mäusen weisen tiTreg-Zellen aus DMAT-behandelten Mäusen eine um 25 % geringere FOXP3-Expression auf, wobei die Frequenz an tiTreg-Zellen durch die pharmakologische CK2-Inhibition nicht beeinflusst wird (Daten nicht gezeigt). Bei tiTreg-Zellen aus unbehandelten *Csnk2b<sup>Treg-/-</sup>* ist ebenfalls eine erniedrigte FOXP3-Expression zu beobachten (Abb. 31B). Diese ist gegenüber tiTreg-Zellen aus unbehandelten wildtypischen Mäusen um 30 % erniedrigt. Demnach ist davon auszugehen, dass sowohl die genetische Depletion der CK2 als auch deren pharmakologische Inhibition zu einer verminderten FOXP3-Expression in Treg-Zellen führt. Die ist dahingehend von Interesse, dass wie bereits erwähnt eine gleichbleibend stabile FOXP3-Expression essenziell für die suppressiven Fähigkeiten von Treg-Zellen ist.<sup>187,186</sup> Die pharmakologische Inhibition der CK2 kann demnach zu verminderten suppressiven Fähigkeiten von Treg-Zellen führen. Zusammenfassend konnte in diesem Kapitel gezeigt werden, dass die pharmakologische Inhibition der CK2 zu einem reduzierten Tumorwachstum führt. Dabei legen die Daten nahe, dass dieser Effekt in gewissem Maße auf der pharmakologischen Inhibition der CK2 in tiTreg-Zellen beruht. Dies deutet das hohe Potential der CK2 in Treg-Zellen als pharmakologisches Zielmolekül an. Aus diesem Grund wurde abschließend der Einfluss der CK2 auf die Expression von pharmakologisch relevanten Oberflächenmolekülen auf Treg-Zellen untersucht. Dies sollte der Generierung von Anhaltspunkten dienen, ob die Manipulation der CK2 synergistische Effekte mit

bereits erprobten oder sich in der Entwicklung befindlichen Wirkstoffen und darauf basierende Therapien haben könnte.

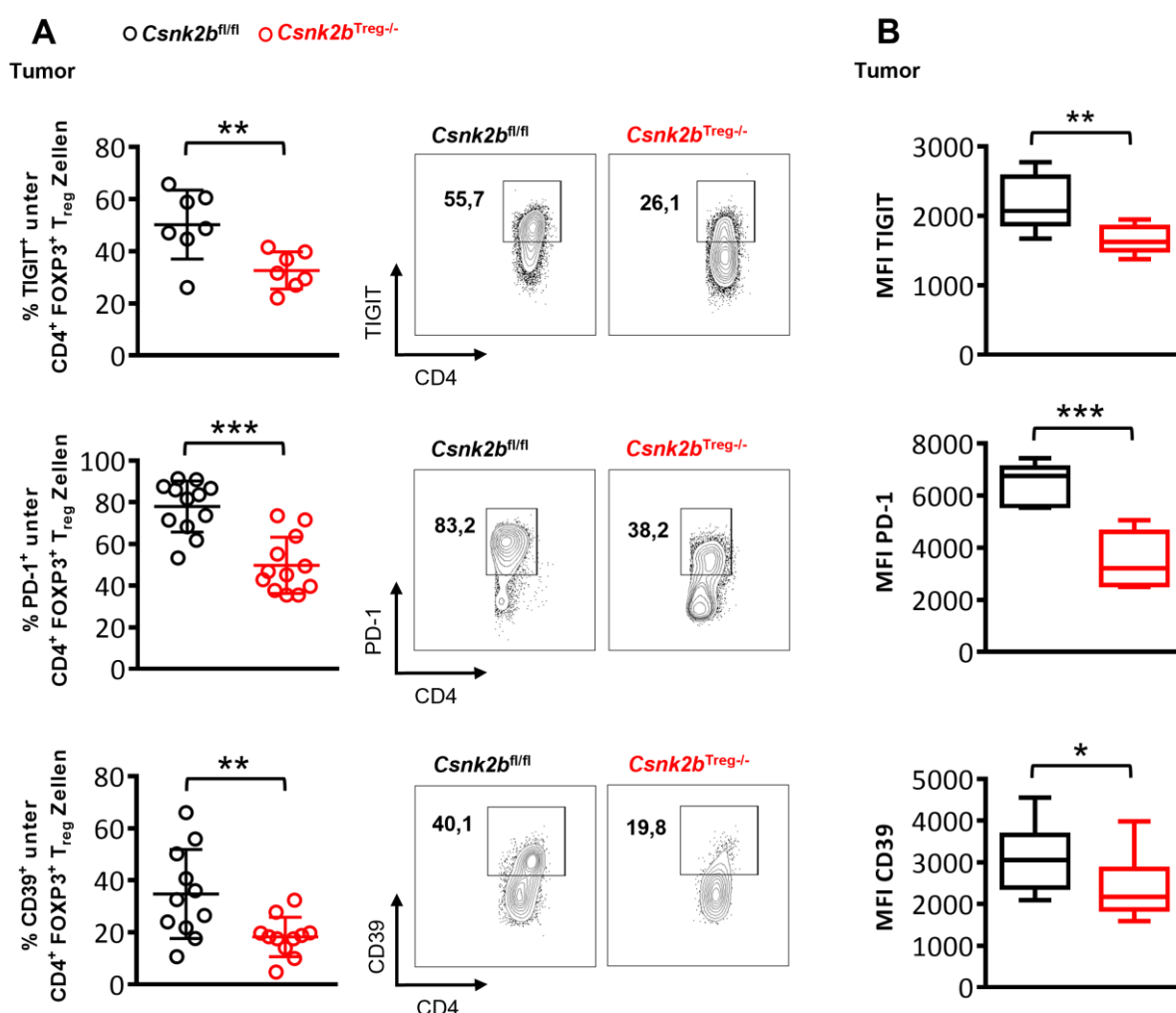
### 3.10 Die Expression pharmakologisch relevanter Oberflächenproteine ist auf tumorinfiltrierenden CK2-defizienten regulatorischen T-Zellen signifikant reduziert

Die Idee, T<sub>reg</sub>-Zellen in ihren suppressiven Fähigkeiten zu inhibieren, ist ein interessanter Ansatzpunkt, um neue onkologische Immuntherapien zu entwickeln oder bereits bestehende Immuntherapien in ihrer Effizienz zu steigern. T<sub>reg</sub>-Zellen besitzen diverse Suppressionsmechanismen, durch die sie die Immunreaktion gegenüber Tumoren supprimieren (Kap. 1.5.3). Genauso vielfältig sind die Zielmoleküle und die dadurch beeinflussten Suppressionsmechanismen, die für die therapeutischen Manipulation von T<sub>reg</sub>-Zellen genutzt bzw. untersucht werden. Ein wesentlicher Teil, der sich in der Entwicklung befindlichen T<sub>reg</sub>-Zell-spezifischen Immuntherapien, richtet sich gegen inhibitorische Oberflächenrezeptoren, wie TIGIT (*T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains*), ICOS (*Inducible T-cell costimulator*), GITR (*Glucocorticoid-induced TNFR-related*) oder LAG-3 (*Lymphocyte-activation gene 3*), über die T<sub>reg</sub>-Zellen die Immunantwort gegenüber Tumoren supprimieren können.<sup>136</sup> Zusätzlich sind T<sub>reg</sub>-Zellen hinsichtlich ihres Einflusses auf bereits bestehende Immuntherapien mit Checkpoint-Inhibitoren (CPI) in den Fokus der Forschung geraten. Dazu zählen die für die klinische Anwendung zugelassenen CPI Ipilimumab (anti (α)-CTLA-4; *Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4*) und Nivolumab (α-PD-1; *Programmed cell death protein 1*). Die Wirkmechanismen von CPI beruhen hauptsächlich auf der Erhöhung der Aktivität von tumor-infiltrierenden effektorischen CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen (T<sub>eff</sub>-Zellen).<sup>188,n</sup> Dabei wird die Bindung von suppressiven Oberflächenmolekülen auf Tumorzellen oder Antigen-präsentierenden Zellen zu deren Interaktionspartner auf T-Zellen (Checkpoint Molekülen) unterbrochen, wodurch die Weiterleitung von suppressiven Signalen an die T-Zelle verhindert wird.<sup>188</sup> Im Falle des malignen Melanoms profitieren dabei ca. 30–40 % der Patienten von Therapien mit den genannten CPI.<sup>189,190</sup> Der Grund für das gestiegene Interesse hinsichtlich T<sub>reg</sub>-Zellen und ihren Einfluss auf CPI ist, dass T<sub>reg</sub>-Zellen die entsprechenden Zielrezeptoren in ähnlichem oder gleichem Ausmaß exprimieren wie die eigentlichen Zielzellen namentlich tumor-infiltrierende T<sub>eff</sub>-Zellen.<sup>191</sup> Die Wirkung der CPI α-CTLA-4 und α-PD-1 auf T<sub>reg</sub>-Zellen ist nicht vollständig aufgeklärt, wobei die Wirkung von α-CTLA-4 zumindest in Teilen auf der Depletion von tiT<sub>reg</sub>-Zellen beruhen soll.<sup>192</sup> Neben inhibitorischen Oberflächenrezeptoren sind T<sub>reg</sub>-spezifische Suppressionsmechanismen, die den Metabolismus von T<sub>eff</sub>-Zellen manipulieren, ebenfalls vielversprechende Ansätze, um die T<sub>reg</sub>-Zell-vermittelte Inhibition von Immunreaktionen gegenüber Tumoren zu supprimieren.<sup>136</sup> Dazu gehört bspw. die pharmakologische Manipulation der Ecto-Nukleotidase CD39, die den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Hydrolyse von extrazellulärem ATP in das stark

---

<sup>n</sup> vorwiegend CD8<sup>+</sup> T-Zellen.

immunsuppressive Adenosin katalysiert.<sup>193</sup> Die Expression von pharmakologisch relevanten Oberflächenmolekülen auf CK2-defizienten  $\text{tiT}_{\text{reg}}$ -Zellen ist demnach von besonderem Interesse. Zum einen können dadurch Rückschlüsse auf die generellen suppressiven Fähigkeiten von CK2-defizienten  $\text{tiT}_{\text{reg}}$ -Zellen gezogen werden und zum anderen könnten dadurch Ansatzpunkte für synergistische Effekte einer Kombinationstherapie von CK2-Inhibitoren mit zukünftigen oder bereits bestehenden onkologischen Immuntherapien detektiert werden. Aus diesen Gründen wurde die Expression verschiedener pharmakologischer relevanter Oberflächenproteine auf CK2-defizienten  $\text{tiT}_{\text{reg}}$ -Zellen im Vergleich zu wildtypischen  $\text{tiT}_{\text{reg}}$ -Zellen evaluiert. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Abb. 33 dargestellt.



**Abbildung 33: Die Expression pharmakologisch relevanter Oberflächenproteinen ist auf tumor-infiltrierenden  $\text{T}_{\text{reg}}$ -Zellen von *Csnk2b*<sup>fl/fl</sup> Mäusen signifikant reduziert.** Die Tumore wurden an Tag 21 isoliert, enzymatisch verdaut (siehe Kap. 2.11.1) und die tumor-infiltrierenden Immunzellen mittels CD45 TIL Beads angereinigt (siehe Kap. 2.12). Die resultierenden Einzelzellsuspensionen wurden wie in Kap. 2.13 beschrieben mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen die Antigene TCR $\beta$ , CD4, TIGIT, PD-1; CD39 und FOXP3 (intrazellulär) gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. **A** Das Punktdiagramm mit  $\bar{x} \pm SD$  illustriert den prozentualen Anteil der Zielpopulation unter  $\text{TCR}\beta^+$   $\text{CD4}^+$   $\text{FOXP3}^+$   $\text{T}_{\text{reg}}$ -Zellen in den Tumoren aus zwei unabhängigen Experimenten (Ausnahme TIGIT: 1 repräsentatives Experiment). Statistische Daten: TIGIT: *Csnk2b*<sup>fl/fl</sup> (n = 7) = 50,21  $\pm$  13,19 %; *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> (n = 7) = 32,61  $\pm$  7,10 %; \*\*p $\leq$ 0,01. PD-1: *Csnk2b*<sup>fl/fl</sup> (n = 12) = 77,98  $\pm$  12,97 %; *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> (n = 12) = 49,66  $\pm$  13,50 %; \*\*\*p $\leq$ 0,001. CD39: *Csnk2b*<sup>fl/fl</sup> (n = 11) = 34,72  $\pm$  17,11 %; *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> (n = 11) = 18,22  $\pm$  7,53 %; \*\*p $\leq$ 0,01. Jeder Datenpunkt repräsentiert die Daten einer einzelnen Maus. Nebenstehend

sind für alle Maustypen repräsentative Plots mit der entsprechenden Prozentzahl der Zielpopulation abgebildet. **B** Die Kastengrafik mit  $M \pm SP$  illustriert die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Färbungen innerhalb  $TCR\beta^+ CD4^+ FOXP3^+$   $T_{reg}$ -Zellen im Tumorgewebe aus einem repräsentativen Experiment. Statistische Daten: TIGIT:  $Csnk2b^{fl/fl}$  (n = 7)  $M = 2070$ ;  $Csnk2b^{Treg-/-}$  (n = 7)  $M = 1623$ ;  $**p \leq 0,01$ ; PD-1:  $Csnk2b^{fl/fl}$  (n = 6)  $M = 6746$ ;  $Csnk2b^{Treg-/-}$  (n = 6)  $M = 3207$ ;  $***p \leq 0,001$ ; CD39:  $Csnk2b^{fl/fl}$  (n = 6)  $M = 3055$ ;  $Csnk2b^{Treg-/-}$  (n = 6)  $M = 2173$ ;  $*p \leq 0,05$ .

Die Ergebnisse der Analysen zeigen, dass die spezifische Deletion der CK2 zu einer reduzierten Expression von Oberflächenproteinen auf  $tiT_{reg}$ -Zellen führt, die wichtig für die suppressiven Fähigkeiten von  $T_{reg}$ -Zellen sind. CK2-defiziente  $T_{reg}$ -Zellen zeigen eine signifikant reduzierte Expression des inhibitorischen Oberflächenrezeptors TIGIT auf ihrer Oberfläche. Die Expression von TIGIT auf CK2-defizienten  $tiT_{reg}$ -Zellen ist gegenüber der Expression auf wildtypischen  $tiT_{reg}$ -Zellen um den Faktor 2 erniedrigt. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der Frequenzbestimmung von TIGIT-exprimierenden  $tiT_{reg}$ -Zellen konnte ein signifikant erniedrigter MFI von TIGIT auf CK2-defizienten  $T_{reg}$ -Zellen detektiert werden (siehe Abb. 33B). In ähnlichem Ausmaß unterscheidet sich die PD-1-Expression auf CK2-defizienten und wildtypischen  $T_{reg}$ -Zellen. Dabei ist die Frequenz von PD-1-exprimierenden  $T_{reg}$ -Zellen in Tumoren von  $Csnk2b^{Treg-/-}$  Mäusen signifikant reduziert. Wird die Analyse der MFI der PD-1 Färbung betrachtet, ist der Unterschied noch deutlicher zu erkennen. Der MFI der PD-1 Färbung auf CK2-defizienten  $T_{reg}$ -Zellen ist dabei um die Hälfte reduziert. Die Analyse der PD-1-Expression auf  $T_{reg}$ -Zellen zeigt zusätzlich, dass vor allem in wildtypischen  $Csnk2b^{fl/fl}$  Mäusen ein beträchtlicher Teil der  $tiT_{reg}$ -Zellen PD-1 exprimiert. Die Größenordnung PD-1-exprimierender  $T_{reg}$ -Zellen ist dabei mit der Frequenz PD-1-exprimierender  $T_{eff}$ -Zellen vergleichbar (Daten nicht gezeigt). Dies unterstreicht die Notwendigkeit, den Einfluss von anti-PD-1 Therapien auf  $T_{reg}$ -Zellen und deren suppressive Fähigkeiten genauer zu analysieren. Abschließend ist in Abb. 33 demonstriert, dass die Expression von CD39 auf  $tiT_{reg}$ -Zellen von  $Csnk2b^{Treg-/-}$  Mäusen signifikant reduziert ist. Wiederum zeigt sich die Frequenz von CD39-exprimierenden  $tiT_{reg}$ -Zellen aus  $Csnk2b^{Treg-/-}$  Mäusen um den Faktor 2 erniedrigt. Der MFI der CD39-Färbung ist bei CK2-defizienten  $tiT_{reg}$ -Zellen ebenfalls signifikant reduziert.

Die Ergebnisse aus Abb. 33 zeigen, dass CK2-defiziente  $T_{reg}$ -Zellen einen weniger suppressiven Phänotyp als wildtypische  $T_{reg}$ -Zellen besitzen. Dabei scheint die Deletion der CK2 einen generellen Einfluss auf die suppressiven Fähigkeiten von  $tiT_{reg}$ -Zellen zu haben, da nicht nur ein bestimmter Suppressionsmechanismus von der CK2-Defizienz betroffen ist.

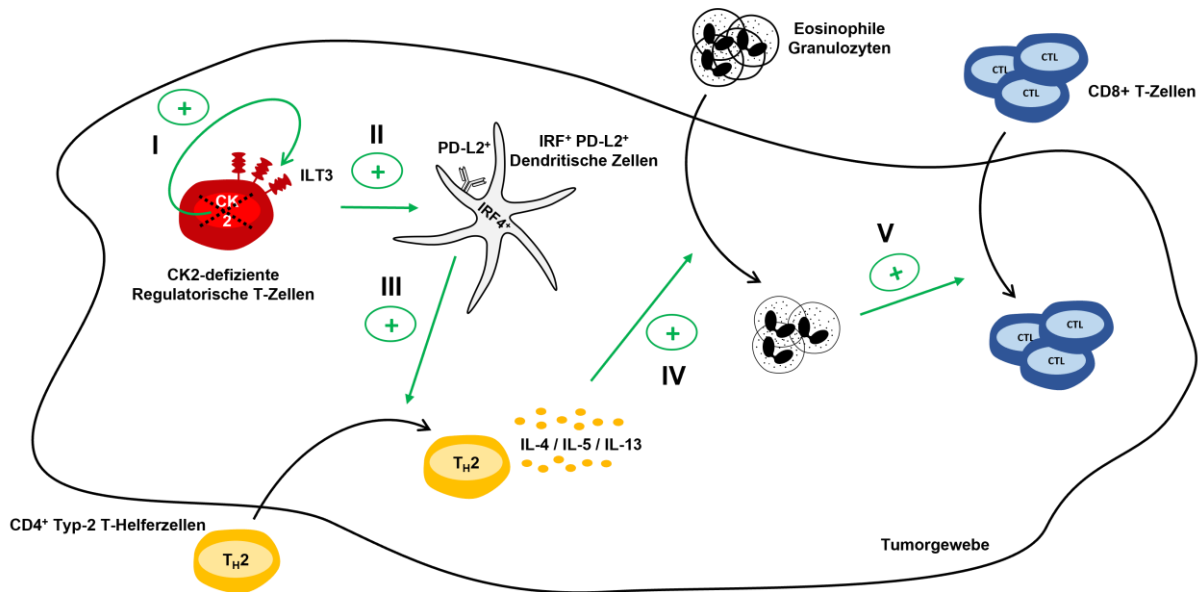
### 3.11 Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser Arbeit sollte die Bedeutung der Proteinkinase CK2 (CK2) für die suppressiven Fähigkeiten von Regulatorischen T-Zellen ( $T_{\text{reg}}$ -Zellen) im Kontext der Tumorummunologie untersucht werden. Aus Daten früherer Studien geht hervor, dass ein Hauptmerkmal der genetischen Depletion der CK2 in  $T_{\text{reg}}$ -Zellen eine erhöhte Expression des Oberflächenrezeptors ILT3 (*Immunoglobulin-like transcript 3*) auf der Oberfläche von  $T_{\text{reg}}$ -Zellen ist.<sup>115</sup> Zudem zeigten sowohl CK2-defiziente als auch CK2-kompetente ILT3-exprimierende  $T_{\text{reg}}$ -Zellen (ILT3<sup>+</sup>  $T_{\text{reg}}$ -Zellen) verminderte Fähigkeiten zur Suppression  $T_{\text{H2}}$ -vermittelter Immunantworten.<sup>115,°</sup> Die Beobachtung, dass CK2-defiziente  $T_{\text{reg}}$ -Zellen eine gesteigerte ILT3-Expression aufweisen, konnte in mehreren sekundär lymphatischen Organen bestätigt werden (Abb. 11). Die genaue Funktion von ILT3 für die suppressiven Fähigkeiten von  $T_{\text{reg}}$ -Zellen ist nicht vollständig geklärt. Die Expression von ILT3 auf  $T_{\text{reg}}$ -Zellen kann aber als Surrogat-Marker für die CK2-Aktivität in  $T_{\text{reg}}$ -Zellen herangezogen werden. Aufgrund der verminderten suppressiven Eigenschaften von CK2-defizienten  $T_{\text{reg}}$ -Zellen bzw. ILT3<sup>+</sup>  $T_{\text{reg}}$ -Zellen sollte in dieser Arbeit analysiert werden, ob dies Auswirkungen auf das Wachstum von Tumoren hat, da  $T_{\text{reg}}$ -Zellen von entscheidender Bedeutung für die Suppression der immunologischen Tumorantwort sind.<sup>194</sup> Um erste Hinweise zu erhalten, ob ILT3<sup>+</sup>  $T_{\text{reg}}$ -Zellen im humanen System relevant für die anti-tumorale Immunantwort sind, wurden Datensätze von humanen Tumorbiopsien hinsichtlich der Genexpression von *LILRB4* (codiert für ILT3) und *FOXP3* (Haupttranskriptionsfaktor von  $T_{\text{reg}}$ -Zellen) analysiert. Dabei wurde im humanen Melanom eine positive Korrelation zwischen der Überlebensrate und der *LILRB4*-Expression beobachtet (Abb. 12A). Zudem korreliert die *LILRB4* Expression mit der *FOXP3*-Expression, was als Indiz für die Präsenz ILT-3 exprimierender  $T_{\text{reg}}$ -Zellen in humanen Melanomen gewertet werden kann (Abb. 12B). Um mögliche Mechanismen aufzudecken, wie sich die  $T_{\text{reg}}$ -spezifische CK2-Defizienz auf die Immunreaktion gegenüber Tumoren auswirkt und die ILT3-Expression auf  $T_{\text{reg}}$ -Zellen relevant dafür ist, wurde ein prä-klinisches B16F10 Melanommodell durchgeführt. Dabei konnte in Mäusen mit einer spezifischen CK2-Depletion in  $T_{\text{reg}}$ -Zellen (*Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäuse) ein signifikant reduziertes Tumorstadium beobachtet werden (Abb. 13), wobei gleichzeitig eine signifikant höhere Frequenz an ILT3<sup>+</sup>  $T_{\text{reg}}$ -Zellen in deren Tumoren detektiert werden konnte (Abb. 14). Als Folge der CK2-Defizienz in  $T_{\text{reg}}$ -Zellen konnte eine massive erhöhte Infiltration an CD45<sup>+</sup> Immunzellen in die Tumore von *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen beobachtet werden (Abb. 15). In der vergleichenden Charakterisierung der T-Zellpopulation in den Tumoren zeigte sich, dass vermehrt CD8<sup>+</sup> T-Zellen und konventionelle CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen ( $T_{\text{konv}}$ -Zellen) (Abb. 16 und 17) in die Tumore von *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäuse einwandern. Dies resultiert in einer starken Erhöhung des Verhältnisses von anti-tumoralen T-Zellen (CD8<sup>+</sup> T-Zellen und  $T_{\text{konv}}$ -Zellen) zu pro-tumoralen  $T_{\text{reg}}$ -Zellen in den Tumoren von *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen. Anschließend wurden verschiedene Effektorfunktionen von tumor-infiltrierenden T-Zellen untersucht. Aufgrund ihrer immunkoordinativen Eigenschaften im Kontext der Tumorummunologie, wurde der Fokus auf tumor-

°  $T_{\text{H2}}$ -Zellen: CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen des Typ 2

infiltrierende CD4<sup>+</sup> T<sub>konv</sub>-Zellen und deren Polarisierung gerichtet. Die Transkriptomanalyse von T<sub>konv</sub>-Zellen offenbarte, dass in T<sub>konv</sub>-Zellen aus Tumoren von *Csnk2b*<sup>Treg<sup>-/-</sup></sup> Mäusen verstärkt Gene exprimiert werden, die mit T<sub>H2</sub>-Zellen assoziiert werden (Abb. 18). Dies konnte auf Proteinebene verifiziert werden. Es zeigte sich, dass in Tumoren von *Csnk2b*<sup>Treg<sup>-/-</sup></sup> Mäusen sowohl die Frequenz an GATA3-exprimierenden T<sub>H2</sub>-Zellen (Abb. 19) als auch die Frequenz an T<sub>konv</sub>-Zellen erhöht war, die T<sub>H2</sub>-assoziierte Zytokine produzieren (Abb. 20). Im Gegensatz dazu war die Produktion T<sub>H1</sub>-assoziiierter Zytokine durch T<sub>konv</sub>-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen nur in geringem Ausmaß verändert (Abb. 21). Ein möglicher Grund für die erhöhte T<sub>H2</sub>-Immunantwort in Tumoren von *Csnk2b*<sup>Treg<sup>-/-</sup></sup> Mäusen könnte die erhöhte Frequenz an Dendritischen Zellen (DC) sein, welche den Transkriptionsfaktor IRF4<sup>+</sup> und den Oberflächenrezeptor PD-L2<sup>+</sup> exprimieren sein (Abb.22). Dieser DC-Subtyp fördert die Differenzierung von T<sub>H2</sub>-Zellen.<sup>165,166</sup> Zusammenfassend zeigte sich in den Tumoren in *Csnk2b*<sup>Treg<sup>-/-</sup></sup> Mäusen eine erhöhte T<sub>H2</sub>-vermittelte Immunreaktion, die auf die verminderte Suppressionsfähigkeit CK2-defizienter T<sub>reg</sub>-Zellen gegenüber diesem Subtyp an CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen zurückzuführen ist. Eine Folge der erhöhten Konzentrationen von T<sub>H2</sub>-assoziierten Zytokinen war die Beobachtung einer erhöhten Infiltration von Eosinophilen in den Tumoren von *Csnk2b*<sup>Treg<sup>-/-</sup></sup> Mäusen (Abb. 23). Weiterführende Experimente zeigten, dass diese für das verminderte Tumorwachstum in von *Csnk2b*<sup>Treg<sup>-/-</sup></sup> Mäusen essenziell sind, da die spezifische Depletion von Eosinophilen mit einem  $\alpha$ -SIGLEC-F Antikörper das Tumorwachstum signifikant verstärkte (Abb. 25). Dabei konnte im Vergleich zu unbehandelten *Csnk2b*<sup>Treg<sup>-/-</sup></sup> Mäusen in Tumoren von  $\alpha$ -SIGLEC-F-behandelten *Csnk2b*<sup>Treg<sup>-/-</sup></sup> Mäusen eine niedrigere Infiltration von CD8<sup>+</sup> T-Zellen detektiert werden (Abb. 26). Die Beobachtungen im B16F10 Melanommodell und die daraus resultierende Hypothese der gesteigerten Typ-2-vermittelten anti-tumoralen Immunantwort auf Basis der T<sub>reg</sub>-spezifischen CK2-Depletion sind in Abb. 34 nochmals graphisch aufbereitet.





**Abbildung 34: Modell der Typ2-vermittelten anti-tumoralen Immunantwort in *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen.** **I** Die genetische Deletion der Proteinkinase CK2 $\beta$ -Untereinheit in T<sub>reg</sub>-Zellen führt zu einer gesteigerten Expression des Oberflächenrezeptors ILT3 auf tumorinfiltrierenden T<sub>reg</sub>-Zellen. **II** ILT3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen fördern die Reifung und erhöhen damit die Frequenz von IRF4<sup>+</sup> PD-L2<sup>+</sup> DCs im Tumorgewebe. **III** IRF4<sup>+</sup> PD-L2<sup>+</sup> DCs vermitteln die Differenzierung von T<sub>H2</sub>-Zellen und die damit verbundene Produktion T<sub>H2</sub>-assoziiierter Zytokine. **IV** Erhöhte Konzentrationen an T<sub>H2</sub>-assoziierten Zytokinen fördern die Migration von Eosinophilen in die Tumore. **V** Eosinophile erhöhen die Migration von CD8<sup>+</sup> T-Zellen in das Tumorgewebe.

Genkorrelationsanalysen von humanen Tumorbiopsien zeigten, dass in humanen Melanombiopsien Parallelen zu den gewonnenen Erkenntnissen aus dem prä-klinischen B16F10 Melanommodell zu beobachten waren. Anhand der Analyse der Genexpression spezifischer Marker von Typ2-Immunzellen konnte beobachtet werden, dass diese einen positiven Einfluss auf die Überlebensrate im humanen malignen Melanom haben. Dabei konnten Korrelationen zwischen der Expression von *LILRB4* und *GATA3* beobachtet werden, die wiederum mit der Expression von *CD4* positiv in Verbindung standen (Abb. 27A und B). Die Verwendung der Genexpression als Surrogat-Marker für die Präsenz der entsprechenden Zelltypen im Tumor lässt die Hypothese zu, dass eine gesteigerte Infiltration von ILT3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen mit einer stärkeren Infiltration von *GATA3*<sup>+</sup> T<sub>H2</sub>-Zellen einhergeht. Eine hohe Expression von *GATA3* stand zusätzlich mit einer höheren Überlebensrate im Zusammenhang (Abb. 27C), wodurch vermutet werden kann, dass im humanen Melanom eine hohe Präsenz an T<sub>H2</sub>-Zellen einen anti-tumoralen Effekt besitzt. Positive Korrelationen konnten zudem zwischen der Expression von *LILRB4* mit *SIGLEC8* (humaner Marker für Eosinophile) sowie *GATA3* und *SIGLEC8* detektiert werden (Abb. 28 A und B). Aus den positiven Korrelationen der Surrogat-Marker für ILT3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen (*LILRB4*, *FOXP3*), *GATA3* (T<sub>H2</sub>-Zellen) und Eosinophile (*SIGLEC8*) kann die Hypothese aufgestellt werden, dass im humanen Melanom ein Zusammenhang zwischen einer starken Infiltration von ILT3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen bzw. *GATA3*<sup>+</sup> T<sub>H2</sub>-Zellen und der Präsenz an Eosinophilen besteht. Zusätzlich war zu beobachten, dass eine hohe Expression von *SIGLEC8* und damit eine starke Infiltration von Eosinophilen zu einer höheren Überlebensrate beitragen (Abb. 28C). Abschließend ließen sich Zusammenhänge zwischen der

Expression von *LILRB4* und *CD8A* beobachten, deren Expressionsstärke wiederum mit der von *SIGLEC8* korrelierte (Abb. 29A und B). Eine hohe *CD8A*-Expression im Tumorgewebe korrelierte dabei mit einer höheren Überlebensrate (Abb. 29C). Anhand der starken Korrelation der Surrogat-Marker von  $ILT3^+$   $T_{reg}$ -Zellen (*LILRB4*) und Eosinophilen (*SIGLEC8*) mit  $CD8^+$  T-Zellen (*CD8A*) kann vermutet werden, dass die Frequenz an  $ILT3^+$   $T_{reg}$ -Zellen und damit einhergehend die Infiltration von Eosinophilen eine hohe Präsenz von  $CD8^+$  T-Zellen im Tumorgewebe bedingen. Die Erkenntnisse aus dem B16F10 Melanommodell und die weitreichenden Parallelen in humanen Melanombiopsien zeigen das Potential, das die pharmakologische Inhibition der CK2 in  $T_{reg}$ -Zellen besitzt. Deshalb wurde in weiterführenden Experimenten die Wirkung der pharmakologischen CK2-Inhibition auf das Tumorstadium und die spezifische Wirkung von CK2-Inhibitoren auf  $tiT_{reg}$ -Zellen im B16F10 Melanommodell untersucht. Dabei zeigte sich, dass durch die Administration des CK2-Inhibitors DMAT das Tumorstadium signifikant reduziert wurde (Abb. 30). Dabei scheint der tumor-reduzierende Effekt von DMAT besonders auf dessen direkter Wirkung auf  $T_{reg}$ -Zellen zu beruhen, da keine nennenswerten Unterschiede im Tumorstadium zwischen DMAT-behandelten und unbehandelten *Csnk2b*<sup>*Treg*-/-</sup> Mäusen beobachtet wurden. Zusätzlich führte die Behandlung zu einer höheren Frequenz an tumor-infiltrierenden  $ILT3^+$   $T_{reg}$ -Zellen und zu einer verminderten FOXP3-Expression durch  $T_{reg}$ -Zellen (Abb. 31 und 32), wodurch ein direkter Einfluss der CK2-Inhibition auf  $T_{reg}$ -Zellen in den Tumoren beobachtet werden konnte. Die Analyse der Expression pharmakologisch relevanter Oberflächenrezeptoren auf tumor-infiltrierenden  $T_{reg}$ -Zellen untermauert das Potential von CK2-Inhibitoren für die Immuntherapie des malignen Melanoms. Es zeigte sich, dass die genetische Depletion der CK2 in  $T_{reg}$ -Zellen zu einer verminderten Expression von TIGIT, PD-1 und CD39 führt. Daraus kann geschlossen werden, dass die spezifische Deletion der CK2 zu verminderten suppressiven Fähigkeiten von  $T_{reg}$ -Zellen führt. Der reduzierende Effekt auf die PD1-Expression von  $T_{reg}$ -Zellen könnte einen vielversprechenden Ansatz für eine Kombinationstherapie mit  $\alpha$ -PD-1 darstellen, da PD-1 exprimierende  $T_{reg}$ -Zellen nach anti-PD-1-Monotherapie einen besonders suppressiven Phänotyp aufweisen.<sup>195</sup> Durch die gleichzeitige Gabe von CK2-Inhibitoren und die damit verbundene Reduktion der PD-1-Expression auf  $T_{reg}$ -Zellen könnte die Wirkung von anti-PD-1 auf PD-1-exprimierende  $T_{reg}$ -Zellen abgeschwächt werden.

## 4 Diskussion

Die zentrale Aufgabe des Immunsystems besteht darin, zwischen körpereigenen und fremden Strukturen (Antigenen) zu unterscheiden.<sup>1</sup> Im Falle von körperfremden Antigenen muss eine weitere Differenzierung in potenziell gefährliche oder harmlose Antigene stattfinden.<sup>2</sup> Regulatorische T-Zellen (T<sub>reg</sub>-Zellen), die als „Wächter des Immunsystems“ angesehen werden können, sind hierbei von entscheidender Bedeutung.<sup>196</sup> Durch ihre vielfältigen suppressiven Fähigkeiten (Kap. 1.3.5) sind sie in der Lage, konventionelle effektorische T-Zellen (CD8<sup>+</sup> T-Zellen und FOXP3<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen), aber auch andere Zellen des Immunsystems (z. B. Dendritische Zellen) in ihren Effektorfunktionen zu supprimieren.<sup>p,81</sup> Dadurch können T<sub>reg</sub>-Zellen überschüssige Immunreaktionen gegen fremde, aber harmlose Antigene unterbinden und verhindern damit allergische Reaktionen gegen Nahrungsmittel oder potentielle Allergene (z. B. Blütenpollen). Ebenso unterbinden T<sub>reg</sub>-Zellen Immunreaktionen gegen körpereigene Antigene, die Autoimmunerkrankungen wie z. B. Multiple Sklerose zur Folge haben können.<sup>197</sup> Sind T<sub>reg</sub>-Zellen in ihren suppressiven Fähigkeiten eingeschränkt, hat dies fatale Auswirkungen, wie es beim humanen IPEX-Syndrom (*Immune dysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked Syndrom*) beobachtet werden kann.<sup>198</sup> Dieser schwerwiegenden Erkrankung liegt eine Mutation im *FOXP3*-Gen zugrunde, das für den gleichnamigen Transkriptionsfaktor codiert, der eine essenzielle Schlüsselrolle in T<sub>reg</sub>-Zellen einnimmt. Die Folge dieser Mutation sind funktionsunfähige T<sub>reg</sub>-Zellen, die Immunreaktionen gegen körpereigene Antigene nicht unterbinden können. Daraus resultiert eine systemische Autoimmunerkrankung, die unbehandelt in den ersten Lebensjahren letal ist. Neben den erwünschten und unbedingt notwendigen Funktionen können die suppressiven Fähigkeiten von T<sub>reg</sub>-Zellen aber auch unerwünschte Effekte nach sich ziehen. Eine der schwerwiegendsten negativen Auswirkungen, die durch T<sub>reg</sub>-Zellen vermittelt werden, ist die Suppression von Immunreaktionen gegenüber Tumoren.<sup>87</sup> Tumoren entwickeln sich durch unkontrolliertes Wachstum mutierter körpereigener Gewebszellen.<sup>22</sup> Basierend auf ihrer Eigenschaft, Immunreaktionen gegenüber körpereigenen Antigenen zu unterbinden, verhindern T<sub>reg</sub>-Zellen eine effektive Bekämpfung von Tumoren durch das Immunsystem.<sup>7</sup> Aus diesem Grund wird eine hohe Frequenz an T<sub>reg</sub>-Zellen im Tumorgewebe als ein negativer prognostischer Marker bei einer Vielzahl von Tumorerkrankungen angesehen.<sup>199</sup> Die negativen Aspekte von T<sub>reg</sub>-Zellen im Kontext von Tumorerkrankungen stellten dabei den grundlegenden Ansatzpunkt für die vorliegende Arbeit dar. Ziel war es, durch gezielte Manipulation von T<sub>reg</sub>-Zellen deren suppressive Eigenschaften zu reduzieren, um dadurch die Effizienz der Immunantwort gegenüber dem Tumor zu erhöhen. Durch die vergleichende Analyse des Tumorwachstums in Mäusen mit einer spezifischen genetischen Deletion der Proteinkinase CK2 (CK2) in T<sub>reg</sub>-Zellen (*Csnk2b*<sup>Treg<sup>-/-</sup></sup> Mäusen) und wildtypischen Mäusen konnte die CK2 als potenzielles Zielmolekül identifiziert werden, da das Tumorwachstum im Vergleich zu wildtypischen

---

<sup>p</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen und konventionelle FOXP3<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen werden im Folgenden unter dem Begriff T<sub>eff</sub>-Zellen (T-Effektorzellen) zusammengefasst.

Mäusen bei *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen signifikant verlangsamt war. Die CK2 stellt demnach ein interessantes Zielmolekül für die pharmakologische Manipulation von T<sub>reg</sub>-Zellen und deren suppressiven Fähigkeiten im Kontext der Tumorummunologie dar. Der Versuch, T<sub>reg</sub>-Zellen in ihren suppressiven Fähigkeiten zu inhibieren, um damit die Immunantwort gegenüber dem Tumor zu stärken, ist Gegenstand intensiver Forschung, wobei vielfältige Ansätze verfolgt werden. Diese sollen im nächsten Abschnitt näher erläutert werden. Des Weiteren sollen die gewonnenen Erkenntnisse dieser Arbeit zum Potential der pharmakologischen Inhibition der CK2 in T<sub>reg</sub>-Zellen in diesen Kontext eingeordnet und anderen Ansätzen zur pharmakologischen Adressierung von T<sub>reg</sub>-Zellen gegenübergestellt werden.

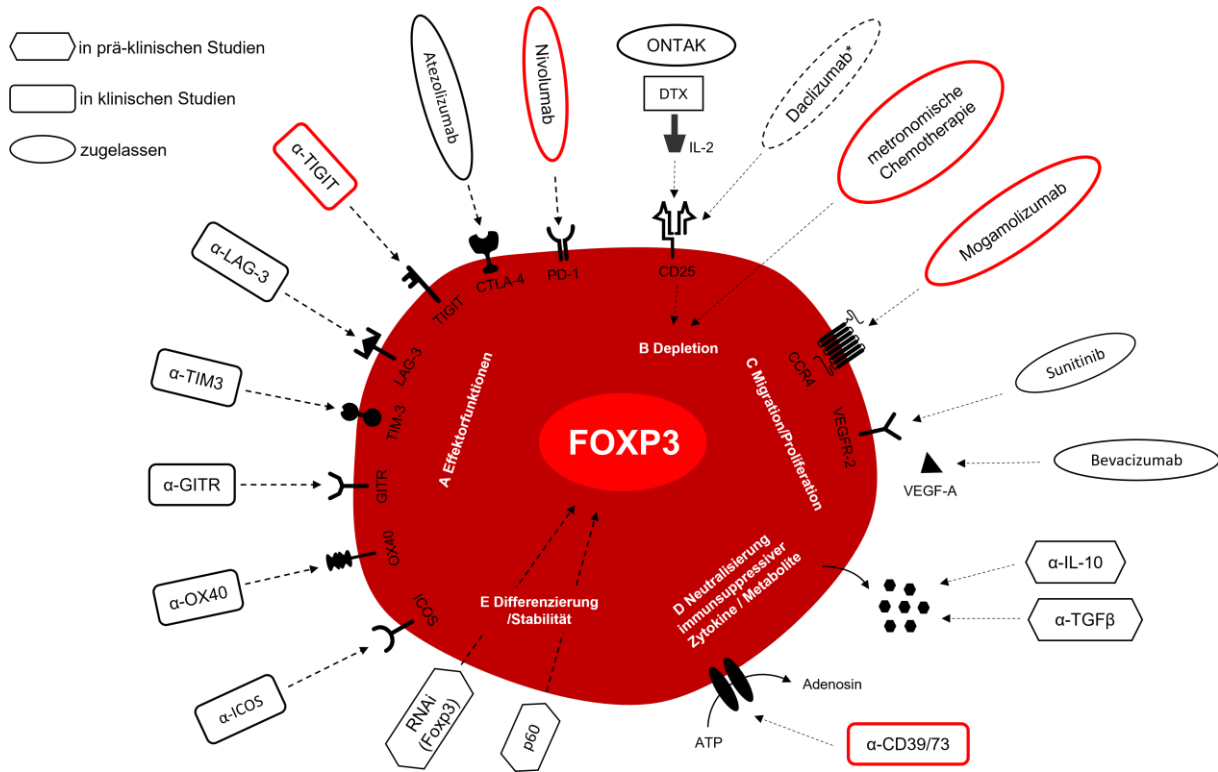
#### 4.1 Therapien zur pharmakologischen Manipulation von intratumoralen regulatorischen T-Zellen

Zur therapeutischen Manipulation von T<sub>reg</sub>-Zellen in der Immunonkologie werden grundsätzlich zwei Ziele verfolgt:<sup>200</sup>

- I. Erniedrigung der Frequenz von T<sub>reg</sub>-Zellen im Tumorgewebe und
- II. Reduzierung/Inhibition der immunsuppressiven Effektormechanismen von tumorinfiltrierenden T<sub>reg</sub>-Zellen (tiT<sub>reg</sub>-Zellen).

Ziel I kann über die Depletion von tiT<sub>reg</sub>-Zellen oder über die Reduktion der Migration von T<sub>reg</sub>-Zellen in das Tumorgewebe erreicht werden. Zusätzlich kann die Stabilität von tiT<sub>reg</sub>-Zellen und damit auch deren Viabilität beeinflusst werden, wodurch wiederum die Frequenz an T<sub>reg</sub>-Zellen in Tumoren vermindert werden kann. Für Ziel II eignet sich die Manipulation verschiedener Effektormechanismen von T<sub>reg</sub>-Zellen (Kap. 1.3.5).<sup>111</sup> Dazu gehören die Blockade von inhibitorischen Oberflächenrezeptoren (iOR), die auf T<sub>reg</sub>-Zellen exprimiert werden. Aber auch die Neutralisierung von immunsuppressiven Zytokinen oder die Reduktion der Produktion von immunsuppressiven Metaboliten sind vielversprechende Ansätze, um die pro-tumorale Wirkung von T<sub>reg</sub>-Zellen zu vermindern. Dabei konnte eine Vielzahl verschiedener Zielmoleküle identifiziert werden, durch die die oben genannten Ziele erreicht werden könnten. Eine Auswahl solcher Zielmoleküle und die korrespondierenden Therapien sind in Abb. 35 graphisch resümiert. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die genannten Ziele auch durch die gezielte pharmakologische Manipulation der CK2 in T<sub>reg</sub>-Zellen erreicht werden können. Die spezifische genetische Deletion der CK2 in T<sub>reg</sub>-Zellen erniedrigt nicht nur den prozentualen Anteil von T<sub>reg</sub>-Zellen im Tumorgewebe (Abb. 17), sondern reduziert gleichzeitig einen Teil der inhibitorischen Effektormechanismen von T<sub>reg</sub>-Zellen (Kap. 3.10). Dabei sind von der T<sub>reg</sub>-spezifischen Deletion der CK2 Mechanismen bzw. Oberflächenmoleküle betroffen, gegen die bereits Therapien entwickelt wurden oder deren Therapien sich in (prä-) klinischen Testphasen befinden (Abb. 35, rot hervorgehoben). Die pharmakologische Manipulation der CK2 in T<sub>reg</sub>-Zellen hat demnach mehrere positive Effekte hinsichtlich der T<sub>reg</sub>-Zellen und deren Rolle im Rahmen der Tumorummunologie. Die

von der T<sub>reg</sub>-spezifischen Deletion der CK2 betroffenen Suppressionsmechanismen und deren korrespondierenden Therapien sollen im Folgenden näher erläutert werden.



**Abbildung 35: Zugelassene und experimentelle Immuntherapien zur Manipulation von tumor-infiltrierenden T<sub>reg</sub>-Zellen.** Verändert nach Chaudhary et al. und Byrne et al.<sup>200,111</sup> **A** Die Therapien zielen auf die Inhibierung von iOR ab, durch die T<sub>reg</sub>-Zellen andere Immunzellen supprimieren können (Nivolumab (α-CTLA-4); α-LAG-3 (Studien ID: R3767-ONC-1613); α-TIM3 (Studien ID: 4020-01-001), α-GITR (Studien-ID: INCAGN 1876-201); α-OX-40 (Studien ID: B9991004); α-ICOS (Studien ID: 9930). **B** Die Therapien haben zum Ziel, die Frequenz an T<sub>reg</sub>-Zellen im Tumorgewebe zu erniedrigen. ONTAK (Fusionsprotein aus IL-2 und Diphtheriatoxin); Daclizumab (α-CD25) \*Hersteller verzichtet auf weitere Zulassung, metronomische Chemotherapie. **C** Die Therapien sollen die Migration von T<sub>reg</sub>-Zellen in das Tumorgewebe und die Proliferation von T<sub>reg</sub>-Zellen inhibieren. α-CCR4 (NCT00888927); Sunitinib (Tyrosinkinase-Hemmer); Bevacizumab (α-VEGF). **D** Die Therapien zielen auf die Neutralisierung von immunsuppressiven Zytokinen ab, die in erheblichem Ausmaß durch T<sub>reg</sub>-Zellen sezerniert werden. α-IL-10, α-TGF-β. **E** Experimentelle Ansätze, die darauf abzielen, durch direkte Manipulation von FOXP3 die Differenzierung und die Stabilität von T<sub>reg</sub>-Zellen zu beeinflussen. RNAi (RNA-Interferenz); p60-Peptid.

### Reduzierung der Frequenz von intratumoralen T<sub>reg</sub>-Zellen

Zahlreiche Studien belegen, dass eine Reduzierung der Frequenz von intratumoralen T<sub>reg</sub>-Zellen das Tumorwachstum vermindert.<sup>136</sup> Dabei ist nicht allein die absolute Zahl oder Frequenz von T<sub>reg</sub>-Zellen entscheidend. Vielmehr ist das Verhältnis von T<sub>eff</sub>-Zellen (insbesondere CD8<sup>+</sup> T-Zellen) zu T<sub>reg</sub>-Zellen für eine effektive Immunantwort gegenüber Tumoren ein wichtiges Kriterium und wird daher als positiv prognostischer Marker für eine Vielzahl von Tumorerkrankungen angesehen.<sup>201</sup> Die spezifische Depletion von T<sub>reg</sub>-Zellen ist nicht trivial, da viele Oberflächenmoleküle, die auf T<sub>reg</sub>-Zellen exprimiert

werden, auch von anderen Immunzellen exprimiert werden. Ein Beispiel hierfür ist CD25, das prinzipiell für die Depletion von T<sub>reg</sub>-Zellen geeignet ist und dadurch eine verstärkte Immunantwort gegenüber Tumoren zur Folge haben kann.<sup>202</sup> Die Depletion von T<sub>reg</sub>-Zellen mit einem monoklonalen Antikörper gegen CD25 (anti (α)-CD25) ist dabei nicht ohne Risiken, da CD25 auch von anderen Immunzellen wie aktivierten T<sub>eff</sub>-Zellen exprimiert wird. Diese Zellen können durch die Gabe von α-CD25 ebenfalls depletiert werden, was sich kontraproduktiv auf die Immunantwort gegenüber Tumoren auswirken kann.<sup>203</sup> Zusätzlich kann die systemische Gabe von α-CD25 schwerwiegende Nebenwirkungen hervorrufen. Der Grund hierfür ist, dass nicht nur intratumorale T<sub>reg</sub>-Zellen depletiert werden, sondern auch T<sub>reg</sub>-Zellen in anderen Geweben betroffen sind, wodurch Entzündungsreaktionen und Autoimmunerkrankungen entstehen können.<sup>204,205</sup>

Auch klassische Krebstherapien können einen Einfluss auf die Frequenz von T<sub>reg</sub>-Zellen haben. Ein Beispiel hierfür ist das Chemotherapeutikum Cyclophosphamid. Murine und humane Studien konnten zeigen, dass durch die wiederholte Gabe von niedrig dosiertem Cyclophosphamid spezifisch die Frequenz von T<sub>reg</sub>-Zellen im Blut von Krebspatienten reduziert werden konnte.<sup>206</sup> Zusätzlich scheint Cyclophosphamid die Effektorfunktionen von T<sub>reg</sub>-Zellen zu beeinflussen, da mit Cyclophosphamid behandelte T<sub>reg</sub>-Zellen die Effektorfunktionen von NK-Zellen und die Proliferation von T-Zellen weniger stark supprimieren als unbehandelte T<sub>reg</sub>-Zellen. Interessanterweise ist der spezifische depletierende Effekt von Cyclophosphamid auf T<sub>reg</sub>-Zellen dosisabhängig. Die wiederholte Gabe höherer Dosen von Cyclophosphamid führte unter anderem dazu, dass neben T<sub>reg</sub>-Zellen auch T<sub>eff</sub>-Zellen depletiert werden, was wiederum der anti-tumoralen Immunantwort entgegenwirkt. Neben den erwünschten sind bei der Gabe von Cyclophosphamid auch Nebeneffekte und Nebenwirkungen beschrieben. Aus immunologischer Sicht ist eine Studie zu erwähnen, die beschreibt, dass Cyclophosphamid die Frequenz an T<sub>reg</sub>-Zellen zwar vermindert, aber gleichzeitig die Frequenz von myeloiden Suppressorzellen im Tumorgewebe erhöht.<sup>207</sup> Zusätzlich sind die klassischen Nebenwirkungen durch Chemotherapeutika bei der Gabe von Cyclophosphamid zu beachten. Wie bereits erwähnt stellt die Migration von T<sub>reg</sub>-Zellen in das Tumorgewebe einen weiteren Ansatzpunkt dar, um die Zahl und Frequenz an T<sub>reg</sub>-Zellen im Tumorgewebe zu reduzieren. Als interessantes Zielmolekül konnte hierfür der Chemokinrezeptor CCR4 (*C-C chemokine receptor 4*) identifiziert werden.<sup>208</sup> CCR4 wird vor allem von hochsuppressiven T<sub>reg</sub>-Zellen exprimiert und spielt in verschiedenen Tumorarten eine bedeutende Rolle bei der Migration von T<sub>reg</sub>-Zellen in das Tumorgewebe. Dabei werden die Liganden CCL (*Chemokine C-C motif ligand*) 17 und CCL22 von Tumorzellen, aber auch tumor-infiltrierenden Immunzellen produziert, wodurch ein Konzentrationsgradient entsteht, anhand dessen T<sub>reg</sub>-Zellen in das Tumorgewebe rekrutiert werden.<sup>209</sup> Humane Studien von Sakagushi et al. zeigen, dass T<sub>reg</sub>-Zellen aus dem Blut von Melanompatienten eine signifikant höhere CCR4-Expression zeigen als T<sub>reg</sub>-Zellen von gesunden Probanden.<sup>210</sup> Zusätzlich offenbarte der Vergleich zwischen T<sub>reg</sub>-Zellen aus dem Melanomgewebe und T<sub>reg</sub>-Zellen aus dem Blut

der Melanompatienten, dass  $tiT_{reg}$ -Zellen eine höhere CCR4-Expression besitzen und diese einen hochsuppressiven Phänotyp aufweisen ( $eT_{reg}$ -Zellen).<sup>9,210</sup> Die Autoren der Studie konnten zeigen, dass durch die Administration von monoklonalen  $\alpha$ -CCR4 Antikörper (Mogamulizumab) selektiv  $eT_{reg}$ -Zellen depletiert werden, während naive  $T_{reg}$ -Zellen in der Peripherie dadurch nicht betroffen sind. Einhergehend mit der Depletion von  $eT_{reg}$ -Zellen konnte in *in vitro* Experimenten eine Induktion von tumorantigen-spezifischen  $T_{eff}$ -Zellen beobachtet werden. Mogamulizumab ist inzwischen für die Behandlung bestimmter T-Zelllymphome zugelassen und wird in weiteren klinischen Studien zur Behandlung solider Tumorarten getestet.<sup>211</sup>

Die Verminderung der Zahl und Frequenz an  $T_{reg}$ -Zellen besitzt demnach großes Potential für die Therapie von Tumorerkrankungen. Die Ergebnisse aus Kap. 3.6 zeigen, dass die spezifische Deletion der CK2 in  $T_{reg}$ -Zellen den prozentualen Anteil an  $T_{reg}$ -Zellen im Tumorgewebe signifikant reduziert. Von einem depletierenden Effekt auf  $T_{reg}$ -Zellen ist dabei nicht auszugehen, da im Laufe dieser Studie keine Hinweise gefunden werden konnten, dass die spezifische Deletion der CK2 einen Einfluss auf die Viabilität von peripheren oder  $tiT_{reg}$ -Zellen hat. Weder in *ex vivo* Analysen verschiedener Kompartimente noch in *in vitro* Kulturen konnten Unterschiede in der Frequenz und Viabilität zwischen CK2-defizienten und wildtypischen  $T_{reg}$ -Zellen festgestellt werden. Zusätzlich sind die absolute Zahl und der prozentuale Anteil von  $T_{reg}$ -Zellen in den drainierenden Lymphknoten von  $Csnk2b^{Treg/-}$  Mäusen erhöht (Abb. 17), was gegen eine Depletion von  $T_{reg}$ -Zellen basierend auf der CK2-Deletion spricht. Ob die Migration von  $T_{reg}$ -Zellen in das Tumorgewebe durch die spezifische Deletion der CK2 gestört ist, konnte in dieser Arbeit nicht endgültig beantwortet werden. Fest steht jedoch, dass das Verhältnis von  $T_{eff}$ -Zellen zu  $T_{reg}$ -Zellen in Tumoren von  $Csnk2b^{Treg/-}$  Mäusen gegenüber dem Verhältnis in Tumoren von wildtypischen Mäusen signifikant erhöht ist (Abb. 17). Dieses Verhältnis kann durch zwei Faktoren erhöht werden. Zum einen kann sich durch Depletion oder verminderte Migration die Zahl von  $T_{reg}$ -Zellen im Tumorgewebe vermindern. Zum anderen kann sich durch verstärkte Migration die Zahl der  $T_{eff}$ -Zellen im Tumorgewebe erhöhen. Folgende Punkte sprechen gegen ein verändertes Migrationsverhalten von CK2-defizienten  $T_{reg}$ -Zellen: Auf das Tumolvolumen bezogen ist die absolute Zahl von  $T_{reg}$ -Zellen in Tumoren von  $Csnk2b^{Treg/-}$  Mäusen erhöht, während die Frequenz von  $tiT_{reg}$ -Zellen signifikant reduziert ist. Betrachtet man die Kennzahlen in den drainierenden Lymphknoten (dLN), ist sowohl die absolute Zahl als auch die Frequenz in  $Csnk2b^{Treg/-}$  Mäusen erhöht. Setzt man die absoluten Zahlen von  $T_{reg}$ -Zellen im Tumorgewebe (pro  $cm^3$ ) und den dLN beider Maustypen ins Verhältnis, ist in beiden Fällen die Zahl in  $Csnk2b^{Treg/-}$  Mäusen um den Faktor 3 erhöht. Die Tatsache, dass sich der Faktor nicht ändert, spricht dafür, dass auch die Migration von  $T_{reg}$ -Zellen nicht maßgeblich durch die CK2-Deletion beeinflusst wird und somit zum gesteigerten Quotienten von  $T_{eff}$ - zu  $T_{reg}$ -Zellen beiträgt. Vielmehr scheint die spezifische Deletion der CK2 in  $T_{reg}$ -Zellen einen Einfluss auf die

<sup>9</sup> Humane  $eT_{reg}$ -Zellen (effektorische  $T_{reg}$ -Zellen) werden durchflusszytometrisch folgendermaßen charakterisiert:  $CD4^+ CD45RA^- CD25^{hi} FOXP3^{hi}$ .

Migration von  $T_{\text{eff}}$ -Zellen zu besitzen. Betrachtet man die Verhältnisse von  $T_{\text{eff}}$ -Zellen zwischen den beiden Maustypen in den dLN und dem Tumorgewebe, so ist zu beobachten, dass sich das Verhältnis sowohl bei  $CD8^+$  T-Zellen (von 1,9 auf 8,2) als auch bei  $CD4^+$  T-Zellen (1,8 auf 8,2) um das 4-fache erhöht.<sup>r</sup> Dies bedeutet im Falle von  $CD4^+$   $T_{\text{eff}}$ -Zellen, dass die absolute Zahl in den dLN im Vergleich von  $Csnk2b^{\text{Treg-/-}}$  zu wildtypischen Mäusen um den Faktor 1,9 erhöht ist, während sie im Tumorgewebe um den Faktor 8,2 erhöht ist. Zieht man in Betracht, dass die lymphatischen Organe von  $Csnk2b^{\text{Treg-/-}}$  Mäusen generell vergrößert sind (Daten nicht gezeigt), würde der Unterschied noch deutlicher ausfallen, wenn auch die absolute Zellzahl in den dLN auf die Größe oder das Volumen bezogen werden würde. Die Ergebnisse deuten demnach darauf hin, dass die spezifische Deletion der CK2 in  $T_{\text{reg}}$ -Zellen einen Einfluss auf die Migration von  $T_{\text{eff}}$ -Zellen aus den dLN in das Tumorgewebe hat. Die Frage, ob die CK2 einen Einfluss auf die Migration von  $T_{\text{reg}}$ -Zellen besitzt, könnte durch weitere Experimente möglicherweise beantwortet werden. Dazu könnte die Analyse der Expression von Chemokinrezeptoren wie CCR4 auf  $T_{\text{reg}}$ -Zellen in tumortragenden  $Csnk2b^{\text{Treg-/-}}$  und wildtypischen Mäusen beitragen. Zusätzliche wertvolle Informationen könnten adoptive Transferexperimente zu dieser Fragestellung liefern. Eine Möglichkeit bestünde darin, ein B16F10 Melanommodell mit RAG-Mäusen<sup>s</sup> durchzuführen, wobei jeweils die gleiche Zahl von  $T_{\text{reg}}$ -Zellen aus  $Csnk2b^{\text{Treg-/-}}$  oder wildtypischen Mäusen adoptiv transferiert wird.<sup>t</sup> Die Analyse der Zahl und Frequenz von  $T_{\text{reg}}$ -Zellen im Tumorgewebe sowie lymphatischen Organen könnte Hinweise über das Migrationsverhalten von CK2-defizienten  $T_{\text{reg}}$ -Zellen liefern. Eine andere Möglichkeit wäre, CK2-defiziente und wildtypische  $T_{\text{reg}}$ -Zellen in dieselbe RAG-Maus zu transferieren, wobei ein wesentlicher Vorteil dieses Experiments darin bestünde, dass beide Arten von  $T_{\text{reg}}$ -Zellen denselben Einflüssen ausgesetzt sind. Zur Unterscheidung der transferierten Zellen müssten in den hypothetischen Experimenten eine der  $T_{\text{reg}}$ -Arten (wildtypisch oder CK2-defizient), kongene Marker wie Ly5.1 oder CD90.1 auf ihrer Oberfläche exprimieren.

### Reduktion der Effektormechanismen von $T_{\text{reg}}$ -Zellen

Auf der Suche nach spezifischeren Zielmolekülen sind iOR auf  $T_{\text{reg}}$ -Zellen in den Fokus der aktuellen Forschung gerückt (Abb. 36). Zwei Faktoren waren und sind hierbei von entscheidender Bedeutung. Zum einen ist die Expression von iOR ein wichtiger Effektormechanismus von  $T_{\text{reg}}$ -Zellen (siehe Kap. 1.3.5), durch die sie eine effektive Immunantwort gegenüber Tumoren verhindern. Zum anderen ist die Expression dieser Rezeptoren auf intratumoralen  $T_{\text{reg}}$ -Zellen gegenüber  $T_{\text{reg}}$ -Zellen in anderen Kompartimenten signifikant erhöht, wodurch eine deutlich höhere Spezifität gegenüber intratumoralen  $T_{\text{reg}}$ -Zellen erreicht werden kann, als sie beispielsweise mit  $\alpha$ -CD25 gegeben ist.<sup>194</sup> Dabei ist anzumerken, dass viele der iOR auch von  $T_{\text{eff}}$ -Zellen und dabei insbesondere von tumor-infiltrierenden

<sup>r</sup> #  $T_{\text{eff}}$ -Zellen  $Csnk2b^{\text{Treg-/-}}$  / #  $T_{\text{eff}}$ -Zellen  $Csnk2b^{\text{fl/fl}}$  Mäusen

<sup>s</sup> RAG (*recombination activating gene 1*)-Mäuse besitzen keine B- und T-Zellen.

<sup>t</sup> Gleichzeitiger Transfer von  $T_{\text{eff}}$ -Zellen aus wildtypischen Mäusen.



T<sub>eff</sub>-Zellen (tiT<sub>eff</sub>-Zellen) exprimiert werden.<sup>191</sup> Hier vermitteln die Rezeptoren suppressive Signale in die T<sub>eff</sub>-Zellen, wodurch deren Effektormechanismen reduziert werden.<sup>188</sup> Die Blockade dieser inhibitorischen Signale war bei vielen Therapien, die gegen iOR gerichtet sind, das ursprüngliche Ziel. In vielen Fällen stellte sich jedoch heraus, dass T<sub>reg</sub>-Zellen diese iOR in erheblichem oder sogar höherem Ausmaß exprimieren und dadurch synergistische Effekte durch die Suppression dieser iOR erreicht werden können: die Steigerung der Effektormechanismen von T<sub>eff</sub>-Zellen und die gleichzeitige Reduzierung der Suppressionsmechanismen von T<sub>reg</sub>-Zellen.<sup>194</sup>

Ein relevantes Beispiel hierfür ist der Oberflächenrezeptor TIGIT. Dieser wird von T<sub>eff</sub>-Zellen, T<sub>reg</sub>-Zellen, aber auch von NK-Zellen exprimiert.<sup>212</sup> Die Expression korreliert dabei mit dem Aktivierungsstatus der Zellen. Die höchste Expression von TIGIT ist auf aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen und T<sub>reg</sub>-Zellen zu finden, wie sie in Tumorgewebe anzutreffen sind, während auf naiven T-Zellen eine sehr geringe TIGIT-Expression zu detektieren ist. TIGIT bindet an die Oberflächenmoleküle CD155 (PVR; *poliovirus receptor*; höchste Affinität) und CD112 (Nectin-2), die unter anderem von DCs, aber auch von verschiedenen Tumorzellen (u. a. Melanomzellen) exprimiert werden.<sup>212</sup> Erste Studien zu TIGIT-vermittelten Suppressionsmechanismen konnten zeigen, dass die Bindung von TIGIT an CD155 auf DCs einen tolerogenen DC-Phänotyp induziert, der sich durch eine erhöhte Produktion immunsuppressiver Zytokine wie IL-10 und TGF- $\beta$  auszeichnet, wodurch die Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen beeinflusst wird.<sup>213</sup> Inzwischen konnten aber auch T-Zell-intrinsische Effekte identifiziert werden, die durch die Aktivierung von TIGIT induziert werden.<sup>214</sup> Diese führt bei T<sub>eff</sub>-Zellen zu einer Reduktion ihrer Effektormechanismen, während es bei T<sub>reg</sub>-Zellen zu einer Steigerung derselben führt. Deswegen wird eine hohe Expression von TIGIT bei T<sub>eff</sub>-Zellen mit einem dysfunktionalen Phänotyp assoziiert.<sup>215</sup> TIGIT-exprimierende T<sub>reg</sub>-Zellen hingegen werden als hochsuppressiv beschrieben. Die Blockade von TIGIT mit monoklonalen Antikörpern ( $\alpha$ -TIGIT) hat insbesondere in Kombination mit anderen Checkpoint-Inhibitoren einen starken anti-tumoralen Effekt, wobei nicht eindeutig geklärt ist, ob die Wirkung auf T<sub>eff</sub>-Zellen oder T<sub>reg</sub>-Zellen überwiegt.<sup>215</sup> Dabei deuten murine Studien von Anderson et al. darauf hin, dass bei  $\alpha$ -TIGIT-Antikörpern der Effekt auf T<sub>reg</sub>-Zellen überwiegt.<sup>216</sup> Die Autoren stützen ihre Aussage auf Experimente, in denen sie TIGIT-defiziente T<sub>reg</sub>-Zellen oder TIGIT-defiziente CD8<sup>+</sup> T-Zellen in RAG Mäuse adoptiv transferierten und nach Inokulation mit B16F10-Zellen das Tumorwachstum beobachteten.<sup>u</sup> Die Ergebnisse offenbarten, dass der Transfer von TIGIT-defizienten T<sub>reg</sub>-Zellen das Tumorwachstum signifikant verlangsamt. Der Transfer von TIGIT-defizienten CD8<sup>+</sup> T-Zellen hat im Vergleich dazu keinen signifikanten Einfluss auf das Tumorwachstum. Studien von Zarour et al. liefern Erkenntnisse über TIGIT-exprimierende T<sub>reg</sub>-Zellen in humanen Melanomen, wobei in dieser Studie auch die Rolle von CD226, dem funktionellen Gegenpart zu TIGIT, für die suppressiven Fähigkeiten von T<sub>reg</sub>-Zellen beleuchtet wird.<sup>217</sup> Die Resultate

<sup>u</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen: gleichzeitiger Transfer von wildtypischen T<sub>eff</sub>-Zellen; CD8<sup>+</sup> T-Zellen: gleichzeitiger Transfer von wildtypischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

zeigen, dass  $tiT_{reg}$ -Zellen im Vergleich zu  $tiT_{eff}$ -Zellen und peripheren  $T_{reg}$ -zellen die niedrigste CD226- und die höchste TIGIT-Expression zeigen. In Übereinstimmung mit anderen Publikationen werden auch hier TIGIT-exprimierende  $T_{reg}$ -Zellen als hochsuppressiv beschrieben und eine hohe Expression verschiedener iOR (CTLA-4; PD-1; CD39 und TIM-3) aufweisen. Im Gegensatz dazu hat die Expression von CD226 bzw. dessen Aktivierung negative Auswirkungen auf die suppressiven Fähigkeiten von  $T_{reg}$ -Zellen (niedrigere Expression von iOR) sowie auf die Stabilität von  $T_{reg}$ -Zellen (niedrigere Expression von FOXP3). In Bezug auf Therapien mit CPI offenbaren die Ergebnisse der Studie, dass ein hoher Quotient von TIGIT- zu CD226-Expression mit einer niedrigeren Ansprechrate bei Therapien mit CPI bei der Behandlung von malignen Melanomen korreliert. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die spezifische Deletion der CK2 in  $T_{reg}$ -Zellen die TIGIT-Expression auf  $tiT_{reg}$ -Zellen signifikant reduziert (Abb. 33). Betrachtet man TIGIT als Marker für einen hochsuppressiven  $T_{reg}$ -Phänotyp, unterstreicht dies die bisherigen Erkenntnisse, dass CK2-defiziente  $T_{reg}$ -Zellen in ihren suppressiven Fähigkeiten eingeschränkt sind. Für weitergehende Analysen ist sicherlich die CD226-Expression auf CK2-defizienten  $tiT_{reg}$ -Zellen von besonderem Interesse. Unter der Annahme, dass diese nicht von der CK2-Defizienz betroffen ist, hat die CK2-Defizienz einen niedrigeren TIGIT/CD226-Expressionsquotienten auf  $tiT_{reg}$ -Zellen zur Folge. In therapeutischer Hinsicht sind diese Ergebnisse dahingehend von Interesse, da die pharmakologische Inhibition der CK2 in  $T_{reg}$ -Zellen ebenfalls zu einem niedrigeren TIGIT/CD226-Expressionsquotienten auf  $tiT_{reg}$ -Zellen führen könnte. Dies wiederum könnte die Effizienz von CPI-Therapien steigern.

Eine der prominentesten iOR, der als Zielmolekül für onkologische Immuntherapien genutzt wird, ist PD-1 (*Programmed cell death protein 1*). In  $T_{eff}$ -Zellen führt die Bindung des Liganden PD-L1, der unter anderem von Tumorzellen exprimiert wird, zu einer Reduktion der T-Zellaktivität. Die Blockade durch monoklonale  $\alpha$ -PD-1 Antikörper führt dazu, dass die PD-1 vermittelte Aktivitätsminderung bei  $T_{eff}$ -Zellen (vorwiegend CD8<sup>+</sup> T-Zellen) verhindert wird.<sup>218</sup> Dabei wird PD-1 auf  $tiT_{reg}$ -Zellen in ähnlichem Ausmaß wie auf  $tiCD8^+$  T-Zellen exprimiert.<sup>195</sup> Die Gabe von  $\alpha$ -PD-1 hat demnach nicht nur einen Einfluss auf  $tiCD8^+$  T-Zellen, sondern auch auf PD-1-exprimierende (PD-1<sup>+</sup>)  $tiT_{reg}$ -Zellen. Die Bedeutung von PD-1 für  $T_{reg}$ -Zellen und deren suppressive Fähigkeiten ist nicht vollständig geklärt und variiert dabei in Abhängigkeit des immunologischen Kontexts. In einem murinen Modell für autoimmun-induzierte Pankreatitis werden PD-1-defizienten  $T_{reg}$ -Zellen stark immunsuppressive Eigenschaften zugeschrieben.<sup>219</sup> Zu ähnlichen Erkenntnissen gelangen Autoren einer kürzlich veröffentlichten Studie, die die Auswirkungen der spezifischen Deletion von PD-1 in  $T_{reg}$ -Zellen untersuchten. In murinen Modellen für Multiple Sklerose und autoimmun-induzierter Diabetes zeigen Mäuse mit PD-1-defizienten  $T_{reg}$ -Zellen mildere Krankheitsverläufe, was ebenfalls auf erhöhte immunsuppressive Eigenschaften von PD-1-defizienten  $T_{reg}$ -Zellen hindeutet.<sup>220</sup> Die Phänotypisierung von PD-1-defizienten  $T_{reg}$ -Zellen offenbarte dabei eine höhere Proliferation sowie eine gesteigerte Expression von  $T_{reg}$ -Aktivierungsmarkern wie ICOS (*Inducible costimulator*) und GITR

(*Glucocorticoid-Induced TNFR-Related protein*). Im Kontext von Autoimmunerkrankungen führt demnach die Expression von PD-1 zu verminderten suppressiven Fähigkeiten von T<sub>reg</sub>-Zellen. Überträgt man diese Erkenntnisse auf T<sub>reg</sub>-Zellen im Kontext der Tumorummunologie, sollte eine hohe PD-1-Expression auf T<sub>reg</sub>-Zellen zu verminderten suppressiven Fähigkeiten von T<sub>reg</sub>-Zellen und damit zu einer gesteigerten Immunreaktion gegenüber Tumoren führen. Zwei Studien der Gruppe um Hiroyoshi Nishikawa untersuchen diese Fragestellung, wobei die Studien vorwiegend die Frage adressieren, inwieweit PD-1<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen die Effizienz von  $\alpha$ -PD-1-Therapien beeinflussen. Die erste Studie verbindet eine hohe PD-1-Expression auf tiT<sub>reg</sub>-Zellen mit dem Phänomen der Hyperprogression nach  $\alpha$ -PD-1-Therapien bei Magenkarzinomen.<sup>v,195</sup> Dem zugrunde liegt eine starke Proliferation von PD-1<sup>+</sup> tiT<sub>reg</sub>-Zellen nach der Behandlung mit  $\alpha$ -PD-1 und einhergehend damit eine gesteigerte Expression von inhibitorischen Oberflächenrezeptoren auf PD-1<sup>+</sup> tiT<sub>reg</sub>-Zellen. In der zweiten Studie postulieren die Autoren, dass ein hohes Verhältnis von PD-1<sup>+</sup> tiCD8<sup>+</sup> T-Zellen zu PD-1<sup>+</sup> tiT<sub>reg</sub>-Zellen die Effizienz von  $\alpha$ -PD-1-Therapien bei Lungenkarzinomen, Magenkarzinomen und malignen Melanomen positiv beeinflusst.<sup>221</sup> Dabei zeigen *in vitro* Experimente mit humanen T-Zellen, dass PD-1<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen die Proliferation von PD-1<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Anwesenheit von  $\alpha$ -PD-1 stärker supprimieren. Im Gegensatz dazu reduziert  $\alpha$ -PD-1 die suppressiven Fähigkeiten von PD-1<sup>-</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen gegenüber PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Diese Erkenntnisse konnten dabei in Mausmodellen verifiziert werden. Dafür transferierten die Autoren der Studie PD-1<sup>-</sup> bzw. wildtypische T<sub>reg</sub>-Zellen und PD-1<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen bzw. wildtypische CD8<sup>+</sup> T-Zellen in verschiedenen Verhältnissen in tumortragende immundefiziente Mäuse. Nach adoptivem Transfer wurden die Mäuse zusätzlich mit  $\alpha$ -PD-1 behandelt, während die Kontrollgruppe nicht behandelt wurde. Die Ergebnisse offenbarten, dass bei adoptivem Transfer von PD-1<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen und wildtypischen T<sub>reg</sub>-Zellen (niedriges Verhältnis von PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu PD-1<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen)  $\alpha$ -PD-1 das Tumorwachstum beschleunigt. Im umgekehrten Fall, dem Transfer von wildtypischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen und PD-1<sup>-</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen (hohes Verhältnis von PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu PD-1<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen), reduziert die Therapie mit  $\alpha$ -PD-1 das Tumorwachstum.  $\alpha$ -PD-1 scheint demnach auf PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen und PD-1<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen einen aktivierenden Einfluss zu besitzen, wobei der letztere Fall dem eigentlichen Zweck der Therapie entgegenwirkt. Die Effizienz wird dabei zum Teil davon bestimmt, welche der beiden Zielzellen in höherer Frequenz im Tumorgewebe zu finden ist. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die spezifische Deletion der CK2 in T<sub>reg</sub>-Zellen zu einer reduzierten Expression von PD-1 auf tiT<sub>reg</sub>-Zellen führt. Bei der Expression von PD-1 auf tiCD8<sup>+</sup> T-Zellen konnten zwischen beiden Maustypen (CK2-kompetent und -defizient) keine Unterschiede detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Die niedrigere PD-1-Expression auf CK2-defizienten tiT<sub>reg</sub>-Zellen führt demnach zu einem höheren Verhältnis von PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu PD-1<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen in den Tumoren. Im Hinblick auf die zuvor beschriebenen Erkenntnisse von Kumagai et al. ergeben sich damit interessante Anhaltspunkte für Kombinationstherapien von CK2-Inhibitoren und  $\alpha$ -PD-1. Es besteht die Möglichkeit, dass die spezifische Inhibition der CK2 in T<sub>reg</sub>-Zellen zu einer niedrigeren PD-1-

<sup>v</sup> Hyperprogression: abnormal stark fortschreitendes Tumorwachstum nach Behandlung mit CPI.

Expression auf  $\text{tiT}_{\text{reg}}$ -Zellen führt, wodurch das Verhältnis von  $\text{PD-1}^+ \text{CD8}^+$  T-Zellen zu  $\text{PD-1}^+ \text{T}_{\text{reg}}$ -Zellen gesteigert wird und damit die Effizienz der  $\alpha$ -PD-1-Therapie erhöht werden kann. Um diese Hypothese experimentell zu bestätigen, bietet sich der Vergleich des Tumorwachstums von unbehandelten  $\text{Csnk2b}^{\text{Treg}/-}$  Mäusen mit  $\alpha$ -PD-1-behandelten  $\text{Csnk2b}^{\text{Treg}/-}$  Mäusen an. Auf Basis der zuvor aufgestellten Hypothese sollte das Tumorwachstum bei  $\alpha$ -PD-1-behandelten  $\text{Csnk2b}^{\text{Treg}/-}$  Mäusen niedriger ausfallen. Zusätzlich könnten Tumorexperimente mit wildtypischen Mäusen durchgeführt werden, die eine Kombinationstherapie eines CK2-Inhibitors und  $\alpha$ -PD-1 erhalten. Hier wäre zu beachten, dass die Spezifität gegenüber der CK2 in  $\text{T}_{\text{reg}}$ -Zellen nicht mehr gegeben wäre und ein Effekt des CK2-Inhibitors auf andere (Immun-) Zellen nicht auszuschließen ist. Im Hinblick auf  $\text{CD8}^+$  T-Zellen konnten in Tumorexperimenten mit CK2-Inhibitoren keine Auswirkungen auf die Frequenz und/oder Effektorfunktionen von  $\text{tiCD8}^+$  T-Zellen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Die Auswirkungen des CK2-Inhibitors auf die PD-1-Expression wurden dabei nicht analysiert, wodurch ein Effekt von CK2-Inhibitoren auf die PD-1-Expression von  $\text{CD8}^+$  T-Zellen nicht auszuschließen ist.

Neben der Adressierung von iOR eignen sich auch weitere  $\text{T}_{\text{reg}}$ -vermittelte Mechanismen, um die suppressiven Fähigkeiten von  $\text{T}_{\text{reg}}$ -Zellen zu reduzieren. Ein vielversprechendes Ziel stellt dabei die Ecto-Nukleotidase CD39 dar. CD39 ist das geschwindigkeitsbestimmende Molekül bei der Hydrolyse von ATP in das stark immunsuppressive Adenosin.<sup>92</sup> CD39-defiziente  $\text{T}_{\text{reg}}$ -Zellen besitzen verminderte suppressive Fähigkeiten im Vergleich zu wildtypischen  $\text{T}_{\text{reg}}$ -Zellen und eine niedrige Expression von CD39 auf  $\text{T}_{\text{reg}}$ -Zellen wird mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht.<sup>91</sup> Im Kontext der Tumorummunologie führen verschiedene Studien vor, dass  $\text{tiT}_{\text{reg}}$ -Zellen (human und murin) eine höhere CD39-Expression zeigen als periphere  $\text{T}_{\text{reg}}$ -Zellen. Eine hohe Frequenz von CD39-exprimierenden  $\text{T}_{\text{reg}}$ -Zellen ( $\text{CD39}^+$   $\text{T}_{\text{reg}}$ -Zellen) wird deshalb bei einigen Tumorerkrankungen und bei der Effizienz von Therapien mit CPI als negativer prognostischer Marker angesehen.<sup>222,223</sup> Auch in murinen Tumormodellen zeigen Studien, dass  $\text{CD39}^+$   $\text{T}_{\text{reg}}$ -Zellen einer effektiven Immunantwort gegenüber Tumoren entgegenwirken. In verschiedenen Tumormodellen offenbarte sich, dass die Tumore in CD39-defizienten Mäusen langsamer wachsen und dabei weniger Metastasen gebildet werden.<sup>224</sup> Die Autoren der Studie postulieren dabei, dass vorwiegend die erniedrigte Suppression von NK-Zellen durch  $\text{T}_{\text{reg}}$ -Zellen für die geringere Tumorlast in CD39-defizienten Mäusen verantwortlich ist. Eine weitere murine Studie konnte wichtige Erkenntnisse sammeln, wie die CD39-Expression auf  $\text{T}_{\text{reg}}$ -Zellen durch Signale im Tumormikromilieu erhöht wird. Die Autoren konnten aufzeigen, dass IL-27 und die damit verbundene Aktivierung von STAT1 (*Signal transducer and activator of transcription 1*) essenziell für die Expression von CD39 auf  $\text{tiT}_{\text{reg}}$ -Zellen ist.<sup>225</sup> Dies stellt einen interessanten Anhaltspunkt für die Gründe hinsichtlich der erniedrigten CD39-Expression auf CK2-defizienten  $\text{tiT}_{\text{reg}}$ -Zellen dar (siehe Abb. 34). Zusätzliche Analysen von  $\text{tiT}_{\text{reg}}$ -Zellen aus  $\text{Csnk2b}^{\text{Treg}/-}$  Mäusen hinsichtlich der Expression des IL-27-Rezeptors und der Expressions- bzw. Aktivierungsstatus von STAT1 würden Informationen liefern, ob diese durch die Deletion der CK2 in  $\text{T}_{\text{reg}}$ -Zellen beeinflusst werden und

dadurch die erniedrigte CD39-Expression auf CK2-defizienten  $\text{tiT}_{\text{reg}}$ -Zellen zu erklären ist. Der Aspekt, dass die CK2 einen Einfluss auf STAT-Moleküle (STAT3) haben kann, konnte dabei bereits in  $\text{CD4}^+$   $\text{T}_{\text{konv}}$ -Zellen gezeigt werden.<sup>134</sup>

Die beschriebenen Beispiele zeigen, dass die Inhibition der CK2 in  $\text{T}_{\text{reg}}$ -Zellen in vielerlei Hinsicht einen positiven Beitrag zu zukünftigen Immuntherapien leisten kann. Sowohl die Reduzierung der Frequenz von  $\text{tiT}_{\text{reg}}$ -Zellen und damit auch die Erniedrigung von deren immunsuppressiven Effektormechanismen könnten die Effizienz zukünftiger und bereits bestehender Immuntherapien beträchtlich steigern.

Ein weiteres charakteristisches Merkmal von CK2-defizienten  $\text{T}_{\text{reg}}$ -Zellen ist die erhöhte Expression von ILT3. Das folgende Kapitel soll dazu dienen, die Bedeutung von ILT3 für die suppressiven Fähigkeiten von (tumor-infiltrierenden)  $\text{T}_{\text{reg}}$ -Zellen näher zu beleuchten.

## 4.2 Die Bedeutung der ILT3-Expression für die suppressiven Fähigkeiten von regulatorischen T-Zellen gegenüber CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen der Typen 1 und 2

Auf Basis der Ergebnisse dieser Arbeit können im Hinblick auf die ILT3-Expression in tiT<sub>reg</sub>-Zellen drei Hypothesen aufgestellt werden.

1. Eine erhöhte Expression von ILT3 auf tiT<sub>reg</sub>-Zellen bzw. eine erhöhte Frequenz ILT3-exprimierender T<sub>reg</sub>-Zellen (ILT3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen) im Tumorgewebe fördert eine Typ2-vermittelte anti-tumorale Immunantwort.
2. Die CK2 kontrolliert die ILT3-Expression auf T<sub>reg</sub>-Zellen.<sup>w,115</sup>
3. Das Tumormikromilieu fördert die ILT3-Expression auf der Oberfläche von T<sub>reg</sub>-Zellen.

Wie bereits erwähnt, konnten initiale Studien von Ulges et al. ILT3-exprimierende T<sub>reg</sub>-Zellen als eigenständigen Subtyp von T<sub>reg</sub>-Zellen identifizieren, der verminderte Fähigkeiten zur Suppression von Typ2-Immunantworten zeigt.<sup>115</sup> Dies konnte in weiteren unabhängigen Studien bestätigt werden. Tung et al. evaluierten die Rolle von T<sub>reg</sub>-Zellen in einem Modell für autoimmuninduzierte Gastritis (AIG).<sup>226</sup> Dafür nutzen die Autoren sogenannte DEREK (*Depletion of Regulatory T cells*)-Mäuse, in denen T<sub>reg</sub>-Zellen durch die Gabe von Diphtheria-Toxin (DT) selektiv depletiert werden können. Eine zeitweilige Depletion von T<sub>reg</sub>-Zellen durch DT war ausreichend, dass die Mäuse eine autoimmun-induzierte Gastritis entwickelten, die durch eine unkontrollierte Typ2-Immunantwort ausgelöst wird. Wird die DT-Gabe beendet, konnte nach 14–21 Tagen dieselbe Frequenz an T<sub>reg</sub>-Zellen („Rebound T<sub>reg</sub>-Zellen“) in den Mägen und den dLN detektiert werden wie in unbehandelten Mäusen. Dies hatte aber keinen nennenswerten Einfluss auf den Verlauf der Gastritis. Die Autoren der Studie führen dies auf eine erhöhte Frequenz von ILT3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen innerhalb der „Rebound T<sub>reg</sub>-Zellen“ zurück, wobei zusätzlich eine höhere Frequenz an T<sub>H</sub>2-dirigierenden IRF4<sup>+</sup> PD-L2<sup>+</sup> DCs<sup>x</sup> in den dLN detektiert werden konnte. In einer kürzlich veröffentlichten Studie von Norlander et al. untersuchten die Autoren die Auswirkungen von Prostaglandin I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>)-Signalen auf T<sub>reg</sub>-Zellen.<sup>227</sup> In einem murinen Asthma-Modell zeigte sich, dass die Deletion des PGI<sub>2</sub>-Rezeptors IP in T<sub>reg</sub>-Zellen (IPKO-T<sub>reg</sub>-Zellen) einen deutlich schwereren Krankheitsverlauf zur Folge hatte, der auf einer unkontrollierten Typ2-Immunantwort basiert. Die Analyse der T<sub>reg</sub>-Zellen in der Lunge offenbarte, dass die ILT3-Expression auf IPKO-T<sub>reg</sub>-Zellen signifikant gesteigert war. Auch in dieser Studie konnte, einhergehend mit einer erhöhten Frequenz von ILT3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen, eine höhere Frequenz an IRF4<sup>+</sup> PD-L2<sup>+</sup> DCs detektiert werden. Vergleicht man die Studien von Tung et al., Norlander et al. und Ulges et al., dann sind weitreichende Parallelen hinsichtlich des Schweregrades von Typ2-vermittelten (Auto-) Immunantworten, der Präsenz von IRF4<sup>+</sup> PD-L2<sup>+</sup> DCs und der Expression von ILT3 auf T<sub>reg</sub>-Zellen im betroffenen Gewebe zu beobachten. Hinsichtlich der Suppression von Typ1-vermittelten Immunantworten durch ILT3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen gelangen verschiedene Studien zu konträren Erkenntnissen.

<sup>w</sup> Hier wurden bereits bestehende Erkenntnisse im Hinblick auf tiT<sub>reg</sub>-Zellen verifiziert.

<sup>x</sup> In mehreren Studien wird beschrieben, dass diese DC-Subpopulation T<sub>H</sub>2-basierte Immunantworten induziert.

In den wegbereitenden Arbeiten von Ulges et al. konnten weder in *in vitro* Suppressionsexperimenten mit polarisierten CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>1-Zellen noch in einem Typ1-basierten *in vivo* Colitis-Modell Unterschiede zwischen ILT3<sup>+</sup> und ILT3<sup>-</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen hinsichtlich ihrer suppressiven Fähigkeiten gegenüber Typ1-Immunantworten beobachtet werden.<sup>115</sup> Dem gegenüber stehen zwei Studien von Joller et al., die sich mit T<sub>reg</sub>-Zellen in Typ1-basierten Virusmodellen befasst haben. Die erste Studie charakterisiert T<sub>reg</sub>-Zellen vom Typ1, die sich durch die Expression des Transkriptionsfaktors T-BET (*T-box expressed in T cells*) und des Chemokinrezeptors CXCR3 (*C-X-C Motif Chemokine Receptor 3*) auszeichnen.<sup>228</sup> Die Studie zeigt, dass Typ1 T<sub>reg</sub>-Zellen ein charakteristisches Expressionsprofil verschiedener Oberflächenrezeptoren und Effektormoleküle aufweisen. Zusätzlich zu den bekannten Markern konnten die Autoren den iOR LAG-3, die Serinprotease Granzym B und ILT3 als charakteristische Merkmale von Typ 1 T<sub>reg</sub>-Zellen im Kontext von zwei verschiedenen Virusmodellen identifizieren. Um zu überprüfen, ob ILT3 eine funktionelle Rolle für die Suppression von Typ1-Immunantworten bzw. T<sub>H</sub>1-Zellen spielt, isolierten die Autoren verschiedene T<sub>reg</sub>-Subpopulationen aus infizierten Mäusen anhand der Oberflächenmarker CXCR3 und ILT3 und beobachteten deren suppressive Fähigkeiten gegenüber T<sub>H</sub>1-Zellen. Die Experimente offenbarten, dass ILT3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen (ILT3<sup>+</sup> CXCR3<sup>-</sup>) im Vergleich zu ILT3<sup>-</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen (ILT3<sup>-</sup> CXCR3<sup>-</sup>) die Proliferation und Zytokinproduktion von T<sub>H</sub>1-Zellen stärker supprimieren. Beim Vergleich von CXCR3<sup>+</sup> ILT3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen und CXCR3<sup>-</sup> ILT3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen konnten die Autoren allerdings keine Unterschiede detektieren. Die Autoren schließen daraus, dass die Expression von ILT3 auf T<sub>reg</sub>-Zellen mit deren suppressiven Fähigkeiten gegenüber T<sub>H</sub>1-Zellen korreliert. Es ist anzumerken, dass sich die erstgenannten Populationen in wichtigen Merkmalen unterscheiden. ILT3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen zeigen im Vergleich zu ILT3<sup>-</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen eine signifikant höhere Expression verschiedener inhibitorischer Oberflächenrezeptoren (bspw. LAG-3 und TIM-3), was in diesem Kontext auf einen erhöhten Aktivierungsstatus von ILT3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen hindeutet. Es könnte demnach sein, dass der generell erhöhte Aktivierungsstatus von ILT3<sup>+</sup> (CXCR3<sup>-</sup>) T<sub>reg</sub>-Zellen für die im Vergleich stärkeren suppressiven Fähigkeiten verantwortlich ist und ILT3 in diesem Zusammenhang eine untergeordnete Rolle spielt. Dafür spricht auch der Vergleich der letztgenannten T<sub>reg</sub>-Populationen (CXCR3<sup>+</sup> ILT3<sup>+</sup> vs. CXCR3<sup>-</sup> ILT3<sup>+</sup>), bei dem keine Unterschiede in den suppressiven Fähigkeiten detektiert werden konnten. Experimente mit effektorischen T<sub>H</sub>2- bzw. T<sub>H</sub>17-Zellen wurden nicht durchgeführt, wodurch ein direkter Vergleich der suppressiven Fähigkeiten der genannten T<sub>reg</sub>-Populationen hinsichtlich der verschiedenen T<sub>H</sub>-Zellen möglich gewesen wäre. Des Weiteren unterstützen Daten aus *in vivo* Zelltransferexperimenten die alternative Interpretation der vorliegenden Studie. Die Autoren transferierten ILT3<sup>+</sup> CXCR3<sup>-</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen oder ILT3<sup>-</sup> CXCR3<sup>-</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen in Kombination mit CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen in RAG-Mäuse. Die Analyse der Proliferation sowie der Zytokinproduktion der Effektor-T-Zellen offenbarte, dass keine Unterschiede zwischen den beiden transferierten T<sub>reg</sub>-Populationen hinsichtlich ihrer suppressiven Fähigkeiten festzustellen waren. Die Autoren der Studie begründen den nicht detektierbaren Unterschied im Falle des Transfers von ILT3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen mit einem Verlust der ILT3-Expression nach dem Zelltransfer. Allerdings ist bei dem

Transfer von ILT3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen ein Anstieg der ILT3-Expression zu beobachten, woraus geschlossen werden kann, dass der Zelltransfer nicht für den Abfall der ILT3-Expression verantwortlich ist. Zusätzlich deuten die Daten des *in vivo* Colitis-Modells aus den Arbeiten von Ulges et al. und zahlreiche selbst durchgeführte *in vitro* Experimente darauf hin, dass die ILT3-Expression auf ILT3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen stabil ist und nicht über die Zeit erniedrigt wird. Aufgrund der Identifizierung des Liganden von ILT3, CD166 auf T<sub>konv</sub>-Zellen konnten Joller et al. die Erkenntnisse der zuvor beschriebenen Studie erweitern.<sup>229</sup> In einer weiteren konnten die Autoren der Studie aufzeigen, dass sich die Expression von CD166 auf effektorischen T<sub>konv</sub>-Zellen (insbesondere auf antigenspezifischen T<sub>konv</sub>-Zellen) während der Virusinfektion erhöht. Auf Basis dieser Ergebnisse stellen die Autoren der Studie die Hypothese auf, dass ILT3<sup>+</sup> Typ 1 T<sub>reg</sub>-Zellen effektorische T<sub>H</sub>1-Zellen über die Bindung an CD166 supprimieren können. Die Autoren der Studie untermauern ihre Hypothese mit zwei *in vitro* Experimenten. Für das erste Experiment wurden Milzzellen von infizierten Mäusen in An- oder Abwesenheit von rekombinanten ILT3 restimuliert. Dabei zeigten effektorische T<sub>konv</sub>-Zellen, die in Anwesenheit von rekombinanten ILT3 stimuliert wurden, eine signifikant erniedrigte Produktion von T<sub>H</sub>1-assoziierten Zytokinen (IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ ). In einem weiteren Experiment wurden CXCR3<sup>+</sup> Typ 1 T<sub>reg</sub>-Zellen (ein hoher Anteil exprimiert dabei ILT3) mit effektorischen T<sub>konv</sub>-Zellen aus infizierten wildtypischen Mäusen oder infizierten CD166-KO Mäusen kultiviert. Dabei zeigte sich, dass CD166-KO T<sub>konv</sub>-Zellen in geringerem Ausmaß durch CXCR3<sup>+</sup> Typ 1 T<sub>reg</sub>-Zellen supprimiert werden als wildtypische T<sub>konv</sub>-Zellen. Im Hinblick auf diese Arbeit sind die erwähnten Studien dahingehend von Interesse, da bei der Bekämpfung von Tumoren durch das Immunsystem Typ1-vermittelte Immunantworten als besonders effizient erachtet werden, die Ergebnisse dieser Arbeit jedoch darauf hindeuten, dass das verminderte Tumorstadium in *Csnk2b*<sup>Treg<sup>-/-</sup></sup> Mäusen und die dabei zugrunde liegende Immunantwort nicht auf einer Typ1-, sondern auf einer Typ2-vermittelten Immunantwort basiert. Kombiniert man die Ergebnisse von Joller et al. mit der Erkenntnis, dass in den Tumoren von *Csnk2b*<sup>Treg<sup>-/-</sup></sup> Mäusen eine erhöhte Frequenz von ILT3<sup>+</sup> Treg-Zellen zu detektieren ist (Abb. 14), sollte dies eine abgeschwächte Immunantwort vom Typ 1 in *Csnk2b*<sup>Treg<sup>-/-</sup></sup> Mäusen zur Folge haben. Dies konnte aber in den Tumoren von *Csnk2b*<sup>Treg<sup>-/-</sup></sup> nicht detektiert werden. Hinsichtlich der Produktion Typ1-assoziiierter Zytokine durch tiT<sub>konv</sub>-Zellen konnten keine Unterschiede zwischen beiden Maustypen detektiert werden. Vielmehr ist die Frequenz von IFN $\gamma$ -produzierenden CD4<sup>+</sup> T<sub>konv</sub>-Zellen in den Tumoren von *Csnk2b*<sup>Treg<sup>-/-</sup></sup> Mäusen sogar leicht erhöht (Abb. 21). Auch die Proliferation von T<sub>konv</sub>-Zellen – insbesondere von CD8<sup>+</sup> T-Zellen – wird durch die hohe Frequenz von ILT3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen in den Tumoren von *Csnk2b*<sup>Treg<sup>-/-</sup></sup> Mäusen tendenziell positiv beeinflusst (Abb. 16). Auf Basis der Erkenntnisse dieser Arbeit scheinen ILT3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen im Kontext der Tumorummunologie keine stärkeren suppressiven Fähigkeiten gegenüber Typ1-Immunantworten zu besitzen. Die Erkenntnisse aus den Studien von Joller et al. liefern trotz der widersprüchlichen Erkenntnisse im Vergleich zu den Arbeiten von Ulges et al. und den Ergebnissen dieser Arbeit interessante Anhaltspunkte für weiterführende Experimente. Von hohem Interesse ist dabei, die Polarisierung von tiT<sub>reg</sub>-Zellen bzw. ILT3<sup>+</sup> tiT<sub>reg</sub>-Zellen anhand der Expression charakteristischer



Marker wie CXCR3, CCR4 oder CCR6 zu untersuchen. Möglicherweise ist im Kontext der Tumorummunologie anders als im Virusmodell kein Zusammenhang zwischen CXCR3 und ILT3 zu beobachten. Der Vergleich zwischen den Studien von Joller et al. und den Ergebnissen dieser Arbeit würde demnach wenig Sinn ergeben, da die Ergebnisse von Joller et al. stark auf der Ko-Expression von CXCR3 und ILT3 auf den untersuchten T<sub>reg</sub>-Zellen basieren. Hinsichtlich des suppressiven Mechanismus von ILT3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen via CD166 könnte die Analyse der CD166-Expression auf tiT<sub>konv</sub>-Zellen Informationen liefern, inwieweit sich die erwähnten Studien miteinander vergleichen lassen. Um die Bedeutung von ILT3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen für die anti-tumorale Immunantwort genauer zu charakterisieren, bieten sich mehrere Experimente an. In Frage käme ein Tumormodell mit dem Einsatz von monoklonalen ILT3-Antikörpern ( $\alpha$ -ILT3) und nachfolgender Analyse der Eigenschaften von tiT<sub>reg</sub>-Zellen. Der Nachteil dieses Experiments bestünde darin, dass durch den Einsatz von  $\alpha$ -ILT3 nicht nur T<sub>reg</sub>-Zellen betroffen wären, sondern auch andere Immunzellen, die ILT3 ebenfalls exprimieren. Dadurch wären Sekundäreffekte auf die Eigenschaften von tiT<sub>reg</sub>-Zellen nicht auszuschließen. Auch etwaige Veränderung der gesamten anti-tumoralen Immunantwort könnten nicht auf einen bestimmten Zelltyp zurückgeführt werden. Ein ähnliches „Interpretationsproblem“ würde bei dem Einsatz von ILT3-KO-Mäusen in einem Tumormodell auftreten. Durch zwei alternative Ansätze könnte dieses Problem umgangen werden. Es könnten Modellsysteme etabliert werden, in denen ausschließlich bzw. keine ILT3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen zu finden wären. Hierfür könnten Experimente mit adoptivem Zelltransfer durchgeführt werden. Denkbar wäre, ILT3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen bzw. ILT3<sup>-</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen in Kombination mit T<sub>konv</sub>-Zellen in RAG-Mäuse zu transferieren und diese anschließend mit Tumorzellen zu inokulieren. Zusätzlich wäre hierzu vorstellbar, ILT3<sup>+</sup>- und ILT3<sup>-</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen in verschiedenen Verhältnissen zu transferieren und das Tumorstadium vergleichend zu beobachten. Hierbei wäre allerdings der enorme Aufwand für die Isolation der benötigten Zahl an Zellen nicht zu unterschätzen. Eine der elegantesten Möglichkeiten, um die Bedeutung von ILT3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen für die anti-tumorale Immunantwort zu untersuchen, wäre die Durchführung eines Tumormodells mit einer konditionellen ILT3 KO-Maus. Unter Verwendung des Cre/loxP-Systems (Kap. 2.8.1) könnte eine Mauslinie generiert werden, in der T<sub>reg</sub>-Zellen nicht mehr in der Lage sind, ILT3 auf ihrer Oberfläche zu exprimieren.<sup>y</sup> Darauf basierend wäre es weiterführend denkbar, eine Mauslinie zu etablieren, bei der T<sub>reg</sub>-Zellen sowohl die CK2 als auch ILT3 nicht mehr exprimieren können.<sup>z</sup> Mit dieser Maus könnte möglicherweise die offene Frage beantwortet werden, ob die erhöhte ILT3-Expression auf CK2-defizienten T<sub>reg</sub>-Zellen funktionelle Folgen hat oder nur einen Surrogat-Marker für eine erniedrigte CK2-Aktivität darstellt. Im Kontext des B16F10 Tumormodells würde im ersten Fall (ILT3 spielt eine funktionelle Rolle) ein erhöhtes Tumorstadium bei den „Doppelflox-Mäusen“ im Vergleich zu *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen beobachtet werden können. Im zweiten Fall (ILT3 ist ein Surrogat-Marker) sollten keine Unterschiede im Tumorstadium zwischen den beiden Maustypen festzustellen sein. Dies würde bedeuten, dass andere

<sup>y</sup> *Foxp3*-Cre x *Lilrb4*<sup>fl/fl</sup>

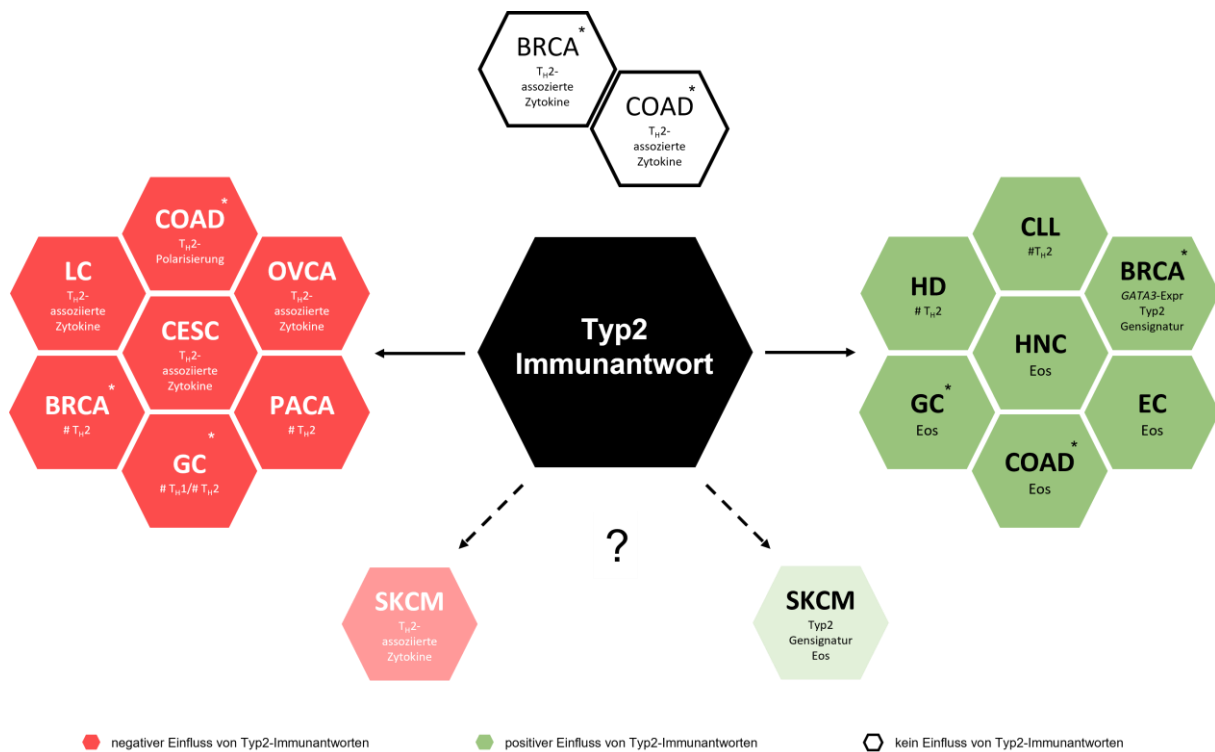
<sup>z</sup> *Foxp3*-Cre x *Csnk2b*<sup>fl/fl</sup> x *Lilrb4*<sup>fl/fl</sup> („Doppelflox-Mäuse“)

durch die CK2-Defizienz bedingte Effekte für die verminderten suppressiven Fähigkeiten von CK2-defizienten T<sub>reg</sub>-Zellen verantwortlich sind.

Abschließend ist die Bedeutung von ILT3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen für die Suppression von Typ1-Immunantworten bei der derzeitigen Datenlage nicht zu beantworten. Zieht man in Betracht, dass die suppressiven Fähigkeiten und Mechanismen von T<sub>reg</sub>-Zellen in starkem Ausmaß von der anatomischen Lokalisation und damit einhergehend von lokalen spezifischen Signalen abhängig sind, müssen sich die Ergebnisse von Joller et al., Ulges et al. und die Erkenntnisse dieser Arbeit nicht ausschließen. Möglicherweise hat die ILT3-Expression auf T<sub>reg</sub>-Zellen unterschiedliche Konsequenzen für deren suppressive Fähigkeiten, je nachdem, in welchem immunologischen Kontext (virale Infektion vs. Allergien vs. Tumore) die Charakteristika von ILT3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen untersucht werden. Hinsichtlich der Suppression von Typ2-Immunantworten ist die Rolle von ILT3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen eindeutiger zu bewerten. In dieser Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass dem verminderten Tumorwachstum in *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen eine erhöhte anti-tumorale Typ2-Immunantwort zugrunde liegt, die wiederum auf der erhöhten Frequenz von ILT3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen beruht. Dabei ist zu erwähnen, dass die Auswirkungen von Typ2-Immunantworten auf das Tumorwachstum teils kontrovers diskutiert werden. Das folgende Kapitel soll deshalb dazu dienen, neueste Erkenntnisse zu anti-tumoralen Immunantworten des Typ 2 näher zu beleuchten und diese dem teils veralteten Dogma von pro-tumoralen Typ2-Immunantworten gegenüberzustellen.

### 4.3 Immunantworten vom Typ 2 im Kontext der Tumorummunologie

Im Vergleich zum anti-tumoralen Einfluss von Typ1-Immunantworten ist die Datenlage bezüglich Typ2-Immunantworten und deren Einfluss auf den Verlauf von Tumorerkrankungen eher kontrovers. Eine graphische Übersicht von humanen Studien und deren Erkenntnissen bezüglich des Einflusses von Typ2-Immunantworten auf den Verlauf verschiedener Tumorerkrankungen ist in Abb. 36 dargestellt.

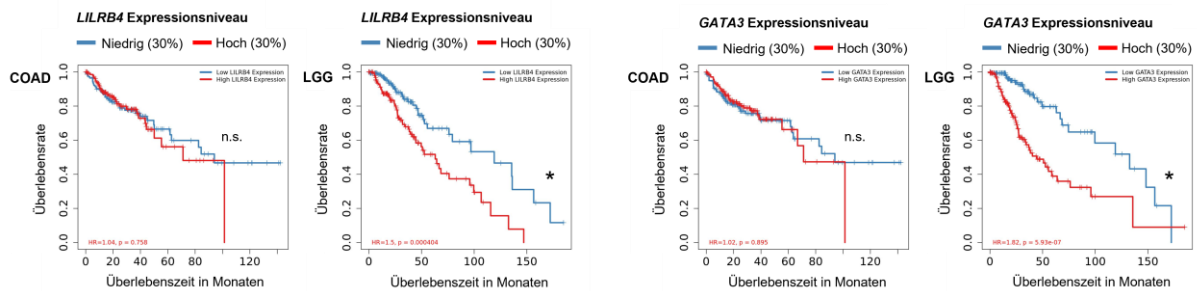


**Abbildung 36: Immunantworten vom Typ 2 und deren Einfluss auf den Verlauf von verschiedenen Tumorerkrankungen.**<sup>230,231</sup> Großgeschriebene Abkürzungen in den Sechsecken bezeichnen die Art der Tumorerkrankung, die in der jeweiligen Studie untersucht wurde. Darunter (kleingeschrieben) sind die entsprechenden Typ2-assoziierten Marker aufgelistet, anhand derer die Auswirkungen auf die Tumorerkrankung untersucht wurden. \* Tumorerkrankungen, bei denen sowohl pro- als auch anti-tumorale Auswirkungen von Typ2-Immunantworten beschrieben wurden. Abkürzungen: Brustkrebs (BRCA = breast cancer); Zervixkarzinom (CESC = Cervical squamous cell carcinoma and endocervical adenocarcinoma); chronische lymphatische Leukämie (CLL = chronic lymphocytic leukemia); kolorektales Karzinom (COAD = colorectal adenocarcinoma); Ösophaguskarzinom (EL = esophageal cancer); Magenkarzinom (GC = gastric cancer); Kopf-Hals-Karzinom (HNC = head and neck cancer); Hodgkin-Lymphom (HD = Hodgkin disease); Lungenkrebs (LC = lung cancer); Ovarialkarzinom (OVCA = ovarian cancer); Pankreaskarzinom (PACA = pancreatic cancer); malignes Melanom (SKCM = skin cutaneous Melanoma).

Tendenziell wurden und werden Typ2-Immunantworten und insbesondere  $T_H2$ -Zellen als negative prognostische Marker für den Verlauf von Tumorerkrankungen angesehen. Abb. 36 illustriert, dass diese generalisierte Sichtweise beim Vergleich verschiedener Studien zumindest teilweise überdacht werden muss. Die aufgeführten Studien zum Einfluss von Typ2-Immunantworten auf Brustkrebs (BRCA) zeigen, dass Aussagen, die auf einem bestimmten Marker beruhen, nicht ausreichen, um eine generalisierte Aussage bezüglich Typ2-Immunantworten zu treffen. So konnten Tokumaru et al. zeigen,

dass ein hohes „T<sub>H</sub>2-Genexpressionsprofil“ in Brusttumoren einen negativen prognostischen Marker darstellt.<sup>232</sup> Yoon et al. beschreiben jedoch, dass eine hohe *GATA3*-Expression im Brustgewebe einen positiven Effekt auf den Krankheitsverlauf hat.<sup>233</sup> *GATA3* wird aber nicht nur von T<sub>H</sub>2-Zellen exprimiert, sondern auch von Brustdrüsenzellen, wobei *GATA3* insbesondere für deren Differenzierung von entscheidender Bedeutung ist.<sup>234</sup> Aus diesem Grund kann *GATA3* in diesem Kontext nicht als spezifischer T<sub>H</sub>2-assoziiierter Marker angesehen werden. Es ist demnach von entscheidender Bedeutung, aussagekräftige Marker bzw. Markerkombinationen zu verwenden, um pro- oder anti-tumorale Immunantworten ausreichend zu charakterisieren. Aussagekräftiger sind die Studien von Liu et al., in denen Gensignaturen, die sich aus spezifischen Markergenen von T<sub>H</sub>2-Zellen zusammensetzen, in datenbankgestützten Analysen untersucht wurden. Beim Vergleich von Patienten mit einer starken Expression dieser Gensignaturen in ihren Tumoren mit jenen, in der eine schwache Expression zu beobachten ist, zeigt sich, dass Patienten mit einer starken Expression dieser T<sub>H</sub>2-assoziierten Markergene eine signifikant höhere Überlebensrate besitzen.<sup>73</sup> Camp et al. wiederum zeigen in ihrer Studie, dass anhand der Frequenz an T-Zellen, die Typ2-assoziierte Zytokine produzieren, keine Aussage über den Krankheitsverlauf von Brustkrebskrankungen getroffen werden kann.<sup>235</sup> Im Falle von Brusttumoren kommen demnach vier Studien zu konträren Ergebnissen, wobei die Ergebnisse von Yoon et al. nicht auf Typ2-Immunantworten bezogen werden können. Nichtsdestotrotz veranschaulichen die Ergebnisse der genannten Studien, dass keine generalisierte Aussage über Typ2-Immunantworten und deren Einfluss auf Tumorerkrankungen getroffen werden kann. Bezüglich der Frequenz von T<sub>H</sub>2-Zellen konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Frequenz von T<sub>H</sub>2-Zellen im Blut einen positiven prognostischen Marker für den Verlauf von malignen hämatologischen Erkrankungen (HD; CLL) darstellt.<sup>236,237</sup> Bei Pankreas (PACA)- und Magenkarzinomen (GC) hingegen wird eine hohe Frequenz von T<sub>H</sub>2-Zellen im Tumorgewebe mit einem negativen Krankheitsverlauf assoziiert.<sup>238,239</sup> Diese scheinbar konträren Ergebnisse verdeutlichen, dass bei der Beurteilung von Immunreaktionen gegenüber Tumoren grundsätzlich der Kontext bzw. die Art der Tumorerkrankung beachtet werden muss. Dies gilt insbesondere für die Beurteilung der anti- oder pro-tumoralen Effekte Typ2-vermittelter Immunantworten. Dies trifft auch auf die Ergebnisse dieser Arbeit zu. Bezüglich des Krankheitsverlaufs von humanen malignen Melanomen konnten in dieser Arbeit (Kap. 3.2 und 3.8) durch datenbankgestützte Genexpressions- und Überlebenszeitanalysen Hinweise gesammelt werden, dass eine verstärkte Typ2-Immunantwort einen positiven Krankheitsverlauf begünstigt. Die Analysen zeigen, dass eine hohe *LILRB4*- (codiert für *ILT3*) und *GATA3*-Expression mit einer höheren Überlebensrate korreliert. Auf Basis der Erkenntnisse, dass die *LILRB4* Expression auch mit der Expression von *FOXP3* korreliert und die *GATA3* Expression mit der von *CD3e* und *CD4*, wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine hohe Frequenz an T<sub>H</sub>2-dirigierenden *ILT3*<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen und damit einhergehend eine hohe Frequenz an T<sub>H</sub>2-Zellen der anti-tumoralen Immunantwort gegenüber malignen Melanomen zuträglich sein können. Bei anderen Tumorarten hingegen führen dieselben Analysen zu konträren Ergebnissen. Bei der Durchführung der gleichen Analysen in Bezug auf die Überlebensrate in Kolonkarzinomen (COAD;

*colon adenocarcinoma*) und niedriggradigen Gliomen (LGG; *brain lower grade glioma*) sind konträre Ergebnisse zu beobachten (Abb. 37).



**Abbildung 37: Überlebenszeitanalysen hinsichtlich der *LILRB4*- und *GATA3*-Expression in Kolonkarzinomen und niedriggradigen Gliomen.** Die Daten wurden mit der internetgestützten Analyseplattform Timer erhoben. Die Kaplan-Meier-Kurven zeigen den Zusammenhang der gesamten *LILRB4*- (links) und *GATA3*-Expression (rechts) mit der Überlebensrate in Kolonkarzinomen (COAD) und niedriggradigen Gliomen (LGG).

Bei Kolonkarzinomen (COAD) zeigen die Analysen, dass eine hohe *LILRB4*- oder *GATA3*-Expression in keinem Zusammenhang mit einer höheren oder niedrigeren Überlebensrate steht. Bei niedriggradigen Gliomen (LGG) hingegen korreliert eine hohe *LILRB4*- und *GATA3*- Expression mit einer niedrigeren Überlebensrate. Demnach könnte bei dieser Tumorart eine verstärkte Immunantwort vom Typ 2 einem positiven Krankheitsverlauf entgegenwirken. Der Vergleich der Analysen unterstreicht, dass spezifische Immunantworten in einer bestimmten Tumorart und deren anti- oder pro-tumorale Auswirkungen nicht zwangsläufig auf andere Tumorarten übertragbar sind. Ähnlich wie im Falle von Brusttumoren oder Kolonkarzinomen sind auch bei humanen malignen Melanomen Studien mit konträren Ergebnissen bezüglich des Einflusses von Typ2-Immuantworten auf den Krankheitsverlauf zu finden. Ein potenziell negativer Einfluss von  $T_H2$ -assoziierten Zytokinen wird unter anderem von Nevala et al. beschrieben. Die Studie zeigt, dass die Plasmakonzentrationen von  $T_H2$ -assoziierten Proteinen (IL-4, IL-5 und IL-13) im Blut von Patienten mit malignen Melanomen im fortgeschrittenen Stadium (Stadium IV) signifikant höher sind als bei Patienten mit malignen Melanomen in niedrigeren Stadien bzw. gesunden Probanden.<sup>240</sup> Allerdings wird in der Studie keine weitere Unterteilung der Patientenkohorte anhand des Stadiums der Erkrankung durchgeführt. Ob es Unterschiede zwischen den Plasmakonzentrationen  $T_H2$ -assoziiierter Zytokine im Blut von Patienten im Stadium I-III gibt, wird in der Studie daher nicht beschrieben. Dadurch kann prinzipiell auch keine Aussage bezüglich des Einflusses von  $T_H2$ -assoziierten Zytokinen auf den Verlauf der Erkrankung getroffen werden, da es vorstellbar wäre, dass erhöhte Konzentrationen von  $T_H2$ -assoziierten Zytokinen in einem früheren Stadium einen positiven prognostischen Marker für den zukünftigen Krankheitsverlauf beim malignen Melanom darstellen. Im Gegensatz zur beschriebenen Studie von Nevara et al. postulieren die Arbeiten von Jacquolot et al., dass

im Falle des malignen Melanoms eine erhöhte Frequenz an T<sub>H</sub>2-Zellen<sup>aa</sup> einen positiven prognostischen Marker darstellt. Ähnlich wie bei den beschriebenen Studien von Liu et al. wurden dafür Gensignaturen erstellt, die sich unter anderem aus typischen Markergenen für T<sub>H</sub>2-Zellen zusammensetzen. Die Analysen von Jacquilot et al. zeigen, dass auch im malignen Melanom eine starke Expression T<sub>H</sub>2-assoziiierter Gene mit einer höheren Überlebensrate korreliert.<sup>241</sup> Zusätzlich offenbarten selbst durchgeführte Überlebenszeitanalysen mit der Typ2-Gensignatur von Liu et al., dass diese bei hoher Expression, auch beim malignen Melanom mit einer höheren Überlebensrate in Verbindung steht (Daten nicht gezeigt).<sup>bb</sup> Die murinen Studien von Liu et al. zeigen zusätzlich interessante Erkenntnisse, wie T<sub>H</sub>2-Zellen bzw. T<sub>H</sub>2-assoziierte Zytokine dem Tumorwachstum entgegenwirken können. Es zeigte sich, dass in einem Brustkrebsmodell die spezifische Deletion des TGF-Beta Rezeptors 2 (TGFβ<sub>2</sub>) in CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu einem verminderten Tumorwachstum führt. Transkriptomanalysen der intratumoralen CD4<sup>+</sup> T-Zellen offenbarten dabei, dass TGFβ<sub>2</sub>-defiziente CD4<sup>+</sup> T-Zellen einen ausgeprägten T<sub>H</sub>2-Phänotyp besitzen. In weiterführenden Analysen konnten die Autoren der Studie zeigen, dass das verminderte Tumorwachstum der transgenen Mäuse auf der Reorganisation der intratumoralen Blutgefäße basiert, wobei diese Prozesse wiederum von IL-4 abhängig sind, das von intratumoralen T<sub>H</sub>2-Zellen produziert wird. Die Autoren der Studie postulieren, dass die Reorganisation der Blutgefäße zu einer Unterversorgung von weiten Teilen des Tumorgewebes führt, was ein Absterben der Tumorzellen aufgrund von Sauerstoffmangel zur Folge hat. Beim Vergleich der Transkriptomanalysen von Liu et al. und dieser Arbeit (Kap. 3.7.1) sind interessante Parallelen zu beobachten (Daten nicht gezeigt).<sup>cc</sup> Demnach bietet der zuvor beschriebene anti-tumorale Mechanismus interessante Ansätze für weitergehende Analysen bezüglich des verminderten Tumorwachstums in *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen. Dafür wären zunächst Analysen der Tumorangiogenese und die Charakterisierung der intratumoralen Blutgefäße von Interesse. Wären hier Unterschiede zwischen wildtypischen und *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen zu detektieren, würden anschließende Analysen bezüglich der TGFβ<sub>2</sub>-Expression von intratumoralen CD4<sup>+</sup> T<sub>konv</sub>-Zellen und/oder der TGFβ-Produktion von tiT<sub>reg</sub>-Zellen Sinn ergeben. Im Gegensatz zu T<sub>H</sub>2-Zellen ist weitgehend akzeptiert, dass eine hohe Frequenz an intratumoralen Eosinophilen einen positiv prognostischen Marker für den Verlauf von malignen Melanomen darstellt.<sup>175</sup> Eosinophile können durch mehrere anti-tumorale Mechanismen zu einem verminderten Tumorwachstum beizutragen. Neben den bekannten direkten zytotoxischen Eigenschaften gegenüber Tumorzellen konnten Carratero et al. zeigen, dass Eosinophile einen starken Einfluss auf die Tumolvaskularisierung besitzen, wodurch die Frequenz an zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Tumor erhöht wird.<sup>172</sup> Interessanterweise wird im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit (Abb. 17 und Abb. 23) in der Studie gezeigt, dass ein Zusammenhang zwischen einer niedrigen Frequenz an tiT<sub>reg</sub>-Zellen und einer hohen Frequenz an

<sup>aa</sup> In der Studie von Jacquilot et al. beziehen sich die Autoren auf eine Gensignatur, die sich aus Markern für T<sub>H</sub>2-Zellen und Markern für lymphoide Zellen des angeborenen Immunsystems vom Typ 2 (ILC2) zusammensetzt.

<sup>bb</sup> Die Überlebenszeitanalysen wurden auf der internetgestützten Plattform Gepia2 ([www.gepia2.cancer-pku.cn](http://www.gepia2.cancer-pku.cn)) durchgeführt.

<sup>cc</sup> Parallelen bei der erhöhten Expression T<sub>H</sub>2-assoziiierter Gene in intratumoralen TGFβ<sub>2</sub>-defizienten CD4<sup>+</sup> T-Zellen und intratumoralen T<sub>konv</sub>-Zellen aus *Csnk2b*<sup>Treg-/-</sup> Mäusen.

intratumoralen Eosinophilen besteht. Welche Mechanismen diesem Zusammenhang zugrunde liegen, wird in der Studie jedoch nicht vollständig beantwortet. Ein möglicher Zusammenhang könnte die erhöhte Konzentration von IL-5 sein, die nach Depletion von T<sub>reg</sub>-Zellen in den Tumoren detektiert werden konnte. Ob und welche T<sub>H</sub>2-assoziierten Zytokine zu einer erhöhten Infiltration von Eosinophilen beitragen, ist nicht vollständig geklärt. Die frühen Arbeiten von Tepper et al. beschreiben eine essenzielle Rolle von IL-4 für die Migration von Eosinophilen in das Tumorgewebe.<sup>71</sup> In anderen Studien hingegen wird diese Rolle IL-5 zugeschrieben.<sup>241,242</sup> Dabei wird diskutiert, dass der Effekt von IL-5 auf die Migration von Eosinophilen in das Tumorgewebe indirekter Natur ist, indem es die Sensitivität von Eosinophilen gegenüber Eotaxinen (CCL11, CCL24, CCL26) erhöht und diese schlussendlich Eosinophile in das Tumorgewebe rekrutieren.<sup>243</sup> In Gänze betrachtet ist es nicht möglich, ein eindeutiges Resümee bezüglich der Rolle von Typ2-Immunantworten und deren Einfluss auf die immunologische Tumorantwort zu ziehen, da sowohl für anti-tumorale als auch für pro-tumorale Auswirkungen von Typ2-Immunantworten aussagekräftige Arbeiten zu finden sind. Vielmehr scheint es von elementarer Bedeutung zu sein, Typ2-Immunantworten und deren Auswirkungen im jeweiligen Kontext (Art des Tumors) zu charakterisieren. Wenig sinnvoll erscheint es dabei, die Erkenntnisse von einer Tumorart auf eine andere zu übertragen.

## 5 Zusammenfassung

Regulatorische T-Zellen (T<sub>reg</sub>-Zellen) sind ein essenzieller Bestandteil peripherer Toleranzmechanismen. Die suppressiven Fähigkeiten von T<sub>reg</sub>-Zellen können aber auch negative Effekte nach sich ziehen, die bei Tumorerkrankungen beobachtet werden können: die Suppression einer effektiven Immunantwort gegenüber Tumoren.<sup>7</sup> Der Versuch, tumor-infiltrierende T<sub>reg</sub>-Zellen in ihren suppressiven Fähigkeiten einzuschränken, stellt deswegen einen vielversprechenden Ansatz für zukünftige anti-tumorale Immuntherapien dar. Basierend auf den Studien von Ulges et al. konnte die Proteinkinase CK2 (CK2) als geeignetes Zielmolekül identifiziert werden.<sup>115</sup> Insbesondere die Fähigkeit zur Suppression von Typ2-Immunantworten in der Lunge war durch die spezifische Deletion der CK2 in T<sub>reg</sub>-Zellen stark eingeschränkt. Verantwortlich dafür zeigte sich eine Subpopulation von T<sub>reg</sub>-Zellen, die den inhibitorischen Oberflächenrezeptor ILT3 exprimieren. Die Expression von ILT3 wird dabei durch die CK2 kontrolliert, wobei die genaue Funktion von ILT3 für die Bedeutung für die Suppressionsmechanismen von T<sub>reg</sub>-Zellen weiterer Studien bedarf. Unbestritten ist jedoch, dass die ILT3-Expression von der CK2-Aktivität negativ reguliert wird und dadurch als nützlicher Surrogat-Marker für die CK2-Aktivität in T<sub>reg</sub>-Zellen verwendet werden kann. Daran anknüpfend sollte in dieser Arbeit die Frage beantwortet werden, ob die genetische und pharmakologische Inhibition der CK2 in T<sub>reg</sub>-Zellen einen Einfluss auf deren suppressiven Fähigkeiten bezüglich der Immunantwort gegenüber Tumoren hat und inwieweit ILT3-exprimierende T<sub>reg</sub>-Zellen (ILT3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen) in diesem Kontext eine Rolle spielen. In Datenbankanalysen von humanen Melanombiopsien konnten erste Hinweise gesammelt werden, dass eine hohe ILT3-Expression im Tumorgewebe einem günstigen Krankheitsverlauf zuträglich sein kann, wobei eine starke Korrelation, zwischen der *ILT3*- und der *FOXP3*-Expression beobachtet wurde. Diese Beobachtungen untermauern die Arbeitshypothese, dass basierend auf einer niedrigen CK2-Expression eine hohe Expression von ILT3 auf T<sub>reg</sub>-Zellen die suppressiven Fähigkeiten von T<sub>reg</sub>-Zellen auch im Kontext der Tumorimmunologie vermindert. Um dies in einem Tiermodell zu verifizieren, wurde im prä-klinischen B16F10 Melanommodell das Tumorwachstum von Mäusen mit einer spezifischen Deletion der CK2 $\beta$ -Untereinheit in T<sub>reg</sub>-Zellen (*Csnk2b*<sup>Treg/-</sup>-Mäusen) und wildtypischen *Csnk2b*<sup>fl/fl</sup>-Mäusen vergleichend beobachtet und nachfolgend die Frequenz von intratumoralen ILT3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen bestimmt. Dabei zeigte sich, dass das Tumorwachstum in *Csnk2b*<sup>Treg/-</sup>-Mäusen signifikant verlangsamt war und gleichzeitig eine signifikant erhöhte Frequenz von ILT3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen in den Tumoren von *Csnk2b*<sup>Treg/-</sup>-Mäusen detektiert werden konnte. In der vergleichenden Analyse der zugrundeliegenden Immunantwort konnten signifikante Unterschiede in der Zusammensetzung der intratumoralen T-Zellpopulation festgestellt werden. Es zeigte sich, dass in die Tumore von *Csnk2b*<sup>Treg/-</sup>-Mäusen verstärkt anti-tumorale T-Zellen (konventionelle CD4<sup>+</sup> T-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen) einwandern, woraus ein deutlich gesteigertes Verhältnis von anti-tumoralen T-Zellen zu pro-tumoralen T<sub>reg</sub>-Zellen in Tumoren von *Csnk2b*<sup>Treg/-</sup>-Mäusen resultiert. Die T-Zellimmunantwort gegen Tumore von *Csnk2b*<sup>Treg/-</sup>-Mäusen zeigte dabei



Charakteristika einer  $T_H2$ -vermittelten Immunantwort. Die damit einhergehende erhöhte Konzentration von  $T_H2$ -assoziierten Zytokinen scheint wiederum verantwortlich zu sein, dass es zu einer gesteigerten Infiltration von Eosinophilen Granulozyten in das Tumorgewebe von *Csnk2b*<sup>Treg<sup>-/-</sup></sup>-Mäusen kommt. Die erhöhte Frequenz von Eosinophilen Granulozyten in den Tumoren erwies sich dabei als essenziell für das verminderte Tumorwachstum in *Csnk2b*<sup>Treg<sup>-/-</sup></sup>-Mäusen. In internetgestützten Datenbankanalysen von humanen Melanombiopsien konnten gewisse Parallelen zum prä-klinischen B16F10 Melanommodell beobachtet werden. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus dem B16F10 Melanommodell zeigte sich, dass eine hohe Expression von Genen, die mit Typ2-Immunzellen assoziiert sind, einen positiven Einfluss auf die Überlebensrate im humanen malignen Melanom hat. Für die Evaluation des Potenzials der pharmakologischen CK2-Inhibition wurde in weiteren Experimenten der Einfluss eines CK2-Inhibitors auf das Tumorwachstum und im Speziellen auf tumor-infiltrierende  $T_{reg}$ -Zellen untersucht. Dabei konnten eindeutige Hinweise gesammelt werden, dass die Applikation des CK2-Inhibitors die Eigenschaften von intratumoralen  $T_{reg}$ -Zellen beeinflusst und dies wesentlich zum verminderten Tumorwachstum beigetragen hat. Im Hinblick auf Kombinationstherapien mit klinisch erprobten Checkpoint-Inhibitoren wurde abschließend, die Expression pharmakologisch relevanter Oberflächenmoleküle auf tumor-infiltrierenden  $T_{reg}$ -Zellen evaluiert. Dabei zeigten intratumorale  $T_{reg}$ -Zellen aus *Csnk2b*<sup>Treg<sup>-/-</sup></sup>-Mäusen unter anderem eine verminderte Expression von PD-1, TIGIT und CD39.

## 6 Abstract

Regulatory T cells (T<sub>reg</sub> cells) are crucial for the maintenance of peripheral tolerance. However, the suppressive properties of T<sub>reg</sub> cells can also have negative effects in cancer through the suppression of an effective immune response against tumours.<sup>7</sup> Therefore, the inhibition of the T<sub>reg</sub> cell-mediated suppression of the antitumour response could be a promising strategy in future cancer immunotherapies. Studies by Ulges et al. identified the protein kinase CK2 as suitable target. CK2 is highly active in T<sub>reg</sub> cells and has a significant impact on the suppressive properties of T<sub>reg</sub> cells.<sup>115</sup> The ability of T<sub>reg</sub> cells to suppress type 2 immune responses in the lungs is especially affected by the specific deletion of the CK2 in T<sub>reg</sub> cells. In this study, a subpopulation of T<sub>reg</sub> cells expressing the inhibitory surface receptor ILT3, and whose expansion is controlled by CK2, were shown to be responsible for these observations. While the exact role of ILT3 in the suppressive functions of T<sub>reg</sub> cells requires further research, it can be used as a surrogate marker for CK2 activity in T<sub>reg</sub> cells. Following on from this, the thesis outlined here, aims to answer the question of whether genetic and pharmacological inhibition of CK2 in T<sub>reg</sub> cells has an impact on their suppressive capabilities with respect to the immune response against tumours. Further, this thesis aims to determine the extent to which ILT3-expressing T<sub>reg</sub> cells (ILT3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> cells) play a role in this context. In database analyses of human melanoma biopsies, preliminary hints have been observed, that a high ILT3 expression in tumour tissues may be conducive to favourable disease progression, with a strong correlation observed between *ILT3* and *FOXP3* expression. These observations support our hypothesis that a high ILT3 expression by T<sub>reg</sub> cells, which is dependent on low CK2 expression, limits the suppressive capacities of T<sub>reg</sub> cells in the context of tumour immunology. To dig deeper into this subject, we conducted a comparative analysis of tumour growth in mice with a conditional knockout of the CK2 $\beta$  subunit in T<sub>reg</sub> cells (*Csnk2b*<sup>Treg/-</sup> mice) and wild type mice (*Csnk2b*<sup>fl/fl</sup> mice) using the preclinical B16F10 melanoma model. We observed that *Csnk2b*<sup>Treg/-</sup> mice showed significantly reduced tumour growth accompanied by an increased frequency of intratumoural ILT3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> cells. In the subsequent analysis of the underlying immune reaction against the tumour we detected significant changes in the composition of the intratumoural T cell population. It was found that more antitumoural T cells (conventional CD4<sup>+</sup> T cells and CD8<sup>+</sup> T cells) migrate into the tumours of *Csnk2b*<sup>Treg/-</sup> mice resulting in a significantly increased ratio of antitumoural T cells to protumoural T<sub>reg</sub> cells. Here, the T-cell-mediated immune response against tumours of *Csnk2b*<sup>Treg/-</sup> mice showed characteristics of a T<sub>H</sub>2-mediated immune response with elevated levels of T<sub>H</sub>2-associated cytokines leading to an increased infiltration of eosinophil granulocytes into the tumours of *Csnk2b*<sup>Treg/-</sup> mice. The increased frequencies of eosinophil granulocytes were found to be responsible for the reduced tumour growth in *Csnk2b*<sup>Treg/-</sup> mice. Regarding a favourable composition of the immune cell population in melanomas, we observed certain parallels between the preclinical B16F10 melanoma model and human malignant melanoma biopsies. It appeared that a high expression of genes which are associated with type 2 immune cells have a positive impact on the survival rate in human malignant melanomas.

To further evaluate the potential of the pharmacological CK2 inhibition we investigated the influence of a CK2 inhibitor on tumour growth and in particular on the properties tumour infiltrating T<sub>reg</sub> cells. We found clear indications that CK2 inhibition has an impact on the characteristics of intratumoural T<sub>reg</sub> cells. Additionally, the results suggested that the impact on the T<sub>reg</sub> cells is particularly important for the anti-tumoral effect of the CK2-inhibitor. In view of combination therapies with clinically proven checkpoint inhibitors we finally examined the expression of pharmacologically relevant surface receptors on T<sub>reg</sub> cells. Here, intratumoural T<sub>reg</sub> cells of *Csnk2b*<sup>Treg<sup>-/-</sup></sup> mice showed a significantly reduced expression of both PD-1; TIGIT and CD39.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Bleyzac, P., Exbrayat, J.-M. & Fellah, J. S. On the origin of the adaptative immune system (AIS): the hypothesis. *Med. Sci. (Paris)*. **21**, 210–215 (2005).
2. Dempsey, P. W., Vaidya, S. A. & Cheng, G. The Art of War: Innate and adaptive immune responses. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**, 2604–2621 (2003).
3. Mackay, I. R. Travels and travails of autoimmunity: A historical journey from discovery to rediscovery. *Autoimmun. Rev.* **9**, A251–A258 (2010).
4. Vesely, M. D., Kershaw, M. H., Schreiber, R. D. & Smyth, M. J. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 235–271 (2011).
5. Spranger, S. & Gajewski, T. F. Mechanisms of Tumor Cell-Intrinsic Immune Evasion. *Annu. Rev. Cancer Biol.* **2**, 213–228 (2018).
6. Liu, Y. & Cao, X. Immunosuppressive cells in tumor immune escape and metastasis. *J. Mol. Med.* **94**, 509–522 (2016).
7. Plitas, G. & Rudensky, A. Y. Regulatory T Cells in Cancer. *Annu. Rev. Cancer Biol.* **4**, 459–477 (2020).
8. Litman, G. W., Rast, J. P. & Fugmann, S. D. The origins of vertebrate adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 543–53 (2010).
9. Janeway, C. A. & Medzhitov, R. Innate Immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 197–216 (2002).
10. Medzhitov, R. & Janeway Jr., C. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev* **173**, 89–97 (2000).
11. Clark, R. & Kupper, T. Old meets new: The interaction between innate and adaptive immunity. *J. Invest. Dermatol.* **125**, 629–637 (2005).
12. Greenberg, S. & Grinstein, S. Phagocytosis and innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **14**, 136–145 (2002).
13. Banchereau, J. *et al.* Immunobiology of Dendritic Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 767–811 (2000).
14. Steinman, R. & Hemmi, H. Dendritic Cells: Translating Innate to Adaptive Immunity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **311**, 17–58 (2006).
15. Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Théry, C. & Amigorena, S. Antigen Presentation and T Cell Stimulation by Dendritic Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 621–667 (2002).
16. Smith-Garvin, J. E., Koretzky, G. A. & Jordan, M. S. T cell activation. *Annu Rev Immunol* **27**,

- 591–619 (2009).
17. Farber, D. L., Netea, M. G., Radbruch, A., Rajewsky, K. & Zinkernagel, R. M. Immunological memory: lessons from the past and a look to the future. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 124–128 (2016).
  18. Farber, D. L., Yudanin, N. a & Restifo, N. P. Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 24–35 (2014).
  19. Barnes, B. *et al.* Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. (2016). doi:10.17886/rkipubl-2016-014
  20. Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E. & Jemal, A. Cancer Statistics, 2021. *CA. Cancer J. Clin.* **71**, 7–33 (2021).
  21. Lambert, A. W., Pattabiraman, D. R. & Weinberg, R. A. Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell* **168**, 670–691 (2017).
  22. Stratton, M. R., Campbell, P. J. & Futreal, P. A. The cancer genome. *Nature* **458**, 719–724 (2009).
  23. Torgovnick, A. & Schumacher, B. DNA repair mechanisms in cancer development and therapy. *Front. Genet.* **6**, 1–15 (2015).
  24. Igney, F. H. & Krammer, P. H. Death and anti-death: Tumour resistance to apoptosis. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 277–288 (2002).
  25. Dunn, G. P., Old, L. J. & Schreiber, R. D. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* **21**, 137–148 (2004).
  26. Burnet, M. Cancer-A Biological Approach I. The Processes Of Control. *Br. Med. J.* **1**, 779–786 (1957).
  27. Barnes, T. A. & Amir, E. HYPE or HOPE: the prognostic value of infiltrating immune cells in cancer. *Br. J. Cancer* **117**, 451–460 (2017).
  28. Kather, J. N. *et al.* Topography of cancer-associated immune cells in human solid tumors. *Elife* **7**, (2018).
  29. Waldman, A. D., Fritz, J. M. & Lenardo, M. J. A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nat. Rev. Immunol.* **20**, 651–668 (2020).
  30. Zhang, N. & Bevan, M. J. CD8+ T Cells: Foot Soldiers of the Immune System. *Immunity* **35**, 161–168 (2011).
  31. Zhu, J., Yamane, H. & Paul, W. E. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. *Annu. Rev. Immunol.* **28**, 445–489 (2010).
  32. Wan, Y. Y. & Flavell, R. A. How Diverse - CD 4 Effector T Cells and their Functions. *J. Mol. Cell Biol.* **1**, 20–36 (2009).

33. Famili, F., Wiekmeijer, A. S. & Staal, F. J. The development of T cells from stem cells in mice and humans. *Futur. Sci. OA* **3**, (2017).
34. Spits, H. Development of  $\alpha\beta$  T cells in the human thymus. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 760–772 (2002).
35. Schatz, D. G. & Ji, Y. Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 251–63 (2011).
36. Klein, L., Hinterberger, M., Wirnsberger, G. & Kyewski, B. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 833–844 (2009).
37. Caramalho, Í., Nunes-Cabaço, H., Foxall, R. B. & Sousa, A. E. Regulatory T-cell development in the human thymus. *Front. Immunol.* **6**, 1–7 (2015).
38. Förster, R., Braun, A. & Worbs, T. Lymph node homing of T cells and dendritic cells via afferent lymphatics. *Trends Immunol.* **33**, 271–280 (2012).
39. Mondino, A., Khoruts, A. & Jenkins, M. K. The anatomy of T-cell activation and tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 2245–2252 (1996).
40. Chen, D. S. & Mellman, I. Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle. *Immunity* **39**, 1–10 (2013).
41. Farhood, B., Najafi, M. & Mortezaee, K. CD8+ cytotoxic T lymphocytes in cancer immunotherapy: A review. *J. Cell. Physiol.* **234**, 8509–8521 (2019).
42. Galon, J. & Bruni, D. Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies. *Nat. Rev. Drug Discov.* **18**, 197–218 (2019).
43. Bonaventura, P. *et al.* Cold Tumors: A Therapeutic Challenge for Immunotherapy . *Frontiers in Immunology* **10**, (2019).
44. Houghton, A. N. & Guevara-Patiño, J. A. Immune recognition of self in immunity against cancer. *J. Clin. Invest.* **114**, 468–471 (2004).
45. Leko, V. & Rosenberg, S. A. Identifying and Targeting Human Tumor Antigens for T Cell-Based Immunotherapy of Solid Tumors. *Cancer Cell* **38**, 454–472 (2020).
46. Zamora, A. E., Crawford, J. C. & Thomas, P. G. Hitting the Target: How T Cells Detect and Eliminate Tumors. *J. Immunol.* **200**, 392–399 (2018).
47. Coulie, P. G., Van Den Eynde, B. J., Van Der Bruggen, P. & Boon, T. Tumour antigens recognized by T lymphocytes: At the core of cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **14**, 135–146 (2014).
48. Jäger, D., Jäger, E. & Knuth, A. Immune responses to tumour antigens: Implications for antigen specific immunotherapy of cancer. *J. Clin. Pathol.* **54**, 669–674 (2001).
49. Scanlan, M. J., Gure, A. O., Jungbluth, A. A., Old, L. J. & Chen, Y. T. Cancer/testis antigens:

- An expanding family of targets for cancer immunotherapy. *Immunol. Rev.* **188**, 22–32 (2002).
50. Jardim, D. L., Goodman, A., de Melo Gagliato, D. & Kurzrock, R. The Challenges of Tumor Mutational Burden as an Immunotherapy Biomarker. *Cancer Cell* **39**, 154–173 (2021).
51. Alexandrov, L. B. *et al.* Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* **500**, 415–421 (2013).
52. Maleki Vareki, S. High and low mutational burden tumors versus immunologically hot and cold tumors and response to immune checkpoint inhibitors. *J. Immunother. Cancer* **6**, 157 (2018).
53. González, S., Volkova, N., Beer, P. & Gerstung, M. Immuno-oncology from the perspective of somatic evolution. *Semin. Cancer Biol.* **52**, 75–85 (2018).
54. Igney, F. H. & Krammer, P. H. Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. *J. Leukoc. Biol.* **71**, 907–20 (2002).
55. Hwang, J.-R., Byeon, Y., Kim, D. & Park, S.-G. Recent insights of T cell receptor-mediated signaling pathways for T cell activation and development. *Exp. Mol. Med.* **52**, 750–761 (2020).
56. Toribio, M. L., Gutiérrez-Ramos, J. C., Pezzi, L., Marcos, M. A. & Martínez, C. Interleukin-2-dependent autocrine proliferation in T-cell development. *Nature* **342**, 82–85 (1989).
57. Cantrell, D. A., Collins, M. K. & Crumpton, M. J. Autocrine regulation of T-lymphocyte proliferation: differential induction of IL-2 and IL-2 receptor. *Immunology* **65**, 343–9 (1988).
58. Keppler, S. J., Rosenits, K., Koegl, T., Vucikuja, S. & Aichele, P. Signal 3 Cytokines as Modulators of Primary Immune Responses during Infections: The Interplay of Type I IFN and IL-12 in CD8 T Cell Responses. *PLoS One* **7**, e40865 (2012).
59. Kushwah, R. & Hu, J. Complexity of dendritic cell subsets and their function in the host immune system. *Immunology* **133**, 409–419 (2011).
60. Zhang, S., Zhang, H. & Zhao, J. The role of CD4 T cell help for CD8 CTL activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **384**, 405–408 (2009).
61. Yeo, C. J. J. & Fearon, D. T. T-bet-mediated differentiation of the activated CD8<sup>+</sup> T cell. *Eur. J. Immunol.* **41**, 60–66 (2011).
62. Raskov, H., Orhan, A., Christensen, J. P. & Gögenur, I. Cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells in cancer and cancer immunotherapy. *Br. J. Cancer* **124**, 359–367 (2021).
63. Kapsenberg, M. L. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 984–993 (2003).
64. Yamane, H. & Paul, W. E. Early signaling events that underlie fate decisions of naive CD4(+) T cells toward distinct T-helper cell subsets. *Immunol. Rev.* **252**, 12–23 (2013).
65. Zhu, J. & Paul, W. E. Peripheral CD4<sup>+</sup> T-cell differentiation regulated by networks of cytokines

- and transcription factors. *Immunol. Rev.* **238**, 247–262 (2010).
66. Kim, H.-J. & Cantor, H. CD4 T-cell subsets and tumor immunity: the helpful and the not-so-helpful. *Cancer Immunol. Res.* **2**, 91–98 (2014).
  67. Borst, J., Ahrends, T., Melief, C. J. M. & Kastenmüller, W. CD4 + T cell help in cancer immunology and immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 635–647 (2018).
  68. Beatty, G. L. & Paterson, Y. IFN- $\gamma$ -Dependent Inhibition of Tumor Angiogenesis by Tumor-Infiltrating CD4 + T Cells Requires Tumor Responsiveness to IFN- $\gamma$  . *J. Immunol.* **166**, 2276–2282 (2001).
  69. Takeuchi, A. & Saito, T. CD4 CTL, a cytotoxic subset of CD4+ T cells, their differentiation and function. *Front. Immunol.* **8**, 1–7 (2017).
  70. Ellyard, J. I., Simson, L. & Parish, C. R. Th2-mediated anti-tumour immunity : friend or foe ? *Tissue Antigens* **70**, 1–11 (2007).
  71. Tepper, R. I., Coffman, R. L. & Leder, P. An eosinophil-dependent mechanism for the antitumor effect of interleukin-4. *Science.* **257**, 548–551 (1992).
  72. Ma, H. L. *et al.* Tumor cells secreting IL-13 but not IL-13R $\alpha$ 2 fusion protein have reduced tumorigenicity in vivo. *Int. Immunol.* **16**, 1009–1017 (2004).
  73. Liu, M. *et al.* TGF- $\beta$  suppresses type 2 immunity to cancer. *Nature* **587**, 115–120 (2020).
  74. Dennis, K. L., Blatner, N. R., Gounari, F. & Khazaie, K. Current status of interleukin-10 and regulatory T-cells in cancer. *Curr. Opin. Oncol.* **25**, 637–645 (2013).
  75. Biswas, S. K. & Mantovani, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: Cancer as a paradigm. *Nat. Immunol.* **11**, 889–896 (2010).
  76. Lewis, C. E. & Pollard, J. W. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res.* **66**, 605–612 (2006).
  77. Guéry, L. & Hugues, S. Th17 Cell Plasticity and Functions in Cancer Immunity. *Biomed Res. Int.* **2015**, (2015).
  78. Asadzadeh, Z. *et al.* The paradox of Th17 cell functions in tumor immunity. *Cell. Immunol.* **322**, 15–25 (2017).
  79. Qian, X. *et al.* Interleukin-17 acts as double-edged sword in anti-tumor immunity and tumorigenesis. *Cytokine* **89**, 34–44 (2017).
  80. Punt, S. *et al.* The correlations between IL-17 vs. Th17 cells and cancer patient survival: A systematic review. *Oncoimmunology* **4**, 1–10 (2015).
  81. Josefowicz, S. Z., Lu, L.-F. & Rudensky, A. Y. Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 531–564 (2012).



82. Povoleri, G. A. M. *et al.* Thymic versus induced regulatory T cells-who regulates the regulators? *Front. Immunol.* **4**, 1–22 (2013).
83. Curotto de Lafaille, M. A. & Lafaille, J. J. Natural and Adaptive Foxp3+ Regulatory T Cells: More of the Same or a Division of Labor? *Immunity* **30**, 626–635 (2009).
84. Fontenot, J. D., Gavin, M. A. & Rudensky, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4 + CD25 + regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **4**, 330–336 (2003).
85. Shohei, H., Takashi, N. & Sakagushi, S. Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3. *Science.* **299**, 1057–1061 (2003).
86. Workman, C. J., Szymczak-Workman, A. L., Collison, L. W., Pillai, M. R. & Vignali, D. A. A. The development and function of regulatory T cells. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 2603–2622 (2009).
87. Facciabene, A., Motz, G. T. & Coukos, G. T-Regulatory cells: Key players in tumor immune escape and angiogenesis. *Cancer Res.* **72**, 2162–2171 (2012).
88. Sakaguchi, S., Wing, K. & Miyara, M. Regulatory T cells - A brief history and perspective. *Eur. J. Immunol.* **37**, 116–123 (2007).
89. Vignali, D. A. A., Collison, L. W. & Workman, C. J. How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 523–532 (2008).
90. Safinia, N., Scotta, C., Vaikunthanathan, T., Lechler, R. I. & Lombardi, G. Regulatory T cells: Serious contenders in the promise for immunological tolerance in transplantation. *Front. Immunol.* **6**, 1–16 (2015).
91. Deaglio, S. *et al.* Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J. Exp. Med.* **204**, 1257–1265 (2007).
92. Bopp, T. *et al.* Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J. Exp. Med.* **204**, 1303–1310 (2007).
93. Bodor, J., Fehervari, Z., Diamond, B. & Sakaguchi, S. ICER/CREM-mediated transcriptional attenuation of IL-2 and its role in suppression by regulatory T cells. *Eur. J. Immunol.* **37**, 884–895 (2007).
94. Thornton, A. M. & Shevach, E. M. CD4+CD25+ Immunoregulatory T Cells Suppress Polyclonal T Cell Activation In Vitro by Inhibiting Interleukin 2 Production . *J. Exp. Med.* **188**, 287–296 (1998).
95. Wing, K. *et al.* CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science.* **322**, 271–275 (2008).
96. Read, S., Malmström, V. & Powrie, F. Cytotoxic T Lymphocyte–Associated Antigen 4 Plays an Essential Role in the Function of Cd25+Cd4+ Regulatory Cells That Control Intestinal Inflammation. *J. Exp. Med.* **192**, 295–302 (2000).

97. Cederbom, L., Hall, H. & Ivars, F. CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur. J. Immunol.* **30**, 1538–1543 (2000).
98. Fallarino, F. *et al.* Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **4**, 1206–1212 (2003).
99. Huang, C.-T. T. *et al.* Role of LAG-3 in Regulatory T Cells. *Immunity* **21**, 503–513 (2004).
100. Liang, B. *et al.* Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J. Immunol.* **180**, 5916–5926 (2008).
101. Tadokoro, C. E. *et al.* Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo. *J. Exp. Med.* **203**, 505–511 (2006).
102. Onishi, Y., Fehervari, Z., Yamaguchi, T. & Sakaguchi, S. Foxp3+ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 10113–10118 (2008).
103. Rubtsov, Y. P. *et al.* Regulatory T Cell-Derived Interleukin-10 Limits Inflammation at Environmental Interfaces. *Immunity* **28**, 546–558 (2008).
104. Mittal, S. K. & Roche, P. A. Suppression of antigen presentation by IL-10. *Curr. Opin. Immunol.* **34**, 22–27 (2015).
105. Joss, A., Akdis, M., Faith, A., Blaser, K. & Akdis, C. A. IL-10 directly acts on T cells by specifically altering the CD28 co-stimulation pathway. *Eur. J. Immunol.* **30**, 1683–1690 (2000).
106. Wan, Y. Y. & Flavell, R. A. ‘Yin–Yang’ functions of transforming growth factor- $\beta$  and T regulatory cells in immune regulation. *Immunol. Rev.* **220**, 199–213 (2007).
107. Li, M. O., Wan, Y. Y. & Flavell, R. A. T Cell-Produced Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 Controls T Cell Tolerance and Regulates Th1- and Th17-Cell Differentiation. *Immunity* **26**, 579–591 (2007).
108. Collison, L. W. *et al.* IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nat. Immunol.* **11**, 1093–1101 (2010).
109. Damo, M. & Joshi, N. S. Treg cell IL-10 and IL-35 exhaust CD8+ T cells in tumors. *Nat. Immunol.* **20**, 674–675 (2019).
110. Cao, X. *et al.* Granzyme B and Perforin Are Important for Regulatory T Cell-Mediated Suppression of Tumor Clearance. *Immunity* **27**, 635–646 (2007).
111. Byrne, W. L., Mills, K. H. G., Lederer, J. A. & O’Sullivan, G. C. Targeting regulatory T cells in cancer. *Cancer Res.* **71**, 6915–6920 (2011).
112. Chames, P., Van Regenmortel, M., Weiss, E. & Baty, D. Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *Br. J. Pharmacol.* **157**, 220–233 (2009).

113. Makurvet, F. D. Biologics vs. small molecules: Drug costs and patient access. *Med. Drug Discov.* **9**, 100075 (2021).
114. Knapp, S. New opportunities for kinase drug repurposing and target discovery editorial. *Br. J. Cancer* **118**, 936–937 (2018).
115. Ulges, A. *et al.* Protein kinase CK2 enables regulatory T cells to suppress excessive TH2 responses in vivo. *Nat. Immunol.* **16**, 267–275 (2015).
116. Burnett, G. & Kennedy, E. P. The enzymatic phosphorylation of proteins. *J. Biol. Chem.* **211**, 969–980 (1954).
117. Litchfield, D. W. Protein kinase CK2: Structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem. J.* **369**, 1–15 (2003).
118. Grankowski, N., Boldyreff, B. & Issinger, O. G. Isolation and characterization of recombinant human casein kinase II subunits  $\alpha$  and  $\beta$  from bacteria. *Eur. J. Biochem.* **198**, 25–30 (1991).
119. Niefind, K. Kristallstruktur der CK2. 2020 Available at: <http://www.uni-koeln.de/math-nat-fak/biochemie/niefind/ck2.shtml>. (Accessed: 21st December 2020)
120. Niefind, K., Yde, C. W., Ermakova, I. & Issinger, O.-G. Evolved to Be Active: Sulfate Ions Define Substrate Recognition Sites of CK2 $\alpha$  and Emphasise its Exceptional Role within the CMGC Family of Eukaryotic Protein Kinases. *J. Mol. Biol.* **370**, 427–438 (2007).
121. Vilk, G. *et al.* Protein kinase CK2 catalyzes tyrosine phosphorylation in mammalian cells. *Cell. Signal.* **20**, 1942–1951 (2008).
122. Pinna, L. A. Protein kinase CK2: A challenge to canons. *J. Cell Sci.* **115**, 3873–3878 (2002).
123. Meggio, F. & Pinna, L. A. One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *FASEB J.* **17**, 349–368 (2003).
124. Duncan, J. S. & Litchfield, D. W. Too much of a good thing: The role of protein kinase CK2 in tumorigenesis and prospects for therapeutic inhibition of CK2. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1784**, 33–47 (2008).
125. Allende, J. E. & Allende, C. C. Protein kinase CK2: an enzyme with multiple substrates and a puzzling regulation. *FASEB J.* **9**, 313–323 (1995).
126. Hathaway, G. M. & Traugh, J. A. Casein Kinases—Multipotential Protein Kinases. *Curr. Top. Cell. Regul.* **21**, 101–127 (1982).
127. Lolli, G. *et al.* Inhibition of Protein Kinase CK2 by Flavonoids and Tyrphostins. A Structural Insight. *Biochemistry* **51**, 6097–6107 (2012).
128. Cozza, G. & Pinna, L. A. Casein kinases as potential therapeutic targets. *Expert Opin. Ther. Targets* **20**, 319–340 (2016).

129. Leroy, D., Heriché, J.-K., Filhol, O., Chambaz, E. M. & Cochet, C. Binding of Polyamines to an Autonomous Domain of the Regulatory Subunit of Protein Kinase CK2 Induces a Conformational Change in the Holoenzyme: A Proposed Role For The Kinase Stimulation. *J. Biol. Chem.* **272**, 20820–20827 (1997).
130. Lawson, K., Larentowicz, L., Artim, S., Hayes, C. S. & Gilmour, S. K. A Novel Protein Kinase CK2 Substrate Indicates CK2 Is Not Directly Stimulated by Polyamines in Vivo. *Biochemistry* **45**, 1499–1510 (2006).
131. Gibson, S. A. & Benveniste, E. N. Protein Kinase CK2: An Emerging Regulator of Immunity. *Trends Immunol.* **39**, 82–85 (2018).
132. Zhang, Y., Sacconi, S., Shin, H. & Nikolajczyk, B. S. Dynamic Protein Associations Define Two Phases of IL-1 $\beta$  Transcriptional Activation. *J. Immunol.* **181**, 503–512 (2008).
133. de Bourayne, M. *et al.* Protein kinase CK2 controls T-cell polarization through dendritic cell activation in response to contact sensitizers. *J. Leukoc. Biol.* **101**, 703–715 (2017).
134. Ulges, A. *et al.* Protein kinase CK2 governs the molecular decision between encephalitogenic TH17 cell and Treg cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2016). doi:10.1073/pnas.1523869113
135. Gibson, S. A. *et al.* Protein Kinase CK2 Controls the Fate between Th17 Cell and Regulatory T Cell Differentiation. *J. Immunol.* **198**, 4244–4254 (2017).
136. Tanaka, A. & Sakaguchi, S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Cell Res.* **27**, 109–118 (2017).
137. Buchou, T. *et al.* Disruption of the Regulatory  $\beta$  Subunit of Protein Kinase CK2 in Mice Leads to a Cell-Autonomous Defect and Early Embryonic Lethality. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 908–915 (2003).
138. Devaud, C., Darcy, P. K. & Kershaw, M. H. Foxp3 expression in T regulatory cells and other cell lineages. *Cancer Immunol. Immunother.* **63**, 869–876 (2014).
139. Ulges, A. Charakterisierung der Protein Kinase CK2 in der Suppression Th2-vermittelter Immunantworten durch regulatorische T-Zellen. (Universität Mainz, 2013).
140. Zambrowicz, B. P. *et al.* Disruption of overlapping transcripts in the ROSA beta geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of beta-galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 3789–3794 (1997).
141. Overwijk, W. W. & Restifo, N. P. B16 as a Mouse Model for Human Melanoma. *Curr. Protoc. Immunol.* **39**, 20.1.1-20.1.29 (2000).
142. Jackson Laboratory. The Jackson Laboratory Handbook on Genetically Standardized Mice. 1–396 (2009).
143. Stackpole, C. W. Distinct lung-colonizing and lung-metastasizing cell populations in B16 mouse melanoma. *Nature* **289**, 798–800 (1981).

144. Li, T. *et al.* TIMER: A Web Server for Comprehensive Analysis of Tumor-Infiltrating Immune Cells. *Cancer Res.* **77**, e108 LP-e110 (2017).
145. Li, T. *et al.* TIMER2.0 for analysis of tumor-infiltrating immune cells. *Nucleic Acids Res.* **48**, W509–W514 (2020).
146. Zwiener, I., Blettner, M. & Hommel, G. Survival analysis: part 15 of a series on evaluation of scientific publications. *Dtsch. Arztebl. Int.* **108**, 163–169 (2011).
147. Wynn, T. A. Type 2 cytokines: mechanisms and therapeutic strategies. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 271–282 (2015).
148. Chetty, R. & Gatter, K. CD3: Structure, function, and role of immunostaining in clinical practice. *J. Pathol.* **173**, 303–307 (1994).
149. Ostroumov, D., Fekete, N. & Michael, D. CD4 and CD8 T lymphocyte interplay in controlling tumor growth. *Cell. Mol. Life Sci.* **75**, 689–713 (2018).
150. Hermiston, M. L., Xu, Z. & Weiss, A. CD45 : A Critical Regulator of Signaling Thresholds in Immune Cells. *Annu. Rev. Immunol* **21**, 107–137 (2003).
151. Klebanoff, C. A., Gattinoni, L. & Restifo, N. P. CD8+ T-cell memory in tumor immunology and immunotherapy. *Immunol. Rev.* **211**, 214–224 (2006).
152. Kennedy, R. & Celis, E. Multiple roles for CD4 T cells in anti-tumor immune responses. *Immunol. Rev.* **222**, 129–144 (2008).
153. Ahrends, T. & Borst, J. The opposing roles of CD4+ T cells in anti-tumour immunity. *Immunology* **154**, 582–592 (2018).
154. Kreslavsky, T., Garbe, A. I., Krueger, A. & Von Boehmer, H. T cell receptor-instructed  $\alpha\beta$  versus  $\gamma\delta$  lineage commitment revealed by single-cell analysis. *J. Exp. Med.* **205**, 1173–1186 (2008).
155. Sallusto, F., Mackay, C. R. & Lanzavecchia, A. Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. *Science.* **277**, 2005–2007 (1997).
156. Miyagaki, T. *et al.* Eotaxins and CCR3 interaction regulates the Th2 environment of cutaneous T-Cell lymphoma. *J. Invest. Dermatol.* **130**, 2304–2311 (2010).
157. Mikhak, Z. *et al.* Contribution of CCR4 and CCR8 to antigen-specific TH2 cell trafficking in allergic pulmonary inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **123**, 67-73.e3 (2009).
158. Morimoto, Y. *et al.* Induction of surface CCR4 and its functionality in mouse Th2 cells is regulated differently during Th2 development. *J. Leukoc. Biol.* **78**, 753–761 (2005).
159. Hoshino, A. *et al.* Critical role for OX40 ligand in the development of pathogenic Th2 cells in a murine model of asthma. *Eur. J. Immunol.* **33**, 861–869 (2003).

160. Hwang, E. S., White, I. A. & Ho, I. C. An IL-4-independent and CD25-mediated function of c-maf in promoting the production of Th2 cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 13026–13030 (2002).
161. Zheng, W. & Flavell, R. A. The Transcription Factor GATA-3 Is Necessary and Sufficient for Th2 Cytokine Gene Expression in CD4 T Cells. *Cell* **89**, 587–596 (1997).
162. Mizrahi, O., Ish Shalom, E., Baniyash, M. & Klieger, Y. Quantitative Flow Cytometry: Concerns and Recommendations in Clinic and Research. *Cytom. Part B Clin. Cytom.* **94**, 211–218 (2018).
163. Falk, C. S. & Oliveira, M. J. Interferon-Gamma at the Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion. *Front. Immunol.* **9**, 1–19 (2018).
164. Wang, X. & Lin, Y. Invited review Tumor necrosis factor and cancer , buddies or foes? *Acta Pharmacol. Sin.* **29**, 1275–1288 (2008).
165. Gao, Y. *et al.* Control of T helper 2 responses by transcription factor IRF4-dependent dendritic cells. *Immunity* **39**, 722–732 (2013).
166. Williams, J. W. *et al.* Transcription factor IRF4 drives dendritic cells to promote Th2 differentiation. *Nat. Commun.* **4**, (2013).
167. Pericle, F. *et al.* An efficient Th2-type memory follows CD8+lymphocyte-driven and eosinophil-mediated rejection of a spontaneous mouse mammary adenocarcinoma engineered to release IL-4. *J. Immunol.* **153**, 5659–5673 (1994).
168. Rothenberg, M. E. & Hogan, S. P. The eosinophil. *Annu. Rev. Immunol.* **24**, 147–174 (2006).
169. Lebel-Binay, S. *et al.* Experimental gene therapy of cancer using tumor cells engineered to secrete interleukin-13. *Eur. J. Immunol.* **25**, 2340–2348 (1995).
170. Gieseck, R. L., Wilson, M. S. & Wynn, T. A. Type 2 immunity in tissue repair and fibrosis. *Nat. Rev. Immunol.* **18**, 62–76 (2018).
171. Varricchi, G. *et al.* Eosinophils: The unsung heroes in cancer? *Oncoimmunology* **7**, 1–14 (2018).
172. Carretero, R. *et al.* Eosinophils orchestrate cancer rejection by normalizing tumor vessels and enhancing infiltration of CD8 + T cells. *Nat. Immunol.* **16**, 609–617 (2015).
173. Habif, G., Crinier, A., André, P., Vivier, E. & Narni-Mancinelli, E. Targeting natural killer cells in solid tumors. *Cell. Mol. Immunol.* **16**, 415–422 (2019).
174. Wendel, M., Galani, I. E., Suri-Payer, E. & Cerwenka, A. Natural killer cell accumulation in tumors is dependent on IFN- $\gamma$  and CXCR3 ligands. *Cancer Res.* **68**, 8437–8445 (2008).
175. Moreira, A., Leisgang, W., Schuler, G. & Heinzerling, L. Eosinophilic count as a biomarker for prognosis of melanoma patients and its importance in the response to immunotherapy. *Immunotherapy* **9**, 115–121 (2017).

176. Prizment, A. E. *et al.* Tumor eosinophil infiltration and improved survival of colorectal cancer patients : Iowa Women ' s Health Study. *Mod. Pathol.* **29**, 516–527 (2016).
177. Lucarini, V. *et al.* IL-33 restricts tumor growth and inhibits pulmonary metastasis in melanoma-bearing mice through eosinophils. *Oncoimmunology* **6**, 1–14 (2017).
178. Zhang, J. Q., Biedermann, B., Nitschke, L. & Crocker, P. R. The murine inhibitory receptor mSiglec-E is expressed broadly on cells of the innate immune system whereas mSiglec-F is restricted to eosinophils. *Eur. J. Immunol.* **34**, 1175–1184 (2004).
179. Zimmermann, N. *et al.* Siglec-F antibody administration to mice selectively reduces blood and tissue eosinophils. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* **63**, 1156–1163 (2008).
180. Aizawa, H. *et al.* Molecular analysis of human Siglec-8 orthologs relevant to mouse eosinophils: Identification of mouse orthologs of Siglec-5 (mSiglec-F) and Siglec-10 (mSiglec-G). *Genomics* **82**, 521–530 (2003).
181. Chua, M. M. J. *et al.* CK2 in cancer: Cellular and biochemical mechanisms and potential therapeutic target. *Pharmaceuticals* **10**, 20–22 (2017).
182. Vasilevska, J. *et al.* Comparative protein profiling of B16 mouse melanoma cells susceptible and non-susceptible to alphavirus infection: Effect of the tumor microenvironment. *Cancer Biol. Ther.* **17**, 1035–1050 (2016).
183. Lian, H. *et al.* Protein kinase CK2, a potential therapeutic target in carcinoma management. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* **20**, 23–32 (2019).
184. Hashimoto, A. *et al.* Inhibition of casein kinase 2 disrupts differentiation of myeloid cells in cancer and enhances the efficacy of immunotherapy in mice. *Cancer Res.* **78**, 5644–5655 (2019).
185. Rudensky, A. Y. Regulatory T cells and Foxp3. *Immunol. Rev.* **2011**, 260–268 (2011).
186. Williams, L. M. & Rudensky, A. Y. Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nat. Immunol.* **8**, 277–284 (2007).
187. Li, X., Liang, Y., Leblanc, M., Benner, C. & Zheng, Y. Function of a Foxp3 cis -Element in Protecting Regulatory T Cell Identity. *Cell* **158**, 734–748 (2014).
188. Ribas, A. & Wolchok, J. D. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science.* **359**, 1350 LP – 1355 (2018).
189. Sosman, J. A. *et al.* Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *New Engl. J. Med. Med.* **363**, 711–723 (2010).
190. Robert, C. *et al.* Nivolumab in Previously Untreated Melanoma without. *New Engl. J. Med. Med.* **372**, 320–330 (2015).
191. Sasidharan Nair, V. & Elkord, E. Immune checkpoint inhibitors in cancer therapy: a focus on T-

- regulatory cells. *Immunol. Cell Biol.* **96**, 21–33 (2018).
192. Selby, M. J. *et al.* Anti-CTLA-4 Antibodies of IgG2a Isotype Enhance Antitumor Activity through Reduction of Intratumoral Regulatory T Cells. *Cancer Immunol. Res.* **1**, 32–43 (2013).
193. Bastid, J. *et al.* ENTPD1/CD39 is a promising therapeutic target in oncology. *Oncogene* **32**, 1743–1751 (2013).
194. Togashi, Y., Shitara, K. & Nishikawa, H. Regulatory T cells in cancer immunosuppression - implications for anticancer therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **16**, (2019).
195. Kamada, T. *et al.* PD-1+ regulatory T cells amplified by PD-1 blockade promote hyperprogression of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**, 9999–10008 (2019).
196. Hill, J. A., Benoist, C. & Mathis, D. Treg cells: guardians for life. *Nat. Immunol.* **8**, 124–125 (2007).
197. Curotto de Lafaille, M. A. & Lafaille, J. J. CD4+ regulatory T cells in autoimmunity and allergy. *Curr. Opin. Immunol.* **14**, 771–778 (2002).
198. Wildin, R. S. *et al.* X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat. Genet.* **27**, 18–20 (2001).
199. Shang, B., Liu, Y., Jiang, S. & Liu, Y. Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3+ regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep.* **5**, 15179 (2015).
200. Chaudhary, B. & Elkord, E. Regulatory T cells in the tumor microenvironment and cancer progression: Role and therapeutic targeting. *Vaccines* **4**, 1–25 (2016).
201. deLeeuw, R. J., Kost, S. E., Kakal, J. A. & Nelson, B. H. The Prognostic Value of FoxP3+ Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Cancer: A Critical Review of the Literature. *Clin. Cancer Res.* **18**, 3022 LP – 3029 (2012).
202. Rech, A. J. *et al.* CD25 blockade depletes and selectively reprograms regulatory T cells in concert with immunotherapy in cancer patients. *Sci. Transl. Med.* **4**, (2012).
203. Rasku, M. A. *et al.* Transient T cell depletion causes regression of melanoma metastases. *J. Transl. Med.* **6**, 12 (2008).
204. Ellis, J. S., Wan, X. & Braley-Mullen, H. Transient depletion of CD4+ CD25+ regulatory T cells results in multiple autoimmune diseases in wild-type and B-cell-deficient NOD mice. *Immunology* **139**, 179–186 (2013).
205. Sakaki, M. *et al.* Intrahepatic status of regulatory T cells in autoimmune liver diseases and chronic viral hepatitis. *Hepatol. Res.* **38**, 354–361 (2008).
206. Ghiringhelli, F. *et al.* Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. *Cancer Immunol. Immunother.* **56**, 641–648 (2007).



207. Sevko, A. *et al.* Cyclophosphamide Promotes Chronic Inflammation–Dependent Immunosuppression and Prevents Antitumor Response in Melanoma. *J. Invest. Dermatol.* **133**, 1610–1619 (2013).
208. Ketcham, J. M., Marshall, L. A. & Talay, O. CCR4 Antagonists Inhibit Treg Trafficking into the Tumor Microenvironment. *ACS Med. Chem. Lett.* **9**, 953–955 (2018).
209. Kohli, K., Pillarisetty, V. G. & Kim, T. S. Key chemokines direct migration of immune cells in solid tumors. *Cancer Gene Ther.* **29**, 10–21 (2022).
210. Sugiyama, D. *et al.* Anti-CCR4 mAb selectively depletes effector-type FoxP3+CD4+ regulatory T cells, evoking antitumor immune responses in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 17945–17950 (2013).
211. Ueda, R. Clinical Application of Anti-CCR4 Monoclonal Antibody. *Oncology* **89(suppl 1)**, 16–21 (2015).
212. Chauvin, J.-M. & Zarour, H. M. TIGIT in cancer immunotherapy. *J. Immunother. Cancer* **8**, e000957 (2020).
213. Yu, X. *et al.* The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nat. Immunol.* **10**, 48–57 (2009).
214. Joller, N. *et al.* Cutting Edge: TIGIT Has T Cell-Intrinsic Inhibitory Functions. *J. Immunol.* **186**, 1338–1342 (2011).
215. Chauvin, J.-M. *et al.* TIGIT and PD-1 impair tumor antigen–specific CD8+ T cells in melanoma patients. *J. Clin. Invest.* **125**, 2046–2058 (2015).
216. Kurtulus, S. *et al.* TIGIT predominantly regulates the immune response via regulatory T cells. *J. Clin. Invest.* **125**, 4053–4062 (2015).
217. Fourcade, J. *et al.* CD226 opposes TIGIT to disrupt Tregs in melanoma. *JCI insight* **3**, 1–13 (2018).
218. Tumeh, P. C. *et al.* PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* **515**, 568–571 (2014).
219. Zhang, B., Chikuma, S., Hori, S., Fagarasan, S. & Honjo, T. Nonoverlapping roles of PD-1 and FoxP3 in maintaining immune tolerance in a novel autoimmune pancreatitis mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 8490–8495 (2016).
220. Tan, C. L. *et al.* PD-1 restraint of regulatory T cell suppressive activity is critical for immune tolerance. *J. Exp. Med.* **218**, (2021).
221. Kumagai, S. *et al.* The PD-1 expression balance between effector and regulatory T cells predicts the clinical efficacy of PD-1 blockade therapies. *Nat. Immunol.* **21**, 1346–1358 (2020).
222. Ahlmanner, F. *et al.* CD39+ regulatory T cells accumulate in colon adenocarcinomas and display

- markers of increased suppressive function. *Oncotarget* **9**, 36993–37007 (2018).
223. Cai, X. Y. *et al.* Overexpression of CD39 and high tumoral CD39+/CD8+ ratio are associated with adverse prognosis in resectable gastric cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **8**, 14757–14764 (2015).
224. Sun, X. *et al.* CD39/ENTPD1 expression by CD4+Foxp3+ regulatory T cells promotes hepatic metastatic tumor growth in mice. *Gastroenterology* **139**, 1030–1040 (2010).
225. Park, Y. J. *et al.* IL-27 confers a protumorigenic activity of regulatory T cells via CD39. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**, 3106–3111 (2019).
226. Harakal, J., Rival, C., Qiao, H. & Tung, K. S. Regulatory T Cells Control Th2-Dominant Murine Autoimmune Gastritis. *J. Immunol.* **197**, 27 LP – 41 (2016).
227. Norlander, A. E. *et al.* Prostaglandin I2 signaling licenses Treg suppressive function and prevents pathogenic reprogramming. *J. Clin. Invest.* **131**, (2021).
228. Littringer, K. *et al.* Common Features of Regulatory T Cell Specialization During Th1 Responses. *Front. Immunol.* **9**, 1344 (2018).
229. Estrada Brull, A. *et al.* CD85k Contributes to Regulatory T Cell Function in Chronic Viral Infections. *International Journal of Molecular Sciences.* **22**, (2021).
230. Chraa, D., Naim, A., Olive, D. & Badou, A. T lymphocyte subsets in cancer immunity: Friends or foes. *Journal of Leukocyte Biology* **105**, 243–255 (2019).
231. Schreiber, S. *et al.* Metabolic Interdependency of Th2 Cell-Mediated Type 2 Immunity and the Tumor Microenvironment. *Front. Immunol.* **12**, 1–12 (2021).
232. Tokumaru, Y. *et al.* Association of Th2 high tumors with aggressive features of breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **38**, e12584–e12584 (2020).
233. Yoon, N. K. *et al.* Higher levels of GATA3 predict better survival in women with breast cancer. *Hum. Pathol.* **41**, 1794–1801 (2010).
234. Chou, J., Provot, S. & Werb, Z. GATA3 in development and cancer differentiation: cells GATA have it! *J. Cell. Physiol.* **222**, 42–49 (2010).
235. Camp, B. J., Dyhrman, S. T., Memoli, V. A., Mott, L. A. & Barth, R. J. In situ cytokine production by breast cancer tumor-infiltrating lymphocytes. *Ann. Surg. Oncol.* **3**, 176–184 (1996).
236. Palma, M. *et al.* T cells in chronic lymphocytic leukemia display dysregulated expression of immune checkpoints and activation markers. *Haematologica* **102**, 562–572 (2017).
237. Kalpadakis, C. *et al.* Circulating Tight Junction Proteins Mirror BBB integrity in Leukemia CNS Metastasis. *Hematol. Oncol.* **25**, 127–131 (2007).

238. De Monte, L. *et al.* Intratumor T helper type 2 cell infiltrate correlates with cancer-associated fibroblast thymic stromal lymphopoietin production and reduced survival in pancreatic cancer. *J. Exp. Med.* **208**, 469–478 (2011).
239. Ubukata, H. *et al.* Evaluations of interferon- $\gamma$ /interleukin-4 ratio and neutrophil/lymphocyte ratio as prognostic indicators in gastric cancer patients. *J. Surg. Oncol.* **102**, 742–747 (2010).
240. Nevaia, W. K. *et al.* Evidence of systemic Th2-driven chronic inflammation in patients with metastatic melanoma. *Clin. Cancer Res.* **15**, 1931–1939 (2009).
241. Jacquelot, N. *et al.* Blockade of the co-inhibitory molecule PD-1 unleashes ILC2-dependent antitumor immunity in melanoma. *Nat. Immunol.* **22**, 851–864 (2021).
242. Zaynagetdinov, R. *et al.* Interleukin-5 facilitates lung metastasis by modulating the immune microenvironment. *Cancer Res.* **75**, 1624–1634 (2015).
243. Grisar-Tal, S., Itan, M., Klion, A. D. & Munitz, A. A new dawn for eosinophils in the tumour microenvironment. *Nat. Rev. Cancer* **20**, 594–607 (2020).

## 8 Abkürzungsverzeichnis

A2AR	Adenosin-A2-Rezeptor
APCs	Antigen presenting cells
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCL	Chemokine C-C motif ligand
CCR	C-C chemokine receptor type
CD	Cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
CK2	Proteinkinase CK2
CK2 $\alpha$ -UE	$\alpha$ -Untereinheit der Proteinkinase CK2
CK2 $\beta$ -UE	$\beta$ -Untereinheit der Proteinkinase CK2
cor	Spearman-Korrelationskoeffizient $\rho$
CPI	Checkpoint-Inhibitoren
Cre	Cyclization recombinase
CTL	Cytotoxic T lymphocyte
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4
CXCR3	C-X-C Motif Chemokine Receptor 3
DCs	Dendritische Zellen
DEREG	Depletion of Regulatory T cells
done	drainierende Lymphknoten
DMAT	2-Dimethylamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazole
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Deoxynucleosidtriphosphate
DTX	Diphtheriatoxin
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Eomes	Eomesodermin
eT <sub>reg</sub> -Zellen	effektorische regulatorische T-Zellen
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
Fas	Fas cell surface death receptor
Fas-L	Fas cell surface death receptor ligand
FCS	Fetales Kälberserum
Foxp3	Forkhead box P3
FSC	Forward scatter
GATA3	GATA Binding Protein 3

GITR	Glucocorticoid-induced TNFR-related
GTP	Guanosintriphosphat
HR	Hazard-Ratio
i.p.	intraperitoneal
ICER	Inducible cAMP early repressor
ICOS	Inducible T-cell costimulator
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL	Interleukin
iLN	inguinale Lymphknoten
ILT3	Immunoglobulin-like transcript 3
iOR	inhibitorische Oberflächenrezeptoren
IPA	Ingenuity pathway analysis
IRF4	Interferon Regulatory Factor 4
Jag1	Jagged1
JAK	Janus kinases
LAG-3	Lymphocyte-activation gene 3
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1
loxp	Locus of X over P1
MACS	Magnet-aktivierte Zellsortierung
MFI	Mean Fluorescence Intensity
MHC	Major histocompatibility complex
mLN	mesenteriale Lymphknoten
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NGS	Next Generation Sequencing
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NSCLC	Non-small lung cancer
nT <sub>reg</sub> -Zellen	Natürliche regulatorische T-Zellen
PAMPs	Pathogen associated molecular patterns
PBS	Phosphate buffered saline
PD-1	Programmed cell death 1
PD-L1	Programmed cell death ligand 1
PD-L2	Programmed cell death ligand 2
PMA	Phorbol 12-myristat 13-acetat
PRR	Pattern recognition receptors
pT <sub>reg</sub> -Zellen	periphere regulatorische T-Zellen
PVR	Poliovirus receptor
RAG	Recombination activating gene 1
Ras	Rat sarcoma

---

RFP	Red fluorescent protein
RIN	RNA Integrity Number
RNA	Ribonukleinsäure
ROR $\gamma$ T	RAR-related orphan receptor gamma
s.c.	subcutan
SD	Standard deviation
SEM	Standard error of the mean
SIGLEC8	Sialic acid binding Ig like lectin 8
SIGLEC-F	Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin F
SSC	Side scatter
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
T-BET	T-box transcription factor
TGF- $\beta$	Transforming growth factor beta
T <sub>H</sub> -Zellen	T-Helferzellen
ti	tumor-infiltrierend
TIGIT	T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains
TIM-3	T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3
TIMER	Tumor Immune Estimation Resource
T <sub>konv</sub> -Zellen	konventionelle T-Zellen
TMB	Tumour mutation burden
Tnfrsf4 (OX-40)	Tumour necrosis factor receptor superfamily member 4
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
T <sub>reg</sub> -Zellen	Regulatorische T-Zellen
TZR	T-Zellrezeptor
UE	Untereinheit

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zelluläre Zusammensetzung des Immunsystems...	2
Abbildung 2: Der Krebsimmunitätszyklus.....	5
Abbildung 3: Mechanismen der T-Zellaktivierung am Beispiel von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen.....	8
Abbildung 4: Die Differenzierung und Aufgaben von CD4 <sup>+</sup> T-Helferzellen.....	10
Abbildung 5: Suppressionsmechanismen von regulatorischen T-Zellen.....	13
Abbildung 6: Die Proteinkinase CK2.....	16
Abbildung 7: Generierung des Mausstammes <i>Foxp3-Cre</i> x <i>Csnk2b<sup>fl/fl</sup></i> mit einer konditionellen Deletion der Proteinkinase CK2 $\beta$ -Untereinheit in regulatorischen T-Zellen.....	29
Abbildung 8: Mechanismus der RFP-Expression in regulatorischen T-Zellen innerhalb der <i>Rosa26-RFP</i> x <i>Foxp3-Cre</i> x <i>Csnk2b<sup>fl/fl</sup></i> Mauslinie.....	30
Abbildung 9: Gating-Strategie zur Identifikation von regulatorischen T-Zellen.....	38
Abbildung 10: Qualitätskontrolle für NGS Sequencing.....	41
Abbildung 11: Die Proteinkinase CK2 kontrolliert die Expression von ILT3 auf T <sub>reg</sub> -Zellen.....	44
Abbildung 12: Im humanen malignen Melanom korreliert die <i>LILRB4</i> -Expression mit einer längeren Überlebenszeit und der <i>FOXP3</i> -Expression.....	46
Abbildung 13: <i>Csnk2b<sup>Treg-/-</sup></i> Mäuse zeigen im B16-Melanommodell ein stark verringertes Tumorwachstum.....	47
Abbildung 14: Die Frequenz an ILT3 <sup>+</sup> T <sub>reg</sub> -Zellen ist in Tumoren von <i>Csnk2b<sup>Treg-/-</sup></i> Mäusen erhöht. ..	48
Abbildung 15: Die erhöhte Frequenz an CD45 <sup>+</sup> Immunzellen in Tumoren von <i>Csnk2b<sup>Treg-/-</sup></i> Mäusen deutet auf eine verstärkte anti-Tumorimmunantwort hin.....	50
Abbildung 16: Die spezifische CK2-Defizienz in T <sub>reg</sub> -Zellen begünstigt die Migration von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen aus den drainierenden Lymphknoten in das Tumorgewebe.....	52
Abbildung 17: Die spezifische CK2-Defizienz reduziert die Frequenz von T <sub>reg</sub> -Zellen im Tumorgewebe, aber nicht in den drainierenden Lymphknoten.....	53
Abbildung 18: T <sub>H2</sub> -assoziierte Gene sind in konventionellen FOXP3 <sup>-</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen aus Tumoren von <i>Csnk2b<sup>Treg-/-</sup></i> Mäusen verstärkt exprimiert.....	55
Abbildung 19: Die Frequenz GATA3-exprimierender T <sub>H2</sub> -Zellen ist in Tumoren von <i>Csnk2b<sup>Treg-/-</sup></i> Mäusen signifikant erhöht.....	57
Abbildung 20: Die Produktion T <sub>H2</sub> -assoziierter Zytokine durch CD4 <sup>+</sup> T <sub>konv</sub> -Zellen ist in Tumoren von <i>Csnk2b<sup>Treg-/-</sup></i> Mäusen signifikant erhöht.....	58
Abbildung 21: Die Produktion Typ1-assoziierter Zytokine durch T-Zellen ist in Tumoren von <i>Csnk2b<sup>Treg-/-</sup></i> Mäusen und wildtypischen Mäusen annähernd identisch.....	60
Abbildung 22: Frequenz an T <sub>H2</sub> -dirigierenden IRF4 <sup>+</sup> PD-L2 <sup>+</sup> Dendritischen Zellen ist in Tumoren von <i>Csnk2b<sup>Treg-/-</sup></i> Mäusen erhöht.....	61
Abbildung 23: Die Frequenz an Eosinophilen ist in Tumoren von <i>Csnk2b<sup>Treg-/-</sup></i> Mäusen erhöht.....	63

---

Abbildung 24: Die Frequenz an NK-Zellen ist in Tumoren von <i>Csnk2b</i> <sup>Treg-/-</sup> Mäusen verringert.....	64
Abbildung 25: Die selektive Depletion von Eosinophilen im B16-Melanommodell erhöht das Tumorstadium in <i>Csnk2b</i> <sup>Treg-/-</sup> Mäusen signifikant.....	66
Abbildung 26: Die selektive Depletion von Eosinophilen reduziert die Frequenz an CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in den Tumoren von <i>Csnk2b</i> <sup>Treg-/-</sup> Mäusen.....	67
Abbildung 27: In humanen Melanombiopsien korreliert die Expression von <i>LILRB4</i> mit dem T <sub>H</sub> 2- Marker <i>GATA3</i> , der mit einer höheren Überlebensrate korreliert.....	69
Abbildung 28: In humanen Melanombiopsien korreliert die Expression von <i>LILRB4</i> mit dem humanen Eosinophilmarker <i>SIGLEC8</i> , der mit einer höheren Überlebensrate korreliert.....	70
Abbildung 29: In humanen Melanombiopsien korreliert die Expression von <i>LILRB4</i> mit dem humanen T-Zellmarker <i>CD8A</i> , der mit einer höheren Überlebensrate korreliert. ....	71
Abbildung 30: Die pharmakologische Inhibition der CK2 verringert im B16F10 Melanommodell das Tumorstadium signifikant.....	73
Abbildung 31: Die pharmakologische Inhibition der CK2 erhöht im Tumorgewebe die Frequenz an ILT3 <sup>+</sup> T <sub>reg</sub> -Zellen.....	75
Abbildung 32: Die pharmakologische Inhibition der CK2 vermindert die Expression des Transkriptionsfaktors FOXP3 in T <sub>reg</sub> -Zellen.....	76
Abbildung 33: Die Expression pharmakologisch relevanter Oberflächenproteinen ist auf tumor- infiltrierenden T <sub>reg</sub> -Zellen von <i>Csnk2b</i> <sup>fl/fl</sup> Mäusen signifikant reduziert. ....	78
Abbildung 34: Modell der Typ2-vermittelten anti-tumoralen Immunantwort in <i>Csnk2b</i> <sup>Treg-/-</sup> Mäusen. 82	
Abbildung 35: Zugelassene und experimentelle Immuntherapien zur Manipulation von tumor- infiltrierenden T <sub>reg</sub> -Zellen.....	86
Abbildung 36: Immunantworten vom Typ 2 und deren Einfluss auf den Verlauf von verschiedenen Tumorerkrankungen. ....	100
Abbildung 37: Überlebenszeitanalysen hinsichtlich der <i>LILRB4</i> - und <i>GATA3</i> -Expression in Kolonkarzinomen und niedriggradigen Gliomen.....	102



---

## 10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Evasionsmechanismen von Tumoren.....	7
Tabelle 2: Geräte und Hilfsmittel.....	20
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien.....	21
Tabelle 4: Reagenzien.....	22
Tabelle 5: Verwendete kommerzielle Kits.....	26
Tabelle 6: Antikörper für die Durchflusszytometrie.....	27
Tabelle 7: Genereller PCR-Ansatz für die Typisierung von Versuchstieren.....	31
Tabelle 8: PCR-Programme zur Genotypisierung von Versuchstieren.....	31
Tabelle 9: Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen dem B16F10 Melanommodell und dem humanen malignen Melanom <sup>129</sup> .....	33
Tabelle 10: Initiale Zellzahlen vor RNA-Präparation und RIN-Werte nach RNA-Präparation (NGS Sequencing)	41

## 11 Danksagung

## 12 Curriculum Vitae