

**INAUGURAL – DISSERTATION**

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

vorgelegt 2008

**von Silvia Kimpfler**

geboren in Böblingen

Tag der mündlichen Prüfung: \_\_\_\_\_

**CHARAKTERISIERUNG CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> REGULATORISCHER T-ZELLEN**  
**IM *RET* TRANSGENEN SPONTANMELANOM-MAUSMODELL**  
**UND BEI MELANOMPATIENTEN**

Gutachter: Prof. Dr. Viktor Umansky  
Prof. Dr. Lutz Gissmann

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 01.04.2005 – 30.10.2008 in der Klinischen Kooperationseinheit Dermato-Onkologie des DKFZ Heidelberg und des Klinikum Mannheim in der AG von Professor Viktor Umansky durchgeführt.

Teile dieser Arbeit wurden auf den folgenden Kongressen vorgestellt:

Kimpfler, S., Schadendorf, D. und Umansky, V. 2006. *Charakterisierung phänotypischer und funktioneller Eigenschaften regulatorischer T-Zellen im ret transgenen Spontanmelanom-Mausmodell*; 4th Annual Meeting of the Association for Immunotherapy of Cancer (CIMT), 4. - 5.05.2006, Mainz, Deutschland

Kimpfler, S., Schadendorf, D. und Umansky, V. 2006. *Characterization of phenotypic and functional properties of regulatory T cells in the ret tg mouse model of spontaneous melanoma*; 6th International conference on Progress in Vaccination Against Cancer (PIVAC-6), 27. - 29.09.2006, Granada, Spanien

Kimpfler, S., Schadendorf, D. und Umansky, V. 2007. *Phenotypic and functional properties of regulatory T cells in ret transgenic mice with spontaneous melanoma*; World immune regulation meeting (WIRM), 11. – 14.04.2007, Davos, Schweiz

Kimpfler, S., Ring, S., Schadendorf, D. und Umansky, V. 2008. *Regulatory T cells in the ret transgenic mouse model of sponateous melanoma*. 15. – 16.05.2008, Mainz, Deutschland

Folgendes Manuskript ist in Vorbereitung:

Silvia Kimpfler, Sabine Ring, Christine Falk, Wolfram Osen, Masashi Kato, Karsten Mahnke, Dirk Schadendorf and Viktor Umansky. *CD25 depletion does not cure primary skin melanoma development in ret transgenic mice*.

Dank

An dieser Stelle möchte ich all jenen Menschen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit maßgeblich beigetragen und die mich die letzten dreieinhalb Jahre begleitet haben, allen voran....

Meinem Doktorvater Professor Viktor Umansky für die Bereitstellung des interessanten Themas und seine intensive Betreuung in jeder Phase meiner Arbeit. Durch seine immerwährende Bereitschaft zu wissenschaftlichen Diskussionen habe ich einen tiefen Einblick in die Tumorimmunologie erhalten und nicht zuletzt seiner Begeisterung und seinem Engagement ist es zu verdanken, dass ich meinen beruflichen Weg auf diesem Gebiet fortsetzen werde.

Professor Dirk Schadendorf für die Möglichkeit, in seiner Abteilung zu promovieren, sowie für die tatkräftige Unterstützung meiner Projekte und die vielen nützlichen Diskussionen und Denkanstöße.

Professor Lutz Gissmann für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens.

Meinen lieben Kollegen Kathrin Frank, Hiltrud Schönhaber, Christiane Meyer, Fang Zhao, Oliver Abschütz, Alexandra Sevko und Marcel Ramacher für das meist entspannte Laborklima, reichlich Abwechslung und so manche Hilfestellung.

Dr. Wolfram Osen für seine Hilfsbereitschaft in Rat und Tat und für den Platz in seiner Hütte.

Dr. Sabine Ring und Dr. Benedikt Fritzsching für die angenehme Kollaboration, das vermittelte Wissen und „know-how“ und nützliche Schreibtips.

PD Dr. Chris Falk für die Bereitstellung des Array readers und die kompetente Anleitung bei der Durchführung der Multiplex Assays.

Allen „Mannheimern“ und „Heidelbergern“ aus der Abteilung Dermato-Onkologie, die mir immer das Gefühl gaben, in ihren Labors, Büroräumen und Kaffeeküchen willkommen zu sein und die es mir leicht gemacht haben, mich bei ihnen wohl zu fühlen.

Meiner Familie und Sebastian für ihre vorbehaltlose Liebe und Unterstützung, ihr Vertrauen in mich und für das Ertragen meiner Launen.

<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>3</b>
<b>I. EINLEITUNG</b> .....	<b>5</b>
I.1 Das adaptive Immunsystem .....	5
I.1.1 Antigenpräsentierende Zellen .....	5
I.1.2 Dendritische Zellen.....	6
I.1.3 T-Zellen .....	6
I.1.4 Gedächtnis-T-Zellen.....	7
I.1.5 Zentrale und periphere T-Zell-Toleranz.....	9
I.2 Regulatorische T-Zellen .....	10
I.2.1 Subpopulationen regulatorischer T-Zellen .....	10
I.2.2 Phänotypische Charakterisierung regulatorischer T-Zellen .....	11
I.2.3 Mechanismen der Immunsuppression durch Treg .....	12
I.2.3.1 Immunsuppression durch Zell-Zell-Kontakt.....	13
I.2.3.2 Sekretion von inhibitorischen Cytokinen .....	14
I.2.3.3 Treg und Autoimmunität .....	14
I.2.3.4 Treg und Tumorummunologie .....	15
I.3 Das maligne Melanom.....	16
I.3.1 Die Entstehung des malignen Melanoms.....	16
I.3.2 Therapiemöglichkeiten für das maligne Melanom.....	17
I.3.2.1 Chirurgischer Eingriff .....	17
I.3.2.2 Chemotherapie .....	17
I.3.2.2 Apoptose induzierende Wirkstoffe .....	18
I.3.2.3 Signalwege und Inhibitoren der Signaltransduktion.....	18
I.3.2.4 Proteasom-Inhibitoren .....	19
I.3.3 Immuntherapie des malignen Melanoms .....	20
I.3.3.1 Krebsimpfstoffe.....	20
I.3.3.2 Antigenpräsentation mit dendritischen Zellen.....	20
I.3.3.3 Monoklonale Antikörper gegen CTLA-4 .....	22
I.3.3.4 Inhibition regulatorischer T-Zellen .....	22
I.4 Das <i>ret</i> transgene Spontanmelanom-Mausmodel .....	23

## Inhalt

I.5	Zielsetzung .....	24
<b>II.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>26</b>
II.1	Chemikalien.....	26
II.2	Antikörper .....	27
II.2.1	Antikörper gegen Mausantigene .....	27
II.2.2	Antikörper für die T-Zell-Stimulation .....	27
II.2.3	Antikörper gegen humane Antigene.....	28
II.3	Geräte .....	28
II.4	Allgemeine Verbrauchsmaterialien.....	29
II.5	Kits .....	30
II.6	Puffer und Medien .....	30
II.7	Mäuse.....	32
II.8	Methoden .....	32
II.8.1	Typisierung von <i>ret</i> tg Mäusen .....	32
II.8.2	Gelelektrophorese .....	34
II.8.3	Präparation der lymphatischen Organe und der Tumoren aus <i>ret</i> tg Mäusen .....	34
II.8.4	Herstellen einer Einzelzellsuspension.....	34
II.8.4.1	Milz.....	34
II.8.4.2	Lymphknoten.....	35
II.8.4.3	Knochenmark .....	35
II.8.4.4	Blut .....	35
II.8.4.5	Tumor .....	35
II.8.5	Isolierung humaner Peripherer Blut Lymphozyten aus Vollblut.....	36
II.8.6	Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus humanem Tumorgewebe .....	36
II.8.7	Aufreinigung des CD25 spezifischen Antikörpers .....	36
II.8.8	Aufreinigung CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> regulatorischer T-Zellen mittels magnetischer Zellsortierung (MACS).....	37

## Inhalt

II.8.9	Aufreinigung CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Treg aus Primärtumoren <i>ret</i> transgener Mäuse mit dem Zellsortierer .....	38
II.8.10	Färbung mit 5-Carboxyfluorescein-Succinimidylester (CFSE) .....	38
II.8.11	Kultivierung von CD4 <sup>+</sup> Effektor T-Zellen mit CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Treg .....	39
II.8.12	<sup>3</sup> H Thymidin Inkorporationsassay .....	39
II.8.13	Stimulation mit löslichem anti-CD3-Antikörper und bestrahlten „Feederzellen“ ...	39
II.8.14	Durchflusszytometrie .....	40
II.8.15	Intranukleare Färbung von Foxp3 .....	40
II.8.16	Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) .....	41
II.8.17	„Multiplex protein array assay“ zur Zytokinbestimmung .....	42
II.8.18	Immunhistochemie an Paraffinschnitten .....	43
II.8.19	Statistik .....	43
<b>III.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>44</b>
III.1	Genotypisierung <i>Ret</i> transgener Mäuse mittels PCR und phänotypische Charakterisierung .....	44
III.2	Nachweis von CD4 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen in Primärtumoren von <i>ret</i> tg Mäusen.....	45
III.3	Vorkommen von Treg in Primärtumoren von <i>ret</i> tg Mäusen .....	45
III.4	Analyse des lokalen Zytokinmilieus von Primärmelanomen in <i>ret</i> tg Mäusen.....	48
III.6	Vorkommen regulatorischer T-Zellen in lymphatischen Organen von <i>ret</i> transgenen Mäusen.....	51
III.7	Inhibitorische Aktivität regulatorischer T-Zellen von <i>ret</i> transgenen Mäusen.....	54
III.8	Depletion CD25 <sup>+</sup> Zellen mit anti-CD25 Antikörpern.....	59
III.10	Verteilung regulatorischer T-Zellen im peripheren Blut von Melanompatienten...	64
III.11	Infiltration von Melanom-Metastasen durch Treg .....	70
III.12	Vorkommen von Treg im peripheren Blut von Melanompatienten vor und nach Therapie .....	71
III.13	Melan-A-spezifische Treg im peripheren Blut von Melanompatienten vor und Therapie .....	74

<b>IV.</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>80</b>
IV.1	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> Treg in <i>ret</i> transgenen Mäusen.....	80
IV.2	Inhibitorische Kapazität von Treg aus <i>ret</i> transgenen Mäusen .....	82
IV.3	Die Depletion CD25 <sup>+</sup> Zellen durch die Administration von anti-CD25-Antikörpern resultierte in einem schwachen antitumor-Effekt im <i>ret</i> transgenen Mäusen.....	83
IV.4	Vorkommen von Treg im peripheren Blut von Melanompatienten vor und nach DC-Vakzinierung und Therapie mit IFN- $\alpha$ .....	86
<b>V.</b>	<b>ABKÜRZUNGEN</b> .....	<b>90</b>
<b>VI.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>93</b>

## ZUSAMMENFASSUNG

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen (Treg) sind essentiell für die Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz und das Vermeiden von Autoimmunerkrankungen. Sie entwickeln sich aus hämatopoetischen Vorläuferzellen im Thymus und stellen 5-10% aller CD4<sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut gesunder Individuen. Charakteristisch für Treg ist die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle, darunter die  $\alpha$ -Kette des Interleukin-2-Rezeptors (CD25), das cytotoxische Lymphozyten-Antigen 4, der „glucocorticoid-induced TNF receptor“ und CD4. In den letzten Jahren wurde außerdem der Transkriptionsfaktor Foxp3 als ausschlaggebend für die Entwicklung und Funktion von Treg und damit als eindeutigster Marker für diese Zellen identifiziert. Treg sind in der Lage, Immunantworten von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen gegen Tumore zu inhibieren. Diese Eigenschaft führte zur extensiven Erforschung der dieser inhibitorischen Funktion zugrunde liegenden Mechanismen und der Entwicklung immuntherapeutischer Behandlungsstrategien bei Tumorerkrankungen. Allerdings konnten bislang nur kleine Erfolge verzeichnet werden.

Das maligne Melanom ist eine sehr progressive und schnell metastasierende Tumormform. Es zeichnet sich zudem durch sein schlechtes Ansprechen auf herkömmliche Behandlungsformen wie Bestrahlung und Chemotherapie und seine hohe Immunogenität aus, weshalb die Entwicklung wirksamerer Therapieansätze derzeit im Fokus der Melanomforschung steht.

In der vorliegenden Arbeit wurde im *ret* transgenen Spontanmelanom-Mausmodelles die Verteilung natürlich vorkommender Treg in den lymphatischen Organen und den Primärtumoren der Mäuse, die humanen Melanomen hinsichtlich der Expression von Melanom assoziierten Antigenen, sowie ihrer Immunogenität und Entwicklung ähnlich sind, charakterisiert. Mit Hilfe durchflusszytometrischer Untersuchungen wurde ein signifikanter Anstieg der Treg-Population in Primärmelanomen von *ret* transgenen Mäusen in frühen Krankheitsstadien im Vergleich zu späteren festgestellt. Diese Veränderung korrelierte invers mit Beobachtungen im Knochenmark derselben Tiere. Diese Ergebnisse legten den Schluss nahe, dass Treg aus dem Knochenmark in den Tumor migrieren können. In einem *in vitro* Proliferationsassay mit autologen CD4<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen wurde gezeigt, dass Treg von tumortragenden Tieren dasselbe inhibitorische Potenzial besitzen, wie Treg von C57BL/6 Wildtyp-Mäusen oder *ret* transgenen tumorfreien Tieren, was eine Funktion der Treg bei der Tumorentstehung in diesem Mausmodell nahelegte. Die Depletion der Treg durch Administration eines anti-CD25-Antikörpers beeinflusste jedoch weder die Tumorentstehung noch den Krankheitsverlauf oder den Allgemeinzustand der behandelten Tiere im Vergleich

zu einer Kontrollgruppe. Zudem wurde gezeigt, dass durch die intraperitoneale Injektion des Antikörpers zwar eine totale Depletion des CD25<sup>+</sup> T-Zellkompartiments im Blut und in den lymphatischen Organen, nicht jedoch im Tumor erreicht werden konnte.

Um einen Überblick über die Verteilung von Treg im peripheren Blut von Melanompatienten zu bekommen, wurden periphere Blutlymphozyten von Patienten, die entweder mit autologen, peptidbeladenen dendritischen Zellen (DC) vakziniert, oder systemisch mit Interferon (IFN)- $\alpha$  behandelt worden waren, aus dem Zeitraum vor und nach Therapie hinsichtlich der Treg-Anzahl durchflusszytometrisch untersucht. Bei den männlichen Patienten beider Therapiegruppen zeigte sich nach Therapie mit DC oder IFN- $\alpha$  eine tendenzielle Zunahme der Treg im peripheren Blut, im Vergleich zu einer Gruppe gesunder Spender im gleichen Alter aber keine signifikante Veränderung. Bei den weiblichen Patienten sank der Anteil der Treg an der CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation nach Behandlung mit DC etwas ab, blieb jedoch vergleichbar mit einer Gruppe gesunder Altersgenossinnen. Bei der Untersuchung einiger ausgewählter Patienten hinsichtlich des Vorkommens tumorantigen-spezifischer Treg und CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde zudem festgestellt, dass die Therapie mit IFN- $\alpha$ , im Gegensatz zur Vakzinierung mit autologen peptidbeladenen DC einen tendenziellen Anstieg der Anzahl spezifischer Treg und CD4<sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut zur Folge hatte.

Diese Daten zeigen, dass quantitative Veränderungen innerhalb der Treg Population während der Tumorprogression sowohl beim *ret* transgenen Spontanmelanom-Mausmodell, als auch beim malignen Melanom auftreten, und dass Treg bei der Tumorentwicklung möglicherweise eine Rolle spielen.

## SUMMARY

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells play a crucial role in the maintenance of self-tolerance as well as in the prevention of autoimmune diseases. They develop from hematopoietic precursor cells in the thymus and reconstitute 5-10% of the peripheral CD4<sup>+</sup> T cell subset in healthy individuals. Treg are characterized by the constitutive expression of several surface markers such as the cytotoxic T lymphocyte antigen 4, the glucocorticoid-induced protein of the TNF receptor family, the Interleukin-2 receptor- $\alpha$  chain (CD25) and CD4. However, none of these markers is exclusively expressed on Treg but also on activated CD4<sup>+</sup> effector T cells. During the last decade, a transcription factor of the forkhead/winged helix family, Foxp3, has been shown to play an essential role in the development and function of naturally occurring Treg. Treg can suppress CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T cell mediated immune responses against tumors. This feature of Treg led to the extensive examination of the molecular mechanisms of the inhibitory function and the development of several immunotherapeutic strategies for the treatment of various cancers. However, none of these immunotherapeutic approaches resulted so far in significant clinical effects.

Malignant melanoma is a rapidly progressing tumor, which is characterized by its poor response to conventional therapies like radiation and chemotherapy. In addition, it is highly immunogenic. Therefore, the development of immunotherapeutic strategies for the treatment of malignant melanoma is of particular interest.

In the present work, the distribution of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in lymphatic organs and tumor tissue has been characterized using a *ret* transgenic mouse model of spontaneous melanoma. This model resembles the situation in human melanoma with respect to the tumor development, immunogenicity and the expression of melanoma associated antigens. Tumors in early stages of development showed significantly increased levels of infiltrating Treg compared to tumors in later stages. This change inversely correlated with the situation in the bone marrow of the same mice, suggesting that Treg could migrate from the bone marrow into the tumor site. The inhibitory capacity of Treg from *ret* transgenic tumor bearing mice was examined in an *in vitro* proliferation assay with autologous conventional CD4<sup>+</sup> T cells as responders in comparison to Treg from *ret* transgenic tumor free mice or non-transgenic littermates. It was shown, that the inhibitory function of Treg from *ret* transgenic tumor bearing mice was not altered. However, the depletion of CD25<sup>+</sup> cells with anti-CD25 antibodies did not significantly influence the tumor development in the treated mice. We found that administration of these antibodies intraperitoneally led to total depletion

## Summary

of CD25<sup>+</sup> cells in the blood and lymphoid organs, but not in the tumor site. This finding can partly explain a weak anti-tumor effect of anti-CD25 antibodies.

Next, we studied, whether changes in Treg numbers could also be observed in the peripheral blood of melanoma patients, who received either vaccination with autologous dendritic cells (DC) pulsed with melanoma specific peptides or systemic therapy with Interferon (IFN)- $\alpha$ . In male patients of both groups, Treg numbers slightly increased after the therapy. No significant changes were observed compared to an age matched group of healthy individuals. In female patients, Treg numbers in peripheral blood remained constant before and after the therapy with DC, as well as with IFN- $\alpha$ . Women, who were treated with IFN- $\alpha$ , showed significantly lower numbers of Treg as compared to an age matched group of healthy individuals. Individual patients expressing HLA-DQ6 were also examined for the incidence of MelanA specific Treg in the peripheral blood before and after therapy. With HLA-DQ6/MelanA (25-36) tetramers, we observed that therapy with autologous DC, in contrast to IFN- $\alpha$ , led to the decrease in numbers of Treg and CD4<sup>+</sup> T cells in the peripheral blood of these melanoma patients.

Taken together, our data provide evidence of Treg alterations in melanoma progression in the *ret* transgenic mouse model and in melanoma patients and suggest a role of Treg in melanoma progression.

## **I. EINLEITUNG**

Die Haut ist das größte und vielseitigste Organ der Säugetiere. Ähnlich wie eine Hülle umgibt sie den Körper und schützt so den Organismus vor dem Eindringen von Pathogenen. Aber die Haut an sich kann auch befallen werden oder sich krankhaft verändern und Tumore bilden. Der entstandene Hautkrebs wird dabei in maligne und nicht-maligne Formen unterteilt. Zur nicht-maligen Form des Hautkrebses, dem weißen Hautkrebs, zählen das Basalzellkarzinom und das Squamozellkarzinom. Diese beiden Tumorarten treten am häufigsten auf und zeichnen sich durch geringe Metastasenbildung aus. Die maligne Form, auch schwarzer Hautkrebs oder malignes Melanom genannt, ist dagegen eine der aggressivsten Tumorformen überhaupt. Charakteristisch für das maligne Melanom sind frühe und rasche Metastasenbildung in anderen Organen und sein schlechtes Ansprechen auf übliche Behandlungsformen wie Chemotherapie oder Bestrahlung. Außerdem zeichnet sich das maligne Melanom im Vergleich zu anderen Tumorarten durch hohe Immunogenität aus, was die Entwicklung und Anwendung von immuntherapeutischen Strategien nahelegt.

### **I.1 Das adaptive Immunsystem**

Die zwei Hauptkomponenten des adaptiven Immunsystems sind B- und T-Zellen. B-Zellen stellen einen Teil der humoralen Immunantwort, die auf die Erkennung und Eliminierung extrazellulärer Pathogene spezialisiert ist.

T-Zellen hingegen generieren zellkontaktabhängige Immunantworten, die intrazelluläre Pathogene bekämpfen. Die Reifung der B-Zellen findet im Knochenmark statt und endet in der Ausbildung eines Antigenbindungsrezeptors auf der Zelloberfläche, dem sogenannten B-Zellrezeptor (BCR), der aus einem membrangebundenen Antikörper besteht. Nach einer Begegnung mit dem spezifischen Antigen differenzieren B-Zellen zu Gedächtnis- und Effektorzellen, sogenannten Plasmazellen. Diese sekretieren Antikörper in löslicher Form.

#### **I.1.1 Antigenpräsentierende Zellen**

Zu den professionellen antigenpräsentierenden Zellen zählen Makrophagen, B-Lymphozyten und dendritische Zellen (DC). Sie werden nach Kontakt mit einem Pathogen oder durch inflammatorische Zytokine aktiviert und wandern in die T-Zell-Areale der regionalen Lymphknoten ein (1).

Makrophagen und B-Zellen exprimieren kostimulatorische Moleküle nicht konstitutiv. Erst nach Aktivierung kommt es zu einer Hochregulation der betreffenden Moleküle. Einzig DC exprimieren bereits im unreifen Zustand kostimulatorische Moleküle konstitutiv, wenn auch in geringen Mengen (2).

### **I.1.2 Dendritische Zellen**

Die Vorläuferzellen für DC stellen eine kleine Population CD34<sup>+</sup> hämatopoetische Vorläuferzellen im Knochenmark oder im peripheren Blut. GM-CSF und Tumornekrosefaktor (TNF) können diese Vorläuferzellen zur Differenzierung zu immunogenen DC stimulieren (3). Dieser Prozess kann durch verschiedene Zytokine, wie zum Beispiel dem Liganden für die „FMS-related tyrosine kinase“ (Flt-3), dem Stammzellfaktor (SCF), dem Tumorstromungsfaktor (TGF)- $\beta$ , IL-3, IL-4, und IL-13 beschleunigt oder anderweitig moduliert werden. Trotzdem ist TNF das für die Reifung von DC ausschlaggebende Signal (4). DC liegen in nahezu allen Körperregionen vor, nehmen Antigene auf, prozessieren und präsentieren sie auf ihrer Zelloberfläche als Peptid-Haupthistokompatibilitätskomplex (Peptid-MHC-) Komplex. Die so aktivierten DC durchlaufen einen Reifungsprozess, der zur Expression kostimulatorischer Moleküle auf ihrer Zelloberfläche führt. Zeitgleich migrieren sie in lymphatische Organe wie die Milz und T-Zell-Regionen lokaler Lymphknoten, um mit antigenspezifischen naiven T-Zellen in Kontakt zu kommen (5).

### **I.1.3 T-Zellen**

T-Zellen entstehen ebenfalls im Knochenmark, migrieren aber für ihre Reifung sofort in den Thymus. Während dieser Reifung exprimieren T-Zellen einen einheitlichen Antigenbindungsrezeptor auf ihrer Zelloberfläche, den T-Zellrezeptor (TCR). Sowohl der BCR als auch der TCR sind Ergebnis somatischer Genmutationen während der Reifung. Die Gene, die diese Rezeptoren kodieren, werden aus verschiedenen variablen und konstanten Fragmenten zusammengesetzt. Dieser Prozess wird als somatische Rekombination bezeichnet und führt zu einem breit gefächerten Repertoire an TCR- und BCR-Spezifitäten. Im Gegensatz zum BCR kann der TCR nur Antigene erkennen, die von einer APC über einen Peptid-MHC-Komplex präsentiert werden. Treffen naive T-Zellen in der Peripherie auf ihr spezifisches Antigen, werden sie aktiviert und beginnen, Effektorfunktionen auszuüben. Diese sind ihnen zum Teil schon genetisch vorgeschrieben. Anhand der Membranglykoproteine CD4 und CD8 können T-Zellen in zwei Klassen unterteilt werden. CD8<sup>+</sup> T-Zellen erkennen Antigene als Peptid-MHC Klasse I-Komplexe, die von mit intrazellulären Pathogenen befallenen Zellen präsentiert werden. Nach Aktivierung produzieren sie zytotoxische Moleküle wie Perforin und Granzym B und lysieren ihre Zielzellen direkt, weshalb sie auch zytotoxische T-Zellen (CTL) genannt werden. CD4<sup>+</sup> T-Zellen erkennen Antigene im Zusammenhang mit MHC Klasse II Molekülen und spielen sowohl bei der humoralen als auch bei der zellulären Immunantwort eine zentrale Rolle. Erkennt eine CD4<sup>+</sup> T-Zelle einen Peptid-MHC Klasse II Komplex, wird sie aktiviert und sekretiert Zytokine, die wiederum andere Immunzellen wie zum Beispiel B-Zellen, CD8<sup>+</sup> T-

Zellen oder Makrophagen aktivieren. Deshalb werden  $CD4^+$  T-Zellen auch Helfer-T-Zellen (Th) genannt. Dabei entscheidet das lokale Zytokin-Milieu, ob die Zellen zu Th1, Th2, Th17 oder Treg differenzieren. Klassischerweise differenzieren  $CD4^+$  T-Zellen entweder zu Th1- oder Th2-Zellen, wie von Mosmann et al. 1986 festgelegt wurde (6). Später wurde bekannt, dass Th1-Zellen unter Einfluss von IL-2 Interferon (IFN)- $\gamma$ , TNF- $\beta$  und IL-2 produzieren, und somit sowohl B-Zellen zur Produktion von Antikörpern anregen, als auch Makrophagen aktivieren können. Th2-Zellen produzieren IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 und IL-13, sofern in der Umgebung IL-4 vorliegt und liefern so optimale Hilfestellung für die Entwicklung einer humoralen Immunantwort (7, 8).

2003 entdeckte eine Gruppe amerikanischer Forscher, dass naive  $CD4^+$  T-Zellen unter Einfluss von IL-23 zu einem weiteren Th-Zelltyp differenzieren konnte, der das inflammatorische Zytokin IL-17 produziert (9). Seitdem wurden in zahlreichen Studien Differenzierungsmechanismen für diesen neuen Zelltyp vorgeschlagen. Als wichtigste Faktoren für die Differenzierung in Th17-Zellen wurden zusätzlich zu IL-23 die Zytokine IL-6 und TGF- $\beta$  identifiziert (10). Unerlässlich für die Differenzierung von Th17-Zellen ist die Expression des Transkriptionsfaktors ROR $\gamma$ t, ein „retinoid orphan nuclear receptor“ (11), was Versuche mit *Rorc*-defizienten Mäusen belegten. Die Effektorfunktionen von Th17-Zellen werden derzeit heftig diskutiert. Sie scheinen sowohl bei der Abwehr von extrazellulären Pathogenen (12-14), als auch bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen eine wichtige Rolle zu spielen, wie zahlreiche Studien an Multipler Sklerose (15, 16), psoriatischer Arthritis (17), entzündlicher Colitis (18) bei Menschen und experimenteller Autoimmun-Encephalomyelitis (EAE) bei Mäusen (19), zeigten.

Das immunologische Gedächtnis ist eine Besonderheit des adaptiven Immunsystems, da es sich Pathogene nach dem ersten Kontakt unwiderruflich einprägt. Folglich führt ein erneuter Kontakt mit dem gleichen Pathogen zu einer stärkeren Immunantwort, was eine Infektion meist verhindert oder zumindest den klinischen Verlauf mildert. Sowohl die zelluläre als auch die humorale Immunantwort verfügen über dieses Gedächtnis und führen unterschiedliche Funktionen aus.

### **I.1.4 Gedächtnis-T-Zellen**

Die Termination einer Immunantwort nach vollständiger Beseitigung des Erregers macht durchaus Sinn, da eine Fortführung der T-Zell-Effektorfunktionen zu Schädigungen des gesunden Gewebes führen kann. Deshalb entwickeln sich zum dauerhaften Schutz des Organismus vor Pathogenen Gedächtnis-T-Zellen.  $CD8^+$  Gedächtnis-T-Zellen sind strategisch günstig in der Mukosa, dem Eintrittsort vieler Pathogene, lokalisiert und können

beim Kontakt mit dem Antigen sehr schnell Effektorfunktionen ausüben. Die Beschleunigung der Immunantwort beruht dabei auf quantitativen und qualitativen Veränderungen der Antigen-spezifischen T-Zellen (20). So ist beispielsweise die Frequenz Antigen-spezifischer T-Zellen in einem immunen Organismus hundert- bis tausendfach erhöht (21).

Wie sich Gedächtnis-T-Zellen entwickeln, aus welchen zellulären Vorläufern sie entstehen und welche Faktoren nötig sind, um zu entscheiden, ob eine Zelle stirbt oder sich zu einer Gedächtniszelle entwickelt, wird derzeit diskutiert. Es haben sich verschiedene Modelle für die Differenzierung von Gedächtniszellen durchgesetzt. Ein Modell beruht auf der Expression der kostimulatorischen Moleküle CD27 und CD28, der  $\alpha$ -Untereinheit des funktionellen Lymphozyten-Antigens (LFA)-1 und der verschiedenen Isoformen von CD45. T-Zellen werden anhand der individuellen Oberflächenexpression dieser Moleküle in naive, Effektor- oder Gedächtnis-T-Zellen eingeteilt (22).

Auf naiven  $CD4^+$  T-Zellen wird eine hochmolekulare Isoform von CD45, CD45RA, exprimiert. Nach Aktivierung teilen sich naive  $CD4^+$  T-Zellen und beginnen, eine niedermolekulare Isoform, CD45RO, zu exprimieren.  $CD45RO^+ CD4^+$  T-Zellen beginnen als Antwort auf einen erneuten Antigenkontakt sehr rasch, sich zu teilen (23). Die Aufgabe von LFA-1 bei der T-Zellaktivierung besteht darin, nach der Stimulation durch eine APC an das Intrazelluläre Adhäsionsmolekül (ICAM)-1 zu binden, um den spezifischen Zell-Zell-Kontakt zu festigen. Deshalb wird LFA-1 auf naiven T-Zellen nur wenig exprimiert, nach einer Aktivierung jedoch hochreguliert. Schließlich werden Gedächtniszellen durch den Verlust von CD27 bei  $CD4^+$  (24) und CD28 bei  $CD8^+$  (25) T-Zellen geprägt.

Ein zweites Modell zur Einteilung der T-Zellen in naive und Gedächtniszellen basiert auf der Expression von L-Selektin (CD62L) vorwiegend auf naiven T-Zellen und Chemokinrezeptor 7 (CCR7). CD62L ist ein wichtiger Faktor beim sogenannten „homing“ der T-Zellen, der Wanderung aus dem Blutstrom zu den Lymphknoten, da es die Zellen durch Wechselwirkungen mit vaskulären Adressinen durch die Venolen mit hohem Endothel (HEVs) leitet. Aufgrund der Expression dieser Oberflächenmoleküle konnten Gedächtniszellen in verschiedenen Subpopulationen eingeteilt werden. Naive  $CD4^+$  T-Zellen exprimieren CD45RA, CCR7 und CD62L. Nach Antigenstimulation differenzieren sie zu  $CD45RA^-$  Gedächtniszellen.  $CD45RA^- CCR7^- CD4^+$  T-Zellen findet man im Blut, in der Milz und in nicht-lymphatischen Geweben. Sie produzieren als Antwort auf eine erneute Stimulation sehr rasch Zytokine und werden deshalb als Effektor-Gedächtniszellen bezeichnet.  $CD45RA^- CCR7^+ CD4^+$  T-Zellen zirkulieren durch Blut, Lymphknoten und Milz, halten sich aber nicht im nicht-lymphatischen Gewebe auf. Nach erneuter Stimulation produzieren sie weniger Zytokine als die Effektor-Gedächtniszellen. Diese Zellen werden als

zentrale Gedächtniszellen bezeichnet und es wurde postuliert, dass sie nach Stimulation die Expression von CCR7 stoppen und zu Effektor-Gedächtniszellen werden (26).

### **I.1.5 Zentrale und periphere T-Zell-Toleranz**

Das zufällige Rearrangement der variablen Ketten des TCR führt zu einem riesigen Repertoire an Antigenespezifitäten. Diese Vielfalt birgt auch das Risiko der Selbsterkennung. So können zum Beispiel einige TCR auch lösliche Antigene, Selbstantigene oder Antigene, die von körperfremden MHC-Molekülen präsentiert werden, erkennen.

Die positive Selektion ist ein Mechanismus, der schon im Thymus sicherstellt, dass TCR auf der Zelloberfläche von reifen DC nur Antigene erkennen, die von körpereigenen MHC-Molekülen präsentiert werden. T-Zellen, die dazu nicht in der Lage sind, werden durch programmierten Zelltod (Apoptose) eliminiert. In einem zweiten Schritt werden T-Zellen eliminiert, die einen hochaffinen TCR für Selbstantigene tragen. Diese sogenannte negative Selektion führt zur Eliminierung von circa 98% aller T-Zellen im Thymus und sichert die Entwicklung von reifen T-Zellen, die ausschließlich körpereigene MHC-Moleküle erkennen und selbst-tolerant sind.

B-Zellvorläufer durchlaufen im Knochenmark einen ähnlichen Prozess. Diese Kontrolle auf Autoreaktivität wird auch zentrale Toleranz genannt. Eine Voraussetzung für zentrale Toleranz ist die Präsentation von Autoantigenen im Thymus. Obwohl viele gewebespezifische Antigene im Thymus zumindest auf mRNA Ebene exprimiert werden ist unklar, ob sie in für eine T-Zelldeletion ausreichendem Maße als Proteine vorliegen. Tatsächlich wurden in gesunden Individuen im peripheren Blut autoreaktive T-Zellen mit TCR niedriger Affinität nachgewiesen. Verschieden Mechanismen schützen den Organismus vor solchen autoreaktiven T-Zellklonen. In der Peripherie kann die Erkennung eines Peptid-MHC Komplex auf einer APC entweder zur Aktivierung und klonalen Expansion einer T-Zelle führen, oder zu einem Stadium der Inaktivität, das auch Anergie genannt wird und, im Gegensatz zur zentralen Toleranz, nicht zur Apoptose führt. Ob eine T-Zelle durch den Kontakt mit einem Peptid-MHC Komplex aktiviert oder anergisch wird, hängt von der Anwesenheit notwendiger kostimulatorischer Signale, wie zum Beispiel die Interaktion von CD28 und B7.1 und B7.2 ab.

DC agieren in diesen Prozessen als APC, indem sie Immunität und Toleranz regulieren. Tatsächlich wurde gezeigt, dass unreife DC T-Zellantworten inhibieren, weshalb sie auch tolerogene DC genannt werden (27). Diesen Mechanismus zur Sicherung der Selbsttoleranz in der Peripherie bezeichnet man als periphere Toleranz (28). Zusätzlich zu klonaler Deletion und Anergie, durch die selbstreaktive Lymphozyten entweder eliminiert oder inaktiviert

werden, induzieren andere Mechanismen T-Zell-Ignoranz gegenüber Selbstantigenen. Diese Ignoranz tritt auf, wenn das Antigen entweder an Stellen exprimiert wird, die T-Zellen nicht zugänglich sind, oder wenn die Menge an Antigen nicht ausreicht, um eine T-Zellantwort auszulösen.

## **I.2 Regulatorische T-Zellen**

Vor nahezu einem halben Jahrhundert wurde ein weiterer Typ von Effektor-T-Zellen entdeckt, der eine immunsuppressive Funktion ausübt (29). Dies wurde in zahlreichen Versuchen belegt, in denen durch neonatale Thymektomie bei Mäusen schwere Autoimmunreaktionen ausgelöst wurden (30-33). Weitere Studien belegten die Existenz einer Population selbstreaktiver CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen, die für die Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz und die Vermeidung von Autoimmunerkrankungen notwendig sind (34, 35).

### **I.2.1 Subpopulationen regulatorischer T-Zellen**

Natürlich vorkommende nTreg stellen 5-10% aller CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Peripherie und besitzen die Fähigkeit, die Differenzierung von naiven T-Zellen zu Th1, Th2 oder Th17-Zellen und deren Effektorfunktionen zu unterdrücken. Durch diese Eigenschaft sind sie maßgeblich an der Erhaltung der Selbsttoleranz beteiligt (36). nTreg bewahren den Organismus vor Autoimmunerkrankungen (37, 38), Allergien (39) und sind in der Lage, Transplantat-abstoßungen zu vermeiden (35). Weniger von Vorteil für den Organismus ist die Fähigkeit von nTreg, durch ihre immunsuppressive Funktion schützende Immunantworten gegen Infektionen und Tumore zu unterdrücken (40, 41).

nTreg verlassen den Thymus als eine funktionell aktive und differenzierte T-Zellpopulation (42, 43). Sie sind schon auf ihre immunsuppressive Funktion spezialisiert, bevor sie mit einem spezifischen Antigen in Kontakt kommen. Das unterscheidet nTreg von anderen Treg-Typen, wie zum Beispiel Tr1- und Th3-Zellen, welche sich unter bestimmten Umständen in der Peripherie aus naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen entwickeln. Diese Treg werden im Gegensatz zu den nTreg als induzierte Treg (iTreg) bezeichnet (44, 45). Tr1-Zellen entwickeln sich in der Peripherie in Gegenwart von IL-10 aus naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen (46). Nach Aktivierung sind sie hypoproliferativ und sekretieren hohe Mengen der immunsupprimierenden Zytokine IL-10 und TGF- $\beta$ , jedoch wenig IL-2 und IL-4, was eine Th2-Antwort begünstigen würde. *In vitro* sind durch IL-10 erzeugte Tr1-Zellen in der Lage, naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu inhibieren (47). Allerdings kann IL-10 nur in Gegenwart von DC die Entstehung von Tr1-Zellen induzieren (48). Offen bleibt die Frage, ob IL-10 und DC auch unter physiologischen Bedingungen die kritischen Faktoren für die Entstehung von Tr1-Zellen sind. Die Bindung von IL-10 an seinen

Rezeptor, der aus den Untereinheiten IL-10R $\alpha$  und IL-10R $\beta$  besteht, führt zur Phosphorylierung und Aktivierung der Rezeptor-Tyrosinkinasen der Familie der Janus-Kinasen JAK1 und Tyk2, die wiederum die „Signal Transducers and Activators of Transcription“ (STAT) 1 $\alpha$  und 3 in T-Zellen und Makrophagen aktivieren (49). Dies führt letztlich zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren „nuclear factor  $\kappa$  B“ (NF $\kappa$ B) und „activator protein 1“ (AP-1) und ist unerlässlich für die anti-inflammatorische Funktion von IL-10 (50, 51).

Th3-Zellen sorgen in der Mukosa für orale Toleranz gegenüber harmlosen Antigenen aus der Nahrung oder Bakterien der Darmflora (52). Werden sie aktiviert, produzieren sie große Mengen von TGF- $\beta$ . Dieses anti-inflammatorische Zytokin übernimmt schon bei der T-Zell-Differenzierung regulatorische Funktionen (53). So verstärkt TGF- $\beta$  beispielsweise die Proliferation von CD8 $^+$  T-Zellen (54) oder treibt die Produktion von TNF- $\alpha$  durch CD4 $^+$  und CD8 $^+$  T-Zellen an (55). Einige Studien zeigten, dass TGF- $\beta$  T-Zellen in Apoptose treiben kann (56, 57), während andere die anti-apoptotische Wirkung von TGF- $\beta$  belegten (58, 59). Unabhängig davon wurde schon 1994 gezeigt, dass TGF- $\beta$  für die *in vitro* Inhibition von CD8 $^+$  T-Zellen notwendig ist (60). Später belegten weitere Studien, dass TGF- $\beta$  bei der Generierung induzierter Treg eine zentrale Rolle spielt (44, 61). Außerdem ist TGF- $\beta$  verantwortlich für die immunsuppressorische Wirkung von Th3-Zellen.

Im Gegensatz zu nTreg führen iTreg ihre suppressorische Funktion nicht zell-zell-kontakt-abhängig, sondern durch die Sekretion inhibitorischer Zytokine aus.

### **I.2.2 Phänotypische Charakterisierung regulatorischer T-Zellen**

Treg zeichnen sich durch die Expression verschiedener Membranproteine aus, die normalerweise auf der Zelloberfläche aktivierter T-Zellen exprimiert werden. Dazu gehören die  $\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptors (CD25), GITR und CTLA-4 (CD152). Der eindeutigste Marker für Treg ist bislang der Transkriptionsfaktor Foxp3, der in Mäusen ausschließlich von Treg exprimiert wird und deren Entwicklung und Funktion kontrolliert (62, 63). Im humanen System ist die Expression von Foxp3 nicht nur auf CD4 $^+$  Treg beschränkt. Einige Studien haben gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor auch von aktivierten CD4 $^+$  Effektor-T-Zellen exprimiert werden kann, allerdings auf einem viel niedrigeren Niveau (64-67).

Wird murines Foxp3 retroviral in CD4 $^+$ CD25 $^-$  T-Zellen transduziert, entstehen T-Zellen, die nTreg funktionell und phänotypisch sehr ähnlich sind. Interessanterweise führt die Überexpression von Foxp3 in humanen CD4 $^+$  T-Zellen nicht zur Ausprägung immunsuppressiver Aktivität *in vitro* (68). Diese Beobachtung legt den Schluss nahe, dass humane und murine Treg einige Unterschiede aufweisen könnten.

*Foxp3* wurde als defektes Gen im Scurfy Mausstamm identifiziert. Es hat eine X-chromosomale rezessive Mutation, die in hemizygoten Männchen oder homozygoten Weibchen nach einer Lebenszeit von circa einem Monat letal ist (69). Mutationen im humanen Orthologen sind der Grund für das „Immune dysregulation Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked immunodeficiency“ (IPEX) Syndrom. Es führt zu organspezifischen Autoimmunerkrankungen, „inflammatory bowel disease“ (IBD), Dermatitis, Lebensmittelallergien, Hyperimmunoglobulinämie E und schwerwiegenden Infektionen (70). Trotz der Seltenheit der Krankheit unterstreicht das IPEX Syndrom durch sein Krankheitsbild und den klinischen Verlauf die wichtige Rolle von Treg in der Aufrechterhaltung der immunologischen Selbsttoleranz.

Die Generierung von *Foxp3*-Reporter-mäusen, die ein *Foxp3* knock-in Allel tragen, welches ein Fusionsprotein aus *Foxp3* und dem grünen fluoreszierenden Protein (GFP) codiert, ermöglichte detaillierte Untersuchungen der Ontogenese von  $Foxp3^+$  T-Zellen (71). Diese Untersuchungen bestätigten die Annahme, dass nTreg erst ein paar Tage nach der Geburt in der Peripherie normaler Mäuse nachweisbar sind. Eine Thymektomie am dritten Tag nach der Geburt etwa verhindert die Entwicklung von Treg (72). Es gibt Hinweise darauf, dass CD25 nicht nur ein Indikator für den chronisch aktivierten Zustand von Treg, sondern auch essentiell für deren Überleben und Funktion ist. Defizite von IL-2, IL-2R $\alpha$  (CD25) und IL-2R $\beta$  (CD122) lösen zum Beispiel ähnlich starke lymphoproliferative Entzündungen aus wie eine *Foxp3*-Defizienz. Dieses Syndrom wird auch als „IL-2 Defizienz Syndrom“ bezeichnet (73, 74). Wird IL-2 systemisch neutralisiert, führt das zu einer Reduktion  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  T-Zellen im Thymus und in der Peripherie. Diesen Beobachtungen zur Folge sind IL-2 und der Transkriptionsfaktor *Foxp3* die Schlüsselmoleküle für die Entwicklung und Funktion von nTreg. Da *Foxp3* ein Kernprotein ist, werden für die Isolation oder Depletion regulatorischer T-Zellen meist CD4 und CD25 in Kombination genutzt.

### **I.2.3 Mechanismen der Immunsuppression durch Treg**

Die Mechanismen, die der Immunsuppression durch Treg zugrunde liegen, werden bis heute intensiv diskutiert. Gegenstand der Diskussion sind oft unterschiedliche Bedingungen *in vitro* und *in vivo*, da die streng kontrollierte Umgebung in einem *in vitro* Versuchssystem physiologisch oft sehr wenig mit den tatsächlichen Bedingungen *in vivo* zu tun hat. Prinzipiell erfolgt die Immunsuppression durch Treg jedoch entweder durch Zell-Zell-Kontakt oder die Sekretion immunsupprimierender Zytokine (75).

### **I.2.3.1 Immunsuppression durch Zell-Zell-Kontakt**

Membranständiges TGF- $\beta$  ist in die Immunsuppression durch Treg involviert (76). Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die Suppression durch Treg *in vitro* in einer Kokultur nur möglich war, wenn die Zellen direkten Kontakt zueinander hatten und nicht durch sogenannte „transwell“-Einsätze getrennt wurden. Außerdem konnte die Inhibition der Proliferation der Effektor-T-Zellen durch die Zugabe eines neutralisierenden anti-TGF- $\beta$ -Antikörpers zur Kultur aufgehoben werden (77). Auch die zytolytischen Zelloberflächenproteine Fas und Granzym B, sowie „lymphocyte activated gene-“, (LAG-) 3 und CTLA-4 sind in die Suppression von Effektor-T-Zellen involviert.

Treg exprimieren CTLA-4 konstitutiv auf ihrer Zelloberfläche, die Funktion dieses Moleküls bei der Immunsuppression durch Treg ist jedoch unklar. Ein möglicher Mechanismus ist die Weiterleitung von inhibitorischen Signalen in die aktivierte CD4<sup>+</sup> T-Zelle durch Interaktion mit den kostimulatorischen Molekülen B7.1 Und B7.2 (78, 79). Im Fall von entzündlicher Kolitis ist die Interaktion von B7-Molekülen auf aktivierten T-Zellen und CTLA-4 auf Treg ausschlaggebend für die Vermeidung einer Immunreaktion, wie durch Experimente mit neutralisierenden Antikörpern gegen CTLA-4 in Mäusen gezeigt werden konnte (80). Wenig später stellte sich heraus, dass Treg von CTLA-4 knock out Mäusen ebenfalls in der Lage sind, entzündliche Kolitis zu kontrollieren (81). Diese kontroversen Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Bedeutung der B7:CTLA-4 Interaktion auf Treg noch nicht komplett verstanden ist und dass weitere Nachforschungen notwendig sind, um diesen Signalweg als therapeutisches Ziel einzusetzen.

Kürzlich wurde cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) als ein Schlüsselmolekül der inhibitorischen Funktion von Treg identifiziert. Schon seit einiger Zeit wird die Erhöhung der cAMP Konzentration mit der Inhibition zellulärer Proliferation und Differenzierung in Verbindung gebracht. In Lymphozyten verursachen hohe cAMP-Konzentrationen nach Aktivierung des „inducible cAMP early repressor“ (ICER) die selektive Inhibition der Produktion von unter anderem IL-2 und IFN- $\gamma$  (82). Treg können die Erhöhung der Konzentration von cAMP in Effektorzellen durch mindestens zwei Mechanismen auslösen. Kürzlich wurde gezeigt, wie Treg ihren Zielzellen durch sogenannte „gap junctions“ cAMP zuführen (83). Durch den Gebrauch von Fluoreszenzfarbstoffen konnte gezeigt werden, wie Treg mit anderen T-Zellen gap junctions bilden, durch die direkter Stoffaustausch stattfinden kann. Außerdem führte die Inhibition der Bildung von gap junctions sowie die Abwesenheit von cAMP zum Verlust der inhibitorischen Funktion der Treg. Noch ist nicht geklärt, durch welche Mechanismen erhöhte cAMP-Konzentrationen die inhibitorische Funktion von Treg beeinflussen. Es ist jedoch bekannt, dass die Bildung von IL-2 durch einen Überschuss an

cAMP gehemmt werden kann, nicht aber die von IL-4 (84). Dies deutet auf eine selektive Beeinflussung der Zytokinproduktion in den jeweiligen Zellen und damit auf gezielte Manipulation der Immunantwort hin. Ungeachtet des jeweiligen Mechanismus scheinen Treg jedoch einen immunregulatorischen Signalweg gemeinsam zu nutzen: cAMP induziert Anergie bei T-Zellen und mildert gleichzeitig die Zerstörung von Gewebe durch Autoimmunreaktionen (85).

### **I.2.3.2 Sekretion von inhibitorischen Cytokinen**

*In vivo* werden die anti-inflammatorischen Zytokine TGF- $\beta$  und IL-10 mit den Effektorfunktionen von Treg in Verbindung gebracht (86, 87). TGF- $\beta$  spielt bei der Homöostase der Lymphozyten in vielen Stadien eine Schlüsselrolle, wie an TGF- $\beta$  defizienten Mäusen eindrucksvoll gezeigt wurde (77). T-Zellen, die den Typ II TGF-Rezeptor (dnTRII) exprimieren, sind nicht in der Lage, TGF- $\beta$  zu binden. Mäuse, deren T-Zellen diesen Rezeptor exprimieren, entwickeln entzündliche Kolitis, da ihre T-Zellen der Kontrolle durch Treg entgehen (88). Dabei muss TGF- $\beta$  nicht zwingend von Treg selbst produziert werden. Experimente mit TGF- $\beta$  knockout Mäusen zeigten, dass deren CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg funktionell und phänotypisch identisch mit Treg von Wildtyp-Mäusen sind (89). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Treg andere Zellen, etwa APC, zur TGF- $\beta$ -Produktion bringen.

Auch IL-10 spielt bei der Immunsuppression durch Treg eine wichtige Rolle, wie in *in vivo*-Experimenten mit dem Entzündungsmodell *Leishmania major* gezeigt wurde, da IL-10 defiziente Mäuse gegen eine erneute Infektion mit dem Erreger nicht immun waren (90).

### **I.2.3.3 Treg und Autoimmunität**

Treg spielen bei der Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz eine unersetzliche Rolle. Die Depletion dieser Zellen aus normalen Tieren mittels Injektion eines monoklonalen Antikörpers gegen CD25 führt zu schweren Autoimmunerkrankungen wie Gastritis, Thyroiditis, Diabetes Typ I und IBD. Werden die fehlenden Treg durch autologe CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Zellen ersetzt, erkranken die Tiere nicht (34, 91).

Treg verhindern aber nicht nur Autoimmunerkrankungen, sondern inhibieren auch eine Reihe von Immunantworten gegen Fremdantigene. Die Depletion von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen in Mäusen verstärkt die Immunantwort gegen Mikroben, löst allergische Reaktionen aus und kann die maternale Toleranz während einer Schwangerschaft aufheben. Außerdem bewirkt die Depletion CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen eine effektive Immunantwort gegen autologe Tumorzellen (92). Treg könnten zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen genutzt werden und zum

Erlangen der immunologischen Toleranz gegen Fremdartigene, wie zum Beispiel bei einer Organtransplantation, beitragen.

#### **I.2.3.4 Treg und Tumorummunologie**

Einerseits verhindern Treg Autoimmunerkrankungen, indem sie Immuntoleranz induzieren, doch andererseits können sie auch Immunantworten von körpereigenen Immunzellen gegen Tumorzellen unterdrücken und somit das Tumorstadium begünstigen.

Beweise für die Inhibition der Anti-Tumor-Immunantwort durch Treg wurden schon früh geliefert. 1980 gelang einer amerikanischen Forschergruppe der Nachweis der Inhibition einer Immunantwort gegen das murine Fibrosarkom MethA in Wildtyp-Mäusen durch CD4<sup>+</sup> Suppressorzellen (93). Eine Studie von Sakaguchi und Kollegen zeigte als erste, dass die Depletion CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen zur Entstehung einer Immunantwort gegen den Tumor führen kann (94). Außerdem wurden Korrelationen zwischen dem vermehrten Auftreten von Treg und schneller Tumorstadium, sowie ausbleibenden Therapieerfolgen gezeigt (95, 96). Zudem wurde gezeigt, dass tumorinfiltrierende Lymphozyten (TIL) im Gegensatz zum peripheren Blut einen hohen Anteil an Foxp3<sup>+</sup> Treg enthalten (97).

In zahlreichen späteren Studien wurde über eine erhöhte Anzahl an Treg im Tumorgewebe oder im peripheren Blut bei verschiedenen Tumorerkrankungen wie zum Beispiel Bronchialkarzinom (98), Brustkrebs (99), Darmkrebs (100), Lymphom (101) und beim malignen Melanom (102) berichtet. Letztere Studie ist von besonderem Interesse, da hier gezeigt wurde, dass tumorinfiltrierende CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen sowohl phänotypisch als auch funktionell den Treg aus der Peripherie gleichen und sie somit eine Schlüsselrolle bei der Kontrolle der lokalen Immunantwort in der Tumorsituation spielen könnten.

Treg verhindern *in vivo* Immunreaktionen gegen Autoantigene, zu denen auch Tumorantigene zählen (103). Dies führte zu der Annahme, dass das gehäufte Auftreten von Treg die Tumorstadium beschleunigen könnte. Versuche mit Mäusen zeigten, dass tumorinfiltrierende Effektor-T-Zellen sich nicht mit einem Tumorantigen stimulieren ließen, wenn in der Tumorumgebung vermehrt Treg vorlagen (104). Tatsächlich wurde nachgewiesen, dass Treg eine Antitumor-Immunantwort durch antigenspezifische CTL, aber auch Natürliche Killer- (NK-) und NKT-Zellen effektiv unterdrücken können (105, 106). Dabei scheinen Treg durch die Sekretion von TGF- $\beta$  die inflammatorische Wirkung der von den CD8<sup>+</sup> CTL ausgeschütteten Th1-Zytokinen gegenüber Tumorzellen zu neutralisieren (107, 108). Diese Inhibition der Immunantwort durch Treg findet in der direkten Umgebung des Tumors statt, weshalb eine lokale Aufhebung dieses Effekts durch die Depletion der Treg eine erfolgreiche Immuntherapie darstellen könnte. In einem murinen Fibrosarkom-Modell wurde gezeigt, dass

Treg in Tumoren akkumulieren und die Proliferation von CD8<sup>+</sup> CTL durch die Sekretion von anti-inflammatorischen Zytokinen wie TGF- $\beta$  und IL-10 inhibieren (109). Außerdem konnte der inhibierende Effekt durch die Depletion der Treg aufgehoben und sogar in fortgeschrittenen Krankheitsstadien eine Regression der Tumore erwirkt werden (109).

Warum Treg in Tumore einwandern, wird derzeit diskutiert, doch die Produktion von spezifischen Chemokinen durch Tumorzellen, wie z.B. CCL22, ist in die Rekrutierung von Treg in den Tumor involviert (110). Zudem produzieren Tumorzellen die immunsupprimierenden Zytokine IL-10 und TGF- $\beta$  und beeinflussen so CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Tumorumgebung, indem sie diese zu Tr1- oder Th3-Zellen konvertieren (111). Zusätzlich wurden bei Melanompatienten antigenspezifische Treg in der Peripherie gefunden, die auf Stimulation mit ihrem Antigen *in vitro* mit der Produktion von IL-10 reagierten (112).

### **I.3 Das maligne Melanom**

Statistisch gesehen ist das maligne Melanom eine eher seltene Todesursache. Nur circa 1% aller durch Krebs verursachten Sterbefälle geht auf den schwarzen Hautkrebs zurück. Allerdings ist diese Tumorform durch seine geringe Überlebensrate von nur 10% nach einmaligem Auftreten von Fernmetastasen eine der tödlichsten überhaupt (113). Die Häufigkeit des malignen Melanoms ist stark mit den klimatischen Umständen in verschiedenen geographischen Lagen assoziiert. Dabei ist die hellhäutige Bevölkerung besonders betroffen. In Australien und den Südstaaten der USA liegt sie bei 30-45 Krankheitsfällen pro 100.000 Einwohner im Jahr, während in Deutschland nur circa 10 neue Fälle pro 100.000 Einwohnern pro Jahr auftreten (114). In den letzten Jahrzehnten ist die Häufigkeit des malignen Melanoms jedoch stark gestiegen. Alle 10-20 Jahre kommt es zu einer Verdopplung der Fälle, wobei die Mortalitätsrate dabei stabil bleibt, bzw. leicht absinkt (115-117). Dieses Phänomen ist wahrscheinlich auf die immer besser werdende Aufklärungsarbeit in der Bevölkerung zurückzuführen, sowie auf besser entwickelte diagnostische Verfahren, die die Entdeckung einer Erkrankung in früheren Stadien und somit eine erfolgreiche Behandlung zur Folge haben.

#### **I.3.1 Die Entstehung des malignen Melanoms**

Verschiedene Risikofaktoren spielen bei der Entstehung des malignen Melanoms eine Rolle. So gibt es zum Beispiel ein schon angeborenes Risiko durch die Pigmentierung der Haut, das gehäufte Auftreten melanozytärer Naevi und Krankheitsfälle innerhalb der Familie (118). Ebenso spielen aber auch verschiedene Umwelteinflüsse, wie zum Beispiel die UV-Strahlenbelastung im frühen Kindesalter (116) oder die Exposition in Sonnenlicht allgemein

eine wichtige Rolle (119). Auch die Suppression des Immunsystems durch das humane Immunschwächevirus HIV oder Medikation beispielsweise nach einer Organtransplantation können ein erhöhtes Risiko darstellen (120).

Molekulargenetisch ist die Entstehung eines malignen Melanoms Folge einer Transformation der Melanozyten-DNA. Diese Melanin produzierenden Zellen liegen in der Basalschicht (Stratum Basale) der Epidermis. Sie transportieren bei UV-Einstrahlung entstehendes Melanin über Zelleinschlüsse, sogenannte Melanosomen, in tiefer gelegene Zellschichten, um diese durch die Pigmentierung vor DNA-Schäden durch UV-Licht zu schützen (121). Durch UV-Licht hervorgerufene Mutationen der Melanozyten-DNA führen zu Schäden, die die Entstehung eines malignen Melanoms begünstigen können. Häufig treten Mutationen der Protoonkogene B-RAF und NRAS auf, die den Signalweg der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) beeinflussen (122).

### **I.3.2 Therapiemöglichkeiten für das maligne Melanom**

#### **I.3.2.1 Chirurgischer Eingriff**

Trotz der verbesserten Behandlungsmöglichkeiten für Melanompatienten durch die Standardisierung von Therapiemethoden sowie optimierte Nachsorge und Kontrolle konnte der klinische Effekt in den vergangenen drei Jahrzehnten nicht signifikant verbessert werden. Die Standardtherapie stellt zunächst immer eine chirurgische Entfernung des Tumors dar. Bei vollständiger Entfernung des Tumorgewebes kann dadurch bereits eine komplette Heilung erzielt werden. Der mögliche Befall der Wächterlymphknoten wird dabei gegebenenfalls durch Biopsien ausgeschlossen (123).

#### **I.3.2.2 Chemotherapie**

Chemotherapeutika gehören trotz des meist schlechten Ansprechens der Patienten zur Standardtherapie beim malignen Melanom, da sie, besonders in fortgeschrittenen Stadien, zur Linderung der Beschwerden beitragen können (113). Die Behandlung mit Dacarbazin (DTIC) kommt seit vielen Jahren als standardisierte Chemotherapie beim malignen Melanom zum Einsatz. In verschiedenen Studien sprachen 7-13% der Patienten auf die Behandlung mit DTIC an und 15-28% dieser Patienten blieben weiterhin stabil (124, 125). Dies ist allerdings eher die Ausnahme. Obwohl es durch eine Chemotherapie bei Melanompatienten am häufigsten zu positiven Reaktionen kommt, bleibt der Nutzen für die Patienten umstritten, da keine eindeutigen Beweise für eine verbesserte Überlebensrate gibt (126, 127). In den letzten Jahren wurde DTIC durch Temozolomid als Standardtherapeutikum abgelöst, da

dieses mildere Nebenwirkungen zeigt (128). Temozolomid ist ein lipophiler Wirkstoff, der die Blut-Hirn-Schranke passieren kann und daher auch bei der Behandlung von Gehirnmetastasen eingesetzt wird (129). Derzeit wird Temozolomid in Studien zusammen mit anderen Medikamenten getestet, beispielsweise dem anti-angiogenetisch wirkenden Thalidomid (130). Viele weitere Chemotherapeutika wurden bei der Behandlung des malignen Melanoms in Studien getestet, unter anderem Carboplatin, welches zu Vernetzungen in der DNA führt und somit die Replikation verhindert (131). Auch Paklitaxel, das den Mikrotubuli-Aufbau stört, Fotemusin, das Doppelstrangbrüche in der DNA induziert und Sorafenib, ein Inhibitor des MAP-Kinase-Signalwegs kamen zum Einsatz, der Erfolg war jedoch immer mäßig (128).

### **I.3.2.2 Apoptose induzierende Wirkstoffe**

Einige anti-apoptotische Proteine wie „B cell lymphoma“ (Bcl)-2, Bcl-xL und der X-chromosomale Inhibitor der Apoptose (XIAP) sind in Melanomzellen überexprimiert und könnten bei Chemotherapie zur Resistenz der Zellen führen (132). Oblimersen ist ein Antagonist für mitochondriales Bcl-2 (133) und Ergebnisse einer randomisierten Vergleichsstudie zwischen DTIC allein und DTIC in Kombination mit Oblimersen zeigten besseres Ansprechen auf die Kombinationstherapie, jedoch keine Verbesserung der Überlebensrate (124). Zudem war es bei dieser Studie nicht möglich, vom Tumor produziertes Bcl-2 zu messen, was die Ergebnisse schlecht interpretierbar machte.

Proteine der IAP Familie sind die einzigen bekannten endogenen Caspase-Inhibitoren (134). XIAP ist in der Lage, Caspase 3 und Caspase 9 zu inhibieren, die direkt an der Apoptose beteiligt sind. Mit der Blockierung der Genexpression von XIAP könnte also in den Tumorzellen Apoptose induziert werden. Mit „antisense“ Oligonukleotiden (AS OGNs), die mRNA binden und so die Genexpression der Zielgene inhibieren, wurde in einer Reihe von verschiedenen Tumorzelllinien und einem Transplantationsmodell erfolgreich versucht, Apoptose zu induzieren (135).

### **I.3.2.3 Signalwege und Inhibitoren der Signaltransduktion**

Das Überleben der Melanomzellen hängt von bestimmten Signalwegen ab, die in den letzten Jahren intensiv studiert wurden. Der wichtigste dieser Signalwege ist der der MAPK, zum Beispiel Ras-Raf-Erk. MAPK sind in nahezu allen Melanomen aktiviert und spielen bei der Zellteilung und beim Überleben der Zellen eine bedeutende Rolle (136). Deshalb stellen sie potenzielle Ziele für therapeutische Strategien dar. In circa 67% aller Melanome treten Mutationen in den Genen für RAS/RAF auf (137). Die häufigste dieser somatischen

Mutationen ist in einem der drei funktionellen Proteine für RAF (A, B, C), nämlich B-RAF, lokalisiert und versetzt das Protein in einen dauerhaft aktivierten Zustand (138, 139). Diese unnatürliche Aktivität zu inhibieren wäre ein möglicher Therapieansatz.

Sorafenib ist ein oraler Multi-Kinase-Inhibitor, der 2 Klassen von Kinasen hemmt (unter anderem Raf-Kinasen und den Rezeptor für „vascular endothelial growth factor“ (VEGF)), die sowohl in der Tumorpheriferation als auch der Tumorangio-genese eine zentrale Rolle spielen (140). Frühe Studien zeigten bei Therapie mit Sorafenib keinen klinischen Effekt (141), erst in Kombination mit anderen Substanzen stellten sich Therapieerfolge ein. Sorafenib wurde bereits bei verschiedenen onkologischen Indikationen sowohl als Einzelsubstanz als auch in Kombination mit anderen Chemotherapeutika in klinischen Studien getestet (142). Die meisten Erfahrungen liegen bei Patienten mit fortgeschrittenem Nierenzell-Karzinom vor. In dieser Indikation erreichte Sorafenib unlängst auch entsprechende Arzneimittelzulassungen (143). Da die Mutationsrate von B-RAF in einigen Melanomzelllinien bei 69% liegt, wurde Sorafenib beim malignen Melanom bereits innerhalb einiger Phase-II- und III-Studien getestet (144). Zumindest in der Monotherapie scheint es jedoch nur gering wirksam zu sein. Auch die Kombination von Sorafenib mit Carboplatin und Paclitaxel konnte keinen zusätzlichen Effekt gegenüber der Chemotherapie alleine erreichen (145).

Verheißungsvollere Ergebnisse liegen für die Kombination von Sorafenib mit DTIC bzw. Temozolomid aus randomisierten Phase-II-Studien vor (144). Jedoch bedarf es größerer Phase-III-Studien, bevor endgültige Aussagen über die Wirksamkeit von Sorafenib beim metastasierten Melanom getroffen werden können. Bis dahin bleibt Sorafenib eine zwar interessante, aber dennoch experimentelle Therapieoption (144).

#### **1.3.2.4 Proteasom-Inhibitoren**

Das Proteasom ist ein Multi-Enzym-Komplex und dient in der Zelle als Hauptabbauweg für Proteine (146). Der planmäßige Abbau von Proteinen ist wichtig für die Regulation der Signaltransduktion, Transkription und Rezeptorfunktionen. Das Proteasom kontrolliert den Level von für Zellzyklus und Apoptose wichtigen Proteinen wie zum Beispiel Cyclinen, Caspasen, Bcl-2 und NF $\kappa$ B (147). Ein Fehler in der Kontrolle durch das Proteasom kann zu Tumorentstehung und Wirkstoffresistenz führen (148). Bortezomib ist ein Wirkstoff, der auf der Basis von Borsäure synthetisiert wurde und der das Proteasom hochspezifisch inhibieren kann (149). Während Bortezomib bei der Behandlung Multipler Myelome erfolgreich angewendet wird, wurde 2005 eine Studie mit Melanompatienten wegen fehlender klinischer Effekte vorzeitig beendet (150).

### **I.3.3 Immuntherapie des malignen Melanoms**

Die Immuntherapie umfasst eine ganze Reihe von therapeutischen Ansätzen, die alle samt darauf abzielen, Tumorzellen durch die Aktivierung von bestimmten Komponenten des Immunsystems zu töten. Es gibt rationale Argumente für den Einsatz von Zytokinen und Impfstoffen (Vakzinen) bei der Behandlung des malignen Melanoms. So wurden zum Beispiel spontane Abstoßungen, sowie die Infiltration von Tumoren durch Lymphozyten oder die Expression von MAA auf Tumorzellen beobachtet (151).

#### **I.3.3.1 Krebsimpfstoffe**

Therapieansätze mit Krebsimpfstoffen (Vakzinen) stehen schon lange im Fokus der Krebsforschung, da trotz intensiver Bemühungen seit über 15 Jahren keines der entwickelten Vakzine zu einem signifikanten Therapieerfolg führte. Momentan steht die Frage nach neuen Tumorantigenen ebenso im Mittelpunkt wie die Induktion und Aufrechterhaltung einer möglichst starken Immunantwort und das Ausschalten der immunologischen Toleranz in der Tumorsituation. Eine Vakzinierung kann mit ganzen Zellen, Zelllysaten, Proteinen oder spezifischen Peptidfragmenten durchgeführt werden (152). Neuen Technologien bieten zudem die Möglichkeit, in malignen Zellen veränderte Genexpression zu identifizieren, was neue Angriffspunkte für eine Vakzinierung schafft (153, 154). Prinzipiell sind autologe Vakzine besser geeignet als allogene, da sich Tumore aus verschiedenen Individuen häufig phänotypisch unterscheiden. Allerdings ist die Herstellung von autologen Vakzinen sehr zeitintensiv und erfordert größere Mengen an Material, weshalb sie für die Routine nicht praktikabel sind (152).

#### **I.3.3.2 Antigenpräsentation mit dendritischen Zellen**

DC sind professionelle APC mit einer zentralen Rolle bei der Entstehung einer Immunantwort. Das macht sie zu geeigneten Helfern bei der Präsentation von Tumorantigenen (155). DC können *in vitro* aus Monozyten aus dem peripheren Blut kultiviert und expandiert und mit einem oder mehreren Antigenen beladen werden (156). Um ihre Reifung zu initiieren, benötigen unreife DC neben dem Kontakt zu einem Antigen auch sogenannte Gefahrensignale. Dazu gehören proinflammatorische Zytokine ebenso, wie Toll-like Rezeptor (TLR)-aktivierende Verbindungen, darunter DNA-Sequenzen, die CpG-Motive enthalten, Einzel- oder Doppelstrang-RNA oder von Bakterien produziertes Lipopolysaccharid (LPS) (157). Die Reifung der DC ist ein terminaler Differenzierungsschritt, der sie zu effektiven Stimulatoren für CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen macht (5), die deren Differenzierung zu CTL, Th1- und Th2-Zellen einleiten können (2).

Bei der Immuntherapie durch Vakzinierung mit antigenbeladenen DC macht man sich diese Eigenschaft reifer immunogener DC zu Nutze. In einer ersten Studie wurden Melanompatienten im Stadium IV mit reifen oder unreifen DC, die mit Tumorlysat oder MAA beladen worden waren, vakziniert (156). Beim näheren Vergleich unreifer und reifer DC in der Therapie stellte sich heraus, dass die vollständige Reifung der DC für die Induktion einer wirksamen Immunantwort unerlässlich ist (158). Folglich führte die Vakzinierung von Melanompatienten im Stadium IV mit ausgereiften DC zu einer signifikanten Expansion tumorantigen-spezifischer T-Zellen (159). Diese Immunantwort führte zwar zur Regression einiger individueller Metastasen, jedoch nicht zur kompletten Remission. Die Mehrheit aller bislang durchgeführten Studien zeigte, dass die Vakzinierung mit DC eine sichere Methode mit geringen Nebenwirkungen für die Immuntherapie bietet, und bei einigen Patienten erfolgreich war, besonders, wenn die DC entsprechend aktiviert wurden (159-161). Der geringe klinische Effekt dieser Therapieform trotz der teils starken Antitumor-Immunantworten ist allerdings sehr enttäuschend und führte 2006 sogar zum vorzeitigen Abbruch einer Studie mit Melanompatienten im Stadium IV, in der die Wirksamkeit autologer peptidbeladener DC mit der des herkömmlichen Chemotherapeutikums DTIC verglichen werden sollte (162). Mögliche Gründe für den fehlenden klinischen Effekt werden derzeit intensiv diskutiert. Eine Erklärung könnte in der Multifunktionalität von unreifen DC liegen. Diese exprimieren im Gegensatz zu reifen immunogenen DC nur geringe Mengen von kostimulatorischen Molekülen auf ihrer Oberfläche und können T-Zellen daher nicht aktivieren. Die Stimulation von naiven  $CD4^+$  T-Zellen mit unreifen DC führte sogar zur Induktion IL-10 produzierender immunsupprimierender  $CD4^+$  T-Zellen (163). Außerdem sind diese DC äußerst sensitiv für Einflüsse aus dem sie umgebenden Zytokinmilieu. So führt zum Beispiel die Anwesenheit von IL-10 und TGF- $\beta$  zur Bildung eines tolerogenen DC-Phänotyps, was die tumorantigen-spezifische Toleranz zur Folge haben kann (164).

Progressive Tumore haben die Eigenschaft, der Erkennung durch das Immunsystem zu fliehen, was auch ein Grund für den geringen klinischen Effekt der Vakzinierung mit DC bei Patienten in fortgeschrittenen Krankheitsstadien sein kann. Dabei scheinen sie Mechanismen zur Blockade der Reifung immunogener DC entwickelt zu haben. Es wurde gezeigt, dass Wachstumsfaktoren wie VEGF, M-CSF, TGF- $\beta$  und IL-6, die von Tumorzellen produziert werden können, die Differenzierung von DC aus  $CD34^+$  Vorläuferzellen aus dem Knochenmark *in vitro* inhibieren können (165) und somit die Entwicklung tolerogener DC fördern. Diese Entdeckung geht einher mit zahlreichen Beobachtungen bei Patienten mit Myelom (166), Bronchialkarzinom (167), Nierenzellkarzinom (168) und Leukämie (169), die dramatisch verringerte Frequenzen von DC im peripheren Blut aufweisen.

### **I.3.3.3 Monoklonale Antikörper gegen CTLA-4**

Eine Immunantwort kann nur entstehen, wenn ein Antigen durch ein MHC-Molekül präsentiert wird und zusätzlich eine Costimulation durch die Interaktion von B7 auf DC und CD28 auf T-Zellen erfolgt. Nach ihrer Aktivierung erhöhen T-Zellen die Expression von CTLA-4 auf der Zelloberfläche, welches mit CD28 um die Bindung mit B7.1 und B7.2 konkurriert. Die Interaktion von B7 und CTLA-4 führt zur Inhibition von T-Zell-Effektorfunktionen, wie der IL-2-Produktion und T-Zell-Proliferation (170). CTLA-4 übt also bei der Entstehung von T-Zell-Antworten eine kritische inhibitorische Funktion aus.

Eine Studie mit dem anti-CTLA-4-Antikörper Ipilimumab führte 2005 bei 13% der behandelten Melanompatienten zu Antitumor-Immunantworten und bei 25% zu schweren Autoimmunsymptomen (171). In dieser Gruppe traten allerdings auch die heftigsten Antitumor-Immunantworten auf. In zwei anderen Studien mit 43 Melanompatienten führte die Behandlung mit Tremelimumab bei 18 Patienten zu einer Überlebensrate von 12 Monaten und 13 Patienten zur vollständigen Regression des Tumors (172). Sowohl bei Ipilimumab als auch bei Tremelimumab sind die Schwere entzündlicher Autoimmunreaktionen wie Kolitis oder Diarrhö limitierend für die verabreichte Dosis. Beide Antikörper werden derzeit in weiterführenden Studien beurteilt und geprüft. Der Antitumor-Effekt scheint dabei auf der verstärkten Aktivierung von T-Zellen zu beruhen und nicht, wie eigentlich erwartet, auf der Depletion oder Inhibition von Treg (173, 174).

Der Einsatz dieser Wirkstoffe wirft neue Fragen auf, die es zu beantworten gilt. So ist zum Beispiel unklar, ob positive Reaktionen auf eine Behandlung immer zwingend mit einer Autoimmunreaktion einhergehen. Auch über Wechselwirkungen mit Medikamenten aus vorangegangenen Therapien weiß man bislang wenig, oder ob die Behandlung mit monoklonalen Antikörpern durch den zusätzlichen Einsatz von Vakzinen noch verbessert werden kann.

### **I.3.3.4 Inhibition regulatorischer T-Zellen**

Natürlich vorkommende Treg haben die Fähigkeit, die Proliferation und Effektorfunktionen von konventionellen T-Zellen zu inhibieren. Die Analyse der Zusammensetzung der T-Zellpopulationen in Lymphknoten von Melanompatienten haben im Vergleich zu normalen Lymphknoten einen übermäßig hohen Anteil an Treg ergeben (102). Auch bei anderen Krebsarten, beispielsweise dem Nierenzellkarzinom ist die Anzahl der Treg gegenüber gesunden Spendern im peripheren Blut deutlich erhöht (175).

IL-2 ist ein wichtiger Wachstumsfaktor für Effektor-T-Zellen und Treg (176). Um mögliche Antitumor-Immunantworten zu verstärken, wurde IL-2 in diversen Studien therapeutisch bei der Behandlung des malignen Melanoms eingesetzt, was zu einer erhöhten Anzahl von Treg im peripheren Blut der Patienten führte. Eine gezielte Inhibition dieser durch IL-2 induzierten Vermehrung der Treg könnte sich positiv auf die Therapie des malignen Melanoms auswirken (177). Eine Reihe solcher Antikörper ist kommerziell erhältlich, doch wurden sie bisher nicht zur Krebstherapie eingesetzt (178).

Denileukin Difitox ist ein Fusionsprotein aus IL-2 und der enzymatisch aktiven Form des Diphtheriatoxins. Es bindet vorzugsweise Zellen, die den hochaffinen IL-2R exprimieren. Nach der Bindung wird Denileukin Difitox endozytotisch in die Zelle aufgenommen und inhibiert die Proteinsynthese, was zum Tod der betroffenen Zelle führt (179). Die „Food and Drug Association“ (FDA) der USA hat Denileukin Diphitox für die Behandlung von kutanen T-Zell-Lymphomen freigegeben. In 60% dieser Tumore wird der IL-2R exprimiert, und das Ansprechen der Patienten auf die Therapie mit Denileukin Diphitox korreliert mit der Expression des Rezeptors (180). Die Effizienz des Wirkstoffes motivierte dazu, Denileukin Diphitox auch bei anderen Tumorerkrankungen als Medikament einzusetzen. Auch wenn die Tumorzellen selbst CD25 nicht exprimieren, könnte Denileukin Diphitox das Tumorstadium indirekt durch Inhibition anderer CD25 exprimierender Zellen, wie etwa regulatorische T-Zellen, beeinflussen (181). Tatsächlich reduziert Denileukin Diphitox die Anzahl von Treg im peripheren Blut von Patienten mit Ovarialkarzinom, malignem Melanom oder Nierenzellkarzinom (182-184).

Tierexperimentelle Arbeiten haben zudem gezeigt, dass die Behandlung mit Denileukin Diphitox die T-Zell-Antwort auf ein rekombinantes Virusvakzin verstärkt (185). Unter dem Handelsnamen ONTAK ist Denileukin Difitox inzwischen zur Behandlung von kutanen Lymphomen und Melanomen anerkannt. Zwar konnten durch Monotherapie mit ONTAK keine therapeutischen Erfolge bei Patienten mit malignem Melanom erzielt werden (186), in Kombination mit einer Vakzinierung mit dem MAA MelanA/MART-1 konnten bei einem Teil der Patienten spezifische T-Zellen induziert und die Immunantwort verstärkt werden (182).

### **I.4 Das *ret* transgene Spontanmelanom-Mausmodell**

Mausmodelle, die das humane Melanom imitieren, bieten die Möglichkeit der Entwicklung und Untersuchung neuer immuntherapeutischer und immunprophylaktischer Verfahren. Es können exogene Risikofaktoren, wie z.B. UV-Strahlung, oder endogene Prädispositionsfaktoren, wie die Inaktivierung von Tumorsuppressoren, simuliert und deren Auswirkung auf die Tumorstadium untersucht werden (187). Im Vergleich zu

Transplantationsmodellen bieten Mausmodelle, die aufgrund genetischer Manipulationen spontan Tumore entwickeln, die Möglichkeit, Tumorwachstum und Veränderungen des Immunsystems in einer der humanen ähnlichen Situation zu untersuchen.

Das in dieser Arbeit untersuchte Spontanmelanom-Mausmodell basiert auf der Überexpression des Protoonkogens *ret* in melaninproduzierenden Zellen. Das Protoonkogen kodiert eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase. Der extrazelluläre Teil von Ret enthält vier Cadherin-ähnliche Wiederholungen, eine Kalzium-Bindungsstelle und eine Cystein-reiche Domäne. Das intrazelluläre Segment besteht aus der Tyrosin-Kinase-Domäne, die typischerweise vier Autophosphorylierungsstellen besitzt. Liganden der Ret-Kinase sind Wachstumsfaktoren der „glial cell line-derived neurotrophic factor“ (GDNF)-Familie, wie Neurturin, Artemin und Persephin. Diese Liganden binden zunächst den GDNF Rezeptor (GFR)- $\alpha$ , der über einen Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker in sogenannten „lipid rafts“ mit der Zellmembran verbunden ist. Die Komplexbildung der beiden Proteine führt zu deren Bindung an Ret und damit zur Homodimerisierung und Autophosphorylierung der Kinase (188). Die phosphorylierten Tyrosinreste der Kinase dienen als Bindungsstellen für Adaptorproteine wie Shc, IRS1/2, FRS2, DOK4/5, deren Bindung zur Aktivierung verschiedener Signalwege führt. Unter anderem werden Signalwege der MAPK und Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase aktiviert, die je nach Zelltyp zu unterschiedlichen Effekten wie die morphologische Veränderungen des Zytoskeletts, Migration, Proliferation und Differenzierung führen können (189). Im *ret* transgenen Melanommodell wird ein fusioniertes Gen aus dem Protoonkogen *ret* und dem murinen Metallothionin-I-Promotor in C57BL/6 Wildtyp-Mäusen exprimiert. Dies führt zur übermäßigen Expression von Ret in allen Melanozyten und damit zu deren Aktivierung und unnatürlich hoher Melaninproduktion (190). Die Tumore entstehen in transgenen Mäusen spontan aus subkutanen Melanozyten. Im Lauf der Tumorprogression erhöhen sich die Expression des Ret-Transgens und damit seine Kinaseaktivität kontinuierlich. Die Folge ist die Aktivierung von bei der Signalübertragung stromabwärts von Ret liegenden Molekülen, die Proliferation und Metastasierung der Tumorzellen begünstigen. Dazu gehören Kinasen der MAPK-Familie, wie zum Beispiel die extrazellulär regulierte Kinase ERK-2, c-Jun und Matrix Metalloproteinasen. Die Tumorentwicklung verläuft dabei vom tumorfreien über ein benignes bis hin zum malignen Stadium, in dem metastasierende Melanome entstehen (190, 191).

### **I.5 Zielsetzung**

Viele Studien haben gezeigt, dass autoreaktive immunsupprimierende Treg die Fähigkeit besitzen, eine Antitumor-Immunantwort zu unterdrücken und somit die Entstehung und Progression von Tumoren begünstigen können. Die meisten dieser Studien wurden mit

## Einleitung

induzierbaren murinen Tumormodellen durchgeführt, die mit der physiologischen Situation bei einer Tumorerkrankung des Menschen nur wenig gemeinsam haben. In der vorliegenden Arbeit sollte im *ret* transgenen Spontanmelanom-Mausmodell die Verteilung der Treg-Population in den lymphatischen Organen und im Tumorgewebe, sowie ihre funktionellen Eigenschaften charakterisiert werden. Außerdem sollte durch immuntherapeutische Strategien, die auf die Eliminierung und Inhibition dieser Treg abzielen versucht werden, einen klinischen Effekt in diesem Tumormodell zu induzieren.

Gleichzeitig wurde in peripheren Blutlymphozyten von Melanompatienten im Stadium II-IV der Einfluss einer Vakzinierung mit autologen, peptidbeladenen DC oder einer systemischen Therapie mit IFN- $\alpha$  auf die Quantität der Treg untersucht. Außerdem wurde die Frequenz tumorantigen-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen und Treg vor und nach der Therapie mit autologen DC analysiert.

## II. MATERIAL UND METHODEN

### II.1 Chemikalien

Bezeichnung	Firma
Agarose	Roth
Ammoniumchlorid	Merck
Bovine Serum Albumin, BSA	Sigma
Concanavalin A	Amersham Biosciences
Cyclophosphamid	Sigma
Dimethylsulfoxid	Merck
EDTA Disodium	GERBU
EDTA 0,5M, pH 8,0	Gibco
Eisessig, CH <sub>3</sub> COOH 100%	Merck
Ethidiumbromid, 1% in H <sub>2</sub> O	Merck
Fötale Kälberserum, FKS	PAN Biotech GmbH
Fluoromount-G, Eindeckmedium	Southern Biotech
Fixogum, elastischer Montagekleber	Marabu
GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus	Fermentas
Isofluoran	Delta Select
Kaliumhydrogencarbonat, KHCO <sub>3</sub>	Roth
Liquemin N	Roche
Natriumacetat, CH <sub>3</sub> COOHNa	NeoLab
Natriumazid, NaN <sub>3</sub>	Roth
Natriumcarbonat, Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	AppliChem
Natriumchlorid, NaCl	Fluka
Natriumhydrogencarbonat, NaHCO <sub>3</sub>	AppliChem
N,N-Dimethylformamid	Sigma
Penicillin/Streptomycin 100X	PAA
Phosphat Buffered Saline, PBS	PAA
Phenol/Chloroform	Roth
Proteinase K	Sigma
Tris 99,9%	Roth
Trypan Blue Solution, 0,4%	Sigma
Tween 20	Sigma

Xylol Histo grade	Baker
Ziegenserum	Gibco

## II.2 Antikörper

### II.2.1 Antikörper gegen Mausantigene

Spezifizität	Konjugat	Klon	Isotyp	Firma
CD3 $\epsilon$	PerCP-Cy5.5	145-2C11	Hamster IgG1, $\kappa$	BD
CD4	FITC/APC/pur	L3T4	Ratte IgG2b, $\kappa$	BD
CD25	FITC	7D4	Ratte IgM, $\kappa$	BD
CD25	PE	3C7	Ratte IgG2a, $\kappa$	BD
CD25	APC	PC61	Ratte IgG1, $\lambda$	BD
CD45.2	FITC/PerPC-Cy5.5	104	Maus IgG2a, $\kappa$	BD
CD127	PE	SB/199	Ratte IgG2b, $\kappa$	BD
NK1.1	PE	PK136	Maus IgG2a, $\kappa$	BD
CD152	PE	UC10-4F10-11	Hamster IgG1, $\kappa$	BD
CD95	PE	Jo2	Hamster IgG	BD
GITR	PE	108619	Ratte IgG2a, $\kappa$	R&D
Foxp3	PE/Alexa Fluor 647/Bio	FJK-16s	Ratte IgG2a, $\kappa$	eBioscience
CD16/CD32	unkonjugiert	2.4G2	Ratte IgG2b, $\kappa$	BD

### II.2.2 Antikörper für die T-Zell-Stimulation

Spezifizität	Konjugat	Klon	Isotyp	Firma
CD3 $\epsilon$	unkonjugiert	145-2C11	Hamster IgG1, $\kappa$	BD
CD28	unkonjugiert	37.51	Hamster IgG2, $\lambda$	BD

### II.2.3 Antikörper gegen humane Antigene

Spezifizität	Konjugat	Klon	Isotyp	Firma
CD4	FITC/APC-Cy7	RPA-T4	Maus IgG1, κ	BD
CD25	PE/APC-H7	M-A251	Maus IgG1, κ	BD
CD3	PerCP-Cy5.5	SK7	Maus IgG1, κ	BD
CD45	PerCP	2D1	Maus IgG1, κ	BD
CD45R0	ECD	UCHL1	Maus IgG2a	Beckman&Coulter
Foxp3	APC	236A/E7	Maus IgG1	eBioscience

### II.3 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Firma
Abzug	STA 120 1297	Prutcher
Durchflußzytometer	FACS Calibur	BD
	FACS Cantoll	BD
	LSR II	BD
ELISA Reader	Rainbow Therma	SLT
Gelkammer	40-1214	PeqLab
Gelkammer-Netzgerät	EC105	Apparatus Corporation
Gel Fotokammer	Gel Jet Imager INATUS	UV Systems
Heizblock	Thermomixer compact	Eppendorf
Inkubator	HeraCell	Hereaus
Lichtmikroskop	Leica DMIL	Leica
	Leica MPS 60	Leica
Magnetrührer	RCT basic	Kika Werke
Mikroskop Kamera	Leica DC500	Leica
Mikrotom	Leica RM 2125 RT	Leica
Mikrowelle	R-352	Sharp
pH Meter	pH-Meter 766	Calimatic
Photometer	UltroSpec 3100 pro	Amersham
Pipettierhilfe	Accu-Jet	Brand
Sterilbank	HeraSafe	Hereaus
Vortex	Vortex Genie 2	Scientific Industries

Waagen	BP 3100P	Sartorius
Wasserbad	DC3	HAAKE/GFL
Zentrifugen	Labofuge 400R Biofuge pico Biofuge primo R Varifuge K RT7 Plus	Heraeus Heraeus Heraeus Heraeus Sorvall

#### II.4 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

ELISA Platten	Maxisorp 96 well	Nunc
Kanülen	Microlance 3, verschiedene Größen	BD
Kryoröhrchen	Mit Innengewinde und Rundboden	Greiner
Objektträger	76x26 mm Super Frost Plus	Menzel Gläser
Deckgläschen	74x24 mm	Roth
Octo MACS	Magnet	Miltenyi
Paramagnetische Säulen	MS/LS	Miltenyi
Pipetten	Pipe lite	Rainin
Polypropylen Röhrchen	15 ml/50 ml, mit Schraubverschluss	Falcon
Quadro MACS	Magnet	Miltenyi
Reaktionsgefäße	200 µl 500 µl 1,5 ml 2,0 ml	Brand Eppendorf Eppendorf Eppendorf
Sterilfilter	0,45µm Rotilabo Spritzenfilter Steril	Roth
Spritzen	1ml, Plastipak 5ml 50ml	BD Terumo Terumo
Zellkulturflaschen	75 cm <sup>2</sup> /175 cm <sup>2</sup>	Greiner
Zellkulturplatten	96 well Rund- oder Flachboden	Greiner

	24 well	Greiner
Zellkulturschalen	60 x 15 mm	Greiner
Zellsiebe	100 µm, Nylon	BD

## II.5 Kits

Bezeichnung	Firma
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Regulatory T cell isolation kit	Miltenyi
CD4 <sup>+</sup> T cell isolation kit	Miltenyi
CD25 <sup>+</sup> Microbead kit	Miltenyi
IFN- $\gamma$ ELISA	BD
Plex sets	BioRad, Millipore
Alkaline Phosphatase Standard	Vector
Alkaline Phosphatase Substrate Kit	Vector
Liquid DAB substrate chromogen system	DAKO

## II.6 Puffer und Medien

### Reaktionspuffer

50 mM Tris pH 8.0, 20 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % SDS in ddH<sub>2</sub>O

### Verdau

20 µl Reaktionspuffer + 2 mg/ml Proteinase K

### 10 x Puffer

200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl

## Material und Methoden

### 50 x TAE Puffer

242 g Tris, 100 ml 0,5 M EDTA, 57,1 ml Eisessig auf 1l H<sub>2</sub>O

### Ladepuffer

0,25% Bromphenolblau (300 bp), 0,25% Xylen Cyanol (4 Kb), 30% Glycerin, 69,5% ddH<sub>2</sub>O

### 10 x Lysepuffer

PBS ohne Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>; 16,6 g NH<sub>4</sub>Cl; 2,0 g KHCO<sub>3</sub>; 0,744 g Na<sub>2</sub>EDTA auf 200 ml ddH<sub>2</sub>O

### PBS

ohne Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> für die Zellkultur

### Waschmedium

RPMI 1640

### Medium für die Kultivierung von T-Zellen

RPMI 1640, 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 50 µM β-Mercaptoethanol

### Kulturmedium für das pc61 Hybridom

RPMI 1640, 5% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Glutamin, 1% Natriumpyruvat, 1% Pen/Strep, 50µM β-Mercaptoethanol

### Einfriermedium

FCS, 20% DMSO

### MACS-Puffer

PBS ohne Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>, 0,25% BSA, 5 mM EDTA steril filtriert

### FACS Puffer (für Einzelzellsuspensionen)

PBS ohne Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>, 2% FCS, 0,2% NaN<sub>3</sub>, pH 8

### FACS Blutpuffer (für Vollblut)

FACS Puffer mit 10 U/ml Heparin

Material und Methoden

### Assay Diluent für ELISA

1 x PBS, 0,5% BSA

### Waschpuffer für ELISA

1 x PBS, 0,025% Tween20

### Fixierung für immunhistochemische Präparate

Zinc fixative, BD

### Blocklösung für die Immunhistochemie

PBS, 10% Ziegen Serum, 2% BSA, 0.05% Tween 20

### Waschpuffer für die Immunhistochemie

PBS, 2% BSA, 0.05% Tween 20

## **II.7 Mäuse**

Für die tierexperimentellen Arbeiten wurden folgende Mausstämme im zentralen Tierlabor (ZTL) des DKFZ Heidelberg gehalten:

1. C57Bl/6 Wildtyp-Mäuse (im Weiteren stets C57Bl/6 wt genannt), von Elevage Janvier (Frankreich) bezogen
2. MT-1/ret transgen 304/B6 (genetischer Hintergrund C57BL/6, H2b)

Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von I. Nakashima, Nagoya University, Japan.

## **II.8 Methoden**

### **II.8.1 Typisierung von Ret-tg Mäusen**

#### Primer

β-Actin: 5'- CGG CTA CCA CAT CCA AGG AA -3' (vorwärts)  
5'- GCT GGA ATT ACC GCG GCT -3' (rückwärts)

## Material und Methoden

ret:            5'- ACT CGG GGA GGC GTT C -3'            (vorwärts)  
                  5'- AAA ATG CAG TCA GAT ATG GA- 3'        (rückwärts)

Für die genotypische Typisierung der Ret-tg Mäuse wurde zunächst ein Stück des Schwanzes biopsiert und anschließend in 20 µl Proteinase K Verdau bei 56°C für 3 Stunden inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 300 µl ddH<sub>2</sub>O versetzt, für 3 min bei 99°C inaktiviert und auf Eis gestellt.

Folgende Komponenten wurden in ein Reaktionsgefäß pipettiert:

34,5 µl	destilliertes Wasser
5,0 µl	10 x Puffer
2,0 µl	Primer 5`
2,0 µl	Primer 3`
1,0 µl	dNTP (10 mM)
0,5 µl	Taq DNA Polymerase (5 U/µl)
3,0 µl	DNA

Die polymerase chain reaction (PCR) wurde in 36 Zyklen durchgeführt. Jeder dieser Zyklen umfasste die folgenden Schritte:

1.	95°C	5 min
2.	94°C	1 min
3.	58°C	1 min
4.	72°C	1,5 min
5.	72°C	10 min

Schließlich wurden die Proben bis zur Gelelektrophorese bei 4°C gekühlt.

Für die Gelelektrophorese wurde 1,5 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht, mit 4 µl Ethidiumbromid versetzt und in eine Elektrophorese Gel-Kammer gegossen.

10 µl der PCR-Proben wurden jeweils mit 3 µl 6x Ladepuffer versetzt und zusammen mit einem DNA-Marker auf das Gel aufgetragen. Nach 1h Laufzeit bei 100 V wurde das Gel in einer Gel Fotokammer fotografiert.

Als Kontrollgen für die PCR diene  $\beta$ -Actin, welches am Aufbau des Zytoskeletts beteiligt ist und in allen Zellen im gleichermaßen exprimiert wird. Anhand eines solchen „house-keeping genes“ kann man erkennen, ob sich die Expression des interessierenden Gens verändert.

### **II.8.2 Gelelektrophorese**

1 g Agarose wurde in 100 ml 1 x TAE Puffer in einem Erlenmeyerkolben durch aufkochen in der Mikrowelle gelöst und bei Raumtemperatur etwas abgekühlt. Man fügte 10  $\mu$ l Ethidiumbromid dazu und durchmischte kurz. Die Agaroselösung wurde in eine vorbereitete Gelapparatur gegossen und bis zur vollständigen Aushärtung bei Raumtemperatur stehen gelassen. 10  $\mu$ l des PCR Produktes wurden mit etwa 2  $\mu$ l Ladepuffer auf das Gel geladen und für circa eine Stunde einer Spannung von 100 V ausgesetzt. Als Kontrolle diente der Marker VI (Boehringer Mannheim).

### **II.8.3 Präparation der lymphatischen Organe und der Tumoren aus Ret tg Mäusen**

Die Maus wurde zunächst durch Zervikale Dislokation (Genickbruch) getötet, anschließend fixiert, und das Fell mit 70% Ethanol desinfiziert. Bauch- und Brusthöhle wurden entlang der Linea Alba bis zum Kehlkopf geöffnet. Die mandibularen, axilaren und inguinalen Lymphknoten und die Milz wurden aus dem umliegenden Gewebe gelöst und in einem 15 ml Röhrchen mit Medium auf Eis gelagert. Hauttumore wurden entfernt und in 15ml Röhrchen mit Medium auf Eis gelagert.

Zur Freilegung von Femur und Tibia wurden Haut, Muskeln und Sehnen vom Knochen abgelöst und das Bein aus dem Hüftgelenk gelöst. Die blanken Knochen wurden in einem 15ml Röhrchen mit Medium auf Eis gelagert.

### **II.8.4 Herstellen einer Einzelzellsuspension**

Je nachdem, ob die Zellen kultiviert werden sollten oder direkt in einem Versuch verwendet wurden, wurde die Präparation unter der Sterilbank oder unsteril auf der Werkbank durchgeführt.

#### **II.8.4.1 Milz**

Zunächst wurde eine Petrischale mit 8-10ml kaltem Medium gefüllt und ein quadratisches Metallsieb, das zuvor mit 80% Ethanol abgespült und abgeflammt wurde, hineingelegt. Die Milz wurde auf das Metallsieb gelegt und mit dem Kolben einer 5ml Spritze zerdrückt. Anschließend wurde die Milzzell-Suspension in ein 15ml Falconröhrchen überführt und bei 1300 rpm und 4°C 6 min zentrifugiert. Das Zellpellets wurde in 1ml Lysepuffer resuspendiert und 10 min bei RT inkubiert, wodurch selektiv Erythrozyten lysiert wurden. Die Erylyse wurde

durch Zugabe von 10ml Medium gestoppt. Daraufhin wurden die Zellen zweimal gewaschen (Zentrifugation 6 min, 1300rpm; 4°C), in 10ml Medium resuspendiert und gezählt.

#### **II.8.4.2 Lymphknoten**

Die Lymphknoten wurden in eine mit 8-10 ml kaltem Medium gefüllte Petrischale überführt und zwischen 2 Objektträgern zerrieben. Die entstandene Zellsuspension wurde daraufhin in ein 15ml Falconröhrchen überführt und gewaschen (Zentrifugation, 6 min, 1300rpm, 4°C). Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 5 ml Medium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

#### **II.8.4.3 Knochenmark**

Die Knochen wurde an beiden Enden aufgeschnitten und das Knochenmark unter Verwendung einer 0,45 mm Kanüle mit eiskaltem PBS ausgespült. Die Zellsuspension wurde in einem 15ml Falconröhrchen aufgefangen. Nach einmaligem Waschen (6 min, 1300rpm, 4°C) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1ml Lysepuffer resuspendiert. Die Lyse wurde nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur durch Zugabe von 10ml Medium (RPMI 1640; 10% FCS; 0,1% Pen/Strep) gestoppt, die Zellen zweimal gewaschen und anschließend in 10ml Medium resuspendiert.

#### **II.8.4.4 Blut**

Den zu untersuchenden Tieren wurde nach Erwärmen unter einer Rotlichtlampe aus der Schwanzvene etwas Blut entnommen, das direkt in heparinhaltigen FACS-Puffer überführt wurde, um die Blutgerinnung zu vermeiden. Die Erythrozyten wurden durch Erylyse eliminiert und das entstandene Zellpellet in normalem FACS-Puffer resuspendiert.

#### **II.8.4.5 Tumor**

Die Tumoren wurden zunächst gewogen, um das Stadium der Tumorentwicklung zu bestimmen. Anschließend wurde das Gewebe in einer Petrischale mit einem Skalpell zerkleinert und schließlich mit dem Stempel einer 5 ml Spritze durch ein Nylonnetz mit 100 µm Porengröße in ein 50 ml Falconröhrchen gedrückt. Nach einmaligem Waschen (Zentrifugation, 6min, 1300rpm, 4°C) wurde das Zellpellet in 1 ml Lysepuffer resuspendiert und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Erylyse durch Zugabe von 20 ml Medium (RPMI 1640, 10% FKS) gestoppt und die Zellen erneut zweimal gewaschen. Nach dem letzten Waschen wurde das Pellet in 10 ml PBS resuspendiert und die Zellzahl bestimmt.

### **II.8.5 Isolierung humaner Peripherer Blut Lymphozyten aus Vollblut**

Periphere Blutlymphozyten (PBL) wurden aus Vollblut, das den Patienten mit einer mit Heparin vorbeschickten 50 ml Spritze abgenommen wurde, über Dichtegradientenzentrifugation isoliert.

Zur Isolation wurden in 50 ml Falcon Röhren je 15 ml Ficoll Paque™ PLUS (Amersham Biosciences AB, Schweden) vorgelegt und auf Raumtemperatur (RT) erwärmt. Die Spritze wurde am vorderen Ende desinfiziert und aufgedreht. Das Vollblut wurde in einer 200 ml Kulturflasche mit  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  freier PBS im Verhältnis eins zu eins verdünnt und gut durchmischt. Nun überschichtete man das Ficoll im 50 ml Falcon Röhren vorsichtig mit 30 ml der Blut-PBS-Mischung und zentrifugierte 30 min bei 2100 rpm und RT. Die Zentrifuge wurde hierbei nicht gebremst. Die die PBL enthaltende Interphase wurde mit einer 5 ml Einmalpipette vorsichtig abgenommen und in ein frisches 50 ml Falcon Röhren pipettiert. Das Falcon Röhren wurde mit  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  freier PBS aufgefüllt und drei- bis viermal 10 min bei 1100 rpm zentrifugiert, um Rückstände des für Zellen toxischen Ficoll auszuwaschen. Gleichzeitig dienten die Waschschrte dem Entfernen zurückgebliebener Erythrozyten. Anschließend wurden die Zellen in Medium aufgenommen und gezählt.

### **II.8.6 Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus humanem Tumorgewebe**

Primäre kutane Melanome oder deren Metastasen wurden in einer Petrischale mit einem Skalpell zerkleinert und anschließend durch ein Nylonsieb mit 100  $\mu\text{m}$  Porengröße gefiltert. Es wurde mehrmals mit Medium nachgespült. Die Zellen wurden bei 4°C und 1300 rpm 6 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1-3 ml Lysepuffer aufgenommen. Nach circa zehnminütiger Eriyse wurden die Zellen erneut mit Medium gewaschen, anschließend in FACS-Puffer aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Für eine Färbung wurden circa  $5 \times 10^6$  Zellen eingesetzt.

### **II.8.7 Aufreinigung des CD25 spezifischen Antikörpers**

Für die Aufreinigung des anti-CD25.Antikörpers wurde das Hybridom PC61 bis zur Konfluenz expandiert. Der Überstand wurde gesammelt und bei 3500 rpm und 4°C 7 min zentrifugiert, um Zellrückstände zu beseitigen. Anschließend wurde der Überstand mit einer Geschwindigkeit von 4 ml/min über eine Protein-G-Säule geleitet und das Eluat in Fraktionen gesammelt. In allen Fraktionen wurde mit einem Photometer die optische Dichte bei 260 nm gemessen. Fraktionen, deren optische Dichte größer als 0,6 war, wurden mit einem SDS-Gel auf Reinheit überprüft. Die Proteinkonzentration wurde mit einem Bradford Assay bestimmt. Anschließend wurden die Fraktionen über Nacht gegen 1 x PBS dialysiert. Der Antikörper wurde aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Die Protein-G-Säule wurde

nach Gebrauch mit einer Peristaltikpumpe mit 70% Ethanol gereinigt und bei 4°C aufbewahrt.

### **II.8.8 Aufreinigung CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischer T-Zellen mittels magnetischer Zellsortierung (MACS)**

Für die Isolation regulatorischer T-Zellen aus Milz und Lymphknoten wurde die Methode der magnetischen Zellsortierung (Miltenyi Biotec, Deutschland) in zwei Schritten angewandt.

Im ersten Schritt, der negativen Selektion, wird eine Einzelzellsuspension aus Milz und Lymphknoten mit einem Cocktail verschiedener biotinylierter Ratte-anti-Maus-IgG-Antikörper gefärbt. Anschließend wird diese Suspension mit an Streptavidin gekoppelten Microbeads inkubiert und über eine mit magnetischen Partikeln gefüllte Säule geleitet, die sich in einem starken Magnetfeld befindet. Die Microbeads und somit auch die an sie gebundenen Zellen bleiben auf der Säule, während nicht markierte Zellen, in diesem Fall CD4<sup>+</sup> T-Zellen, diese ungehindert passieren. In einem zweiten Schritt, der sogenannten positiven Selektion, werden diese CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit PE-konjugiertem Ratte-anti-Maus CD25-Antikörper gefärbt. Diesem Schritt folgt die Inkubation mit Microbeads, die mit PE spezifischem Ratte-IgG-Antikörper überzogen sind. Das Gemisch wird erneut auf eine Säule im Magnetfeld gegeben. CD25<sup>+</sup> T-Zellen bleiben nun auf der Säule haften, während CD25<sup>-</sup> T-Zellen hindurchfließen. Um die gewünschte Zellpopulation von der Säule zu eluieren, wird diese aus dem Magnetfeld genommen, mit MACS Puffer gefüllt und auf ein 15 ml Falconröhrchen gesetzt. Mit einem Stempel wird der Puffer durch die Säule gedrückt. Durch den hohen Druck und das Fehlen des Magnetfeldes werden die an der Säule haftenden Zellen heruntergespült. Dieser Vorgang wird ein zweites Mal wiederholt, um die Ausbeute der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen zu erhöhen.

Vor Versuchsbeginn wurden alle Materialien im Kühlraum gekühlt. Die zuvor aus Milz und Lymphknoten isolierten Zellen wurden mit 10 µl (pro 10<sup>7</sup> totale Zellen) biotinyliertem Ratte-anti-Maus-IgG-Antikörpern in 40 µl MACS Puffer für 10 min in einem 15 ml Falcon Röhrchen bei 4°C inkubiert. Ohne Waschschrift wurden direkt weitere 30 µl MACS Puffer und 20 µl mit Streptavidin überzogenen Microbeads dazugegeben. Das Gemisch wurde 15 min bei 4°C und langsamer Rotation inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 3-5-ml MACS-Puffer resuspendiert. Während des Waschschriftes wurde eine gekühlte LS-Säule im Magneten platziert und dreimal mit 3 ml MACS Puffer gespült. Anschließend wurde die Zellsuspension aufgetragen. Nachdem das komplette Volumen durch die Säule gelaufen war, wurde mit 3 ml MACS Puffer nachgespült. Die im Durchlauf gesammelten Zellen wurden gewaschen und sogleich in 100 µl MACS Puffer mit 10 µl PE-konjugiertem anti-CD25-Antikörper 10 min bei 4°C inkubiert. Um

ungebundenen Antikörper zu entfernen, wurden die Zellen nach diesem Schritt gewaschen. Das Pellet wurde danach in 100 µl MACS Puffer resuspendiert und mit 20 µl anti-PE-Microbeads 15 min bei 4°C und langsamer Rotation inkubiert. Eine gekühlte MS-Säule wurde währenddessen im Magneten platziert und mit 500 µl MACS Puffer gespült. Nach erneutem Waschen der Zellen wurden diese in 500 µl MACS Puffer aufgenommen und auf die Säule aufgetragen. Nachdem das komplette Volumen die Säule passiert hatte, wurde dreimal mit 500 µl MACS Puffer nachgespült. Nun wurde die Säule aus dem Magnetfeld genommen, auf ein 15 ml Falconröhrchen gesetzt und mit 1 ml MACS Puffer beschickt. Mit einem passenden Kolben wurde die Flüssigkeit durch die Säule gedrückt und mit ihr die Zellen eluiert. Das Eluat wurde erneut über eine MS-Säule gegeben, um die Reinheit der gewonnenen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen zu erhöhen. Als Nebenprodukt dieser Prozedur entstanden CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die in Proliferationsassays als Effektorzellen eingesetzt wurden.

### **II.8.9 Aufreinigung CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg aus Primärtumoren *ret* transgener Mäuse mit dem Zellsortierer**

Als alternative Methode zur Aufreinigung CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg wurde ein Zellsortierer (FACS Diva) benutzt. 10<sup>7</sup> aus *Ret* Tumoren isolierte Zellen wurden mit spezifischen Antikörpern für CD45.2 PerCP-Cy5.5, CD4 FITC und CD25 PE 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS ohne Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> gewaschen, gezählt, in einer Konzentration von etwa 10<sup>7</sup> Zellen/ml in FACS Puffer aufgenommen und bis zum Sortieren auf Eis aufbewahrt. Nach dem Sortieren wurden die Zellen in serumhaltigem Medium auf Eis gelagert, gezählt und so schnell wie möglich weiterverarbeitet.

### **II.8.10 Färbung mit 5-Carboxyfluorescein-Succinimidylester (CFSE)**

Um die Proliferation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen *in vitro* verfolgen zu können, wurden diese mit CFSE markiert, bevor man sie in Kultur nahm. CFSE ist ein fluoreszierender Farbstoff, der intrazellulär irreversibel an Makromoleküle bindet, ohne die Zelle zu schädigen. Bei einer Zellteilung werden Zellbestandteile und somit auch der Farbstoff zwischen Mutter – und Tochterzelle aufgeteilt. Im Durchflusszytometer kann man daher anhand der Intensität des Farbstoffes die Zellteilungen verfolgen.

Zur CFSE-Färbung wurden 5 x 10<sup>6</sup> Zellen in einem 15 ml Falcon Röhrchen in 1 ml IMDM-Kulturmedium ohne FCS aufgenommen und im Verhältnis 1:1000 mit CFSE versetzt. Man inkubierte 10 min bei 37°C im Brutschrank und stoppte die Reaktion mit FCS haltigem Medium. Es wurde zweimal 6 min bei 1300 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in geeignetem Medium aufgenommen.

### **II.8.11 Kultivierung von CD4<sup>+</sup> Effektor T-Zellen mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen**

Nach der Färbung mit CFSE wurden die CD4<sup>+</sup> Effektor T-Zellen in 1 ml pro 10<sup>6</sup> Zellen Kulturmedium aufgenommen. Immer 100 µl (entspricht 10<sup>5</sup> Zellen) wurden in eine Vertiefung einer 96 well plate mit Rundboden pipettiert. Die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen wurden ebenfalls in 1 ml pro 10<sup>6</sup> Zellen Kulturmedium resuspendiert und in den Verhältnissen 1:1, 1:2, 1:4 und 1:10 (Treg:Tcon) zu den Effektor T-Zellen pipettiert.

Für die Stimulation der Zellen erfolgte über den T-Zell-Rezeptor wurden anti-CD3- und anti-CD28-Antikörper in einer Konzentration von je 0,5 µg/ml eingesetzt. Der anti-CD3-Antikörper ist spezifisch für die Epsilon-Kette des CD3-Antigens auf T-Zellen, das mit dem T-Zell-Rezeptor (TCR) assoziiert ist und nach einer Aktivierung für die Signalweiterleitung in die Zelle verantwortlich ist. Der anti-CD28-Antikörper weist Spezifität für das kostimulatorische Antigen CD28 auf T-Zellen, dessen Liganden CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) sind.

Die Zellen wurden 3 Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

### **II.8.12 <sup>3</sup>H Thymidin Inkorporationsassay**

Eine sensitivere Alternative zur Quantifizierung der Proliferation von konventionellen T-Zellen mittels CFSE Messung bietet ein radioaktiver Proliferationsassay mit <sup>3</sup>H-Thymidin. Diese mit radioaktivem Wasserstoff markierte Nukleinsäure wird von lebenden Zellen aus dem Kulturmedium aufgenommen und in die DNA eingebaut. Je häufiger sich eine Zelle teilt, desto mehr radioaktiv markiertes Thymidin baut sie in ihre DNA ein. Es wurden wiederum 10<sup>5</sup> CD4<sup>+</sup> Tcon in eine Vertiefung einer 96 well plate pipettiert und mit 0,5 µg/ml anti-CD3/anti-CD28-Antikörper stimuliert. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg wurden der Kultur in verschiedenen Konzentrationen zugefügt. Nach 72 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde das Medium in einer Konzentration von 5 µCi/ml mit dem radioaktiv markierten Thymidin versetzt. Nach weiteren 16 h Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden die Zellen mit destilliertem Wasser auf eine Filtermatte aus Fiberglasfasern geerntet, wodurch die Zellen platzen und die DNA freigesetzt wird. Da die Filtermatte nur von Partikeln mit einer Größe von weniger als 1,5 µm passiert werden kann, bleiben intakte DNA-Fragmente auf der Matte hängen. Nach mehrmaligem Waschen wurde die Matte getrocknet und die Radioaktivität mit einem beta-Counter quantifiziert. Als Kontrolle dienten unstimulierte CD4<sup>+</sup> Tcon und stimulierte CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg.

### **II.8.13 Stimulation mit löslichem anti-CD3-Antikörper und bestrahlten „Feederzellen“**

Die Stimulation mit löslichem anti-CD3-Antikörper diente als alternative Methode zur anti-CD3/anti-CD28-Stimulation. Da bei dieser Methode keine Kostimulation durch anti-CD28 gegeben ist, müssen sogenannte „feeder cells“ zugegeben werden, die die Aufgabe der APC

übernehmen. Bei diesen Zellen handelt es sich um Milzzellen einer C57BL/6 Maus, die vor der Kultivierung sublethal mit 60 Gy bestrahlt wurden. Die Bestrahlung hinderte die feeder cells daran, selbst zu proliferieren.

Für die Stimulation wurden in einer 96 well plate mit Rundboden  $10^5$  isolierte CFSE-markierte Zellen pro Vertiefung in 100  $\mu$ l Kulturmedium aufgenommen. Dazu gab man  $10^5$  unmarkierte Milzzellen einer C57BL/6 Maus als „Feeder Cells“ und 0,2  $\mu$ g des löslichen Antikörpers. Anschließend wurde bei 37°C im Brutschrank inkubiert für ein bis vier Tage inkubiert.

#### **II.8.14 Durchflusszytometrie**

Man kann Oberflächenmoleküle auf Zellen nachweisen, indem man sie mit Antikörpern, die gegen ein bestimmtes Epitop dieses Moleküls gerichtet sind, markiert. Diese Antikörper sind in der Regel selbst an einen Fluoreszenzfarbstoff wie zum Beispiel Fluorescein Isothiocyanat (FITC) gekoppelt, oder werden durch einen fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper (Anti-Immunglobulin) gebunden. Die so markierten Zellen lassen sich dann in einem Durchflußzytometer detektieren. Dabei werden die einzelnen Zellen in einer Trägerflüssigkeit einem Laserstrahl ausgesetzt, der Fluoreszenzfarbstoff wird angeregt und das emittierte Licht von Photodetektoren gemessen. Durch die Lichtstreuung erhält man zusätzlich Informationen über die Größe und Granularität der Zellen, die im Vorwärts/Seitwärts Scatter (FSC/SSC) dargestellt werden, was Rückschlüsse auf die Art der Zelle erlaubt.

Färbungen von Zellen aller Art wurden in der Regel unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

$10^6$  Zellen wurden in 100  $\mu$ l FACS Puffer in einem 5 ml Röhrchen resuspendiert und mit 0,5 - 1  $\mu$ g des jeweiligen Antikörpers 20 min auf Eis inkubiert. Nach kurzem Vortexen wurde das Röhrchen mit FACS Puffer aufgefüllt und 6 min bei 1300 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und der Waschvorgang gegebenenfalls wiederholt. Nach dem Färben wurden die Zellen in ca. 500  $\mu$ l FACS Puffer unter Lichtausschluss (Kühlschrank) bis zur Analyse im Durchflußzytometer aufbewahrt. Für die Analyse erst am darauffolgenden Tag statt, wurden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd (PFA) in PBS fixiert.

#### **II.8.15 Intranukleare Färbung von Foxp3**

Um den Transkriptionsfaktor Foxp3 im Nukleus regulatorischer T Zellen nachweisen zu können, mussten die Zellen zunächst permeabilisiert werden. Hierzu diente ein speziell von der Firma eBioscience entwickeltes Permeabilisierungskit (Perm/Wash). Nach vollendeter Färbung der gewünschten Oberflächenmoleküle wurden die Zellen mit FACS Puffer

gewaschen. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 500 µl Fix/Perm Concentrate:Fix/Perm Diluent 1:3 resuspendiert. Nach 1-18 stündiger Inkubation bei 4°C wurden die Zellen bei 1300 rpm und 4°C 6 min zentrifugiert. Währenddessen wurde Foxp3 spezifischer Antikörper in 1 x Perm/Wash Lösung 1:100 verdünnt. Der Überstand wurde von den Zellen abgesaugt und je ein Röhrchen mit 100 µl der Antikörperlösung beschickt. Nach 30 min Inkubation bei 4°C unter Lichtausschluss wurden die Zellen erneut gewaschen, danach in etwa 500 µl 1 x Perm/Wash Lösung resuspendiert und bis zur Durchflusszytometrie bei 4°C gelagert.

### **II.8.16 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)**

Zytokine sind wichtige Indikatoren von verschiedenen T-Zellfunktionen. So schütten zum Beispiel proliferierende Effektor T-Zellen IFN- $\gamma$  aus, ein inflammatorisches Zytokin, welches eine Immunreaktion begünstigt. Anders verhalten sich etwa regulatorische T-Zellen im Falle einer Aktivierung. Sie produzieren immunsuppressive Zytokine, wie IL-10 und TGF- $\beta$ . Bei einem Proliferationsassay sammeln sich diese Zytokine im Kulturüberstand. Dieser kann beim Ernten der Zellen als Nebenprodukt gesammelt und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert werden.

Für einen indirekten ELISA assay wird zunächst ein für das interessierende Zytokin spezifischer monoklonaler Antikörper („capture antibody“) an eine Festphase gekoppelt (MaxiSorp, 96-well Platte). Der Kulturüberstand sowie das gewünschte Zytokin in verschiedenen Konzentrationen zur Erstellung einer Standardkurve werden auf die Platte gegeben. Im Überstand vorhandenes Zytokin bindet nun irreversibel an den „capture antibody“ und kann mit Hilfe eines biotinylierten Detektionsantikörpers nachgewiesen werden. Für den quantitativen Nachweis des Zytokins wird ein Avidin-Enzym-Komplex zugegeben. Avidin ist ein Protein aus Hühnereiweiß, das spezifisch an Biotin bindet. Da je ein Avidinmolekül vier Bindungsstellen für Biotin besitzt, kommt es zu einer Signalverstärkung, was ein Vorteil des indirekten ELISA assays ist. Im Gegensatz hierzu kann beim direkten ELISA assay, bei dem der Detektionsantikörper bereits das Enzym zur Farbreaktion trägt, nur eine Enzymeinheit pro Zytokinmolekül gebunden werden. Als Enzym wird häufig HRP („horse radish peroxidase“) eingesetzt. Durch Inkubation mit einer geeigneten Substratlösung kommt es zum Farbumschlag, der nach Abstoppen in einem ELISA reader photometrisch gemessen und anhand der erstellten Standardkurve quantifiziert werden kann.

Der „capture antibody“ wurde in 1x PBS nach Angaben des Herstellers verdünnt, je 100µl/Well in eine Maxisorp 96-well Platte pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am

folgenden Tag wurde die Antikörperlösung abgekippt und die Platte fünf Mal mit 200µl Waschpuffer/Well gewaschen. Nach einstündigem Blockieren der Wells mit je 200µl „assay diluent“ wurde die Platte erneut fünf Mal gewaschen und anschließend mit 100µl Probe je Well beladen. Parallel dazu wurde je Platte eine Standardreihe mit Konzentrationen von 2000 pg/ml bis 31,3 pg/ml (IFN- $\gamma$ ) oder 200 pg/ml bis 3,1 pg/ml (IL-2) eingesetzt. Nach 2h Inkubation wurden die Wells fünf Mal mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde die Platte für 1h mit 100µl/Well der vorgeschriebenen „Working Detector“ Verdünnung („detection antibody“ + Streptavidin-HRP) inkubiert. Nach siebenmaligem Waschen wurde dann 100µl/Well Substrat (TMB) zugegeben und in der Dunkelheit inkubiert.

Die Enzymreaktion wurde nach 10-20min durch Zugabe von 50µl/Well 1M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> gestoppt und die Platte am ELISA Reader bei 450nm gelesen.

### **II.8.17 „Multiplex protein array assay“ zur Zytokinbestimmung**

Eine neuartige Methode der Zytokin- und Chemokinbestimmung in Zell- und Gewebelysaten oder Kulturüberständen bzw. Seren sind sogenannte Multiplex Assays. Anstatt nur eines einzigen Parameters, wie zum Beispiel bei einem herkömmlichen ELISA Assay, zu messen, ist die zeitgleiche Analyse von bis zu 100 verschiedenen Zytokinen und Chemokinen möglich. Grundlage der Methode sind magnetische Partikel mit einem Durchmesser von 8 µm, die mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen und dem Antikörper gegen ein bestimmtes Zytokin oder Chemokin beschichtet sind. Anhand der verschiedenen Fluoreszenzen auf der Oberfläche dieser Partikel können diese mit zwei Parametern spektralphotometrisch unterschieden werden. Da für jedes messbare Zytokin Partikel mit individueller Fluoreszenzmarkierung erhältlich sind, wird die Messung mehrerer Parameter in einer Probe zur gleichen Zeit möglich. Die Quantifizierung der an die beads gebundenen Zytokinmenge erfolgt anhand eines PE-markierten sekundären Antikörpers.

Um das Zytokinmilieu in Ret Tumoren untersuchen zu können, wurden circa 2 mm<sup>3</sup> große Gewebestücke von Tumoren und Lymphknoten in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Aus dem Gewebe wurden in Anwesenheit des Proteaseinhibitors PMSF Lysate hergestellt. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe eines Bradford Assays bestimmt und anschließend mit Bio-plex Lysepuffer optimalerweise auf 500 µg/ml eingestellt. Zytokin- und Chemokin-konzentrationen in den Lysaten wurden nach Herstellerangaben mit Bio-plex-assays der Firmen Bio-Rad und Millipore bestimmt.

### **II.8.18 Immunhistochemie an Paraffinschnitten**

Die in Zinklösung fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben wurden an einem Mikrotom 3-5 µm dick geschnitten und in einem 42°C warmen Wasserbad zur vollständigen Ausdehnung des Gewebes gelagert. Die Schnitte wurden anschließend auf Objektträger gezogen und in einem Trockenschrank über Nacht bei 60°C getrocknet. Um den Überschuss an Paraffin von den Objektträgern zu entfernen wurden die Schnitte zunächst für 20 min in ein Xylolbad gestellt. Anschließend wurden die Präparate nacheinander in 100%, 96%, 90% und 70% Ethanol und schließlich in destilliertem Wasser für jeweils 5 min inkubiert. Die Schnitte wurden 30 min bei Raumtemperatur mit Blocklösung inkubiert. Nach einmaligem Spülen mit PBS folgte eine einstündige Inkubation mit anti-Maus CD4 als Primärantikörper. Als Sekundärantikörper diente ein biotinylierter Hase anti-Ratte-Antikörper für 30 min bei Raumtemperatur. Als Enzym diente an Streptavidin gekoppelte Peroxidase mit deren Substrat, DAB (3,3-Diaminobenzidin) das Molekül schließlich sichtbar gemacht wurde. Nachdem die Schnitte in PBS gespült worden waren, folgte die Inkubation mit biotinyliertem anti-Foxp3-Antikörper bei Raumtemperatur für 1 h. Es folgte ein Komplex aus Alkalischer Phosphatase und Streptavidin, der schließlich mit dem „substrate kit“ für Alkalische Phosphatase visualisiert wurde. Die Präparate wurden mit Mayer's Hämalaun gegengefärbt, mit Eindeckmedium eingedeckt und mit einem Lichtmikroskop analysiert.

### **II.8.19 Statistik**

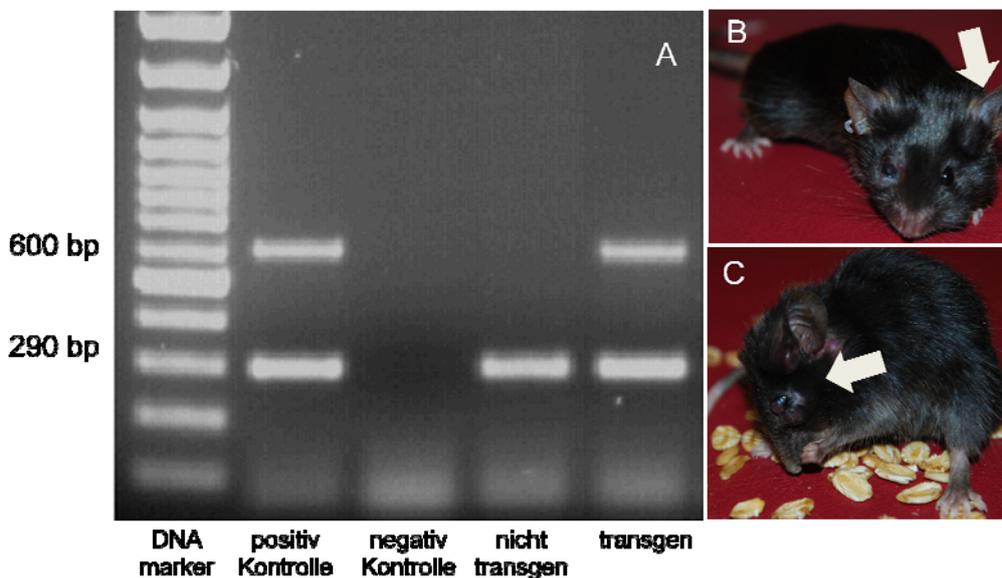
Zur Feststellung der statistischen Signifikanz der Unterschiede in den verschiedenen Gruppen wurden diese anhand eines ungepaarten t-Tests überprüft. P-Werte, die kleiner als 0,05 waren, wurden als statistisch signifikant betrachtet.

### III. ERGEBNISSE

#### III.1 Genotypisierung Ret transgener Mäuse mittels PCR und phänotypische Charakterisierung

Alle aus Verpaarungen mit *ret* transgenen (tg) und C57BL/6 Wildtyp (wt) Mäusen entstandenen heterozygoten Nachkommen wurden in einer PCR mit spezifischen Primern auf die Expression des Ret Gens untersucht. In Abbildung 1 A ist ein typisches Agarosgels als Ergebnis einer solchen Typisierung-PCR gezeigt. Die Bande bei 600 bp entspricht dem Produkt der Ret Primer. Als sogenanntes „house keeping gene“ wurde bei der Typisierung stets  $\beta$ -Aktin, ein Bestandteil des Zytoskeletts, mitgetestet. Das entsprechende PCR-Produkt hat eine Größe von etwa 290 bp.

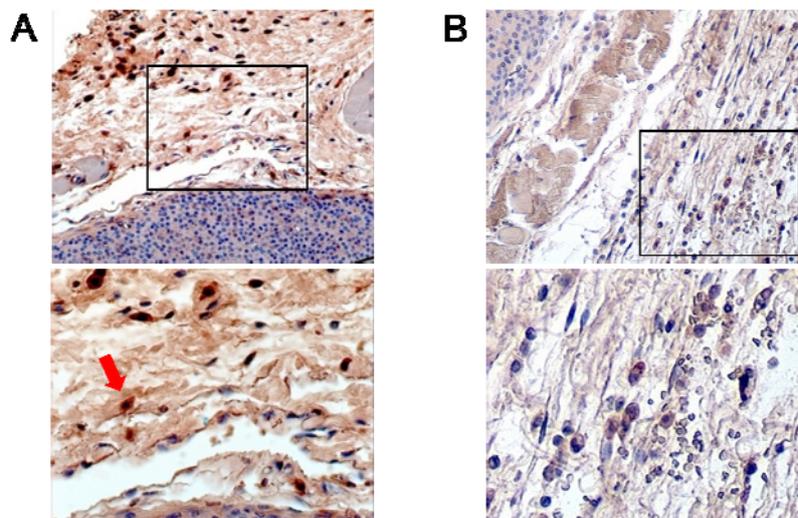
Alle für das Ret Transgen positiv getesteten Tiere wurden regelmäßig nach entstehenden Melanomen untersucht, die sich bei circa 25% aller Tiere nach einer Latenzzeit von 20 – 90 Tagen zuerst meist in der Gesichtsregion um die Augen, Nase und Ohren, und mit fortschreitender Progression auch im Nacken, auf dem Rücken und an der Schwanzwurzel zeigten (Abbildung 1 B, C). Metastasenbildung wurde bei allen tumortragenden Tieren in den Lymphknoten beobachtet. Außerdem metastasierten die Primärtumore in Gehirn, Lunge und Leber.



**Abb. 1:** Die Mäuse wurden mit spezifischen Primern für das Ret-Transgen in einer Typisierungs-PCR auf dessen Expression getestet. Anhand eines DNA Markers wurden in den PCR-Produkten die Gene für Ret (600 bp) und  $\beta$ -Actin (290 bp) als Kontrollgen identifiziert (A). Tumore entwickelten sich bei den transgenen Mäusen zuerst meist im Bereich der Augen (B, C).

### III.2 Nachweis von CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen in Primärtumoren von *ret tg* Mäusen

Um den Nachweis zu erbringen, dass CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg in Ret Tumoren einwandern, wurde in Zinklösung fixiertes und in Paraffin eingebettetes Tumorgewebe in circa 5 µm dicken Schnitten immunhistologisch auf das Vorkommen von CD4<sup>+</sup> und Foxp3<sup>+</sup> Zellen untersucht. In Abbildung 2B ist die Einwanderung von Treg in das Tumorstroma zu erkennen.



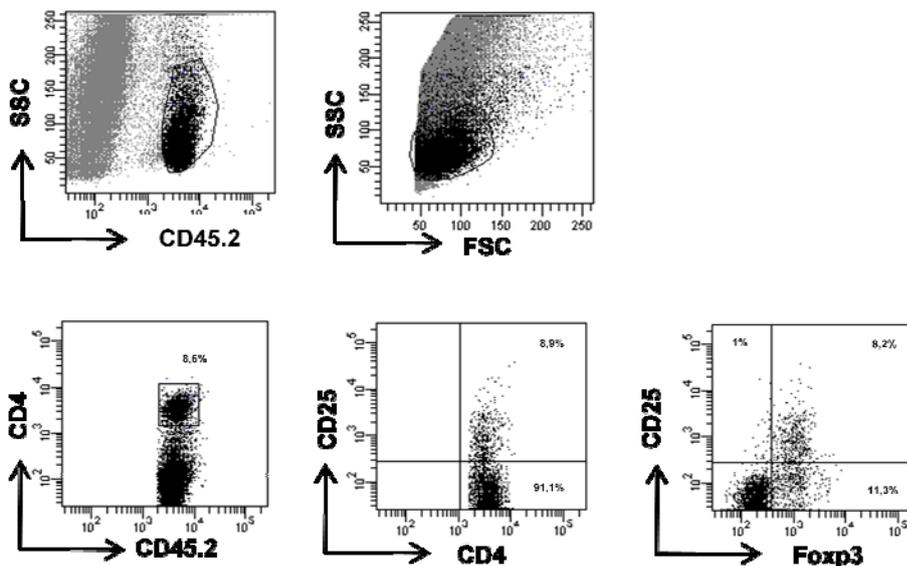
**Abb. 2. Treg infiltrieren Primärmelanome von *ret tg* Mäusen.** Zinkfixiertes, in Paraffin eingebettetes Tumorgewebe wurde 5 µm dick geschnitten und mit spezifischen monoklonalen Antikörpern für CD4 (braun) und Foxp3 (schwarz) immunhistologisch gefärbt (A). Als Kontrolle diente eine Färbung ohne primäre Antikörper (B). Die vergrößerten Ausschnitte in der unteren Zeile sind im jeweiligen Originalbild durch einen Kasten gekennzeichnet.

### III.3 Vorkommen von Treg in Primärtumoren von *ret tg* Mäusen

Um einen Überblick über das Vorkommen regulatorischer T-Zellen in Primärmelanomen im *ret tg* Mausmodell zu bekommen, wurden Einzelzellsuspensionen der isolierten Tumore mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern für CD45.2, CD3, CD4, CD25 und Foxp3 gefärbt und in einem Durchflusszytometer analysiert. Bei der Auswertung der Tumoren wurden zunächst nur die Zellen betrachtet, die CD45.2<sup>+</sup> waren. CD45.2 ist ein auf Leukozyten ubiquitär exprimiertes Molekül und kann daher zur Unterscheidung von Leukozyten und anderen

## Ergebnisse

Zellen, beispielsweise Tumorzellen, dienen. Die CD45.2<sup>+</sup> Population wurde außerdem mittels FSC und SSC auf ihre Größe und Granularität überprüft, was Aufschluss über den Vitalitätszustand der Zellen gab. Schließlich wurde eine Auswahl getroffen, die zu große oder tote Zellen ausschloss. Diese tumorinfiltrierenden Leukozyten machten zwischen 0,3 und 4% der Gesamtzellzahl in einem Tumor aus. Im Weiteren wurde der Anteil der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg innerhalb der CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation betrachtet. Dieser variierte je nach Größe des Tumors zwischen 0,1 und 18,8%. In Abbildung 3 ist ein typisches Beispiel für die Auswertung einer Tumormessung gezeigt.

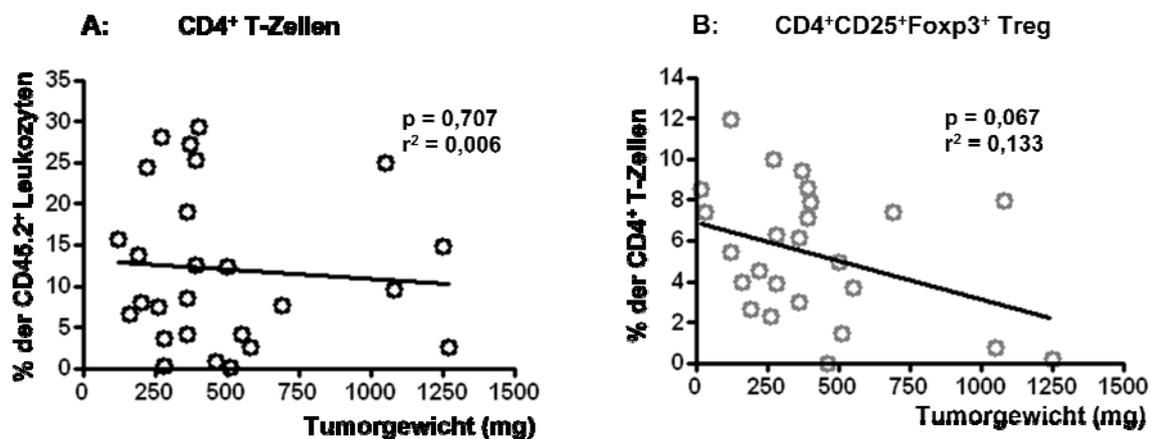


**Abb. 3. Infiltration von Primärtumoren durch Treg.** Einzelzellsuspensionen aus Primärtumoren *ret tg* Mäuse wurden mit den folgenden spezifischen monoklonalen Antikörpern gefärbt: CD45.2-PerCP-Cy5.5, CD4-FITC, CD25-APC und Foxp3-PE. Anschließend wurden die Zellen in einem Durchflusszytometer analysiert. Die Punktdiagramme zeigen den typischen Auswertungsverlauf einer Tumormessung.

Bei verschiedenen Tumorerkrankungen wurde gezeigt, dass die Migration regulatorischer T-Zellen in den Tumor häufig in direktem Zusammenhang mit der Tumorentwicklung und dem daraus resultierenden Krankheitsstadium steht (199-202). Um herauszufinden, ob im *ret tg* Mausmodell ein solcher Zusammenhang besteht, wurden insgesamt 25 Tumore verschiedenen Ursprungs und verschiedener Stadien auf das Vorkommen von Treg

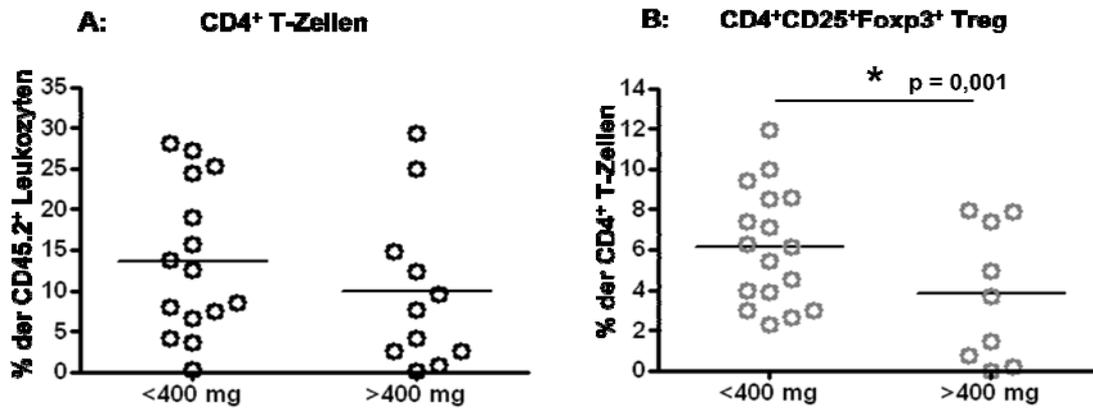
## Ergebnisse

untersucht. Dabei wurde deutlich, dass die Anzahl tumorinfiltrierender Leukozyten (CD45.2<sup>+</sup>) von Tumor zu Tumor stark variierte. Ebenso verhielt es sich mit der Population der CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Abbildung 4A). Bei keiner der beiden Zellpopulationen konnten Korrelationen mit dem Krankheitsstadium, dem Alter und Geschlecht der Mäuse oder der Dauer der Krankheit festgestellt werden. Bei der Betrachtung der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg fiel auf, dass in Tumoren früherer Krankheitsstadien signifikant mehr Treg nachgewiesen werden konnten als in späteren (Abbildung 4B).



**Abb.4: Vorkommen von Treg in Primärtumoren *ret tg* Mäuse.** Einzelzellsuspensionen aus Primärtumoren von *ret tg* Mäusen wurden mit Antikörpern gegen CD45.2, CD4, CD25 und Foxp3 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. (A) Prozentualer Anteil CD4<sup>+</sup> Zellen unter den CD45.2<sup>+</sup> Leukozyten, (B) Anteil CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg innerhalb der CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation der einzelnen Tiere mit Mittelwert.

Hieraus ergab sich die Einteilung *ret tg* tumortragender Tiere in zwei Gruppen bezüglich ihres Krankheitsstadiums. Im Folgenden werden die Stadien *ret tu I* und *ret tu II* betrachtet, deren Unterscheidung anhand des Tumorgewichtes möglich ist. Die Grenze zwischen den beiden Stadien wurde bei einem Gewicht von 400 mg festgelegt. Diese Einteilung ergab sich aus einer gestaffelten Betrachtung der Ergebnisse. So wurden die Tumore zuerst in Gruppen mit einem Gewicht von 0-100 mg, 100-200 mg etc. betrachtet. Dabei fiel auf, dass es bei 400 mg eine signifikante Veränderung im Anteil Foxp3<sup>+</sup> Treg gab, die oberhalb und unterhalb von 400 mg konstant blieb.

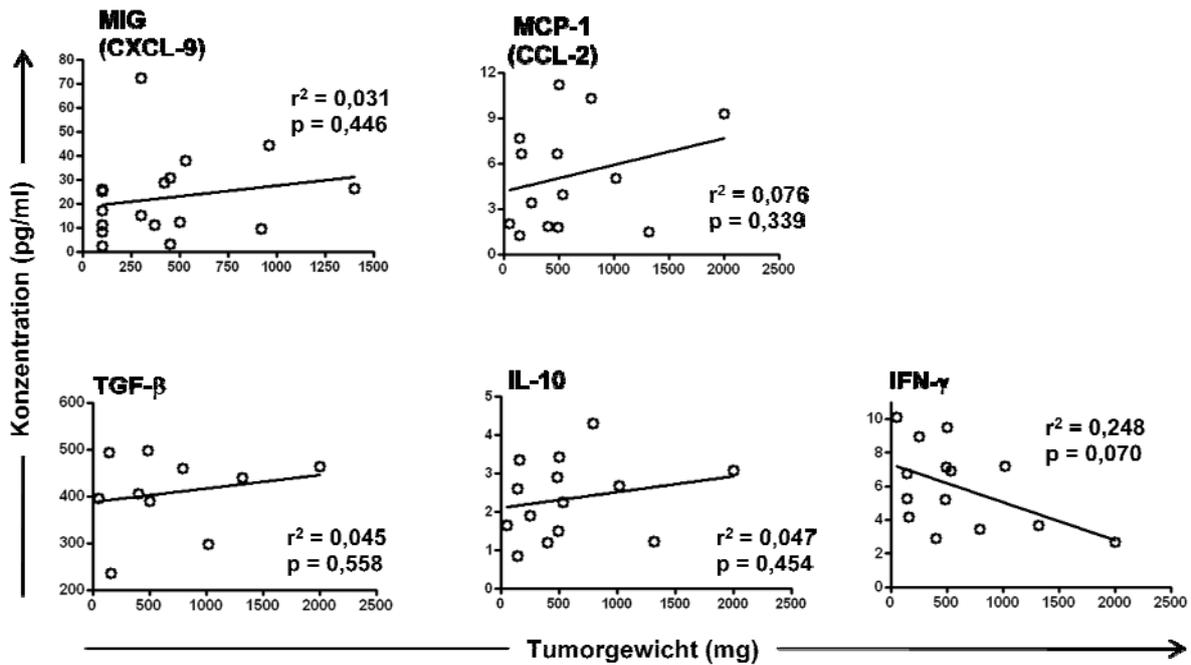


**Abb.5: Vorkommen von Treg in Primärtumoren *ret tg* Mäuse.** Einzelzellsuspensionen aus Primärtumoren von *ret tg* Mäusen wurden mit Antikörpern gegen CD45.2, CD4, CD25 und Foxp3 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die einzelnen Datenpunkte repräsentieren den prozentualen Anteil der CD4<sup>+</sup> Zellen unter den CD45.2<sup>+</sup> Leukozyten (A) oder den Anteil CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg innerhalb der CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation (B) mit Mittelwert.

### III.4 Analyse des lokalen Zytokinmilieus von Primärmelanomen in *ret tg* Mäusen

Um Hinweise darauf zu bekommen, warum Treg in kleineren Primärmelanomen von *ret tg* Mäusen akkumulieren, wurde mittels eines „Multiplex Array Assays“ die Konzentration einiger Zytokine bzw. Chemokine in der Tumorumgebung und in metastasierten bzw. nicht-metastasierten Lymphknoten gemessen, die typisch für T-Zellaktivitäten sind oder bekanntermaßen das Migrationsverhalten von Treg beeinflussen können. Als Indikatoren für T-Zellaktivität dienten IL-10 und TGF- $\beta$  für Treg gegenüber IFN- $\gamma$  für Effektor-T-Zellen. IL-10 und TGF- $\beta$  sind sehr vielseitige immunsupprimierende Zytokine. Sie können auch von Tumorzellen produziert werden, um eine eventuelle lokale Immunantwort zu unterdrücken. Für die Rekrutierung von Treg wurden die Chemokine MIG (CXCL-9) und MCP-1 (CCL-2).

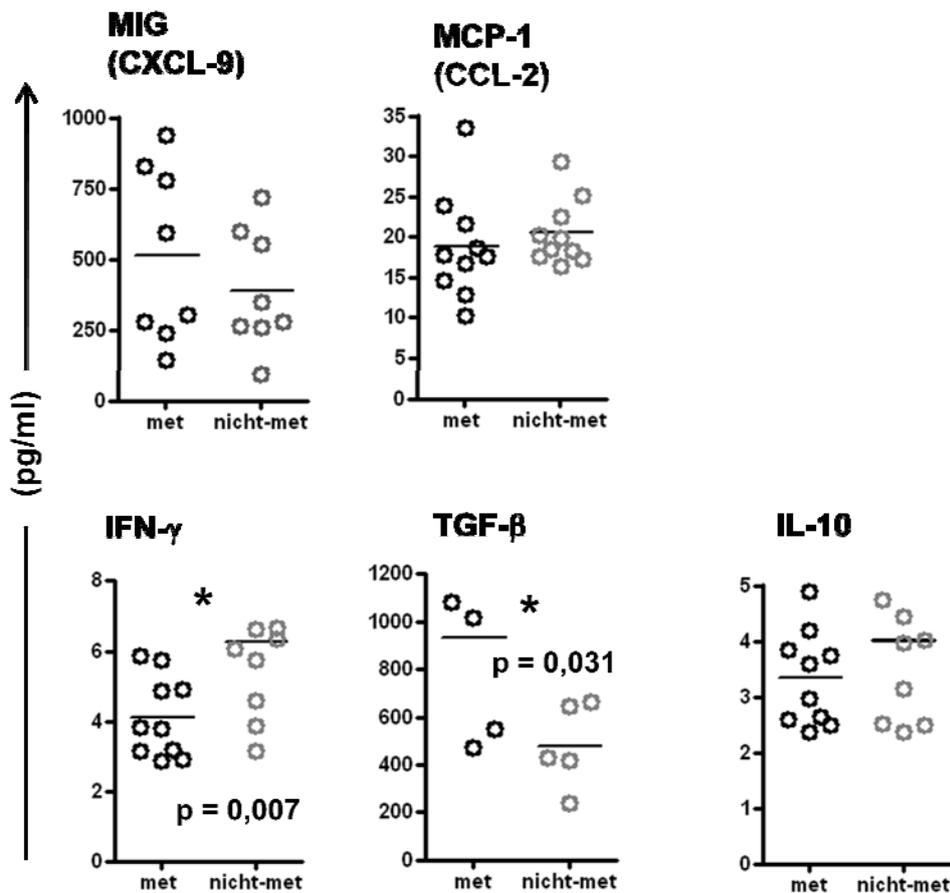
## Ergebnisse



**Abb.6: Vorliegen inhibitorischer und Treg rekrutierender Zytokine und Chemokine in der Tumorumgebung.** Mittels eines Multiplex Array Assay (BioRad) wurden die Konzentrationen der Zytokine TGF- $\beta$ , IL-10 und IFN- $\gamma$ , sowie der Chemokine CXCL-9 und CCL-2 in Lysaten aus Primärtumoren von *ret tg* tumortragenden Mäusen analysiert. Gezeigt sind die Werte der individuellen Tiere als Konzentration in pg/ml in linearer Abhängigkeit zum Tumorgewicht.

Abbildung 6 zeigt die Konzentrationen der einzelnen Zytokine und Chemokine in pg/ml in Abhängigkeit zum Tumorgewicht. Sowohl für die Zytokine TGF- $\beta$  und IL-10, als auch für die Chemokine CXCL-9 und CCL-2 zeigte sich eine leichte Erhöhung der jeweiligen Konzentration in Korrelation zum Tumorgewicht, jedoch keine signifikanten Veränderungen. IFN- $\gamma$  lag in größeren Tumoren tendenziell in höheren Konzentrationen vor, als in kleinen. Auch dieser Trend war jedoch statistisch nicht signifikant.

Da Primärmelanome von *ret tg* tumortragenden Mäusen in Lymphknoten metastasieren, stellte sich die Frage, ob sich Veränderungen im Zytokinmilieu zwischen metastasierten und nicht-metastasierten Lymphknoten abzeichnen würden. Um diese Frage zu klären, wurden Lysate von metastasierten und nicht-metastasierten Lymphknoten von *ret tg* Mäusen mit makroskopischen Tumoren ebenfalls auf das Vorliegen von TGF- $\beta$ , IL-10, IFN- $\gamma$ , CXCL-9 und CCL-2 hin untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 zusammengefasst.



**Abb. 7:** Vorliegen immunsupprimierender Zytokine und Treg rekrutierender und Chemokine in metastasierten und nicht metastasierten Lymphknoten von *ret tg* tumortragenden Mäusen. Mittels eines Multiplex Array Assays (BioRad, Millipore) wurden die Konzentrationen der folgenden Zytokine und Chemokine in Lysaten von metastasierten (met) bzw. nicht-metastasierten (nicht-met) Lymphknoten bestimmt: IL-10, TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , CXCL-9 und CCL-2. Gezeigt sind die Werte der einzelnen Tiere mit Mittelwert in pg/ml.

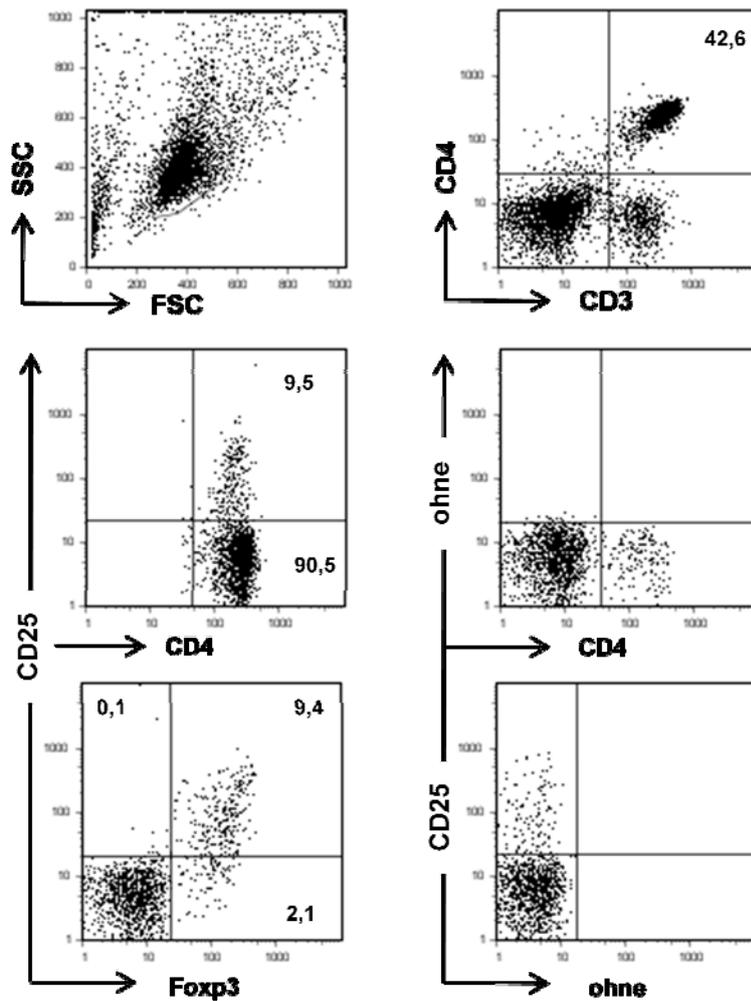
Es zeigte sich, dass TGF- $\beta$  in metastasierten Lymphknoten in signifikant höheren Konzentrationen vorlag, wohingegen die IL-10 Konzentration in metastasierten und nicht-metastasierten Lymphknoten vergleichbar war. Mit dem pro-inflammatorischen Zytokin IFN- $\gamma$  verhielt es sich genau anders herum. Verglichen mit metastasierten Lymphknoten wurden in nicht-metastasierten signifikant höhere Konzentrationen gemessen. Die Chemokine CCL-2

und CXCL-9 wurden in metastasierten und nicht-metastasierten Lymphknoten in vergleichbaren Konzentrationen nachgewiesen (Abbildung 7).

Das lokale Chemokin- und Zytokinmilieu in Tumoren und in metastasierten bzw. nicht-metastasierten Lymphknoten spricht für die Anwesenheit von Treg in diesen Geweben, da Chemokine, die in die Rekrutierung von Treg involviert sind, in messbaren Konzentrationen vorliegen.

### **III.6 Vorkommen regulatorischer T-Zellen in lymphatischen Organen von *ret* transgenen Mäusen**

Um einen Überblick der  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  Treg im gesamten Immunsystem *ret* tg Mäuse zu erlangen, wurden Einzelzellsuspensionen aus den lymphatischen Organen *ret* transgener Tiere mit oder ohne makroskopische Primärmelanome und aus Wildtyp-Tieren durchflusszytometrisch auf das Vorkommen von Treg untersucht. Mit den Einzelzellsuspensionen aus lymphatischen Organen der Mäuse wurde dabei ähnlich verfahren, wie zuvor mit den Primärtumoren. Anstelle von CD45.2 als Leukozytenmarker wurde CD3 zur Identifizierung der gesamten T-Zellpopulation eingesetzt (Abbildung 8). Zunächst wurde mit Hilfe von FSC und SSC die Lymphozytenpopulation ausgewählt. Im Folgenden wurde ebenfalls der prozentuale Anteil  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  Treg innerhalb der  $CD3^+CD4^+$  T-Zellpopulation betrachtet. In Abbildung 8 ist als Beispiel das Ergebnis der durchflusszytometrischen Messung eines peripheren Lymphknotens gezeigt. Zur besseren Unterscheidung zwischen positiver und negativer Population wurde für CD25 und Foxp3 jeweils eine „fluorescence minus one“ (FMO) Kontrolle analysiert. Bei dieser Art von Kontrolle wird eine normale FACS-Färbung ohne den Antikörper gegen das in diesem Fall interessierende Molekül durchgeführt.

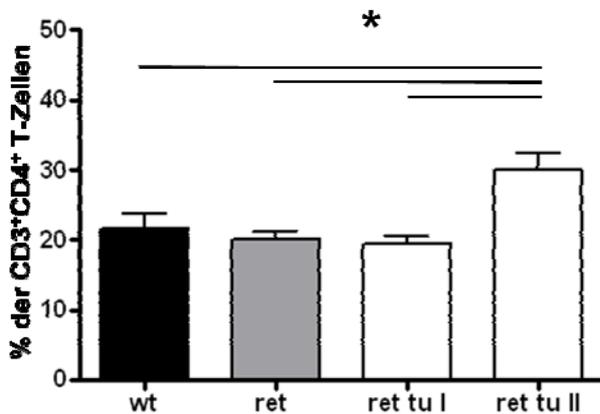


**Abb. 8: Treg in lymphatischen Organen von *ret tg* Mäusen.**

Einzelzellsuspensionen aus Lymphknoten von *ret tg* Mäusen mit und ohne Primärtumore, sowie von *wt* Mäusen wurden mit monoklonalen Antikörpern für CD3, CD4, CD25 und Foxp3 gefärbt und durchflussytometrisch analysiert.

In den Punktdiagrammen ist ein typisches Auswertungsbeispiel einer Färbung im Lymphknoten dokumentiert. Als Kontrolle für die genaue Abgrenzung der negativen Populationen für Foxp3 und CD25 diente jeweils eine FMO Kontrolle.

Im Knochenmark der *ret tg* tumortragenden Tiere variierte der Anteil  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  Treg innerhalb der  $CD4^+$  T-Zellpopulation zwischen 6 und 36%, wobei ein deutlicher Anstieg des Anteils der Treg mit steigendem Tumorgewicht verzeichnet werden konnte (Abbildung 9). Wurden die beiden Stadien *ret tu I* (Tumorgewicht. 0-400 mg) und *ret tu II* (Tumorgewicht > 400 mg), die zuvor bei der Untersuchung von Primärtumoren hinsichtlich des Vorkommens von Treg festgelegt worden waren (Abbildung 5), getrennt voneinander betrachtet, konnten im Knochenmark der Mäuse im Stadium *ret tu II* signifikant mehr Treg nachgewiesen ( $30,1 \pm 2,2\%$ ) werden als in Mäusen im Stadium *ret tu I* ( $19,3 \pm 1,9\%$ ). Dabei war der Anteil der Treg im Knochenmark der Mäuse im Stadium *ret tu I* vergleichbar mit dem von *ret* und *wt* Mäusen (Abbildung 9).

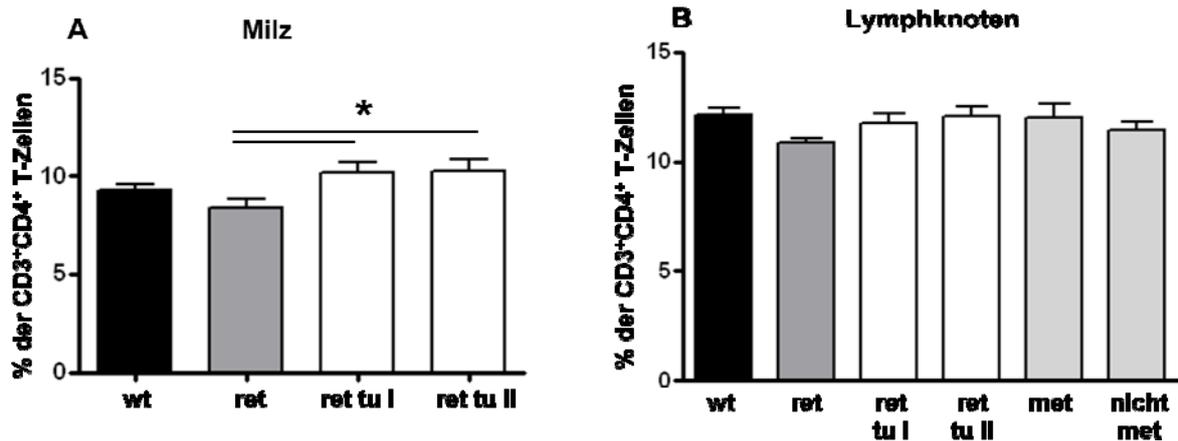


**Abb. 9: Vorkommen von Treg im Knochenmark von *ret* tu Mäusen.**

Einzelzellsuspensionen aus dem Knochenmark von wt, *ret* tg und *ret* tg tumortragenden Mäusen wurden mit monoklonalen Antikörpern spezifisch für CD3, CD4, CD25 und Foxp3 gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Gezeigt ist der prozentuale Anteil der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg an der CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation in den betrachteten Gruppen als Mittelwerte mit Standardfehler. *ret* tu I: <400 mg; *ret* tu II: >400 mg \*: p < 0,05; n = 11-25.

In der Milz der *ret* tg Mäuse mit markoskopischen Primärmelanomen früher Stadien betrug der Anteil der Treg an der CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation  $10,2 \pm 0,6\%$ , was mit den Werten in späteren Stadien ( $10,3 \pm 0,6\%$ ) vergleichbar war. Allerdings machten die Treg in der Milz tumortragender Tiere durchschnittlich einen signifikant höheren prozentualen Anteil der CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus als in tumorfreien ( $8,4 \pm 0,4\%$ ) und Wildtyp Tieren ( $9,3 \pm 0,3\%$ ; Abbildung 10A).

In den peripheren Lymphknoten bewegte sich der Anteil CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg an der CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation bei *ret* tg Mäusen mit makroskopisch sichtbaren Tumoren der Stadien *ret* tu I und II zwischen  $11,8 \pm 0,4\%$  und  $11,6 \pm 0,5\%$ , was sich mit den Werten in den Lymphknoten von tumorfreien ( $10,9 \pm 0,2\%$ ) und Wildtyp-Mäusen ( $12,8 \pm 0,5\%$ ) vergleichen ließ. Da die Möglichkeit bestand, dass die Anzahl der Treg in metastasierten Lymphknoten (*ret* tu met) variierte, wurden diese gesondert untersucht. Allerdings zeigten sich auch hier keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zu nicht-metastasierten Lymphknoten (*ret* tu nicht-met) oder den anderen betrachteten Gruppen (Abbildung 10B).



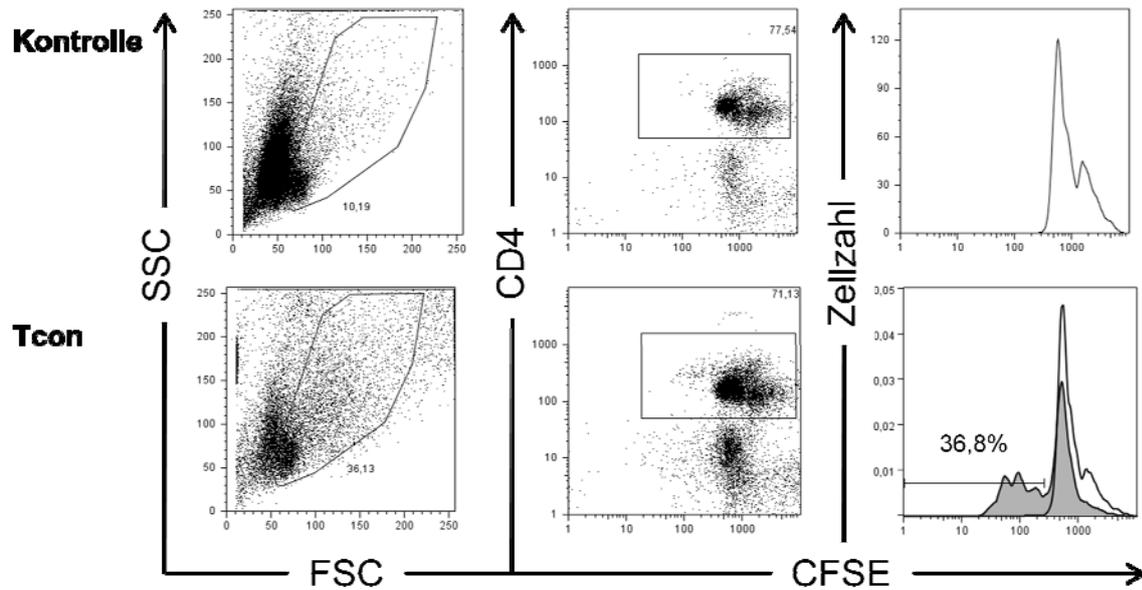
**Abb.10: Vorkommen von Treg in Milz und Lymphknoten von *ret tu* Mäusen.** Einzelzell-suspensionen aus Milz (A) und Lymphknoten (B) von wt, ret tg und *ret tu* Mäusen wurden mit monoklonalen Antikörpern spezifisch für CD3, CD4, CD25 und Foxp3 gefärbt und im Durchflusszytometer untersucht. Gezeigt ist der prozentuale Anteil der Treg an der CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation als Mittelwert mit Standardfehler für die angegebenen Gruppen. \*  $p < 0,05$ ;  $n = 6-21$

### III.7 Inhibitorische Aktivität regulatorischer T-Zellen von *ret* transgenen Mäusen

Um zu überprüfen, ob sich Treg von tumortragenden, tumorfreen und wildtyp Mäusen in ihrem inhibitorischen Potenzial gegenüber konventionellen CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Tcon) unterscheiden, wurde ein Proliferationsassay durchgeführt. Hierbei inkubierte man aus Milz und Lymphknoten von wt Mäusen mittels MACS isolierte CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg mit CD4<sup>+</sup> Tcon in verschiedenen Verhältnissen und stimulierte mit anti-CD3/anti-CD28 „T cell expander beads“. Bei dieser Art der T-Zellstimulation übernehmen die mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 beschichteten „beads“ die Stimulation über den TCR und gleichzeitig die Kostimulation über CD28. Als Positivkontrolle für eine ungebremste T-Zellproliferation diente hierbei die CD4<sup>+</sup> Population, die vor der Kultivierung mit CFSE markiert wurde, um die Zellteilung im Durchflusszytometer sichtbar zu machen. Die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg blieben unmarkiert, weshalb sie von den Tcon unterschieden werden können.

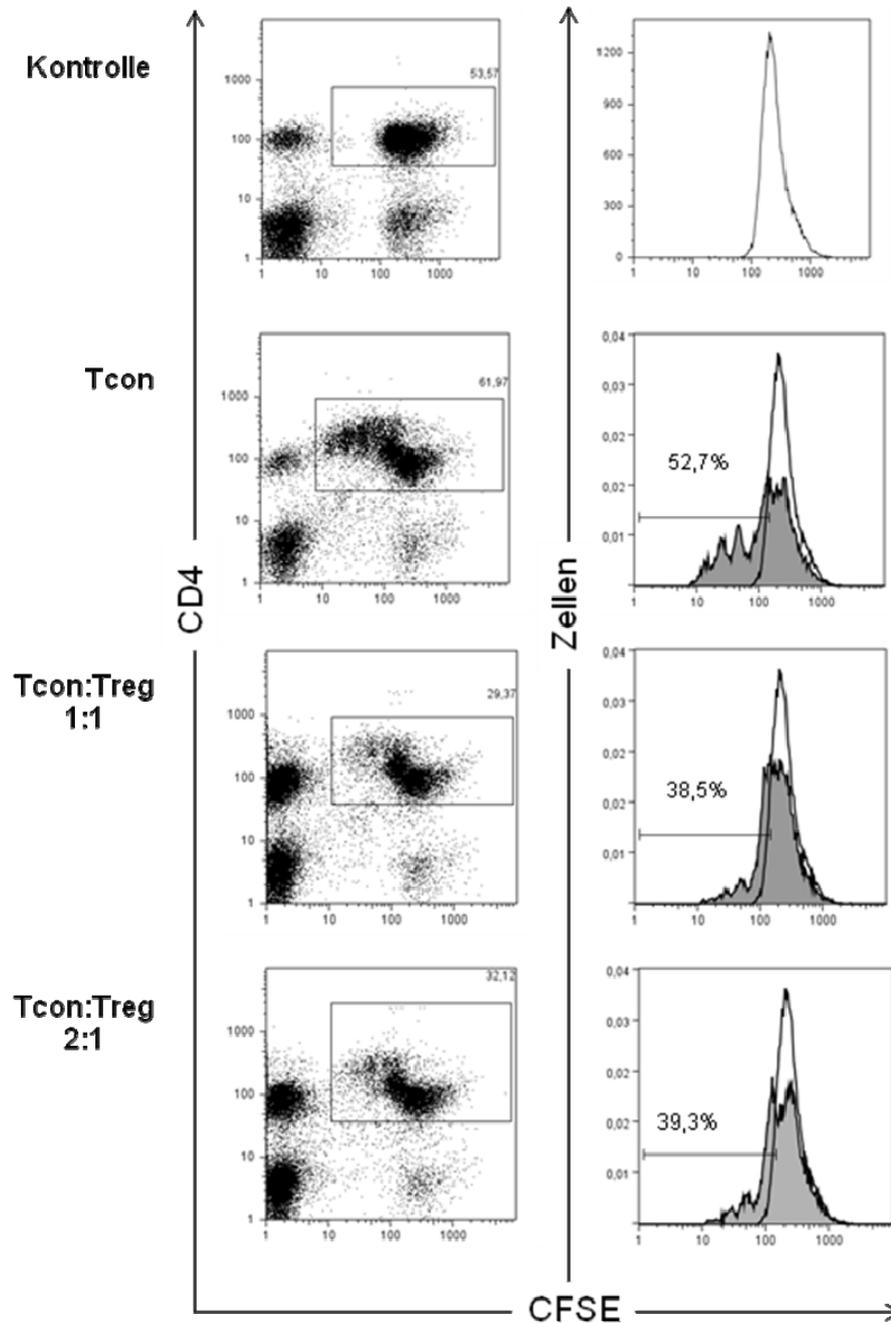
Da die Hauptaufmerksamkeit des Versuches auf der Proliferation CD4<sup>+</sup> Tcon gerichtet war, wurden die Zellen nach der Kultivierung mit anti-CD4-Antikörper angefärbt.

Die Stimulation mit anti-CD3/CD28 T cell expander beads führte zwar zur Proliferation der CD4<sup>+</sup> Tcon, jedoch in weitaus geringerem Maße als erwartet (Abbildung 11). So proliferierten nur 36,8% aller CD4<sup>+</sup> Tcon, wenn sie ohne suppressorische CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg inkubiert wurden.



**Abb.11: Stimulation von CD4<sup>+</sup> Tcon mit T cell expander beads.** Aus Einzelzellsuspensionen aus Milz und Lymphknoten von wt Mäusen wurden mittels MACS Technik CD4<sup>+</sup> Tcon und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg isoliert. Tcon wurden vor der Kultivierung mit CFSE markiert. Die Stimulation über den T-Zellrezeptor erfolgte durch Dynabeads „CD3/CD28 T cell expander beads“, die der Kultur im Verhältnis 1:1 (CD4<sup>+</sup> Tcon:beads) zugegeben wurden. Nach 3 Tagen bei 37°C wurden die Zellen geerntet, mit APC markiertem anti-CD4 Antikörper gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Gezeigt ist die Proliferation CD4<sup>+</sup> Tcon in Prozent aus einem repräsentativen von drei Experimenten.

Da aus der Fachliteratur höhere Werte für die Proliferation CD4<sup>+</sup> Tcon nach Stimulation bekannt sind, wurde angenommen, dass die Aktivierung anti-CD3/anti-CD28 „T cell expander beads“ nicht den gewünschten Effekt auf die CD4<sup>+</sup> Tcon hatte. Um stärkere Zellteilungsaktivität zu induzieren, wurde der Ansatz mit einem anderen Stimulus versucht. Hierzu wurden wieder CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg und CD4<sup>+</sup> Tcon mittels MACS aus der Milz von wt Mäusen separiert. Als Stimulus diente diesmal löslicher anti-CD3 Antikörper, welcher der Kokultur in einer Konzentration von 0,5 µg/ml zugesetzt wurde. Die kostimulatorische Funktion übernahmen in diesem Ansatz sublethal radioaktiv bestrahlte Milzzellen einer wt Maus, die im Verhältnis 1:1 (Tcon:Milzzellen) zugesetzt wurden und als APC dienten. Die vorangehende Bestrahlung verhinderte dabei die Proliferation der in der Milz enthaltenen Lymphozyten.



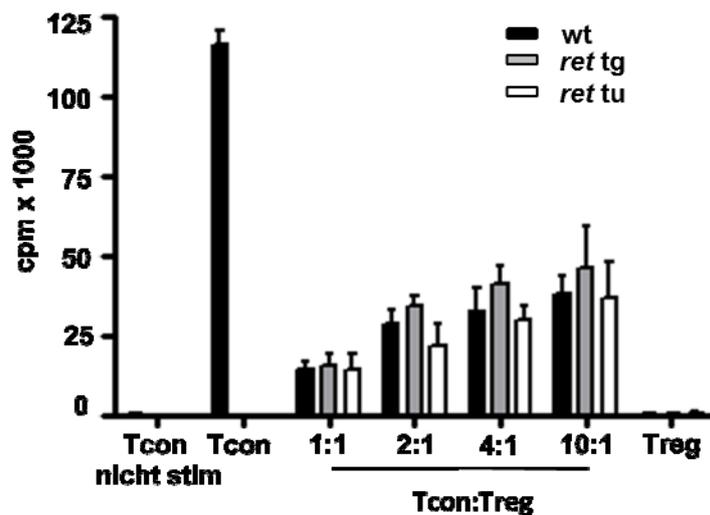
**Abb.12: Proliferationsassay mit CD4<sup>+</sup> Tcon und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg mit bestrahlten „feeder“ Zellen.** Aus Einzelzellensuspensionen von Milz und Lymphknoten von wt Mäusen wurden mittels MACS Technik CD4<sup>+</sup> Tcon und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg isoliert. Tcon wurden vor der Kultivierung mit Treg mit CFSE markiert. Die Zellen wurden in den angegebenen Mischungsverhältnissen kultiviert. Die T-Zellrezeptorstimulation erfolgte durch 0,5 µg/ml löslichen anti-CD3 Antikörper und sublethal bestrahlte antigen präsentierende Zellen, die der Kultur im Verhältnis Tcon:APC = 1:1 zugegeben wurden. Nach drei Tagen bei 37°C wurden die Zellen geerntet, mit APC markiertem anti-CD4 Antikörper gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Gezeigt ist die Proliferation CD4<sup>+</sup> T-Zellen allein oder in Ko-Kultur mit Treg in Prozent von einem repräsentativen Experiment von drei.

## Ergebnisse

Da weder die bestrahlten APC, noch  $CD4^+CD25^+$  Treg vor der Kultivierung mit CFSE markiert wurden, konnte man beide Zellpopulationen wieder eindeutig im Durchflusszytometer von den Tcon unterscheiden. Mit löslichem anti-CD3-Antikörper als Stimulus und den bestrahlten Milzzellen als APC konnte die Proliferation der  $CD4^+$  Tcon im Gegensatz zur Stimulation mit „T cell expander beads“ deutlich erhöht werden (52,7 im Vergleich zu 36,8%). Dies deutet auf die deutlich physiologischere Situation dieses Ansatzes hin (Abbildung 12). Bei Koinkubation der Tcon mit Treg im Verhältnis 1:1 oder 1:2 (Treg:Tcon) konnte die Proliferation zwar fast um 50% gehemmt werden, jedoch blieb die vermutete Zunahme der Proliferation bei abnehmender Treg Anzahl aus (Abbildung 12).

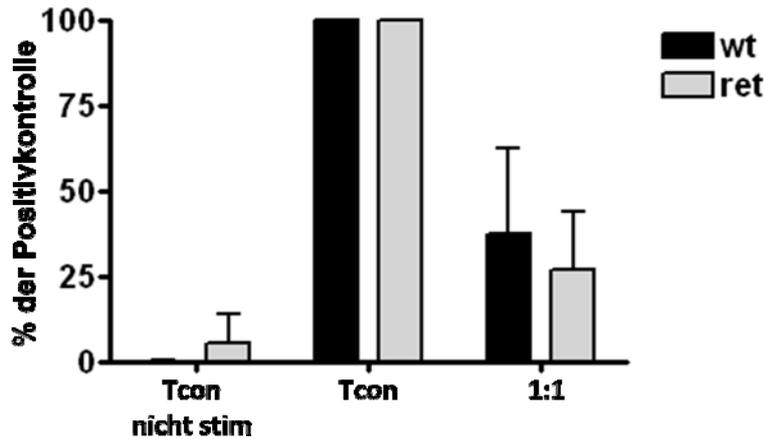
Eine weitere Meßmethode für die Proliferation von Zellen ist die Quantifizierung der Inkorporation von radioaktiv markiertem Thymidin.  $^3H$ -Thymidin wird dem Kulturmedium zugesetzt und von sich teilenden Zellen in ihre DNA eingebaut. Anhand der abgegebenen Strahlung kann die Menge des eingebauten  $^3H$ -Thymidins mit einem „Counter“ quantifiziert werden. Diese „counts“ dienen bei dieser Methode als Maß für die T-Zellproliferation. Tcon wurden, wie in den beiden vorangegangenen Beispielen in den Mischverhältnissen Tcon:Treg = 1:1, 2:1 und zusätzlich noch 4:1 drei Tage bei 37°C inkubiert. Die Stimulation der Tcon erfolgte durch die Zugabe von 0,5 µg/ml anti-CD3 und anti-CD28 Antikörper zum Medium. Als Positivkontrolle dienten stimulierte Tcon. Die Negativkontrolle stellten Tcon ohne stimulierende Antikörper dar. Um sicherzustellen, dass Treg trotz der Stimulation durch CD3 und CD28 nicht proliferierten und so das Versuchsergebnis beeinflussten, wurden als Kontrolle auch Treg alleine mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern inkubiert. Tcon von tumortragenden, tumorfreien und Wildtyp-Mäusen proliferierten als Reaktion auf die Stimulation in vergleichbarem Maße (Abbildung 13). Treg aus Wildtyp-, tumorfreien und tumortragenden Tieren inhibierten diese Proliferation im Verhältnis 1:1 gleichermaßen stark.

In allen drei Gruppen stieg die Aufnahme an  $^3H$ -Thymidin durch die Tcon bei Kokultivierung in den Verhältnissen 2:1 und 4:1 wieder an. Abbildung 13 zeigt ein repräsentatives Experiment. Die Ansätze wurden jeweils in Triplikaten ausgeführt.



**Abb. 13: <sup>3</sup>H-Thymidin-Inkorporationsassay.** Aus Einzelzellsuspensionen aus Milz und Lymphknoten von wt, ret und ret tu Mäusen wurden mittels MACS Technik CD4<sup>+</sup> Tcon und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg isoliert. Je 10<sup>5</sup> Treg von wt, ret und ret tu Mäusen wurden in den angegebenen Mischverhältnissen mit CD4<sup>+</sup> Tcon von wt Mäusen unter Stimulation von je 0,5 µg/ml anti-CD3 und anti-CD28-Antikörper bei 37°C inkubiert. Nach 2 Tagen in Kultur wurden jedem Ansatz 0,5 µCi <sup>3</sup>H-Thymidin zugegeben und für weitere 16-20 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden auf eine Filtermatte geerntet, getrocknet und mit einem Betacounter wurde die Menge an inkorporiertem <sup>3</sup>H-Thymidin quantifiziert. Gezeigt sind die „counts“ der jeweils in Triplikaten durchgeführten Ansätze als Mittelwerte mit Standardfehler für ein repräsentatives Experiment von drei.

Aktiviert, proliferierende Tcon produzieren das inflammatorische Zytokin IFN- $\gamma$ , welches eine Immunantwort begünstigt. Bei der Immunsuppression durch Treg wird auch die IFN- $\gamma$  Produktion unterdrückt. Um das Ausmaß der IFN- $\gamma$  Produktion in den verschiedenen Ansätzen und deren Hemmung durch Treg zu messen, wurden die zuvor gesammelten Kulturüberstände in einem IFN- $\gamma$  ELISA Assay analysiert. Je stärker dabei die Immunsuppression durch die Treg, desto weniger IFN- $\gamma$  ließ sich in den Überständen nachweisen (Abbildung 14).



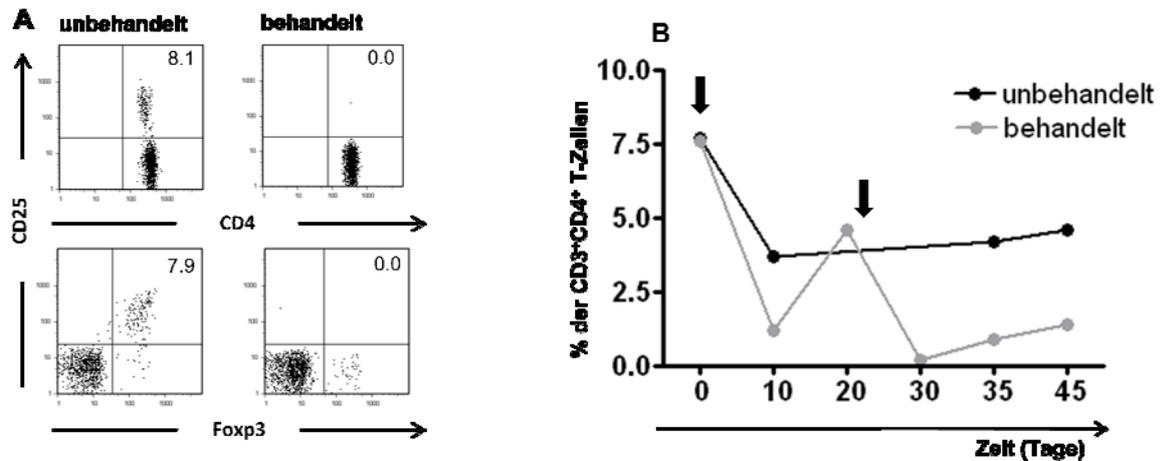
**Abb.14: Inhibition der IFN- $\gamma$  Produktion von Tcon durch Treg.** Kulturüberstände aus den Kokulturen mit Tcon und Treg wurden im IFN- $\gamma$  ELISA analysiert. Gezeigt ist die IFN- $\gamma$ -Produktion der Tcon aus der Ko-Kultur in Prozent der Positivkontrolle (IFN- $\gamma$ -Produktion von stimulierten Tcon).

Die ungehemmte IFN- $\gamma$ -Produktion von CD4<sup>+</sup> Tcon wurde als 100% betrachtet. Diese wurde von Treg aus wt Mäusen um durchschnittlich 63% und von Treg aus ret Mäusen um 74% gehemmt. Die Zytokinmessung aus Überständen der Ko-Kultur mit Treg von *ret* tg tumortragenden Mäusen und CD4<sup>+</sup> Tcon von wt Mäusen konnte aus technischen Gründen nicht durchgeführt werden. Da jedoch die Hemmung der IFN- $\gamma$ -Produktion mit der Inhibition der Proliferation von CD4<sup>+</sup> Tcon korrelierte war anzunehmen, dass Treg von *ret* tg Mäusen mit makroskopischen Tumoren sich ebenso verhielten.

### III.8 Depletion CD25<sup>+</sup> Zellen mit anti-CD25 Antikörpern

In den vorangegangenen Versuchen wurde gezeigt, dass CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg schon in sehr frühen Stadien vermehrt in Primärtumoren von *ret* tg Mäusen akkumulieren. Diese Tatsache implizierte eine Funktion dieser Treg bei der Tumorentstehung. Es stellte sich die Frage, ob eine Depletion der CD25<sup>+</sup> Zellen aus der Peripherie einen Einfluss auf die Tumorprogression oder die Überlebensrate der Mäuse hat.

Hierzu wurde *ret* tg Mäusen im Alter von circa 4 Wochen 400  $\mu$ g des anti-CD25 Antikörpers i.p. verabreicht. Die Depletion der CD25<sup>+</sup> Zellen im Blut wurde durchflusszytometrisch in regelmäßigen Abständen überprüft. Es zeigte sich, dass die Zellen mit der genannten Dosis an Tag 10 nach der ersten Behandlung in der Peripherie fast vollständig depletiert waren (Abbildung 15A). An Tag 20 wurde die nächste Blutuntersuchung durchgeführt, die einen Wiederanstieg der CD25<sup>+</sup> Population ergab. Eine zweite Injektion an Tag 21 führte erneut zur Depletion CD25<sup>+</sup> Zellen (Abbildung 15B).

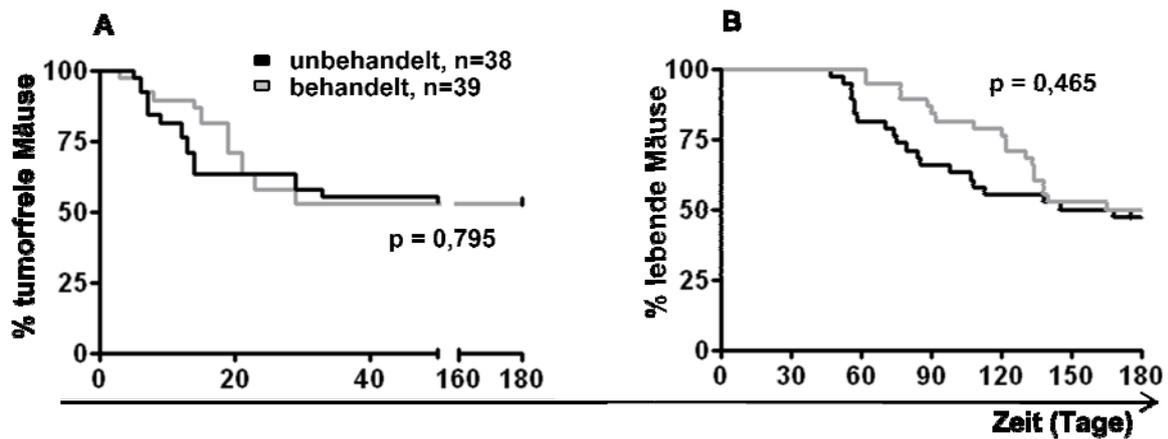


**Abb. 15: Depletion von CD25<sup>+</sup> Zellen in *ret* transgenen Mäusen.** 10 *ret* transgenen Mäusen wurde an Tag 0 und Tag 21 400 µg des anti-CD25 Antikörpers i.p. injiziert. Die daraus resultierende Depletion CD25<sup>+</sup> Zellen wurde mittels FACS Analyse im Vollblut der Mäuse überprüft. Aus der Schwanzvene wurden einige Tropfen Blut entnommen und mit spezifischen Antikörpern für CD3, CD4, CD25 und Foxp3 gefärbt (A). Diese Prozedur wurde alle 5-10 Tage wiederholt. Mit der genannten Dosis des Antikörpers konnte vorübergehend eine totale Depletion der CD25<sup>+</sup> Zellen im Blut erreicht werden (B). Die Pfeile in (B) zeigen den Zeitpunkt der Injektion des Antikörpers an.

Insgesamt wurden drei Experimente nach dem oben genannten Schema durchgeführt und im Nachhinein zusammengefasst, um eine größere Anzahl an Mäusen auf einmal betrachten zu können. Die Mäuse wurden über einen Zeitraum von 180 Tagen beobachtet, was für die Einschätzung eines Effektes der Depletion auf die Tumorentwicklung ausreichend war.

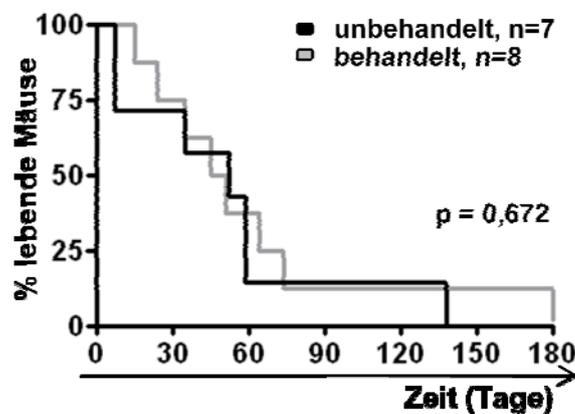
50% aller Mäuse entwickelten in einem Zeitraum von circa 50 Tagen Melanome, wobei in der Kontrollgruppe ebenso viele Tiere erkrankten wie in der behandelten Gruppe (Abbildung 16A). Auch glichen sich die beiden Gruppen bei der Geschwindigkeit der Tumorentstehung. Die Überlebensrate in der behandelten Gruppe deutete zunächst einen positiven Effekt der Depletion an, verschlechterte sich aber nach einiger Zeit rapide (Abbildung 16B).

## Ergebnisse



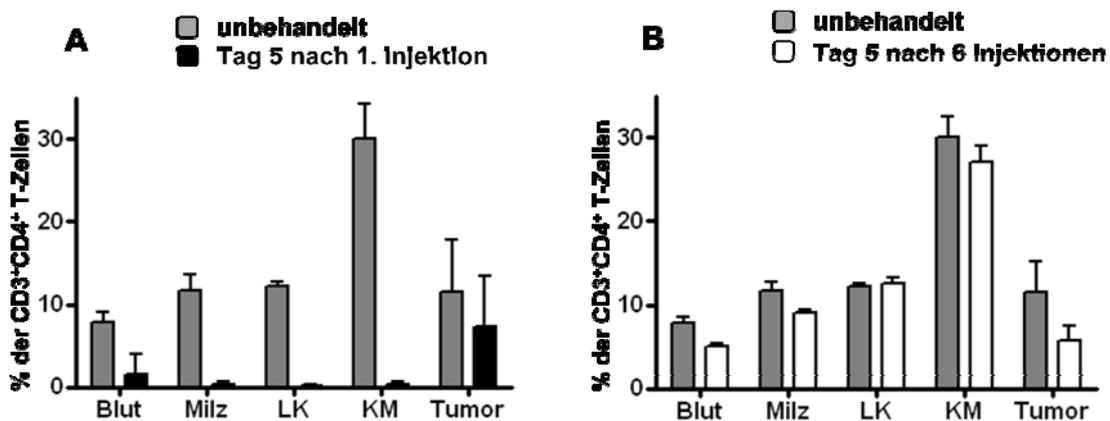
**Abb. 16: Prophylaktische Depletion CD25<sup>+</sup> Zellen.** Alle Tiere wurden über einen Zeitraum von 180 Tagen regelmäßig auf Tumorentstehung und Allgemeinzustand überprüft. Die Abbildung zeigt Kaplan-Meier-Kurven der Tumorentstehung (A) und der Überlebensrate (B) 39 prophylaktisch mit anti-CD25 Antikörper behandelte Tiere. Als Kontrollgruppe dienten 38 mit PBS behandelte Tiere.

Die therapeutische Behandlung mit dem anti-CD25-Antikörper führte tendenziell zu einer höheren Überlebensrate in der behandelten Gruppe (Abbildung 17).



**Abb. 17: Therapeutische Depletion CD25<sup>+</sup> Zellen.** Alle Tiere wurden über einen Zeitraum von 175 Tagen regelmäßig auf Tumorentstehung und Allgemeinzustand überprüft. Die Abbildung zeigt eine Kaplan-Meier-Kurven der Überlebensrate von 8 therapeutisch mit dem anti-CD25 Antikörper behandelte Tieren. Als Kontrollgruppe dienten 7 Tiere, die mit PBS behandelt wurden.

Da die Depletion  $CD25^+$  Zellen aus der Peripherie keinen signifikanten therapeutischen Effekt lieferte, stellte sich die Frage, ob die Therapie auch eine Depletion der  $CD25^+$  Zellen aus den lymphatischen Organen und dem Tumor erwirkte. Dazu wurde fünf *ret tg* Mäusen mit makroskopischen Primärtumoren eine einmalige Dosis von 400  $\mu$ g des anti-CD25-Antikörpers i.p. verabreicht. Fünf Tage nach der Behandlung wurden die Mäuse anästhesiert, durch Herzpunktion das Blut gewonnen und nach Genickbruch Knochenmark, Lymphknoten, Milz und Tumore entnommen. Die Organe wurden im Durchflusszytometer auf das Vorkommen von Treg getestet. Der Versuch zeigte, dass eine Injektion von 400  $\mu$ g des Antikörpers ausreichte, um Treg im Blut, im Knochenmark, in der Milz und in den Lymphknoten fast vollständig zu depletieren (Abbildung 18A).



**Abb.18: Depletion  $CD25^+$  Zellen in Blut, lymphatischen Organen und Tumor von *ret tg* Mäusen.**

Organe und Tumore von fünf *ret tg* Mäusen mit makroskopischen Primärmelanomen wurden an Tag 5 nach der initialen Administration (A) und an Tag 5 nach der 6. Injektion (B) von 400  $\mu$ g anti-CD25 Antikörper i.p. mit spezifischen Antikörpern für CD3 oder CD45.2, CD4, CD25 und Foxp3 gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Als Kontrolle dienten 5 unbehandelte *ret tu* Mäuse (grau). Gezeigt ist der prozentuale Anteil Foxp3<sup>+</sup> Treg an der Gesamt-CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation in den angegebenen Gruppen als Mittelwert mit Standardfehler. LK: Lymphknoten, KM: Knochenmark

Im Gegensatz dazu konnte in Primärtumoren keine Depletion der  $CD25^+$  Zellen erreicht werden (Abbildung 18A). Desweiteren zeigte sich, dass in Mäusen, die bereits mehrere Injektionen des Antikörpers erhalten hatten,  $CD25^+$  Zellen nicht mehr depletiert werden konnten. Dazu wurden fünf *ret tg* tumortragenden Mäusen wöchentlich 400  $\mu$ g anti-CD25 Antikörper i.p. verabreicht. Nach der sechsten Injektion wurden Blut, Organe und Tumor der Tiere durchflusszytometrisch untersucht. In Abbildung 18B ist gezeigt, dass diese Tiere im

## Ergebnisse

Blut, in den lymphatischen Organen und im Tumor mit unbehandelten Tieren vergleichbare Treg-Werte aufwiesen.

Unsere Daten zeigen eine inverse Korrelation der Anzahl tumorinfiltrierender Treg mit der Progression der Primärmelanome im *ret tg* Spontanmelanom-Mausmodell. Schon in Tumoren sehr früher Stadien akkumulierten Treg, was wiederum invers mit der Situation im Knochenmark der Tiere invers korrelierte. In anderen lymphatischen Organen wie der Milz und Lymphknoten lagen Treg in *ret tg* tumortragenden Tieren im Vergleich zu tumorfreien Tieren in größeren Mengen vor, es wurde aber keine stadienabhängige Veränderung der Treg-Population beobachtet.

Die Untersuchung des lokalen Zytokinmilieus in Primärtumoren von *ret tg* Mäusen ergaben, dass sowohl anti-inflammatorische Zytokine wie TGF- $\beta$  und IL-10, als auch die Chemokine CCL-2 und CXCL-9, die die Migration von Treg beeinflussen können, in messbaren Konzentrationen vorlagen. In metastasierten Lymphknoten wurde TGF- $\beta$  in signifikant höheren Konzentrationen gemessen, als in nicht-metastasierten.

Ein *in vitro* Funktionstest der Treg aus *ret tg* Mäusen mit und ohne makroskopische Primärtumore ergab keine signifikanten Veränderungen der inhibitorischen Kapazität der Treg hinsichtlich der Suppression der Proliferation und IFN- $\gamma$ -Produktion von CD4<sup>+</sup> Tcon aus wt Mäusen. Die prophylaktische oder therapeutische Depletion der Treg mittels Administration von anti-CD25-Antikörpern hatte keinen signifikanten Effekt auf die Tumorentwicklung oder die Überlebensrate von *ret tg* Mäusen.

### III.10 Verteilung regulatorischer T-Zellen im peripheren Blut von Melanompatienten

Auch bei der Therapierung des malignen Melanoms wird versucht, durch die Hemmung oder Eliminierung von Treg in der Peripherie von Melanompatienten klinische Effekte zu erzielen. Bislang sind die Erfolge mit immuntherapeutischen Ansätzen nicht ausschlaggebend, weshalb große Anstrengungen unternommen werden, die genaue Rolle der Treg bei der Tumorentstehung – und bei der Entwicklung maligner Melanome insbesondere – zu verstehen. Dabei stießen Fritzsching et al. auf eine interessante Entdeckung (192). Sie stellten durch FACS Analyse mit verschiedenen T-Zellmarkern fest, dass sich Treg im peripheren Blut von Erwachsenen in zwei Gruppen unterteilen lassen. Die Unterscheidung erfolgte anhand des T-Zellmarkers CD45R0, der charakteristisch für Gedächtnis-T-Zellen ist.  $CD4^+CD25^+Foxp3^+CD45R0^+$  Gedächtnis-Treg zeichnen sich zusätzlich durch eine hohe Expressionsrate von CD95 auf der Oberfläche aus, was eine Aussage über ihren Aktivierungsgrad zulässt. CD45R0 low Treg, die als naive Treg bezeichnet werden, exprimieren kaum CD95 auf ihrer Oberfläche, was sie resistent gegen die durch CD95L induzierte Apoptose macht. Die Autoren zeigten nicht nur die Existenz dieser beiden Subpopulationen, sondern auch, dass der Anteil naiver Treg an der Gesamtpopulation mit dem Alter abnimmt, bis schließlich im Alter von 50 – 60 Jahren durchschnittlich nur noch 10% naive Treg vorhanden sind (192).

Um Aufschluss über die Zusammensetzung der Treg Population im peripheren Blut von Melanompatienten zu bekommen, wurden eingefrorene PBMC von insgesamt 33 Patienten aus zwei verschiedenen Therapiestudien mit monoklonalen Antikörpern spezifisch für CD4, CD25, CD45R0, CD95, CD127 und Foxp3 gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Dabei wurden immer PBMC vor und nach einer Behandlungsphase untersucht, um gleichzeitig zur allgemeinen Verteilung auch Informationen über Einflüsse der jeweiligen Therapie auf die Treg-Population zu bekommen.

In Tabelle 1 sind einige klinische Merkmale der Patienten aufgeführt, die an einer immuntherapeutischen Studie mit autologen DC teilgenommen hatten. Dazu wurden aus dem peripheren Blut der Patienten unter GMP-Bedingungen mononukleäre Zellen isoliert. Die DC wurden durch spezifische Stimuli einige Tage im Brutschrank gereift und mit Peptiden von typischen MAA beladen, ehe sie den Patienten mittels einer Infusion wieder zugeführt wurden. Die Patienten erhielten insgesamt drei bis sechs Injektionen ihrer körpereigenen, *in vitro* gereiften und expandierten DC. Die Blutabnahme erfolgte in regelmäßigen Abständen vor, während und nach der Therapie.

## Ergebnisse

Durchflusszytometrische Untersuchungen bezüglich der Treg Populationen wurden mit Blutproben aus dem Zeitraum vor und nach Therapie durchgeführt.

Patient	Geschlecht	Alter	Stadium	Aktueller Status	Überleben nach Therapie
1	M	47	III	AWD	118
2	M	74	IV	†	3
3	M	62	IV	AWD	72
4	M	54	IV	†	42
5	M	17	IV	†	3
6	M	50	IV	†	3
7	M	67	IV	AWD	85
8	M	49	IV	†	21
9	M	62	II	N/A	N/A
10	M	65	IV	†	13
11	M	80	IV	†	41
12	M	60	IV	N/A	80
13	W	47	IV	†	5
14	W	74	IV	†	49
15	W	62	IV	AWD	85
16	W	54	IV	†	37
17	W	17	III	AWD	35
18	W	50	IV	†	6
19	W	67	IV	†	17

**Tab. 1: Klinischer Verlauf und Eigenschaften aller getesteten Patienten aus der Studie mit autologen DC.** AWD: „alive with disease“, M: Männer, W: Frauen, †: verstorben, N/A: Daten nicht vorhanden, Überleben nach Therapie in Monaten

## Ergebnisse

Tabelle 2 zeigt klinische Daten aller untersuchten Patienten, die systemisch mit IFN- $\alpha$  behandelt worden waren. Auch bei dieser Gruppe wurde den Patienten vor und nach Therapie Blut entnommen.

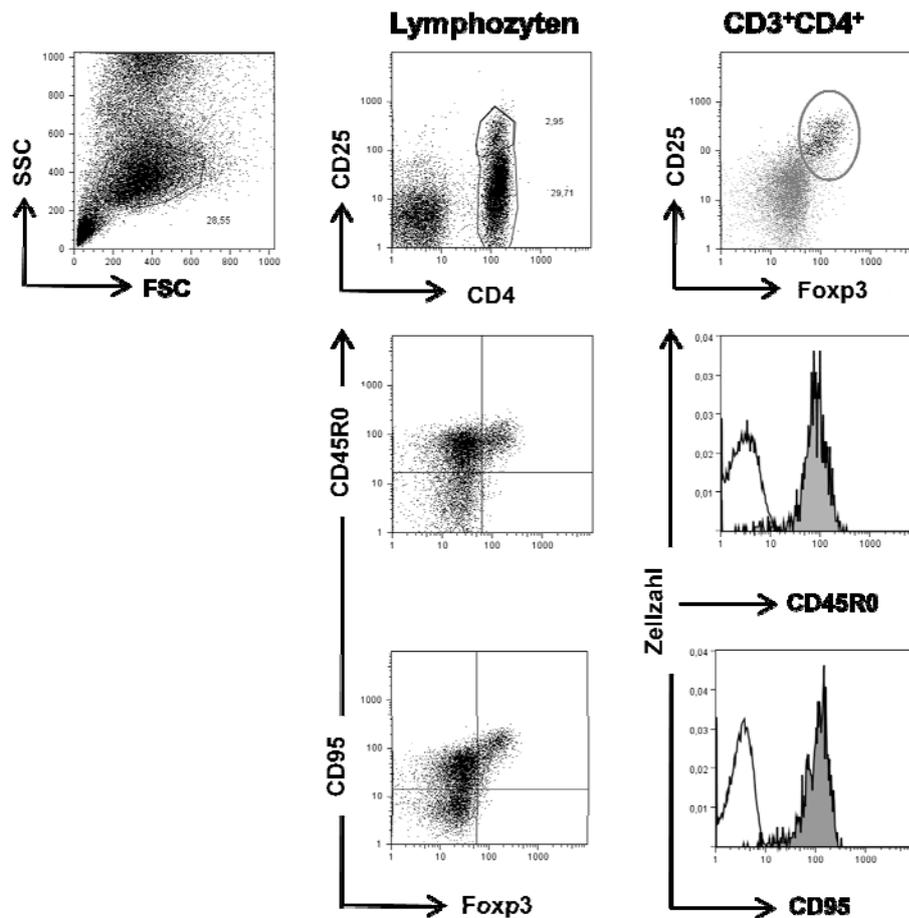
Patient	Geschlecht	Alter	Stadium	aktueller Status	Überleben nach Therapie
1	M	67	II	AWD	83
2	M	33	II B	AWD	64
3	M	28	III	AWD	58
4	M	75	II	AWD	54
5	M	72	II	AWD	46
6	M	70	II	AWD	65
7	M	65	III	AWD	63
8	M	76	II	AWD	57
9	M	69	II	AWD	52
10	M	60	II	†	13
11	W	38	II	AWD	61
12	W	56	II	AWD	66
13	W	72	I	AWD	45
14	W	68	II	AWD	57

**Tab. 2: Klinischer Verlauf und Eigenschaften aller getesteten Patienten mit IFN- $\alpha$ -Therapie.**  
AWD: „alive with disease“, M: Männer, W: Frauen, †: verstorben, N/A: Daten nicht vorhanden,  
Überleben nach Therapie in Monaten

In Abbildung 19 ist ein typisches Auswertungsbeispiel der mit allen Proben vorgenommenen Färbung gezeigt. Zunächst wurden anhand des FSC und SSC nur Zellen ausgewählt, die von der Größe und Granularität mononukleären Zellen entsprechen. Anschließend wurde die

## Ergebnisse

Auswahl auf CD4<sup>+</sup> Zellen innerhalb dieser Population begrenzt. So wurde sichergestellt, dass das Meßergebnis nicht durch Makrophagen verfälscht wurde, die ebenfalls CD4 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Schließlich wurde die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg-Population mit Hilfe von Histogrammen auf die Expression der Moleküle CD45R0 und CD95 hin untersucht.

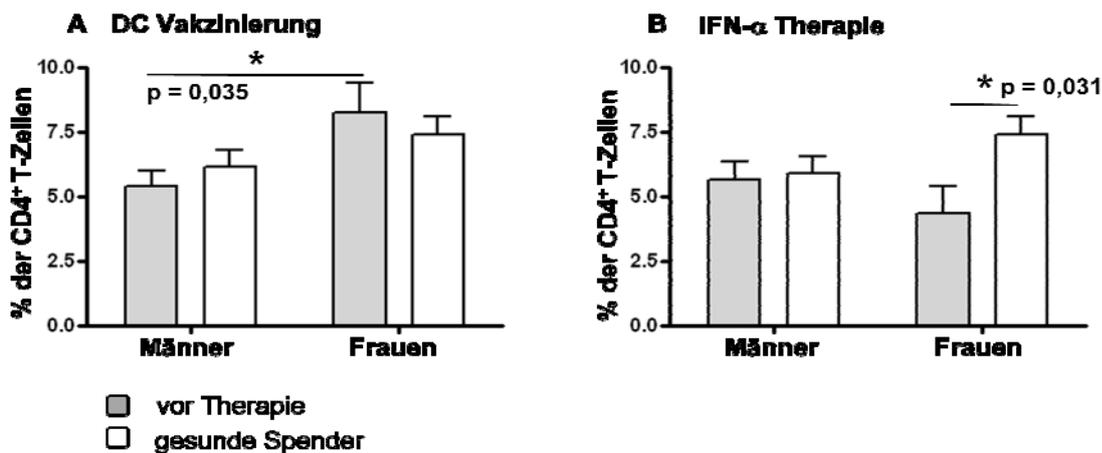


**Abb. 19: FACS Analyse von PBMC von Melanompatienten.** Gefrorene PBMC von Melanompatienten verschiedener Stadien und Therapie wurden mit direkt konjugierten monoklonalen Antikörpern spezifisch für CD4, CD25, CD45R0, CD95, CD127 und Foxp3 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt sind Expression von CD45R0 und CD95 in der gesamten CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation sowie die Expression von CD45R0 und CD95 in der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg Population als Histogramme im Vergleich zur Isotypkontrolle. In der Abbildung ist ein repräsentatives Beispiel dargestellt.

## Ergebnisse

Um einen Überblick über die Verteilung von Treg im peripheren Blut von Melanompatienten verschiedener Stadien zu bekommen, wurden PBMC aller Patienten aus dem Zeitraum vor der jeweiligen Therapie gemessen und mit einer Gruppe gesunder Altersgenossen verglichen.

Bei den Patienten aus der Studie mit DC zeigte sich ein deutlicher Unterschied der Anzahl der Treg zwischen Männern und Frauen vor Beginn der Therapie (Abbildung 20). Bei den weiblichen Patienten betrug der prozentuale Anteil der Treg an der Gesamt-CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation  $8,2 \pm 1,2\%$ , was im Gegensatz zu den männlichen Patienten mit  $5,4 \pm 0,6\%$  signifikant höher war. Diese Beobachtung deckte sich mit den gemessenen Treg-Werten im peripheren Blut der gesunden Spender. In dieser Gruppe wiesen die Frauen mit  $7,4 \pm 0,7\%$  zumindest tendenziell höhere Anteile an Treg auf, als die Männer mit  $6,1 \pm 0,7\%$ . Der Vergleich zwischen Patienten beider Geschlechter mit ihren jeweiligen gesunden Altersgenossen lieferte hingegen keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf den Anteil der Treg im peripheren Blut (Abbildung 20A).

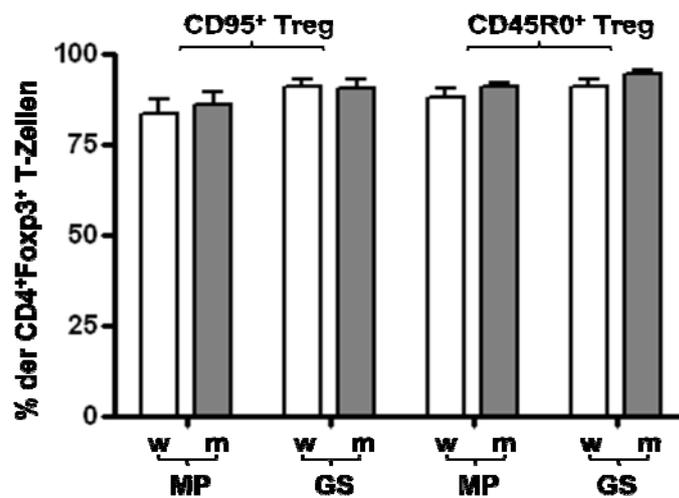


**Abb. 20: Vorkommen CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg im peripheren Blut von Melanompatienten.** PBMC von 13 männlichen und 6 weiblichen Melanompatienten, die an einer klinischen Studie mit autologen peptidbeladenen DC teilgenommen hatten (A) und von 10 männlichen und 4 weiblichen Patienten, die systemisch mit IFN- $\alpha$  behandelt worden waren (B) wurden mit spezifischen Antikörpern für CD3, CD4, CD25 und Foxp3 gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Gezeigt ist der Anteil der Treg an der CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation als Mittelwert der angegebenen Gruppen mit Standardfehler im Vergleich zu einer Gruppe gesunder Altersgenossen (Männer: n = 9, Frauen: n = 6).

Anders verhielt es sich bei den Patienten mit IFN- $\alpha$  Therapie. Hier ergab sich beim Vergleich der weiblichen Patienten, die mit  $4,3 \pm 1,0\%$  eine signifikante Reduktion der Treg innerhalb der CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation im peripheren Blut im Vergleich zu ihren gesunden Altersgenossinnen mit  $7,4 \pm 0,7\%$  (Abbildung 20B).

Frauen schienen nach der ersten Betrachtung der Daten zumindest in der Gruppe der mit DC behandelten Patienten einen signifikant höheren Treg-Anteil an der Gesamt-CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation zu haben, weshalb im Folgenden Männer und Frauen immer getrennt voneinander betrachtet werden.

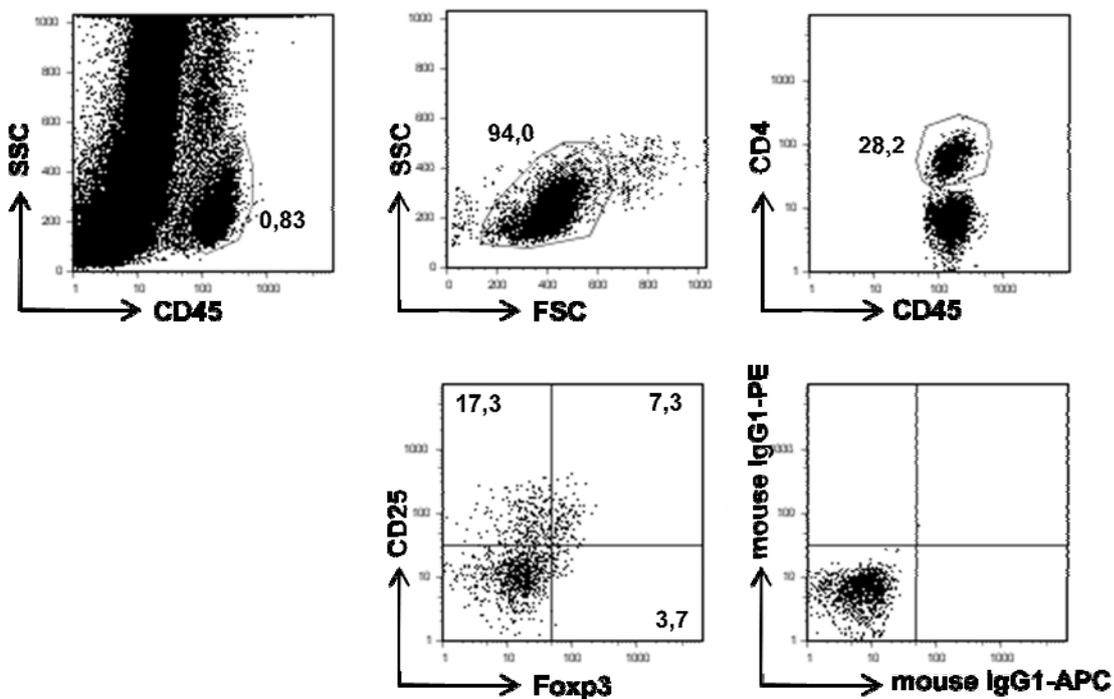
Bei der Betrachtung der Treg hinsichtlich der Expression der Aktivierungsmarker CD95 und CD45R0 fiel auf, dass fast 100% der Zellen auch CD45R0 und CD95 exprimierten, wie in Abbildung 21 für die Patienten beider Behandlungsgruppen im Vergleich zu gesunden Spendern dargestellt ist. Das bedeutet, dass in der Peripherie von Melanompatienten und gesunden Individuen gleichen Alters fast ausschließlich Treg mit Gedächtnis-Phänotyp vorkommen, was wahrscheinlich auf das meist fortgeschrittene Alter der Patienten zurückzuführen ist.



**Abb. 21: Expression des Gedächtnis-Phänotyps von Treg im peripheren Blut von Melanompatienten und gesunden Individuen.** PBMC von 23 männlichen und 10 weiblichen Melanompatienten wurden mit spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen CD3, CD4, CD25, Foxp3, CD45R0 und CD95 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt ist der Anteil der CD95<sup>+</sup> bzw. CD45R0<sup>+</sup> Treg innerhalb der CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg-Population als Mittelwert mit Standardfehler für die angegebenen Gruppen. w: Frauen, m: Männer, MP: Melanompatienten, GS: gesunder Spender.

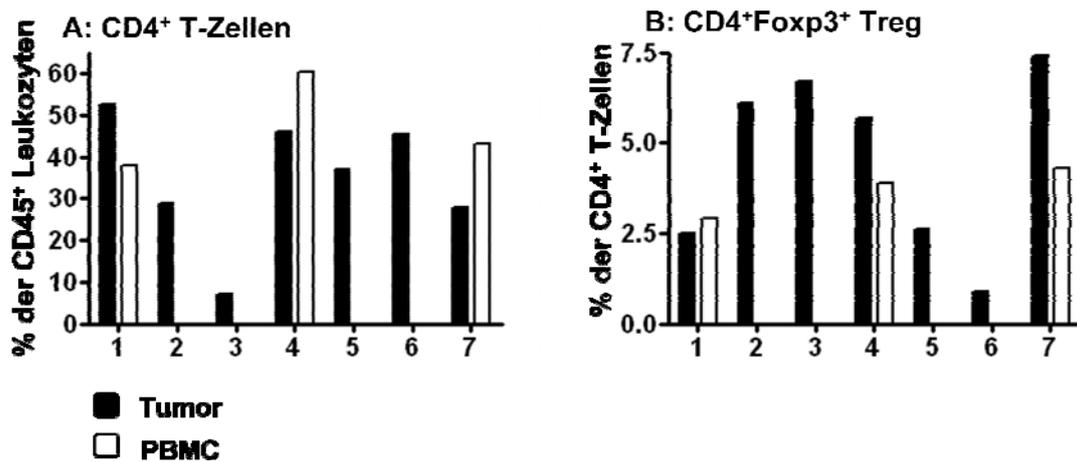
### III.11 Infiltration von Melanom-Metastasen durch Treg

Aus verschiedenen Studien ist bekannt, dass Treg vermehrt Tumore infiltrieren. Dabei geschieht die Infiltration gerade beim malignen Melanom in Abhängigkeit zum Stadium (193). Ihre Funktion in der Tumorumgebung ist bislang noch nicht bekannt, man geht jedoch davon aus, dass tumorinfiltrierende Treg inhibitorisch aktiv sind und eine möglich lokale Immunantwort gegen den Tumor vor Ort unterdrücken. Um die Situation beim malignen Melanom zu evaluieren, wurden Metastasen von Melanompatienten in den Stadien III und IV auf das Vorkommen von Treg untersucht. In Abbildung 22 ist ein Beispiel solch einer Färbung gezeigt.



**Abb. 22: Infiltration von Melanom-Metastasen durch Treg.** Aus Melanom-Metastasen wurde durch mechanische Zerkleinerung und Filtern über ein Nylonsieb mit 100  $\mu\text{m}$  Porengröße eine Einzelzellsuspension hergestellt. Nach dem Lysieren der Erythrozyten wurden die Zellen gezählt und mit direkt konjugierten monoklonalen Antikörpern gegen CD45 als Leukozytenmarker, CD4, CD25 und Foxp3 gefärbt. Gezeigt sind prozentuelle Anteile der jeweiligen Zellpopulationen an der Gesamt-Leukozyten- bzw. CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation. Für die Abgrenzung der positiven Populationen diente eine Isotypkontrolle.

Es wurden insgesamt sieben Primärtumore bzw. Metastasen untersucht. Allerdings konnte nur von drei Patienten gleichzeitig auch Blut abgenommen werden, um die Anzahl der tumorinfiltrierenden  $CD4^+Foxp3^+$  Treg mit der im peripheren Blut vergleichen zu können. Bei zwei von drei Patienten zeigte sich im Vergleich zum peripheren Blut tendenziell eine Akkumulation der Treg im Tumor (Abbildung 23).



**Abb. 23: Infiltration von Melanom-Metastasen durch Treg.** Einzelzellsupensionen aus Tumoren von Melanompatienten und frisch isolierte PBMC wurden mit spezifischen Antikörpern gegen CD45, CD4, CD3, CD25 und Foxp3 gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Gezeigt sind prozentuale Anteile der  $CD4^+$  T-Zellen an der Gesamt-Leukozytenpopulation (A) und der  $CD4^+Foxp3^+$  Treg an der  $CD4^+$  T-Zellpopulation (B) als Vergleich zwischen Tumor von sieben und peripherem Blut von drei untersuchten Melanompatienten.

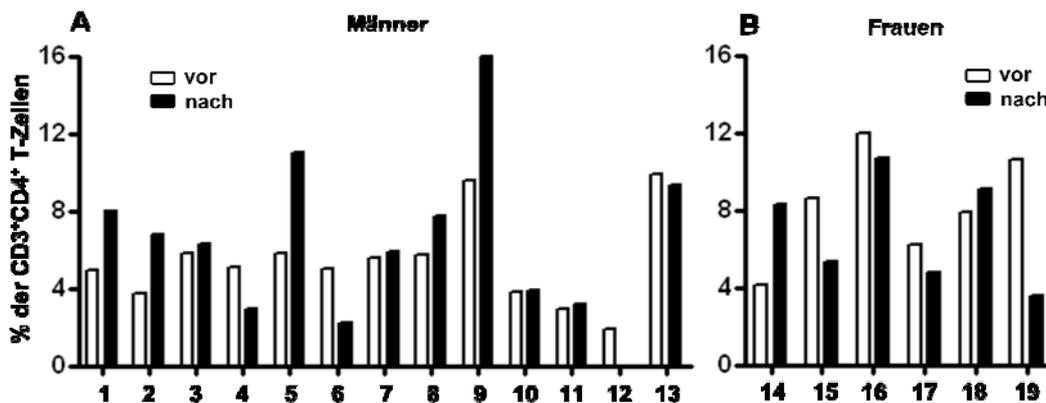
### III.12 Vorkommen von Treg im peripheren Blut von Melanompatienten vor und nach Therapie

Es stellte sich die Frage, ob verschiedene immuntherapeutische Behandlungen Veränderungen innerhalb der Treg-Population im peripheren Blut von Melanompatienten bewirken. Hierzu wurden PBMC von Patienten, die mit autologen peptidbeladenen DC oder systemisch mit  $IFN-\alpha$  behandelt worden waren aus dem Zeitraum vor und nach Therapie hinsichtlich des Vorkommens von Treg durchflusszytometrisch analysiert.

In Abbildung 24 sind die Ergebnisse der einzelnen Patienten und Patientinnen aus der Studie mit autologen peptidbeladenen DC dargestellt.

## Ergebnisse

Bei den männlichen Patienten variierte der Anteil der Treg an der CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation zwischen 1,9 und 9,9% vor und 2,2 und 16,0% nach Therapie. Im peripheren Blut von 5 von 13 Patienten hatte die Therapie mit autologen DC einen Anstieg der Treg im Blut zur Folge. Bei 5 Patienten blieb der Anteil der Treg auf stabilem Niveau und bei 2 Patienten gab es eine Reduzierung der Treg-Anzahl. Bei einem Patient konnte die Anzahl der Treg nach Therapie aus messtechnischen Gründen nicht bestimmt werden. Bei den Frauen lag der Anteil der Treg an der CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation vor Therapie zwischen 4,1 und 12,0% und nach Therapie zwischen 3,6 und 10,7%. Bei zwei Patientinnen kam es nach Therapie zu einem Anstieg und bei 4 Patientinnen zu einer Reduzierung der Treg-Anzahl im peripheren Blut im Vergleich zu der Situation vor Therapie. In Abbildung 25 sind die Ergebnisse der einzelnen Patienten und Patientinnen aus der Studie mit autologen peptidbeladenen DC dargestellt.

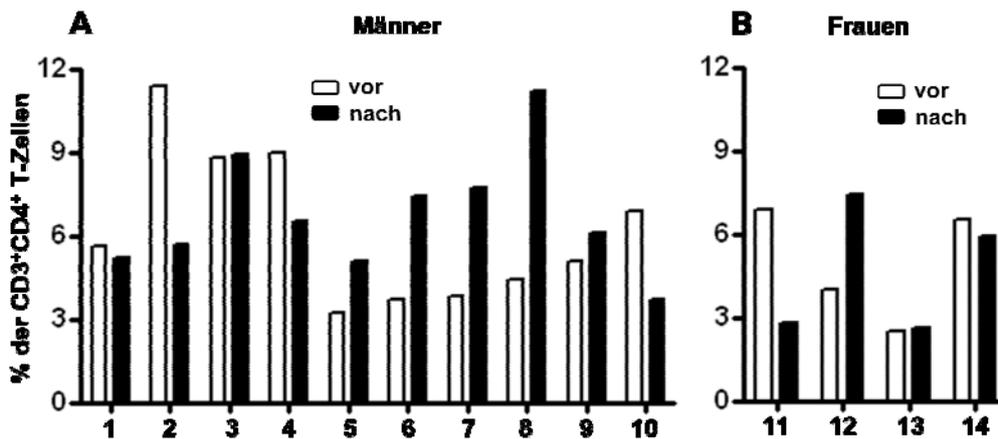


**Abb. 24: Vorkommen von Treg im peripheren Blut von Melanompatienten vor und nach Therapie mit autologen peptidbeladenen DC.** PBMC von 13 männlichen (A) und 6 weiblichen (B) Patienten vor und nach Therapie wurden mit spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen CD3, CD4, CD25 und Foxp3 gefärbt und in einem Durchflusszytometer analysiert. Gezeigt ist der prozentuale Anteil der Foxp3<sup>+</sup> Treg an der Gesamt-CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation im Blut der einzelnen Patienten.

In Abbildung 25 sind die Ergebnisse der einzelnen Patienten und Patientinnen, die systemisch mit IFN- $\alpha$  behandelt worden waren, dargestellt.

In der Patientengruppe, die mit IFN- $\alpha$  behandelt worden war, lag der Treg-Anteil an der CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation vor Therapie zwischen 3,2 und 11,4%, und nach Therapie zwischen 3,7 und 11,2%. Bei 5 der Patienten kam es nach Therapie mit IFN- $\alpha$  zu einem Anstieg der Treg-

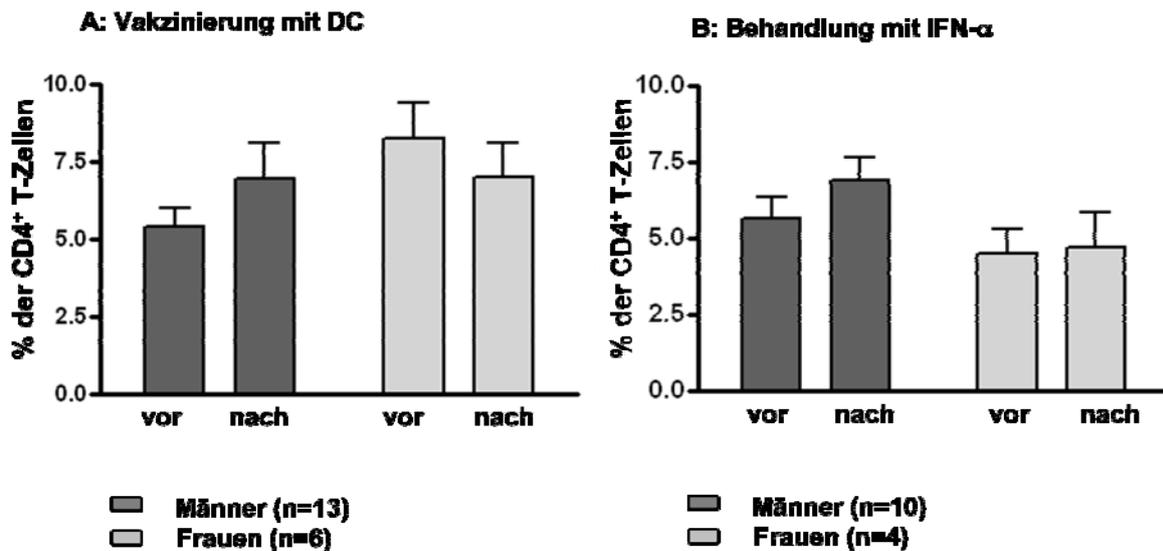
Anzahl, bei 3 zu einem Absinken und bei 2 Patienten blieb der Treg-Anteil im peripheren Blut konstant. Bei den Frauen traten Variationen zwischen 2,5 und 6,9% vor Therapie im Vergleich zu 2,6 und 7,4% nach Therapie auf. Dabei verzeichnete eine Patientin nach Therapie einen Anstieg der Treg-Population, bei 2 Patientinnen reduzierte sich die Treg-Anzahl, und bei einer Patientin blieb der Wert wiederum konstant.



**Abb. 25: Vorkommen von Treg im peripheren Blut von Melanompatienten vor und nach Therapie mit IFN- $\alpha$ .** PBMC von 10 männlichen (A) und 4 weiblichen (B) Patienten vor und nach Therapie wurden mit spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen CD3, CD4, CD25 und Foxp3 gefärbt und in einem Durchflusszytometer analysiert. Gezeigt ist der prozentuale Anteil der Foxp3<sup>+</sup> Treg an der Gesamt-CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation im Blut der einzelnen Patienten.

Die Behandlung mit autologen peptidbeladenen DC hatte bei den männlichen Patienten einen tendenziellen Anstieg des Anteils der Treg an der Gesamt-CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation zur Folge, nämlich von  $5,4 \pm 2,3\%$  vor auf  $6,9 \pm 3,9\%$  nach Therapie ( $p = 0,229$ , Abbildung 26A). Im Vergleich zu den gesunden Individuen mit  $6,3 \pm 1,9\%$  war der Anteil der Treg bei Patienten nach Therapie leicht erhöht. Die Patientinnen dieser Therapiegruppe wiesen mit  $8,2 \pm 2,9\%$  vor Therapie im Vergleich zu  $7,0 \pm 2,8\%$  nach Therapie ( $p = 0,457$ ) leicht erhöhte Treg-Anteile im Blut auf (Abbildung 26A).

Der Treg-Anteil bei Patienten, die mit IFN- $\alpha$  behandelt worden waren lag nach Therapie mit  $4,7 \pm 2,4\%$  an der Gesamt-CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation leicht unterhalb des vor Therapie gemessenen Werts von  $5,1 \pm 2,1\%$  ( $p = 0,836$ , Abbildung 26B). Bei den mit IFN- $\alpha$  behandelten Männern stieg der Anteil der Treg mit  $6,2 \pm 2,7\%$  vor auf  $6,6 \pm 2,2\%$  ( $p = 0,618$ ) nach Therapie an.



**Abb. 26: Vorkommen von Treg im peripheren Blut von Melanopatienten vor und nach Therapie mit IFN- $\alpha$ .** PBMC von 19 mit autologen peptidbeladenen DC vakzinierten (A) und 14 systemisch mit IFN- $\alpha$  behandelten (B) Melanopatienten aus dem Zeitraum vor und nach Therapie wurden mit spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen CD3, CD4, CD25 und Foxp3 gefärbt und in einem Durchflusszytometer analysiert. Gezeigt ist der prozentuale Anteil der Foxp3<sup>+</sup> Treg an der Gesamt-CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation der angegebenen Gruppen als Mittelwerte mit Standardfehler.

Zusammenfassend kann man sagen, dass sowohl die Behandlung mit autologen peptidbeladenen DC, als auch mit IFN- $\alpha$  tendenziell zu einem quantitativen Anstieg der Treg-Population in der Peripherie der Patienten geführt hat.

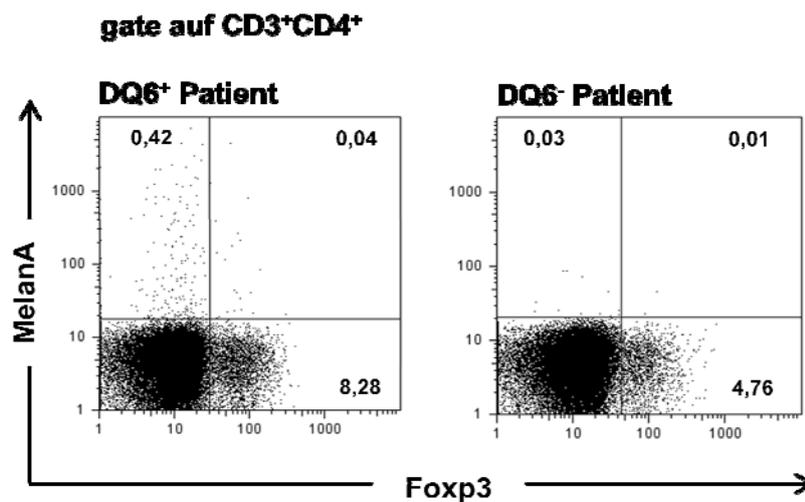
### III.13 Melan-A-spezifische Treg im peripheren Blut von Melanopatienten vor und nach Therapie

Im Folgenden wurde untersucht, ob sich zwischen dem Migrationsverhalten der Treg und auf Melanomzellen exprimierten MAA ein Zusammenhang nachweisen ließ. Ein häufig vorkommendes MAA ist Melan-A, das von fast allen Melanomzellen auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Mit Hilfe von Peptidfragmenten aus Melan-A ist es möglich, Tetramere herzustellen, die antigenspezifische T-Zellen binden können. In diesem Fall handelte es sich um ein PE-gekoppeltes MHC-Klasse-II-Tetramer. Einige der Patienten aus den beiden Behandlungsgruppen mit autologen DC oder IFN- $\alpha$  wurden auf ihren HLA-Typ hin

## Ergebnisse

untersucht. Diejenigen von ihnen, auf deren T-Zellen HLA-DQ6 nachgewiesen wurde, kamen für die folgende Untersuchung in Frage.

Dazu wurden gefrorene PBMC mit monoklonalen Antikörpern gegen CD3, CD4, CD25, Foxp3 und zusätzlich mit dem PE-gekoppelten HLA-DQ6-Melan-A<sub>(25-36)</sub>-Tetramer gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. In Abbildung 27 ist das Ergebnis einer solchen Färbung gezeigt.



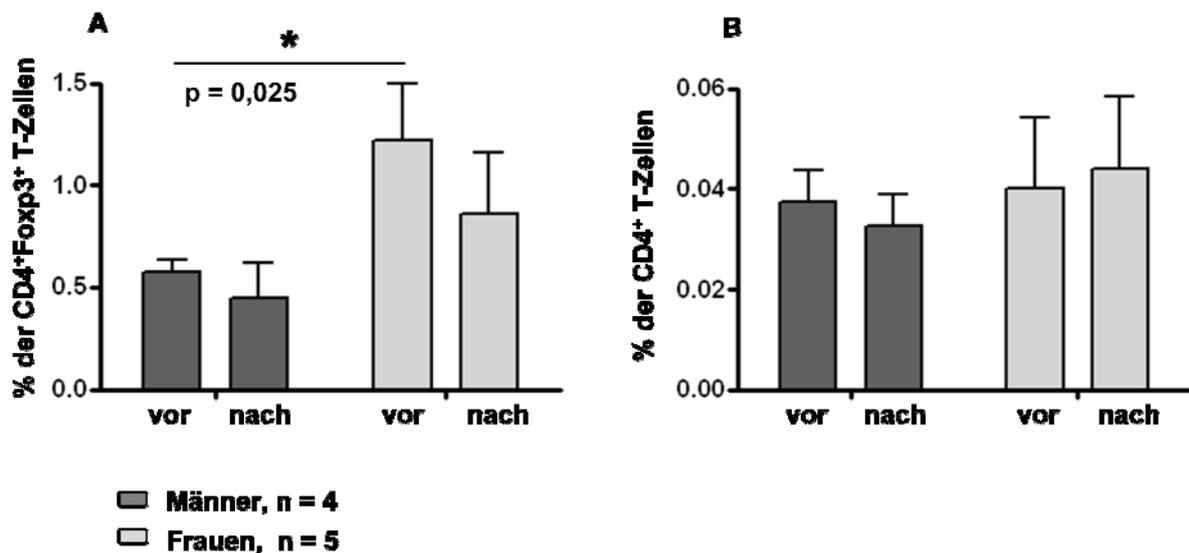
**Abb. 27: Vorkommen melanomspezifischer Treg im peripheren Blut von Melanompatienten.** PBMC von je einem auf HLA-DQ6 positiv und negativ getesteten Patienten wurden mit direkt konjugierten monoklonalen Antikörpern für CD3, CD4, Foxp3 und mit einem PE-konjugierten HLA-DQ6-Melan-A<sub>(25-36)</sub>-Tetramer gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt sind prozentuale Anteile Melan-A-spezifischer Zellen an der Gesamt-CD4<sup>+</sup>- bzw. CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg-Population.

Insgesamt wurden 12 Melanompatienten auf das Vorkommen Melan-A-spezifischer CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> konventioneller T-Zellen und CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg getestet. Dazu wurden gefrorene PBMC der entsprechenden Patienten aus dem Zeitraum vor und nach Therapie mit monoklonalen direkt konjugierten Antikörpern spezifisch für CD3, CD4, CD25, Foxp3 und mit PE-konjugiertem HLA-DQ6-Melan-A<sub>(25-36)</sub>-Tetramer gefärbt. Anschließend wurden die Proben in einem Durchflusszytometer analysiert.

Die Behandlung mit autologen DC führte sowohl bei männlichen als auch bei den weiblichen Patienten tendenziell zu einer Verminderung der Anzahl Melan-A-spezifischer CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg innerhalb der Gesamt-Treg-Population (Abbildung 28A). Dabei zeigten weibliche Patienten mit einer Frequenz von  $1,22 \pm 0,63\%$  vor Therapie im Vergleich zu den männlichen Patienten mit  $0,58 \pm 0,13\%$  signifikant mehr Melan-A-spezifische Treg im

peripheren Blut. Nach der Therapie sank der Anteil Melan-A-spezifischer Treg bei den Patientinnen auf  $0,86 \pm 0,67\%$  leicht ab ( $p = 0,203$ , im Vergleich zu vor Therapie). Auch die männlichen Patienten verzeichneten nach Therapie mit DC einen tendenziellen Rückgang der spezifischen Treg, nämlich auf  $0,45 \pm 0,34\%$  nach Therapie ( $p = 0,259$  im Vergleich zu vor Therapie).

Bei der Betrachtung der Melan-A-spezifischen Treg-Population innerhalb der Gesamt-CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation blieb der Trend zur Abnahme der spezifischen Treg nach Therapie im Vergleich zu vor der Therapie bei den Männern bestehen (Abbildung 28B). Bei den Frauen kam es zu einem tendenziellen Anstieg der spezifischen Treg, weshalb die Population der Melan-A-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen genauer betrachtet wurde.

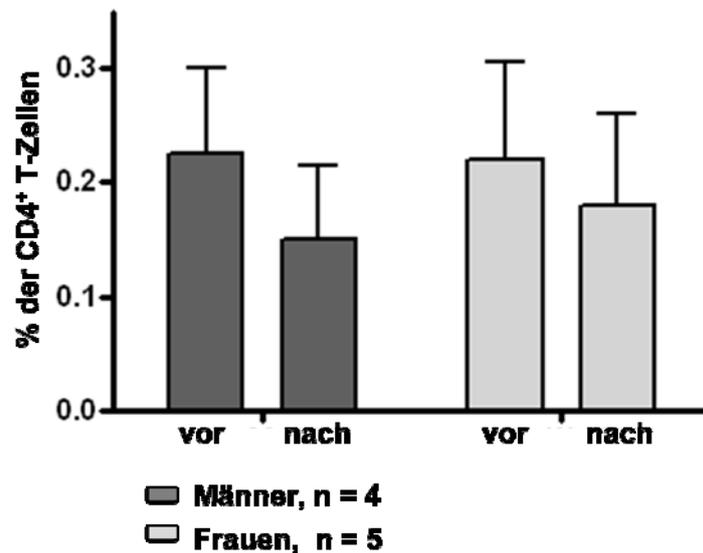


**Abb. 28: Anteil Melan-A-spezifischer Treg in Melanompatienten vor und nach Therapie mit autologen DC.** PBMC von 4 männlichen und 5 weiblichen Patienten, die mit autologen peptidbeladenen DC behandelt worden waren aus dem Zeitraum vor und nach Therapie, wurden mit Antikörpern gegen CD3, CD4, CD25, Foxp3 und PE-konjugiertem HLA-DQ6-Melan-A<sub>(25-36)</sub>-Tetramer gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardfehler der gemessenen Melan-A-spezifischen Zellen prozentanteilig an Gesamtpopulation der CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg-(A) und der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Population (B) vor und nach Therapie.

Bei männlichen und weiblichen Patienten kam es nach der Therapie mit autologen DC zu einem tendenziellen Absinken der Frequenz Melan-A-spezifischer CD4<sup>+</sup> Tcon im Vergleich zu vor der Therapie. Bei den Männern sank der Anteil Melan-A-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen

## Ergebnisse

von  $0,58 \pm 0,13\%$  vor auf  $0,15 \pm 0,13\%$  nach Therapie und bei den Frauen von  $0,22 \pm 0,19$  auf  $0,18 \pm 0,18\%$  (Abbildung 29).

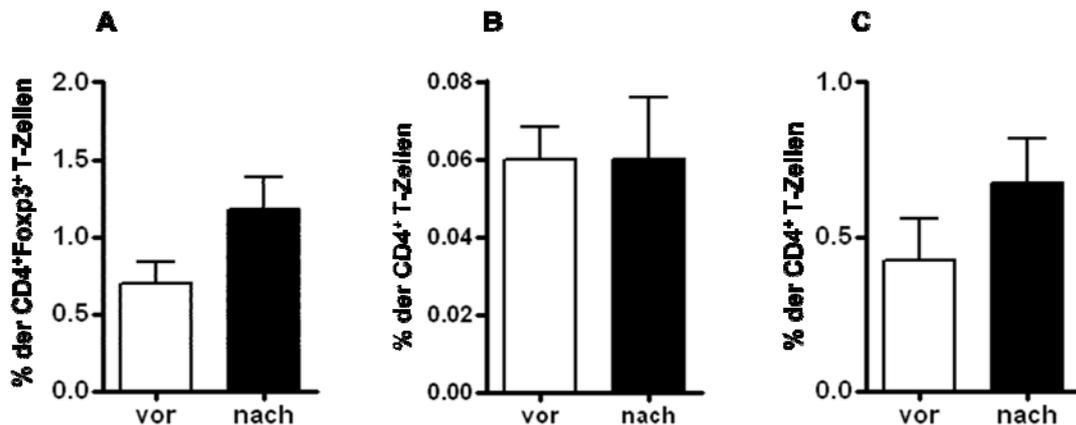


**Abb. 29: Anteil Melan-A-spezifischer konventioneller CD4<sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut von Melanompatienten vor und nach Therapie mit autologen DC.** PBMC von 4 männlichen und 5 weiblichen Patienten, die mit autologen peptidbeladenen DC behandelt worden waren aus dem Zeitraum vor und nach Therapie, wurden mit Antikörpern gegen CD3, CD4, CD25, Foxp3 und PE-konjugiertem HLA-DQ6-Melan-A<sub>(25-36)</sub>-Tetramer gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardfehler der gemessenen Melan-A-spezifischen CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> Zellen prozentanteilig an der Gesamtpopulation der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Populationen vor und nach Therapie.

Wegen der geringen Anzahl der für HLA-DQ6 positiv getesteten Patienten, die mit IFN- $\alpha$  behandelt worden waren, wurden diese ungeachtet ihres Geschlechts als eine Gruppe hinsichtlich des Vorkommens Melan-A-spezifischer Treg und CD4<sup>+</sup> Tcon betrachtet. Diese Gruppe setzte sich aus drei Männern und einer Frau zusammen. Abbildung 30 zeigt den Anteil Melan-A-spezifischer Treg an der Gesamt-Treg-Population bzw. der Gesamt-CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation, sowie den Anteil Melan-A-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen an der Gesamt-CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation.

Der Anteil der spezifischen Treg stieg nach Therapie im Vergleich zu vor Therapie von  $0,7 \pm 0,3\%$  auf  $1,2 \pm 0,4\%$  ( $p = 0,051$ , Abbildung 30A) an, was auch die gemessenen Werte der einzelnen Patienten widerspiegelt. Dieser Effekt konnte bei der Betrachtung des Anteils

spezifischer Treg in der Gesamt-CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation nicht beobachtet werden (Abbildung 30B). In der Population der CD4<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen gab es nach Therapie ebenfalls einen tendenziellen Anstieg des Anteils der Melan-A-spezifischen Zellen, nämlich von  $0,4 \pm 0,7\%$  vor auf  $0,7 \pm 0,3\%$  ( $p = 0,123$ ) nach Therapie.



**Abb. 30: Anteil Melan-A-spezifischer Treg im peripheren Blut von Melanompatienten vor und nach Therapie mit IFN- $\alpha$ .** PBMC von 3 männlichen und 1 weiblichen Patienten aus dem Zeitraum vor und nach IFN- $\alpha$ -Therapie, wurden mit Antikörpern gegen CD3, CD4, CD25, Foxp3 und PE-konjugierten HLA-DQ6-Melan-A<sub>(25-36)</sub>-Tetramer gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardfehler der gemessenen Melan-A-spezifischen CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Zellen prozentantilig an der Gesamtpopulation der CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg (A), bzw. der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Population (B), sowie der prozentuale Anteil MelanA-spezifischer CD4 T-Zellen an der Gesamt-CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation (C) vor und nach Therapie.

Sowohl die Therapie mit IFN- $\alpha$ , als auch die Vakzinierung scheinen einen Effekt auf die Population der Melan-A-spezifischen Treg und CD4<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen zu haben. Während sich bei Patienten mit DC-Vakzinierung nach Therapie tendenziell ein Rückgang der spezifischen Treg und CD4<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen abzeichnete, stieg die Frequenz beider Populationen bei Patienten mit IFN- $\alpha$ -Therapie. Dieser Effekt wurde unabhängig vom Geschlecht der Patienten beobachtet.

Es wurde gezeigt, dass in der Peripherie einiger Melanompatienten im Vergleich zu gesunden Altersgenossen vermehrt Treg vorlagen, und dass weibliche Melanompatienten im Stadium IV signifikant mehr Treg im Blut hatten, als männliche. Außerdem akkumulierten Treg in Primärmelanomen bzw. Metastasen im Vergleich zum peripheren Blut. Die

## Ergebnisse

Immuntherapie mit autologen DC oder IFN- $\alpha$  induzierte tendenziell einen Anstieg des Treg-Anteils an der Gesamt-CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation.

Zudem führten beide Therapieformen zu quantitativen Veränderungen innerhalb der melanomspezifischen Treg-Population. So induzierten DC tendenziell einen Rückgang der Melan-A-spezifischen Treg, wohingegen IFN- $\alpha$  das Gegenteil bewirkte.

## IV. DISKUSSION

### IV.1 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg in *ret* transgenen Mäusen

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg primäre Hauttumoren in *ret* tg Mäusen infiltrieren (Abbildung 2). Diese immunhistologischen Ergebnisse wurden mittels Durchflusszytometer bestätigt und quantifiziert. Außerdem wurde im Knochenmark und in der Milz von *ret* tg Tieren mit makroskopischen Primärtumoren ein signifikanter Anstieg der Treg-Population im Vergleich zu tumorfreien Tieren verzeichnet. Dass Treg Tumore infiltrieren und in tumortragenden Mäusen in den lymphatischen Organen in größerer Zahl vorliegen, als in tumorfreien Tieren, wurde bereits beschrieben (194). Es besteht die Hypothese, dass Tumore direkt an der Erhöhung der Anzahl der Treg in der Peripherie beteiligt sind und dass diese Treg mit für die Unterdrückung des Immunsystems in tumortragenden Individuen verantwortlich sein könnten (194). In einem induzierbaren Myelommodell wurde zudem gezeigt, dass Treg schon während der T-Zell-Entwicklung im Thymus Einfluß auf die Tumorprogression beim multiplen Myelom in diesem Mausmodell nehmen (195). Diese Daten deuten darauf hin, dass Treg auch im *ret* tg Spontanmelanom-Mausmodell eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Primärmelanome spielen könnten.

Bei der Untersuchung der Primärmelanome *ret* tg Mäuse hinsichtlich des Vorkommens von Treg stellte sich heraus, dass diese in Abhängigkeit vom Krankheitsstadium in die Tumore einwanderten (Abbildung 4). In einer Studie mit Patienten mit Leberkarzinom wurde über eine Korrelation der steigenden Akkumulierung von tumorinfiltrierenden Treg im Lauf der Tumorprogression und schlechten Überlebensraten berichtet (196). Diese Beobachtungen wurden in anderen Studien mit Patienten mit Nierenzellkarzinom (197), Ovarialkarzinom (198) und Pankreaskarzinom (199) belegt. Bei Patienten mit malignem Melanom wurde vor kurzem ebenfalls über die selektive Akkumulierung von Treg im Tumorgewebe im Vergleich zu normalem Gewebe und peripherem Blut berichtet (200). Diese Treg glichen phänotypisch ihren Homologen im Blut der Patienten, was ihr inhibitorisches Potential gegenüber Effektor-T-Zellen impliziert. Außerdem konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass tumorinfiltrierende Treg auf Stimulation *in vitro* mit Anergie reagierten, ein weiteres Indiz dafür, dass es sich bei den Zellen tatsächlich um CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg handelte (200).

Die stadienabhängige Infiltration der Primärmelanome von *ret* tg Mäusen durch Treg könnte ein Hinweis darauf sein, dass Treg hier schon in sehr frühen Stadien die Antitumor-Immunantwort durch CTL unterdrücken. Den Treg würde dadurch eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der Melanome in diesem Modell zukommen. Warum die Anzahl der tumorinfiltrierenden Treg im Verlauf der Tumorprogression abnimmt, ist nicht ganz klar. Eine

mögliche Erklärung wäre die frühe Rolle der Treg bei der Tumorentstehung. Einige Studien mit induzierbaren Tumormodellen bei Mäusen zeigten, dass die Depletion von Treg aus der Peripherie von tumortragenden Tieren nur in einem sehr frühen Krankheitsstadium von therapeutischem Nutzen war (200-202). Zusammen mit der Beobachtung, dass die Anzahl der tumorinfiltrierenden Treg in *ret tg* Mäusen im Verlauf der Tumorprogression stetig abnimmt, könnten diese Daten einen Hinweis auf die initiale Rolle der Treg bei der Tumorentstehung geben. Im Lauf der Tumorprogression könnten andere immunsupprimierende Zellen Toleranz induzieren. So wurden beispielsweise in Nierenzell- oder Prostatakarzinomen nur wenige infiltrierende DC gefunden (203) und diese exprimierten kaum kostimulatorische Moleküle. Im Blut von Tumorpatienten wurde zudem eine erhöhte Frequenz von DC mit tolerogenem Phänotyp beobachtet (203), was sich auch in Mausmodellen bestätigte (204, 205). Ihre Anwesenheit in der Tumorumgebung und im peripheren Blut spricht dafür, dass sie an der Entwicklung der T-Zell-Toleranz gegen Tumore beteiligt sind (203). Auch myeloide Suppressorzellen könnten für die Tumorprogression von Bedeutung sein, da sie Antitumor-Immunantworten unterdrücken und für das Tumorwachstum wichtige Signalmoleküle produzieren können (206).

Der Nachweis der immunsupprimierenden Zytokine TGF- $\beta$  und IL-10 könnte ein Hinweis auf die Anwesenheit aktiver Treg im Tumor sein. Die Bedeutung von Chemokinen bei der Rekrutierung von Treg in Tumore wird derzeit untersucht und intensiv diskutiert. Es ist bekannt, dass Treg im peripheren Blut die Chemokinrezeptoren CCR-4 und CCR-8 exprimieren, die als Liganden von Makrophagen produzierte Chemokine wie CCL-22, CCL-17, MCP oder MIP-1 binden können (207).

Die Migration von Treg aus der Peripherie zum Tumor könnte also durch Chemokine gesteuert sein. Diese Annahme wurde unlängst in einer Studie bestätigt, in der die chemotaktische Migration von Treg durch Interaktion von CCR-4 und CCL-22 bzw. CCL-17 bei Patienten mit Darmkrebs gezeigt werden konnte (208). In der vorliegenden Arbeit wurden Primärtumore, sowie metastasierte und nicht-metastasierte Lymphknoten von *ret tg* Mäusen mit makroskopischen Primärtumoren hinsichtlich der Chemokine CCL-2 und CXCL-9 untersucht. Diese Chemokine werden von Makrophagen produziert und sind in der Lage, mit T-Zellen zu interagieren. Beide Chemokine wurden sowohl in Tumoren, als auch in Lymphknoten *ret tg* Mäuse in meßbaren Konzentrationen gefunden, jedoch gab es keinerlei signifikanten Korrelationen mit der zuvor beobachteten Akkumulierung von Treg in kleinen Tumoren. Dass Chemotaxis bei der Rekrutierung von Treg in Primärmelanome von *ret tg* Mäusen eine Rolle spielt, ist nicht ausgeschlossen, jedoch bleibt die Frage in dieser Arbeit offen.

Die starke Infiltration der Primärmelanome von *ret* tg Mäusen durch Treg in frühen Krankheitsstadien und deren Abhängigkeit von der Tumorprogression korrelierte invers mit der Situation im Knochenmark derselben Mäuse (Abbildung 9). Eine mögliche Erklärung für diesen Sachverhalt ist die Migration der Treg aus dem Knochenmark in den Tumor. Das Knochenmark ist stark von Blutgefäßen, jedoch nicht von Lymphgefäßen durchzogen und spielt bei der Zirkulation von Lymphozyten eine wichtige Rolle (209). Dies könnte bedeuten, dass im Knochenmark vorkommende Treg über das Blutgefäßsystem gezielt in den Tumor einwandern. Gestützt wird diese Hypothese durch die Entdeckung von Zou et al. (210), die zeigten, dass humane Treg durch im Knochenmark exprimiertes CXCL-12 dorthin rekrutiert werden und auch für längere Zeit persistieren können. Außerdem können Treg durch die Expression von G-CSF in der Peripherie wieder an andere Orte migrieren. Dabei sind Treg aus dem Knochenmark im *in vitro* Funktionstest genau so aktiv wie ihre Homologe aus dem Blut (210). Das Knochenmark würde also als eine Art Reservoir für funktionelle Treg dienen, von wo aus diese je nach Bedarf in Tumore migrieren könnten (210). Dort könnten die Treg schließlich eine mögliche Antitumor-Immunantwort unterdrücken. Beweise für diese Hypothese lieferten Studien an Patienten mit verschiedenen Tumorerkrankungen. So wurde z.B. bei Patienten mit Leberkarzinom gezeigt, dass Treg selektiv in entartetes Gewebe, und nicht in normales Lebergewebe einwanderten. Zusätzlich korrelierte das vermehrte Auftreten von Treg im Tumorgewebe mit der verminderten Infiltration der Tumore durch CD8<sup>+</sup> CTL (211).

#### **IV.2 Inhibitorische Kapazität von Treg aus *ret* transgenen Mäusen**

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Treg aus der Milz tumortragender *ret* transgener Mäuse die *in vitro*-Proliferation und IFN- $\gamma$ -Produktion CD4<sup>+</sup> Tcon genauso stark inhibieren, wie ihre Homologe aus Wildtypmäusen (Abbildung 14). Mit tumorinfiltrierenden Treg konnten keine *in vitro* Experimente durchgeführt werden, da ihre Anzahl für diese Art von Versuchen zu gering war.

Zu diesem Thema wurden jedoch zahlreiche Studien veröffentlicht, deren Ergebnisse alle in die gleiche Richtung weisen. So zeigten tumorinfiltrierende Treg aus Brustkrebs (98), Gebärmutterhalskrebs (198), malignem Melanom (102), Darmkrebs (212) und Lymphom (101) *in vitro* vergleichbare inhibitorische Kapazität gegenüber CD4<sup>+</sup> Tcon wie Treg aus dem peripheren Blut der Patienten. Im übertragenen Sinn kann man davon ausgehen, dass tumorinfiltrierende Treg im *ret* transgenen Mausmodell ähnlich immunsuppressiv aktiv sind wie Treg aus der Milz.

Folglich wäre ein möglicher immuntherapeutischer Ansatz zur Behandlung des malignen Melanoms in *ret* transgenen Mäusen die Eliminierung von Treg, um die körpereigene Immunantwort gegen den Tumor zu verstärken.

#### **IV.3 Die Depletion CD25<sup>+</sup> Zellen durch die Administration von anti-CD25-Antikörpern resultierte in einem schwachen Antitumor-Effekt im *ret* transgenen Mäusen**

1999 zeigten Onizuka et al. (213) dass es möglich ist, durch die Administration eines neutralisierenden Antikörpers gegen CD25 (IL-2R- $\alpha$ ) Treg in verschiedenen Tumor-transplantationsmodellen zu depletieren. Sie injizierten dazu eine einmalig Dosis des von dem Rattenhybridom pc61 produzierten anti-CD25-Antikörpers intraperitoneal vier Tage bevor verschiedene Tumorzelllinien subkutan verabreicht wurden. Als Ergebnis zeigte sich eine totale Depletion CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg in der Peripherie der behandelten Mäuse, sowie die Abstoßung der Tumore (213). Seitdem wurden zahlreiche Studien mit immuntherapeutischen Ansätzen veröffentlicht, denen als Grundlage die Depletion der CD25<sup>+</sup> Treg diene (201, 214-217).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine ähnliche Strategie verfolgt. *Ret* transgene Tiere wurden vor oder nach dem makroskopischen Auftreten von Hauttumoren mit anti-CD25-Antikörper behandelt. Wie in Abbildung 16 gezeigt ist, wurde auch hier eine vollständige Depletion der Treg in der Peripherie der Tiere erreicht. Allerdings kam es nicht zur Abstoßung der Tumore oder verbesserten Überlebenschancen (Abbildung 17). Zusätzlich wurde gezeigt, dass eine einmalige Dosis des Antikörpers zwar die Depletion der Treg im Blut und in den lymphatischen Organen zu Folge hatte, nicht jedoch im Tumor (Abbildung 19). Der fehlende therapeutische Effekt dieser Behandlungsstrategie könnte auf das progressive Tumorstadium zum Zeitpunkt der Antikörperadministration zurückzuführen sein. Curtin et al. (201) zeigten vor kurzem, dass die Abstoßung der murinen Glioblastomzelllinie GL26 durch die Depletion CD25<sup>+</sup> Zellen nur dann möglich war, wenn der Antikörper zu einem sehr frühen Zeitpunkt verabreicht wurde (201). C57BL/6-Mäusen wurden GL26 Zellen implantiert und das Tumorwachstum wurde mittels Magnetresonanztomographie gemessen. Wurden die Tiere mit anti-CD25-Antikörpern behandelt, bevor die Tumore eine Größe von 0,45 mm<sup>3</sup> erreicht hatten, konnten sie abgestoßen werden. Bei einer Behandlung zu einem späteren Zeitpunkt stellte sich kein therapeutischer Effekt ein (201). Es ist daher möglich, dass das Tumorwachstum bei den *ret* transgenen Tieren zum Zeitpunkt der Behandlung mit anti-CD25-Antikörpern bereits zu weit fortgeschritten war, und die Depletion CD25<sup>+</sup> Zellen keinen Einfluss mehr auf die Antitumorimmunantwort haben konnte. Außerdem wurde in

Primärtumoren von *ret* tg Mäusen schon in sehr frühen Tumorstadien eine Akkumulierung von Treg beobachtet, was für eine rasche Tumorprogression und eine gebremste Antitumor-Immunantwort spricht (200).

Gestützt wird diese Annahme durch kürzlich veröffentlichte Ergebnisse von Versuchen mit dem murinen Melanommodell B16F10 (202). In dieser Studie wurden Treg entweder prophylaktisch oder therapeutisch durch die Administration von anti-CD25-Antikörpern depletiert. Ein therapeutischer Effekt stellte sich aber nur in den Tieren ein, bei denen Treg schon vor Induzierung des Tumors eliminiert worden waren (202). Die Erklärung für dieses Phänomen ist die Anwesenheit immunsupprimierender Treg im Tumor, die antigenspezifische Effektor-T-Zellen daran hindern, ins Tumorgewebe einzuwandern und somit eine Antitumor-Immunantwort verhindern oder abschwächen. Werden Treg schon prophylaktisch depletiert, könnte diese Hemmung der Immunantwort umgangen werden. Dies könnte auch auf das *ret* transgene Spontanmelanom-Mausmodell zutreffen.

Warum tumorinfiltrierende Treg in *ret* transgenen Mäusen nicht depletiert werden können, ist nicht vollständig geklärt. Möglicherweise ist das Tumorgewebe dem verabreichten Antikörper schlecht zugänglich. Treg könnten vor Ort immunsuppressiv auf CD4<sup>+</sup> Tcon wirken, somit die Antitumor-Immunantwort schwächen und für die weitere Tumorprogression verantwortlich sein. Da CD25 nicht nur auf Treg, sondern auch auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird wäre es möglich, dass durch die wiederholte Injektion des Antikörpers auch diese depletiert werden, was für eine mögliche Antitumor-Immunantwort sehr ungünstig wäre. Eine dauerhafte Depletion der Treg war durch eine einzige Depletion jedoch nicht möglich, weshalb dieser negative Umstand in Kauf genommen werden musste.

Die wiederholte Injektion des anti-CD25-Antikörpers hatte anscheinend eine weitere Wirkung auf den Organismus. So wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die Injektion von anti-CD25-Antikörpern in Mäusen, die zuvor schon mehrere Dosen des Antikörpers erhalten hatten, wirkungslos blieb (Abbildung 19). Dies könnte bedeuten, dass die Mäuse mit einer Immunantwort auf das dem Organismus fremde Protein reagieren und einen neutralisierenden Antikörper produzieren. Diese Hypothese könnte einen weiteren Grund für den fehlenden therapeutischen Effekt der Depletion CD25<sup>+</sup> Zellen in *ret* tg Mäusen darstellen.

Zudem etabliert sich nach und nach die Meinung, dass die alleinige Depletion von CD25<sup>+</sup> Zellen durch neutralisierende Antikörper für die Tumorregression und Genesung in verschiedenen Mausmodellen nicht ausreichend ist. In immer mehr Studien wird gezeigt, dass erst ein zusätzlicher Stimulus für eine von Effektor-T-Zellen gesteuerte Antitumor-

Immunantwort ausschlaggebend für die erfolgreiche Therapie ist. Eine Studie von Nagai et al. (218), die mit dem induzierbaren Melanommodell B16F10 arbeiten ergab, dass die alleinige Administration des anti-CD25-Antikörpers zwar CD25<sup>+</sup> Zellen aus der Peripherie der Mäuse depletierte, aber keinen therapeutischen Effekt in Bezug auf die Tumorprogression oder das Überleben der Mäuse hatte. Die Autoren injizierten je 50 µg des Antikörpers an den Tagen 1, 3 und 7 nach Induzierung des Tumors und setzten die Behandlung mit einer Dosis des Antikörpers pro Woche fort. Ein Effekt dieser Therapie stellte sich erst ein, nachdem B16F10-Zellen mit IL-12 transfiziert worden waren, um die Wirkung von lokal produziertem IL-12 in diesem Tumormodell zu untersuchen. Wurde der Antikörper jetzt in der gleichen Weise injiziert, wurden die Tumore abgestoßen. Dabei verbesserte sich der therapeutische Effekt mit der Anzahl der Injektionen von einer teilweisen zur totalen Tumorregression (218). IL-12 ist ein von immunogenen DC produziertes inflammatorisches Zytokin, das bei der Generierung von Th1- und Th2-Zellen eine entscheidende Rolle spielt und außerdem die IFN- $\gamma$ -Produktion bei NK- und T-Zellen stimuliert (219). Somit könnte ein inflammatorisches Signal in der Tumorumgebung, welches unterstützend auf die Entstehung einer Immunantwort wirkt, zusätzlich zur Depletion immunsupprimierender Treg, der Schlüssel für eine erfolgreiche Immuntherapie sein.

Ergebnisse einer anderen Studie bestätigten diese Theorie in einem induzierbaren Tumormodell mit der murinen Darmkrebszelllinie MC38 (220). Sie transfizierten diese mit IL-2 und injizierten diese Zellen subkutan in C57BL/6-Mäuse. Im Gegensatz zu der zuvor beschriebenen Publikation versuchten die Autoren hier eine prophylaktische Depletion von CD25<sup>+</sup> Zellen, indem sie den Mäusen die erste Dosis von 100 µg des anti-CD25-Antikörpers 6 Tage vor Injektion der MC38/IL-2-Zellen verabreichten. Als Kontrolle dienten untransfizierte MC38-Zellen, die den Tieren im gleichen Schema verabreicht wurden. In diesen Experimenten wurde gezeigt, dass Treg in den MC38/IL-2-induzierten Tumoren stärker akkumulierten, als in Tumoren, die aus untransfizierten Zellen gewachsen waren. Bei einer prophylaktischen Depletion der Treg durch anti-CD25-Antikörper waren die Tiere durchweg in der Lage, das Tumorwachstum zu unterdrücken (220).

Obgleich IL-2 für die Stimulation von Treg unerlässlich ist, scheint bei einer kombinierten Therapie aus der Depletion der Treg in Verbindung mit der Anwesenheit von IL-2 in der Tumorumgebung der inflammatorische Effekt des Zytokins zu überwiegen (213). Diese Studien stützen die Hypothese, dass mit einer Inhibition oder Eliminierung immunsupprimierender CD25<sup>+</sup> T-Zellen allein kein therapeutischer Effekt erzielt werden kann, obgleich in anderen Studien gezeigt wurde, dass eine einzige Injektion des anti-CD25-Antikörpers zur partiellen Tumorregression führen kann (213). Alle diese therapeutischen

Ansätze erfolgten allerdings in induzierbaren Tumormodellen und sind nicht mit Spontantumormodellen vergleichbar.

In der Klinik kommt die Depletion CD25<sup>+</sup> Zellen seit einiger Zeit bei der Behandlung des malignen Melanoms zum Einsatz. Hierzu wird Denileukin Diphitox, ein Fusionsprotein aus IL-2 und dem Diphtheriatoxin, welches unter dem Handelsnamen ONTAK bekannt ist, verwendet. Bei Patienten mit multiplen Myelom konnte durch die Therapie mit ONTAK eine Verringerung der im Blut zirkulierenden Treg erreicht werden (221). Zudem sprachen einige der Patienten partiell auf die Behandlung an (221). Auch bei Melanompatienten wurden Studien mit ONTAK durchgeführt. Mahnke et al. (182) erreichten durch Behandlung mit ONTAK eine vorübergehende Reduzierung der Anzahl der Treg im peripheren Blut der Patienten. Außerdem konnten sie durch die zusätzliche Peptid-Immunisierung der Patienten mit MelanA/MART-1 und gp100 gezielt Antitumor-Immunantworten von CD8<sup>+</sup> CTL verstärken (182). Trotz der Stärke der Ergebnisse gelang es in dieser Studie nicht, einen klinischen Effekt zu erzielen (182).

In einer weiteren Studie mit Melanompatienten im Stadium IV wurde eine ähnliche Strategie verfolgt (222). Den Patienten wurde ONTAK lediglich in einer etwas höheren Dosis verabreicht. Insgesamt wurden 4 Injektionen in einem zeitlichen Abstand von 21 Tagen vorgenommen. Im Gegensatz zu der zuvor beschriebenen Publikation wurden die Patienten nicht zusätzlich mit Peptiden immunisiert. Auch hier fanden sich nach Therapie verstärkt antigenspezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen gegen die MAA Tyrosinase, MART-1 und gp100 im Blut und in Metastasen der Patienten (222). Außerdem kam es bei einigen Patienten zur Regression der Metastasen und zur Entwicklung von Vitiligo, einem Autoimmunsyndrom, bei dem den Patienten ihre natürliche Pigmentierung der epidermalen Zellen verloren geht. Eine positive Stimulation der Antitumor-Immunantwort, etwa durch eine Peptidimmunisierung, zusätzlich zu der Depletion CD25<sup>+</sup> Zellen könnte also den Erfolg bei diesem Ansatz der Immuntherapie bringen.

#### **IV.4 Vorkommen von Treg im peripheren Blut von Melanompatienten vor und nach DC-Vakzinierung und Therapie mit IFN- $\alpha$**

Die Behandlung des malignen Melanoms mit immuntherapeutischen Strategien steht derzeit im Fokus der Melanomforschung. Viele verschiedene Ansätze wurden bereits in Studien getestet (223). Die Vakzinierung mit körpereigenen DC ist eine davon (156). DC werden *in vitro* aus Monozyten aus dem peripheren Blut von Patienten unter Zugabe verschiedener

Faktoren, darunter GM-CSF und TNF- $\alpha$  gereift. Schließlich werden die DC mit verschiedenen Peptiden von MAA beladen und den Patienten subkutan injiziert. In der vorliegenden Arbeit wurden 19 Patienten aus einer solchen Studie vor und nach der Therapie mit autologen DC hinsichtlich des Vorkommens von Treg im peripheren Blut untersucht. Das vermehrte Auftreten von Treg im peripheren Blut von Patienten mit verschiedenen Tumorerkrankungen, wie etwa dem Lungenkarzinom (98), Brustkrebs (99), Prostatakrebs (224) und Darmkrebs (225) wurde schon beschrieben. Auch bei den hier untersuchten Patienten wurden im Vergleich zu gesunden Spendern erhöhte Treg Anzahlen im peripheren Blut nachgewiesen.

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Patienten wurde sowohl nach Therapie mit autologen DC als auch mit IFN- $\alpha$  tendenziell mehr Treg im peripheren Blut gemessen als zuvor. Dieser Effekt könnte bei den Patienten, die eine Behandlung mit DC erhalten hatten, durch die eventuelle Treg induzierende Wirkung von tolerogenen DC erklärt werden. So ist zum Beispiel bekannt, dass Tumorzellen durch die Sekretion von immunsupprimierenden Zytokinen wie IL-10 und TGF- $\beta$  ein anti-inflammatorisches Milieu schaffen, welches ungünstig für Antitumor-Immunantworten durch Effektor-T-Zellen ist (226). Außerdem beeinflussen diese Zytokine die Reifung von DC und induzieren einen tolerogenen Phänotyp, der irreversibel ist. Diese DC sind nicht mehr in der Lage, auf inflammatorische Stimuli zu reagieren und eine Immunantwort auszulösen, sondern induzieren anergische oder immunsupprimierende T-Zellen (163).

Eine weitere Erklärung für das vermehrte Auftreten von Treg in der Peripherie von Melanompatienten ist die Tatsache, dass Tumorantigene immer körpereigenen Ursprungs sind, d.h., dass sie in leicht veränderten Varianten auch auf normalen Zellen, in diesem Fall Melanozyten, exprimiert werden können (151). So verwundert es nicht, dass aufgrund der Aufrechterhaltung der Selbst-Toleranz antigenspezifische Treg für eben diese Antigene im Blut zirkulieren (151). Die Spezifität von CD4<sup>+</sup> T-Zellen für eines der Peptide, mit denen die DC beladen worden waren, wurde in dieser Arbeit ebenfalls untersucht. Es handelte sich um das HLA-DQ6 restringierte Peptid 25-36 des MAA Melan-A. Mithilfe von MHC-Klasse-II-Tetrameren wurden eingefrorene PBMC der Patienten vor und nach Therapie mit autologen DC oder IFN- $\alpha$  bezüglich des Vorliegens für dieses Peptid spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen und Treg getestet. Im Gegensatz zur Gesamtzahl der Treg nahm die Rate der Melan-A-spezifischen Treg in der Peripherie der Patienten nach Behandlung mit autologen DC tendenziell ab. Dieser Effekt könnte auch von der Abnahme der Melan-A-spezifischen CD4<sup>+</sup> Effektor-T-Zellpopulation herrühren, da sich diese nach der Therapie ebenfalls verringerte.

Anders verhielt es sich mit den PBMC der Patienten, die mit IFN- $\alpha$  behandelt worden waren. Hier verzeichneten sowohl antigenspezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen als auch Treg tendenziell einen Anstieg an der Gesamtpopulation. IFN- $\alpha$  ist ein stark immunmodulierendes Zytokin mit vielschichtigen Funktionen (227). Es kann anti-proliferativ und pro-apoptotisch auf Melanomzellen wirken (228), weshalb IFN- $\alpha$  seit 1995 bei der Therapie des malignen Melanoms eingesetzt wird. In 20% aller Fälle sprechen die Patienten auf die Behandlung an (229). Eine Studie, in der Melanompatienten mit einem HLA-A-0201-restringierten Peptid des MAA gp100 vakziniert wurden ergab, dass die zusätzliche Behandlung mit IFN- $\alpha$  einen Anstieg der Anzahl gp100 spezifischer CTL zur Folge hatte (230). Außerdem steigerte die Gabe von IFN- $\alpha$  die spezifische Antitumor-Immunantwort durch CTL und verbesserte das allgemeine Ansprechen der Patienten auf die Therapie.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass im *ret* transgenen Spontanmelanom-Mausmodell eine inverse Korrelation zwischen der Tumorprogression und der Anzahl tumorinfiltrierender Treg besteht, was den Schluss nahe legt, dass Treg bei der Tumorentstehung in diesem Modell eine bedeutende Rolle spielen. Diese Hypothese wurde durch Ergebnisse aus dem Knochenmark gestützt, da im Knochenmark von *ret* tg Mäusen in frühen Krankheitsstadien signifikant weniger Treg vorlagen, was eine Migration der Treg aus dem Knochenmark in den Tumor wahrscheinlich machte.

Die Depletion der Treg aus der Peripherie der *ret* tg Mäuse durch die Administration eines anti-CD25-Antikörpers lieferte weder im prophylaktischen noch im therapeutischen Ansatz einen signifikanten therapeutischen Effekt in Bezug auf die Tumorprogression oder das Überleben der Mäuse. Diese Daten sprechen dafür, dass die Depletion von Treg durch anti-CD25-Antikörper allein für eine erfolgreiche Immuntherapie nicht ausreichend ist. Möglicherweise könnte hier durch kombinierte Therapieansätze mit einer zusätzlichen Stimulation der Antitumor-Immunantwort der therapeutische Effekt verbessert werden.

Es wurde gezeigt, dass der Anteil CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg im peripheren Blut von Melanompatienten verschiedener Stadien tendenziell höher liegt, als bei gesunden Spendern. Die Therapie mit autologen, mit melanomspezifischen Peptiden beladenen DC oder IFN- $\alpha$  führte tendenziell zu einer Zunahme der Treg in der Peripherie der Patienten. Außerdem wurde in primären Melanomen bzw. Metastasen eine Akkumulierung von Treg im Vergleich zum peripheren Blut derselben Patienten beobachtet.

## Diskussion

Die Immuntherapie mit autologen DC oder IFN- $\alpha$  führte zudem zu Veränderungen der melanomspezifischen Treg-Population. So induzierten DC tendenziell einen Rückgang der Melan-A-spezifischen Treg, wohingegen IFN- $\alpha$  das Gegenteil bewirkte.

Zusammenfassend kann man sagen, dass es während der Tumorentwicklung beim malignen Melanom und im *ret* tg Sponatmelanom-Mausmodell zu Veränderungen innerhalb der Treg-Population kommt, die eine Bedeutung dieser Zellen für die Tumorprogression nahe legen.

**V. ABKÜRZUNGEN**

APC	Antigenpräsentierende Zelle Allophycocyanin
Bcl-2	"B cell lymphoma gene 2"
BCR	B-Zell-Rezeptor
Bio	Biotin
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCL	C-C Chemokinligand
CCR	C-C Chemokinrezeptor
CD	"cluster of differentiation"
CFSE	5- Carboxyfluorescein-Succinimidylester
cm	Zentimeter
CTL	zytotoxische T-Zelle
CTLA-4	"cytotoxic T lymphocyte antigen 4"
CXCL	C-X Chemokinligand
CXCR	C-X Chemokinrezeptor
d	Tag
DC	Dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTIC	Dacarbazin
EAE	"experimental autoimmune encephalomyelitis"
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	"enzyme linked immunosorbent assay"
Erk	"extracellular signal-regulated kinase"
FACS	"fluorescent activated cell sorting"
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszin-Isothiocyanat
FMO	"fluorescence minus one"
Foxp3	"forkhead/winged helix transcription factor"
FSC	forward scatter
g	Gramm
G-CSF	"granulocyte colony stimulating factor"
GDNF	„glial cell line-derived neurotrophic factor“

## Abkürzungen

GFP	"green fluorescent protein"
GITR	„glucocorticoid-induced TNF-receptor family-related gene/protein“
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
Gy	Gray
h	Stunde
hd	"healthy donor"
HEV	Venolen mit hohem Endothel
HIV	humanes Immunschwächevirus
IBD	"inflammatory bowel disease"
ICER	„inducible cAMP early repressor“
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
	„Immune dysregulation Polyendocrinopathy, Enteropathy,
IPEX	X-linked immunodeficiency“
iTreg	induzierte Treg
JAK	Januskinase
kg	Kilogramm
l	Liter
LAG-3	"Lymphocyte-activated gene-3"
LPS	Lipopolysaccharid
MAA	Melanom-assoziiertes Antigen
MACS	magnetische Zellseparierung
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCP-1	„Monocyte chemoattractant protein-1“
MHC	"major histocompatibility complex"
MIG	„monokine induced by interferon- $\gamma$ “
min	Minute
ml	Milliliter
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ m	Mikrometer
NF $\kappa$ B	"nuclear factor $\kappa$ B"
ng	Nanogramm
nm	Nanometer

## Abkürzungen

nTreg	natürlich vorkommende Treg
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBL	Periphere Blut-Lymphozyten
PBS	phosphatgepufferte Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
ROR	„retinoid orphan nuclear receptor“
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SA	Streptavidin
SLE	Systemischer Lupus Erythemathodes
SSC	side scatter
STAT	"signal transducers and activators of transcription"
Tcon	Konventionelle T-Zelle
TCR	T-Zell-Rezeptor
tg	Transgen
TGF- $\beta$	"tumor growth factor $\beta$ "
Th1, 2, 3 Zelle	T-Helferzelle Typ 1, 2, 3
TIL	Tumor infiltrierender Lymphozyt
TLR	"Toll like receptor"
TNF	Tumornekrosefaktor
Tr1	Typ1 regulatorische T-Zelle
Treg	regulatorische T-Zelle
VEGF	"vascular endothelial growth factor"
wt	Wildtyp
XIAP	X-chromosomaler Inhibitor der Apoptose

**VI. LITERATURVERZEICHNIS**

1. Steinman, R.M. 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9:271-296.
2. Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y.J. Liu, B. Pulendran, and K. Palucka. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18:767-811.
3. Shortman, K., and C. Caux. 1997. Dendritic cell development: multiple pathways to nature's adjuvants. *Stem Cells* 15:409-419.
4. Santiago-Schwarz, F., E. Belilos, B. Diamond, and S.E. Carsons. 1992. TNF in combination with GM-CSF enhances the differentiation of neonatal cord blood stem cells into dendritic cells and macrophages. *J Leukoc Biol* 52:274-281.
5. Banchereau, J., and R.M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245-252.
6. Mosmann, T.R., H. Cherwinski, M.W. Bond, M.A. Giedlin, and R.L. Coffman. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136:2348-2357.
7. Reiner, S.L., and R.M. Locksley. 1993. The worm and the protozoa: stereotyped responses or distinct antigens? *Parasitol Today* 9:258-260.
8. Mosmann, T.R., and R.L. Coffman. 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7:145-173.
9. Aggarwal, S., N. Ghilardi, M.H. Xie, F.J. de Sauvage, and A.L. Gurney. 2003. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem* 278:1910-1914.
10. Bettelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T.B. Strom, M. Oukka, H.L. Weiner, and V.K. Kuchroo. 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441:235-238.
11. Ivanov, I.I., B.S. McKenzie, L. Zhou, C.E. Tadokoro, A. Lepelletier, J.J. Lafaille, D.J. Cua, and D.R. Littman. 2006. The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 126:1121-1133.
12. Chung, D.R., D.L. Kasper, R.J. Panzo, T. Chitnis, M.J. Grusby, M.H. Sayegh, and A.O. Tzianabos. 2003. CD4+ T cells mediate abscess formation in intra-abdominal sepsis by an IL-17-dependent mechanism. *J Immunol* 170:1958-1963.
13. Huang, W., L. Na, P.L. Fidel, and P. Schwarzenberger. 2004. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-Candida albicans host defense in mice. *J Infect Dis* 190:624-631.
14. Kelly, M.N., J.K. Kolls, K. Happel, J.D. Schwartzman, P. Schwarzenberger, C. Combe, M. Moretto, and I.A. Khan. 2005. Interleukin-17/interleukin-17 receptor-mediated signaling is important for generation of an optimal polymorphonuclear response against Toxoplasma gondii infection. *Infect Immun* 73:617-621.
15. Lock, C., G. Hermans, R. Pedotti, A. Brendolan, E. Schadt, H. Garren, A. Langer-Gould, S. Strober, B. Cannella, J. Allard, P. Klonowski, A. Austin, N. Lad, N. Kaminski, S.J. Galli, J.R. Oksenberg, C.S. Raine, R. Heller, and L. Steinman. 2002. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med* 8:500-508.
16. Tzartos, J.S., M.A. Friese, M.J. Craner, J. Palace, J. Newcombe, M.M. Esiri, and L. Fugger. 2008. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol* 172:146-155.

17. Teunissen, M.B., C.W. Koomen, R. de Waal Malefyt, E.A. Wierenga, and J.D. Bos. 1998. Interleukin-17 and interferon-gamma synergize in the enhancement of proinflammatory cytokine production by human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 111:645-649.
18. Fujino, S., A. Andoh, S. Bamba, A. Ogawa, K. Hata, Y. Araki, T. Bamba, and Y. Fujiyama. 2003. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 52:65-70.
19. Cua, D.J., J. Sherlock, Y. Chen, C.A. Murphy, B. Joyce, B. Seymour, L. Lucian, W. To, S. Kwan, T. Churakova, S. Zurawski, M. Wiekowski, S.A. Lira, D. Gorman, R.A. Kastelein, and J.D. Sedgwick. 2003. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 421:744-748.
20. Kaech, S.M., E.J. Wherry, and R. Ahmed. 2002. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol* 2:251-262.
21. Ahmed, R., and D. Gray. 1996. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* 272:54-60.
22. Hamann, D., P.A. Baars, M.H. Rep, B. Hooibrink, S.R. Kerkhof-Garde, M.R. Klein, and R.A. van Lier. 1997. Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells. *J Exp Med* 186:1407-1418.
23. Michie, C.A., A. McLean, C. Alcock, and P.C. Beverley. 1992. Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms. *Nature* 360:264-265.
24. Baars, P.A., M.M. Maurice, M. Rep, B. Hooibrink, and R.A. van Lier. 1995. Heterogeneity of the circulating human CD4+ T cell population. Further evidence that the CD4+CD45RA-CD27- T cell subset contains specialized primed T cells. *J Immunol* 154:17-25.
25. Azuma, M., J.H. Phillips, and L.L. Lanier. 1993. CD28- T lymphocytes. Antigenic and functional properties. *J Immunol* 150:1147-1159.
26. Seder, R.A., and R. Ahmed. 2003. Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation. *Nat Immunol* 4:835-842.
27. Steinman, R.M., D. Hawiger, and M.C. Nussenzweig. 2003. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 21:685-711.
28. Fathman, C.G., and N.B. Lineberry. 2007. Molecular mechanisms of CD4+ T-cell anergy. *Nat Rev Immunol* 7:599-609.
29. Nishizuka, Y., and T. Sakakura. 1969. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science* 166:753-755.
30. Taguchi, O., and Y. Nishizuka. 1981. Experimental autoimmune orchitis after neonatal thymectomy in the mouse. *Clin Exp Immunol* 46:425-434.
31. Taguchi, O., A. Kojima, and Y. Nishizuka. 1985. Experimental autoimmune prostatitis after neonatal thymectomy in the mouse. *Clin Exp Immunol* 60:123-129.
32. Kojima, A., Y. Tanaka-Kojima, T. Sakakura, and Y. Nishizuka. 1976. Spontaneous development of autoimmune thyroiditis in neonatally thymectomized mice. *Lab Invest* 34:550-557.
33. Kojima, A., O. Taguchi, and Y. Nishizuka. 1980. Experimental production of possible autoimmune castritis followed by macrocytic anemia in athymic nude mice. *Lab Invest* 42:387-395.
34. Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155:1151-1164.
35. Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, J. Shimizu, S. Yamazaki, T. Sakihama, M. Itoh, Y. Kuniyasu, T. Nomura, M. Toda, and T. Takahashi. 2001. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev* 182:18-32.

36. Sakaguchi, S., and F. Powrie. 2007. Emerging challenges in regulatory T cell function and biology. *Science* 317:627-629.
37. Kim, J.M., J.P. Rasmussen, and A.Y. Rudensky. 2007. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat Immunol* 8:191-197.
38. Suri-Payer, E., and B. Fritzsching. 2006. Regulatory T cells in experimental autoimmune disease. *Springer Semin Immunopathol* 28:3-16.
39. Romagnani, S. 2006. Regulation of the T cell response. *Clin Exp Allergy* 36:1357-1366.
40. Bacchetta, R., E. Gambineri, and M.G. Roncarolo. 2007. Role of regulatory T cells and FOXP3 in human diseases. *J Allergy Clin Immunol* 120:227-235; quiz 236-227.
41. Bopp, T., H. Jonuleit, and E. Schmitt. 2007. Regulatory T cells--the renaissance of the suppressor T cells. *Ann Med* 39:322-334.
42. Seddon, B., and D. Mason. 2000. The third function of the thymus. *Immunol Today* 21:95-99.
43. Itoh, M., T. Takahashi, N. Sakaguchi, Y. Kuniyasu, J. Shimizu, F. Otsuka, and S. Sakaguchi. 1999. Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol* 162:5317-5326.
44. Chen, W., W. Jin, N. Hardegen, K.J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady, and S.M. Wahl. 2003. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 198:1875-1886.
45. Apostolou, I., and H. von Boehmer. 2004. In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J Exp Med* 199:1401-1408.
46. Roncarolo, M.G., S. Gregori, M. Battaglia, R. Bacchetta, K. Fleischhauer, and M.K. Levings. 2006. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* 212:28-50.
47. Groux, H., A. O'Garra, M. Bigler, M. Rouleau, S. Antonenko, J.E. de Vries, and M.G. Roncarolo. 1997. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389:737-742.
48. Roncarolo, M.G., R. Bacchetta, C. Bordignon, S. Narula, and M.K. Levings. 2001. Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev* 182:68-79.
49. Finbloom, D.S., and K.D. Winestock. 1995. IL-10 induces the tyrosine phosphorylation of tyk2 and Jak1 and the differential assembly of STAT1 alpha and STAT3 complexes in human T cells and monocytes. *J Immunol* 155:1079-1090.
50. Riley, J.K., K. Takeda, S. Akira, and R.D. Schreiber. 1999. Interleukin-10 receptor signaling through the JAK-STAT pathway. Requirement for two distinct receptor-derived signals for anti-inflammatory action. *J Biol Chem* 274:16513-16521.
51. Takeda, K., B.E. Clausen, T. Kaisho, T. Tsujimura, N. Terada, I. Forster, and S. Akira. 1999. Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity* 10:39-49.
52. Izcue, A., and F. Powrie. 2008. Special regulatory T-cell review: Regulatory T cells and the intestinal tract--patrolling the frontier. *Immunology* 123:6-10.
53. Li, M.O., and R.A. Flavell. 2008. TGF-beta: a master of all T cell trades. *Cell* 134:392-404.
54. Lee, H.M., and S. Rich. 1993. Differential activation of CD8+ T cells by transforming growth factor-beta 1. *J Immunol* 151:668-677.
55. Gray, J.D., T. Liu, N. Huynh, and D.A. Horwitz. 2001. Transforming growth factor beta enhances the expression of CD154 (CD40L) and production of tumor necrosis factor alpha by human T lymphocytes. *Immunol Lett* 78:83-88.
56. Chung, E.J., S.H. Choi, Y.H. Shim, Y.J. Bang, K.C. Hur, and C.W. Kim. 2000. Transforming growth factor-beta induces apoptosis in activated murine T cells through the activation of caspase 1-like protease. *Cell Immunol* 204:46-54.

57. Sillett, H.K., S.M. Cruickshank, J. Southgate, and L.K. Trejdosiewicz. 2001. Transforming growth factor-beta promotes 'death by neglect' in post-activated human T cells. *Immunology* 102:310-316.
58. Chen, W., W. Jin, H. Tian, P. Sicurello, M. Frank, J.M. Orenstein, and S.M. Wahl. 2001. Requirement for transforming growth factor beta1 in controlling T cell apoptosis. *J Exp Med* 194:439-453.
59. Genestier, L., S. Kasibhatla, T. Brunner, and D.R. Green. 1999. Transforming growth factor beta1 inhibits Fas ligand expression and subsequent activation-induced cell death in T cells via downregulation of c-Myc. *J Exp Med* 189:231-239.
60. Gray, J.D., M. Hirokawa, and D.A. Horwitz. 1994. The role of transforming growth factor beta in the generation of suppression: an interaction between CD8+ T and NK cells. *J Exp Med* 180:1937-1942.
61. Fantini, M.C., C. Becker, G. Monteleone, F. Pallone, P.R. Galle, and M.F. Neurath. 2004. Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol* 172:5149-5153.
62. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299:1057-1061.
63. Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4:330-336.
64. Walker, M.R., D.J. Kasproicz, V.H. Gersuk, A. Benard, M. Van Landeghen, J.H. Buckner, and S.F. Ziegler. 2003. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. *J Clin Invest* 112:1437-1443.
65. Roncador, G., P.J. Brown, L. Maestre, S. Hue, J.L. Martinez-Torrecuadrada, K.L. Ling, S. Pratap, C. Toms, B.C. Fox, V. Cerundolo, F. Powrie, and A.H. Banham. 2005. Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells at the single-cell level. *Eur J Immunol* 35:1681-1691.
66. Morgan, M.E., J.H. van Bilsen, A.M. Bakker, B. Heemskerk, M.W. Schilham, F.C. Hartgers, B.G. Elferink, L. van der Zanden, R.R. de Vries, T.W. Huizinga, T.H. Ottenhoff, and R.E. Toes. 2005. Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4+CD25+ T regulatory cells in humans. *Hum Immunol* 66:13-20.
67. Allan, S.E., S.Q. Crome, N.K. Crellin, L. Passerini, T.S. Steiner, R. Bacchetta, M.G. Roncarolo, and M.K. Levings. 2007. Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int Immunol* 19:345-354.
68. Allan, S.E., L. Passerini, R. Bacchetta, N. Crellin, M. Dai, P.C. Orban, S.F. Ziegler, M.G. Roncarolo, and M.K. Levings. 2005. The role of 2 FOXP3 isoforms in the generation of human CD4+ Tregs. *J Clin Invest* 115:3276-3284.
69. Brunkow, M.E., E.W. Jeffery, K.A. Hjerrild, B. Paeper, L.B. Clark, S.A. Yasayko, J.E. Wilkinson, D. Galas, S.F. Ziegler, and F. Ramsdell. 2001. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 27:68-73.
70. Bennett, C.L., J. Christie, F. Ramsdell, M.E. Brunkow, P.J. Ferguson, L. Whitesell, T.E. Kelly, F.T. Saulsbury, P.F. Chance, and H.D. Ochs. 2001. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 27:20-21.
71. Fontenot, J.D., J.L. Dooley, A.G. Farr, and A.Y. Rudensky. 2005. Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny. *J Exp Med* 202:901-906.
72. Asano, M., M. Toda, N. Sakaguchi, and S. Sakaguchi. 1996. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J Exp Med* 184:387-396.
73. Suzuki, H., Y.W. Zhou, M. Kato, T.W. Mak, and I. Nakashima. 1999. Normal regulatory alpha/beta T cells effectively eliminate abnormally activated T cells lacking the interleukin 2 receptor beta in vivo. *J Exp Med* 190:1561-1572.
74. Horak, I., J. Lohler, A. Ma, and K.A. Smith. 1995. Interleukin-2 deficient mice: a new model to study autoimmunity and self-tolerance. *Immunol Rev* 148:35-44.

75. Scheffold, A., K.M. Murphy, and T. Hofer. 2007. Competition for cytokines: T(reg) cells take all. *Nat Immunol* 8:1285-1287.
76. Nakamura, K., A. Kitani, and W. Strober. 2001. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med* 194:629-644.
77. Li, M.O., S. Sanjabi, and R.A. Flavell. 2006. Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity* 25:455-471.
78. Bodor, J., Z. Fehervari, B. Diamond, and S. Sakaguchi. 2007. ICER/CREM-mediated transcriptional attenuation of IL-2 and its role in suppression by regulatory T cells. *Eur J Immunol* 37:884-895.
79. Paust, S., L. Lu, N. McCarty, and H. Cantor. 2004. Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:10398-10403.
80. Read, S., V. Malmstrom, and F. Powrie. 2000. 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.
81. Read, S., R. Greenwald, A. Izcue, N. Robinson, D. Mandelbrot, L. Francisco, A.H. Sharpe, and F. Powrie. 2006. Blockade of CTLA-4 on CD4+CD25+ regulatory T cells abrogates their function in vivo. *J Immunol* 177:4376-4383.
82. Bodor, J., J. Bodorova, and R.E. Gress. 2000. Suppression of T cell function: a potential role for transcriptional repressor ICER. *J Leukoc Biol* 67:774-779.
83. Bopp, T., C. Becker, M. Klein, S. Klein-Hessling, A. Palmetshofer, E. Serfling, V. Heib, M. Becker, J. Kubach, S. Schmitt, S. Stoll, H. Schild, M.S. Staeger, M. Stassen, H. Jonuleit, and E. Schmitt. 2007. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med* 204:1303-1310.
84. Novak, T.J., and E.V. Rothenberg. 1990. cAMP inhibits induction of interleukin 2 but not of interleukin 4 in T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:9353-9357.
85. Zarek, P.E., C.T. Huang, E.R. Lutz, J. Kowalski, M.R. Horton, J. Linden, C.G. Drake, and J.D. Powell. 2008. A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood* 111:251-259.
86. Powrie, F., J. Carlino, M.W. Leach, S. Mauze, and R.L. Coffman. 1996. A critical role for transforming growth factor-beta but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1-mediated colitis by CD45RB(low) CD4+ T cells. *J Exp Med* 183:2669-2674.
87. Asseman, C., S. Mauze, M.W. Leach, R.L. Coffman, and F. Powrie. 1999. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med* 190:995-1004.
88. Fahlen, L., S. Read, L. Gorelik, S.D. Hurst, R.L. Coffman, R.A. Flavell, and F. Powrie. 2005. T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med* 201:737-746.
89. Kullberg, M.C., V. Hay, A.W. Cheever, M. Mamura, A. Sher, J.J. Letterio, E.M. Shevach, and C.A. Piccirillo. 2005. TGF-beta1 production by CD4+ CD25+ regulatory T cells is not essential for suppression of intestinal inflammation. *Eur J Immunol* 35:2886-2895.
90. Belkaid, Y., C.A. Piccirillo, S. Mendez, E.M. Shevach, and D.L. Sacks. 2002. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* 420:502-507.
91. Singh, B., S. Read, C. Asseman, V. Malmstrom, C. Mottet, L.A. Stephens, R. Stepankova, H. Tlaskalova, and F. Powrie. 2001. Control of intestinal inflammation by regulatory T cells. *Immunol Rev* 182:190-200.
92. Sakaguchi, S. 2004. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 22:531-562.

93. Berendt, M.J., and R.J. North. 1980. T-cell-mediated suppression of anti-tumor immunity. An explanation for progressive growth of an immunogenic tumor. *J Exp Med* 151:69-80.
94. Shimizu, J., S. Yamazaki, and S. Sakaguchi. 1999. Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol* 163:5211-5218.
95. Kono, K., H. Kawaida, A. Takahashi, H. Sugai, K. Mimura, N. Miyagawa, H. Omata, and H. Fujii. 2006. CD4(+)CD25high regulatory T cells increase with tumor stage in patients with gastric and esophageal cancers. *Cancer Immunol Immunother* 55:1064-1071.
96. Wolf, A.M., D. Wolf, M. Steurer, G. Gastl, E. Gunsilius, and B. Grubeck-Loebenstein. 2003. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin Cancer Res* 9:606-612.
97. Albers, A.E., R.L. Ferris, G.G. Kim, K. Chikamatsu, A.B. DeLeo, and T.L. Whiteside. 2005. Immune responses to p53 in patients with cancer: enrichment in tetramer+ p53 peptide-specific T cells and regulatory T cells at tumor sites. *Cancer Immunol Immunother* 54:1072-1081.
98. Woo, E.Y., H. Yeh, C.S. Chu, K. Schlienger, R.G. Carroll, J.L. Riley, L.R. Kaiser, and C.H. June. 2002. Cutting edge: Regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation. *J Immunol* 168:4272-4276.
99. Liyanage, U.K., T.T. Moore, H.G. Joo, Y. Tanaka, V. Herrmann, G. Doherty, J.A. Drebin, S.M. Strasberg, T.J. Eberlein, P.S. Goedegebuure, and D.C. Linehan. 2002. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol* 169:2756-2761.
100. Ormandy, L.A., T. Hillemann, H. Wedemeyer, M.P. Manns, T.F. Greten, and F. Korangy. 2005. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 65:2457-2464.
101. Yang, Z.Z., A.J. Novak, M.J. Stenson, T.E. Witzig, and S.M. Ansell. 2006. Intratumoral CD4+CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression of infiltrating CD4+ T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 107:3639-3646.
102. Viguier, M., F. Lemaitre, O. Verola, M.S. Cho, G. Gorochov, L. Dubertret, H. Bachelez, P. Kourilsky, and L. Ferradini. 2004. Foxp3 expressing CD4+CD25(high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. *J Immunol* 173:1444-1453.
103. Nishikawa, H., T. Kato, K. Tanida, A. Hiasa, I. Tawara, H. Ikeda, Y. Ikarashi, H. Wakasugi, M. Kronenberg, T. Nakayama, M. Taniguchi, K. Kuribayashi, L.J. Old, and H. Shiku. 2003. CD4+ CD25+ T cells responding to serologically defined autoantigens suppress antitumor immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10902-10906.
104. Wang, H.Y., D.A. Lee, G. Peng, Z. Guo, Y. Li, Y. Kiniwa, E.M. Shevach, and R.F. Wang. 2004. Tumor-specific human CD4+ regulatory T cells and their ligands: implications for immunotherapy. *Immunity* 20:107-118.
105. Ho, W.Y., C. Yee, and P.D. Greenberg. 2002. Adoptive therapy with CD8(+) T cells: it may get by with a little help from its friends. *J Clin Invest* 110:1415-1417.
106. Nishikawa, H., E. Jager, G. Ritter, L.J. Old, and S. Gnjatic. 2005. CD4+ CD25+ regulatory T cells control the induction of antigen-specific CD4+ helper T cell responses in cancer patients. *Blood* 106:1008-1011.
107. Chakraborty, N.G., S. Chattopadhyay, S. Mehrotra, A. Chhabra, and B. Mukherji. 2004. Regulatory T-cell response and tumor vaccine-induced cytotoxic T lymphocytes in human melanoma. *Hum Immunol* 65:794-802.
108. Chen, M.L., M.J. Pittet, L. Gorelik, R.A. Flavell, R. Weissleder, H. von Boehmer, and K. Khazaie. 2005. Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF-beta signals in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:419-424.

109. Yu, P., Y. Lee, W. Liu, T. Krausz, A. Chong, H. Schreiber, and Y.X. Fu. 2005. Intratumor depletion of CD4+ cells unmasks tumor immunogenicity leading to the rejection of late-stage tumors. *J Exp Med* 201:779-791.
110. Ishida, T., and R. Ueda. 2006. CCR4 as a novel molecular target for immunotherapy of cancer. *Cancer Sci* 97:1139-1146.
111. Ghiringhelli, F., P.E. Puig, S. Roux, A. Parcellier, E. Schmitt, E. Solary, G. Kroemer, F. Martin, B. Chauffert, and L. Zitvogel. 2005. Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J Exp Med* 202:919-929.
112. Vence, L., A.K. Palucka, J.W. Fay, T. Ito, Y.J. Liu, J. Banchereau, and H. Ueno. 2007. Circulating tumor antigen-specific regulatory T cells in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:20884-20889.
113. Schultz, E.S., and G. Schuler. 2005. [Malignant melanoma. Diagnosis and therapy]. *HNO* 53:928-939.
114. Lehnert, M., A. Eberle, S. Hentschel, A. Katalinic, J. Kieschke, I. Schmidtman, G. Schubert-Fritschle, C. Stegmaier, and H.W. Hense. 2005. [Malignant melanoma of the skin as evidenced by epidemiological cancer registries in Germany -- incidence, clinical parameters, variations in recording]. *Gesundheitswesen* 67:729-735.
115. Lasithiotakis, K.G., U. Leiter, R. Gorkiewicz, T. Eigentler, H. Breuninger, G. Metzler, W. Strobel, and C. Garbe. 2006. The incidence and mortality of cutaneous melanoma in Southern Germany: trends by anatomic site and pathologic characteristics, 1976 to 2003. *Cancer* 107:1331-1339.
116. Diepgen, T.L., and V. Mahler. 2002. The epidemiology of skin cancer. *Br J Dermatol* 146 Suppl 61:1-6.
117. Buettner, P.G., U. Leiter, T.K. Eigentler, and C. Garbe. 2005. Development of prognostic factors and survival in cutaneous melanoma over 25 years: An analysis of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society. *Cancer* 103:616-624.
118. Harrison, S.L., R. MacLennan, and P.G. Buettner. 2008. Sun exposure and the incidence of melanocytic nevi in young Australian children. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17:2318-2324.
119. Anna, B., Z. Blazej, G. Jacqueline, C.J. Andrew, R. Jeffrey, and S. Andrzej. 2007. Mechanism of UV-related carcinogenesis and its contribution to nevi/melanoma. *Expert Rev Dermatol* 2:451-469.
120. Markovic, S.N., L.A. Erickson, R.D. Rao, R.H. Weenig, B.A. Pockaj, A. Bardia, C.M. Vachon, S.E. Schild, R.R. McWilliams, J.L. Hand, S.D. Laman, L.A. Kottschade, W.J. Maples, M.R. Pittelkow, J.S. Pulido, J.D. Cameron, and E.T. Creagan. 2007. Malignant melanoma in the 21st century, part 2: staging, prognosis, and treatment. *Mayo Clin Proc* 82:490-513.
121. Gidanian, S., M. Mentelle, F.L. Meyskens, Jr., and P.J. Farmer. 2008. Melanosomal damage in normal human melanocytes induced by UVB and metal uptake--a basis for the pro-oxidant state of melanoma. *Photochem Photobiol* 84:556-564.
122. Brose, M.S., P. Volpe, M. Feldman, M. Kumar, I. Rishi, R. Gerrero, E. Einhorn, M. Herlyn, J. Minna, A. Nicholson, J.A. Roth, S.M. Albelda, H. Davies, C. Cox, G. Brignell, P. Stephens, P.A. Futreal, R. Wooster, M.R. Stratton, and B.L. Weber. 2002. BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Res* 62:6997-7000.
123. Thorn, M., R. Bergstrom, M. Hedblad, B. Lagerlof, U. Ringborg, and H.O. Adami. 1996. Predictors of late mortality in cutaneous malignant melanoma--a population-based study in Sweden. *Int J Cancer* 67:38-44.
124. Bedikian, A.Y., M. Millward, H. Pehamberger, R. Conry, M. Gore, U. Trefzer, A.C. Pavlick, R. DeConti, E.M. Hersh, P. Hersey, J.M. Kirkwood, and F.G. Haluska. 2006. Bcl-2 antisense (oblimersen sodium) plus dacarbazine in patients with advanced melanoma: the Oblimersen Melanoma Study Group. *J Clin Oncol* 24:4738-4745.

125. Middleton, M.R., J.J. Grob, N. Aaronson, G. Fierlbeck, W. Tilgen, S. Seiter, M. Gore, S. Aamdal, J. Cebon, A. Coates, B. Dreno, M. Henz, D. Schadendorf, A. Kapp, J. Weiss, U. Fraass, P. Statkevich, M. Muller, and N. Thatcher. 2000. Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. *J Clin Oncol* 18:158-166.
126. Chapman, P.B., L.H. Einhorn, M.L. Meyers, S. Saxman, A.N. Destro, K.S. Panageas, C.B. Begg, S.S. Agarwala, L.M. Schuchter, M.S. Ernstoff, A.N. Houghton, and J.M. Kirkwood. 1999. Phase III multicenter randomized trial of the Dartmouth regimen versus dacarbazine in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 17:2745-2751.
127. Middleton, M.R., P. Lorigan, J. Owen, L. Ashcroft, S.M. Lee, P. Harper, and N. Thatcher. 2000. A randomized phase III study comparing dacarbazine, BCNU, cisplatin and tamoxifen with dacarbazine and interferon in advanced melanoma. *Br J Cancer* 82:1158-1162.
128. Wolchok, J.D., and Y.M. Saenger. 2007. Current topics in melanoma. *Curr Opin Oncol* 19:116-120.
129. Quirbt, I., S. Verma, T. Petrella, K. Bak, and M. Charette. 2007. Temozolomide for the treatment of metastatic melanoma. *Curr Oncol* 14:27-33.
130. Atkins, M.B., J.A. Sosman, S. Agarwala, T. Logan, J.I. Clark, M.S. Ernstoff, D. Lawson, J.P. Dutcher, G. Weiss, B. Curti, and K.A. Margolin. 2008. Temozolomide, thalidomide, and whole brain radiation therapy for patients with brain metastasis from metastatic melanoma: a phase II Cytokine Working Group study. *Cancer* 113:2139-2145.
131. Boulikas, T., and M. Vougiouka. 2004. Recent clinical trials using cisplatin, carboplatin and their combination chemotherapy drugs (review). *Oncol Rep* 11:559-595.
132. Tang, L., V.A. Tron, J.C. Reed, K.J. Mah, M. Krajewska, G. Li, X. Zhou, V.C. Ho, and M.J. Trotter. 1998. Expression of apoptosis regulators in cutaneous malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 4:1865-1871.
133. Gjertsen, B.T., T. Bredholt, N. Anensen, and O.K. Vintermyr. 2007. Bcl-2 antisense in the treatment of human malignancies: a delusion in targeted therapy. *Curr Pharm Biotechnol* 8:373-381.
134. Chang, H., and A.D. Schimmer. 2007. Livin/melanoma inhibitor of apoptosis protein as a potential therapeutic target for the treatment of malignancy. *Mol Cancer Ther* 6:24-30.
135. Hu, Y., G. Cherton-Horvat, V. Dragowska, S. Baird, R.G. Korneluk, J.P. Durkin, L.D. Mayer, and E.C. LaCasse. 2003. Antisense oligonucleotides targeting XIAP induce apoptosis and enhance chemotherapeutic activity against human lung cancer cells in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 9:2826-2836.
136. Panka, D.J., M.B. Atkins, and J.W. Mier. 2006. Targeting the mitogen-activated protein kinase pathway in the treatment of malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 12:2371s-2375s.
137. Dadzie, O.E., S. Yang, A. Emley, M. Keady, J. Bhawan, and M. Mahalingam. 2008. RAS and RAF mutations in banal melanocytic aggregates contiguous with primary cutaneous melanoma: clues to melanomagenesis. *Br J Dermatol*
138. Davies, H., G.R. Bignell, C. Cox, P. Stephens, S. Edkins, S. Clegg, J. Teague, H. Woffendin, M.J. Garnett, W. Bottomley, N. Davis, E. Dicks, R. Ewing, Y. Floyd, K. Gray, S. Hall, R. Hawes, J. Hughes, V. Kosmidou, A. Menzies, C. Mould, A. Parker, C. Stevens, S. Watt, S. Hooper, R. Wilson, H. Jayatilake, B.A. Gusterson, C. Cooper, J. Shipley, D. Hargrave, K. Pritchard-Jones, N. Maitland, G. Chenevix-Trench, G.J. Riggins, D.D. Bigner, G. Palmieri, A. Cossu, A. Flanagan, A. Nicholson, J.W. Ho, S.Y. Leung, S.T. Yuen, B.L. Weber, H.F. Seigler, T.L. Darrow, H. Paterson, R. Marais, C.J. Marshall, R. Wooster, M.R. Stratton, and P.A. Futreal. 2002. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417:949-954.

139. Wan, P.T., M.J. Garnett, S.M. Roe, S. Lee, D. Niculescu-Duvaz, V.M. Good, C.M. Jones, C.J. Marshall, C.J. Springer, D. Barford, and R. Marais. 2004. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 116:855-867.
140. Gollob, J.A., S. Wilhelm, C. Carter, and S.L. Kelley. 2006. Role of Raf kinase in cancer: therapeutic potential of targeting the Raf/MEK/ERK signal transduction pathway. *Semin Oncol* 33:392-406.
141. Eisen, T., T. Ahmad, K.T. Flaherty, M. Gore, S. Kaye, R. Marais, I. Gibbens, S. Hackett, M. James, L.M. Schuchter, K.L. Nathanson, C. Xia, R. Simantov, B. Schwartz, M. Poulin-Costello, P.J. O'Dwyer, and M.J. Ratain. 2006. Sorafenib in advanced melanoma: a Phase II randomised discontinuation trial analysis. *Br J Cancer* 95:581-586.
142. Dal Lago, L., V. D'Hondt, and A. Awada. 2008. Selected combination therapy with sorafenib: a review of clinical data and perspectives in advanced solid tumors. *Oncologist* 13:845-858.
143. Hutson, T.E., and R.A. Figlin. 2008. Experimental therapy for advanced renal cell carcinoma. *Expert Opin Investig Drugs* 17:1693-1702.
144. Egberts, F., K.C. Kahler, E. Livingstone, and A. Hauschild. 2008. Metastatic melanoma: scientific rationale for sorafenib treatment and clinical results. *Onkologie* 31:398-403.
145. Flaherty, K.T., J. Schiller, L.M. Schuchter, G. Liu, D.A. Tuveson, M. Redlinger, C. Lathia, C. Xia, O. Petrenciuc, S.R. Hingorani, M.A. Jacobetz, P.A. Van Belle, D. Elder, M.S. Brose, B.L. Weber, M.R. Albertini, and P.J. O'Dwyer. 2008. A phase I trial of the oral, multikinase inhibitor sorafenib in combination with carboplatin and paclitaxel. *Clin Cancer Res* 14:4836-4842.
146. Hershko, A. 2005. The ubiquitin system for protein degradation and some of its roles in the control of the cell division cycle. *Cell Death Differ* 12:1191-1197.
147. Kashani-Sabet, M., L. Shaikh, J.R. Miller, 3rd, M. Nosrati, C.M. Ferreira, R.J. Debs, and R.W. Sagebiel. 2004. NF-kappa B in the vascular progression of melanoma. *J Clin Oncol* 22:617-623.
148. Mani, A., and E.P. Gelmann. 2005. The ubiquitin-proteasome pathway and its role in cancer. *J Clin Oncol* 23:4776-4789.
149. Adams, J. 2004. The proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nat Rev Cancer* 4:349-360.
150. Markovic, S.N., S.M. Geyer, F. Dawkins, W. Sharfman, M. Albertini, W. Maples, P.M. Fracasso, T. Fitch, P. Lorusso, A.A. Adjei, and C. Erlichman. 2005. A phase II study of bortezomib in the treatment of metastatic malignant melanoma. *Cancer* 103:2584-2589.
151. Boon, T., P.G. Coulie, B.J. Van den Eynde, and P. van der Bruggen. 2006. Human T cell responses against melanoma. *Annu Rev Immunol* 24:175-208.
152. Chapman, P.B. 2007. Melanoma vaccines. *Semin Oncol* 34:516-523.
153. Smith, C.M., N.S. Wilson, J. Waithman, J.A. Villadangos, F.R. Carbone, W.R. Heath, and G.T. Belz. 2004. Cognate CD4(+) T cell licensing of dendritic cells in CD8(+) T cell immunity. *Nat Immunol* 5:1143-1148.
154. Soiffer, R., F.S. Hodi, F. Haluska, K. Jung, S. Gillissen, S. Singer, K. Tanabe, R. Duda, S. Mentzer, M. Jaklitsch, R. Bueno, S. Clift, S. Hardy, D. Neuberg, R. Mulligan, I. Webb, M. Mihm, and G. Dranoff. 2003. Vaccination with irradiated, autologous melanoma cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by adenoviral-mediated gene transfer augments antitumor immunity in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 21:3343-3350.
155. Grabbe, S., S. Beissert, T. Schwarz, and R.D. Granstein. 1995. Dendritic cells as initiators of tumor immune responses: a possible strategy for tumor immunotherapy? *Immunol Today* 16:117-121.

156. Nestle, F.O., S. Aljagic, M. Gilliet, Y. Sun, S. Grabbe, R. Dummer, G. Burg, and D. Schadendorf. 1998. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 4:328-332.
157. Iwasaki, A., and R. Medzhitov. 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 5:987-995.
158. Jonuleit, H., A. Giesecke-Tuettenberg, T. Tuting, B. Thurner-Schuler, T.B. Stuge, L. Paragnik, A. Kandemir, P.P. Lee, G. Schuler, J. Knop, and A.H. Enk. 2001. A comparison of two types of dendritic cell as adjuvants for the induction of melanoma-specific T-cell responses in humans following intranodal injection. *Int J Cancer* 93:243-251.
159. Schuler-Thurner, B., E.S. Schultz, T.G. Berger, G. Weinlich, S. Ebner, P. Woerl, A. Bender, B. Feuerstein, P.O. Fritsch, N. Romani, and G. Schuler. 2002. Rapid induction of tumor-specific type 1 T helper cells in metastatic melanoma patients by vaccination with mature, cryopreserved, peptide-loaded monocyte-derived dendritic cells. *J Exp Med* 195:1279-1288.
160. Mackensen, A., B. Herbst, J.L. Chen, G. Kohler, C. Noppen, W. Herr, G.C. Spagnoli, V. Cerundolo, and A. Lindemann. 2000. Phase I study in melanoma patients of a vaccine with peptide-pulsed dendritic cells generated in vitro from CD34(+) hematopoietic progenitor cells. *Int J Cancer* 86:385-392.
161. Banchereau, J., A.K. Palucka, M. Dhodapkar, S. Burkeholder, N. Taquet, A. Rolland, S. Taquet, S. Coquery, K.M. Wittkowski, N. Bhardwaj, L. Pineiro, R. Steinman, and J. Fay. 2001. Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine. *Cancer Res* 61:6451-6458.
162. Schadendorf, D., S. Ugurel, B. Schuler-Thurner, F.O. Nestle, A. Enk, E.B. Brocker, S. Grabbe, W. Rittgen, L. Edler, A. Sucker, C. Zimpfer-Rechner, T. Berger, J. Kamarashev, G. Burg, H. Jonuleit, A. Tutenberg, J.C. Becker, P. Keikavoussi, E. Kampgen, and G. Schuler. 2006. Dacarbazine (DTIC) versus vaccination with autologous peptide-pulsed dendritic cells (DC) in first-line treatment of patients with metastatic melanoma: a randomized phase III trial of the DC study group of the DeCOG. *Ann Oncol* 17:563-570.
163. Jonuleit, H., E. Schmitt, G. Schuler, J. Knop, and A.H. Enk. 2000. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med* 192:1213-1222.
164. Mahnke, K., and A.H. Enk. 2005. Dendritic cells: key cells for the induction of regulatory T cells? *Curr Top Microbiol Immunol* 293:133-150.
165. Gabrilovich, D.I., H.L. Chen, K.R. Girgis, H.T. Cunningham, G.M. Meny, S. Nadaf, D. Kavanaugh, and D.P. Carbone. 1996. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med* 2:1096-1103.
166. Ratta, M., F. Fagnoni, A. Curti, R. Vescovini, P. Sansoni, B. Oliviero, M. Fogli, E. Ferri, G.R. Della Cuna, S. Tura, M. Baccharani, and R.M. Lemoli. 2002. Dendritic cells are functionally defective in multiple myeloma: the role of interleukin-6. *Blood* 100:230-237.
167. Almand, B., J.R. Resser, B. Lindman, S. Nadaf, J.I. Clark, E.D. Kwon, D.P. Carbone, and D.I. Gabrilovich. 2000. Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer. *Clin Cancer Res* 6:1755-1766.
168. Ormandy, L.A., A. Farber, T. Cantz, S. Petrykowska, H. Wedemeyer, M. Horning, F. Lehner, M.P. Manns, F. Korangy, and T.F. Greten. 2006. Direct ex vivo analysis of dendritic cells in patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 12:3275-3282.
169. Maecker, B., D. Mougiakakos, M. Zimmermann, M. Behrens, S. Hollander, A. Schrauder, M. Schrappe, K. Welte, and C. Klein. 2006. Dendritic cell deficiencies in pediatric acute lymphoblastic leukemia patients. *Leukemia* 20:645-649.

170. Greenfield, E.A., K.A. Nguyen, and V.K. Kuchroo. 1998. CD28/B7 costimulation: a review. *Crit Rev Immunol* 18:389-418.
171. Attia, P., G.Q. Phan, A.V. Maker, M.R. Robinson, M.M. Quezada, J.C. Yang, R.M. Sherry, S.L. Topalian, U.S. Kammula, R.E. Royal, N.P. Restifo, L.R. Haworth, C. Levy, S.A. Mavroukakis, G. Nichol, M.J. Yellin, and S.A. Rosenberg. 2005. Autoimmunity correlates with tumor regression in patients with metastatic melanoma treated with anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4. *J Clin Oncol* 23:6043-6053.
172. Ribas, A., L.H. Camacho, G. Lopez-Berestein, D. Pavlov, C.A. Bulanhagui, R. Millham, B. Comin-Anduix, J.M. Reuben, E. Seja, C.A. Parker, A. Sharma, J.A. Glaspy, and J. Gomez-Navarro. 2005. Antitumor activity in melanoma and anti-self responses in a phase I trial with the anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 monoclonal antibody CP-675,206. *J Clin Oncol* 23:8968-8977.
173. Maker, A.V., P. Attia, and S.A. Rosenberg. 2005. Analysis of the cellular mechanism of antitumor responses and autoimmunity in patients treated with CTLA-4 blockade. *J Immunol* 175:7746-7754.
174. Peggs, K.S., S.A. Quezada, A.J. Korman, and J.P. Allison. 2006. Principles and use of anti-CTLA4 antibody in human cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 18:206-213.
175. Cesana, G.C., G. DeRaffele, S. Cohen, D. Moroziewicz, J. Mitcham, J. Stoutenburg, K. Cheung, C. Hesdorffer, S. Kim-Schulze, and H.L. Kaufman. 2006. Characterization of CD4+CD25+ regulatory T cells in patients treated with high-dose interleukin-2 for metastatic melanoma or renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 24:1169-1177.
176. Turka, L.A., and P.T. Walsh. 2008. IL-2 signaling and CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells. *Front Biosci* 13:1440-1446.
177. Ahmadzadeh, M., and S.A. Rosenberg. 2006. IL-2 administration increases CD4+ CD25(hi) Foxp3+ regulatory T cells in cancer patients. *Blood* 107:2409-2414.
178. Buhaescu, I., L. Segall, D. Goldsmith, and A. Covic. 2005. New immunosuppressive therapies in renal transplantation: monoclonal antibodies. *J Nephrol* 18:529-536.
179. Re, G.G., C. Waters, L. Poisson, M.C. Willingham, K. Sugamura, and A.E. Frankel. 1996. Interleukin 2 (IL-2) receptor expression and sensitivity to diphtheria fusion toxin DAB389IL-2 in cultured hematopoietic cells. *Cancer Res* 56:2590-2595.
180. Talpur, R., D.M. Jones, A.J. Alencar, N. Apisarnthanarax, K.L. Herne, Y. Yang, and M. Duvic. 2006. CD25 expression is correlated with histological grade and response to denileukin diftitox in cutaneous T-cell lymphoma. *J Invest Dermatol* 126:575-583.
181. Morgan, S.J., J.F. Seymour, H.M. Prince, D.A. Westerman, and M.M. Wolf. 2004. Confirmation of the activity of the interleukin-2 fusion toxin denileukin diftitox against chemorefractory chronic lymphocytic leukemia, including cases with chromosome 17p deletions and without detectable CD25 expression. *Clin Cancer Res* 10:3572-3575.
182. Mahnke, K., K. Schonfeld, S. Fondel, S. Ring, S. Karakhanova, K. Wiedemeyer, T. Bedke, T.S. Johnson, V. Storn, S. Schallenberg, and A.H. Enk. 2007. Depletion of CD4+CD25+ human regulatory T cells in vivo: kinetics of Treg depletion and alterations in immune functions in vivo and in vitro. *Int J Cancer* 120:2723-2733.
183. Dannull, J., Z. Su, D. Rizzieri, B.K. Yang, D. Coleman, D. Yancey, A. Zhang, P. Dahm, N. Chao, E. Gilboa, and J. Vieweg. 2005. Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells. *J Clin Invest* 115:3623-3633.
184. Barnett, B., I. Kryczek, P. Cheng, W. Zou, and T.J. Curiel. 2005. Regulatory T cells in ovarian cancer: biology and therapeutic potential. *Am J Reprod Immunol* 54:369-377.
185. Litzinger, M.T., R. Fernando, T.J. Curiel, D.W. Grosenbach, J. Schlom, and C. Palena. 2007. IL-2 immunotoxin denileukin diftitox reduces regulatory T cells and enhances vaccine-mediated T-cell immunity. *Blood* 110:3192-3201.

186. Attia, P., A.V. Maker, L.R. Haworth, L. Rogers-Freezer, and S.A. Rosenberg. 2005. Inability of a fusion protein of IL-2 and diphtheria toxin (Denileukin Diftitox, DAB389IL-2, ONTAK) to eliminate regulatory T lymphocytes in patients with melanoma. *J Immunother* 28:582-592.
187. Kannan, K., N.E. Sharpless, J. Xu, R.C. O'Hagan, M. Bosenberg, and L. Chin. 2003. Components of the Rb pathway are critical targets of UV mutagenesis in a murine melanoma model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:1221-1225.
188. Asai, N., M. Jijiwa, A. Enomoto, K. Kawai, K. Maeda, M. Ichihara, Y. Murakumo, and M. Takahashi. 2006. RET receptor signaling: dysfunction in thyroid cancer and Hirschsprung's disease. *Pathol Int* 56:164-172.
189. van Weering, D.H., and J.L. Bos. 1998. Signal transduction by the receptor tyrosine kinase Ret. *Recent Results Cancer Res* 154:271-281.
190. Kato, M., M. Takahashi, A.A. Akhand, W. Liu, Y. Dai, S. Shimizu, T. Iwamoto, H. Suzuki, and I. Nakashima. 1998. Transgenic mouse model for skin malignant melanoma. *Oncogene* 17:1885-1888.
191. Kato, M., W. Liu, A.A. Akhand, Y. Dai, M. Ohbayashi, T. Tuzuki, H. Suzuki, K. Isobe, M. Takahashi, and I. Nakashima. 1999. Linkage between melanocytic tumor development and early burst of Ret protein expression for tolerance induction in metallothionein-I/ret transgenic mouse lines. *Oncogene* 18:837-842.
192. Fritzsching, B., N. Oberle, E. Pauly, R. Geffers, J. Buer, J. Poschl, P. Krammer, O. Linderkamp, and E. Suri-Payer. 2006. Naive regulatory T cells: a novel subpopulation defined by resistance toward CD95L-mediated cell death. *Blood* 108:3371-3378.
193. De Panfilis, G., N. Campanini, M. Santini, G. Mori, E. Tognetti, R. Maestri, M. Lombardi, E. Froio, D. Ferrari, and R. Ricci. 2008. Phase- and stage-related proportions of T cells bearing the transcription factor FOXP3 infiltrate primary melanoma. *J Invest Dermatol* 128:676-684.
194. Hontsu, S., H. Yoneyama, S. Ueha, Y. Terashima, M. Kitabatake, A. Nakano, T. Ito, H. Kimura, and K. Matsushima. 2004. Visualization of naturally occurring Foxp3+ regulatory T cells in normal and tumor-bearing mice. *Int Immunopharmacol* 4:1785-1793.
195. Laronne-Bar-On, A., D. Zipori, and N. Haran-Ghera. 2008. Increased regulatory versus effector T cell development is associated with thymus atrophy in mouse models of multiple myeloma. *J Immunol* 181:3714-3724.
196. Gao, Q., S.J. Qiu, J. Fan, J. Zhou, X.Y. Wang, Y.S. Xiao, Y. Xu, Y.W. Li, and Z.Y. Tang. 2007. Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. *J Clin Oncol* 25:2586-2593.
197. Siddiqui, S.A., X. Frigola, S. Bonne-Annee, M. Mercader, S.M. Kuntz, A.E. Krambeck, S. Sengupta, H. Dong, J.C. Cheville, C.M. Lohse, C.J. Krco, W.S. Webster, B.C. Leibovich, M.L. Blute, K.L. Knutson, and E.D. Kwon. 2007. Tumor-infiltrating Foxp3-CD4+CD25+ T cells predict poor survival in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 13:2075-2081.
198. Curiel, T.J., G. Coukos, L. Zou, X. Alvarez, P. Cheng, P. Mottram, M. Evdemon-Hogan, J.R. Conejo-Garcia, L. Zhang, M. Burow, Y. Zhu, S. Wei, I. Kryczek, B. Daniel, A. Gordon, L. Myers, A. Lackner, M.L. Disis, K.L. Knutson, L. Chen, and W. Zou. 2004. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 10:942-949.
199. Hiraoka, N., K. Onozato, T. Kosuge, and S. Hirohashi. 2006. Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clin Cancer Res* 12:5423-5434.
200. Ahmadzadeh, M., A. Felipe-Silva, B. Heemskerk, D.J. Powell, Jr., J.R. Wunderlich, M.J. Merino, and S.A. Rosenberg. 2008. FOXP3 expression accurately defines the population of intratumoral regulatory T cells that selectively accumulate in metastatic melanoma lesions. *Blood*

201. Curtin, J.F., M. Candolfi, T.M. Fakhouri, C. Liu, A. Alden, M. Edwards, P.R. Lowenstein, and M.G. Castro. 2008. Treg depletion inhibits efficacy of cancer immunotherapy: implications for clinical trials. *PLoS ONE* 3:e1983.
202. Quezada, S.A., K.S. Peggs, T.R. Simpson, Y. Shen, D.R. Littman, and J.P. Allison. 2008. Limited tumor infiltration by activated T effector cells restricts the therapeutic activity of regulatory T cell depletion against established melanoma. *J Exp Med* 205:2125-2138.
203. Gabrilovich, D. 2004. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nat Rev Immunol* 4:941-952.
204. Ishida, T., T. Oyama, D.P. Carbone, and D.I. Gabrilovich. 1998. Defective function of Langerhans cells in tumor-bearing animals is the result of defective maturation from hemopoietic progenitors. *J Immunol* 161:4842-4851.
205. Ciavarrà, R.P., D.A. Holterman, R.R. Brown, P. Mangiotti, N. Yousefieh, G.L. Wright, Jr., P.F. Schellhammer, W.F. Glass, and K.D. Somers. 2004. Prostate tumor microenvironment alters immune cells and prevents long-term survival in an orthotopic mouse model following flt3-ligand/CD40-ligand immunotherapy. *J Immunother* 27:13-26.
206. Serafini, P., I. Borrello, and V. Bronte. 2006. Myeloid suppressor cells in cancer: recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression. *Semin Cancer Biol* 16:53-65.
207. Iellem, A., M. Mariani, R. Lang, H. Recalde, P. Panina-Bordignon, F. Sinigaglia, and D. D'Ambrosio. 2001. Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med* 194:847-853.
208. Mizukami, Y., K. Kono, Y. Kawaguchi, H. Akaike, K. Kamimura, H. Sugai, and H. Fujii. 2008. CCL17 and CCL22 chemokines within tumor microenvironment are related to accumulation of Foxp3+ regulatory T cells in gastric cancer. *Int J Cancer* 122:2286-2293.
209. Osmond, D.G. 1994. Production and selection of B lymphocytes in bone marrow: lymphostromal interactions and apoptosis in normal, mutant and transgenic mice. *Adv Exp Med Biol* 355:15-20.
210. Zou, L., B. Barnett, H. Safah, V.F. Larussa, M. Evdemon-Hogan, P. Mottram, S. Wei, O. David, T.J. Curiel, and W. Zou. 2004. Bone marrow is a reservoir for CD4+CD25+ regulatory T cells that traffic through CXCL12/CXCR4 signals. *Cancer Res* 64:8451-8455.
211. Kobayashi, N., N. Hiraoka, W. Yamagami, H. Ojima, Y. Kanai, T. Kosuge, A. Nakajima, and S. Hirohashi. 2007. FOXP3+ regulatory T cells affect the development and progression of hepatocarcinogenesis. *Clin Cancer Res* 13:902-911.
212. Kawaida, H., K. Kono, A. Takahashi, H. Sugai, K. Mimura, N. Miyagawa, H. Omata, A. Ooi, and H. Fujii. 2005. Distribution of CD4+CD25high regulatory T-cells in tumor-draining lymph nodes in patients with gastric cancer. *J Surg Res* 124:151-157.
213. Onizuka, S., I. Tawara, J. Shimizu, S. Sakaguchi, T. Fujita, and E. Nakayama. 1999. Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res* 59:3128-3133.
214. Ohmura, Y., K. Yoshikawa, S. Saga, R. Ueda, Y. Kazaoka, and S. Yamada. 2008. Combinations of tumor-specific CD8+ CTLs and anti-CD25 mAb provide improved immunotherapy. *Oncol Rep* 19:1265-1270.
215. Matsushita, N., S.A. Pilon-Thomas, L.M. Martin, and A.I. Riker. 2008. Comparative methodologies of regulatory T cell depletion in a murine melanoma model. *J Immunol Methods* 333:167-179.
216. Jaron, B., E. Maranghi, C. Leclerc, and L. Majlessi. 2008. Effect of attenuation of Treg during BCG immunization on anti-mycobacterial Th1 responses and protection against *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS ONE* 3:e2833.

217. Chen, Y.L., J.H. Fang, M.D. Lai, and Y.S. Shan. 2008. Depletion of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can promote local immunity to suppress tumor growth in benzo[a]pyrene-induced forestomach carcinoma. *World J Gastroenterol* 14:5797-5809.
218. Nagai, H., T. Horikawa, I. Hara, A. Fukunaga, S. Oniki, M. Oka, C. Nishigori, and M. Ichihashi. 2004. In vivo elimination of CD25+ regulatory T cells leads to tumor rejection of B16F10 melanoma, when combined with interleukin-12 gene transfer. *Exp Dermatol* 13:613-620.
219. Trinchieri, G. 1994. Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. *Blood* 84:4008-4027.
220. Imai, H., M. Saio, K. Nonaka, T. Suwa, N. Umemura, G.F. Ouyang, J. Nakagawa, H. Tomita, S. Osada, Y. Sugiyama, Y. Adachi, and T. Takami. 2007. Depletion of CD4+CD25+ regulatory T cells enhances interleukin-2-induced antitumor immunity in a mouse model of colon adenocarcinoma. *Cancer Sci* 98:416-423.
221. LeMaistre, C.F., M.N. Saleh, T.M. Kuzel, F. Foss, L.C. Platanius, G. Schwartz, M. Ratain, A. Rook, C.O. Freytes, F. Craig, J. Reuben, and J.C. Nichols. 1998. Phase I trial of a ligand fusion-protein (DAB389IL-2) in lymphomas expressing the receptor for interleukin-2. *Blood* 91:399-405.
222. Rasku, M.A., A.L. Clem, S. Telang, B. Taft, K. Gettings, H. Gragg, D. Cramer, S.C. Lear, K.M. McMasters, D.M. Miller, and J. Chesney. 2008. Transient T cell depletion causes regression of melanoma metastases. *J Transl Med* 6:12.
223. Kirkwood, J.M., A.A. Tarhini, M.C. Panelli, S.J. Moschos, H.M. Zarour, L.H. Butterfield, and H.J. Gogas. 2008. Next generation of immunotherapy for melanoma. *J Clin Oncol* 26:3445-3455.
224. Miller, A.M., K. Lundberg, V. Ozenci, A.H. Banham, M. Hellstrom, L. Egevad, and P. Pisa. 2006. CD4+CD25high T cells are enriched in the tumor and peripheral blood of prostate cancer patients. *J Immunol* 177:7398-7405.
225. Ichihara, F., K. Kono, A. Takahashi, H. Kawaida, H. Sugai, and H. Fujii. 2003. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers. *Clin Cancer Res* 9:4404-4408.
226. Mantovani, A., P. Romero, A.K. Palucka, and F.M. Marincola. 2008. Tumour immunity: effector response to tumour and role of the microenvironment. *Lancet* 371:771-783.
227. Taniguchi, T., N. Tanaka, and S. Taki. 1998. Regulation of the interferon system, immune response and oncogenesis by the transcription factor interferon regulatory factor-1. *Eur Cytokine Netw* 9:43-48.
228. Kirkwood, J. 2002. Cancer immunotherapy: the interferon-alpha experience. *Semin Oncol* 29:18-26.
229. Kirkwood, J.M., M.S. Ernstoff, C.A. Davis, M. Reiss, R. Ferraresi, and S.A. Rudnick. 1985. Comparison of intramuscular and intravenous recombinant alpha-2 interferon in melanoma and other cancers. *Ann Intern Med* 103:32-36.
230. Astsaturov, I., T. Petrella, E.U. Bagriacik, M. de Benedette, R. Uger, G. Lumber, N. Berinstein, I. Elias, N. Iscoe, C. Hammond, P. Hamilton, and D.E. Spaner. 2003. Amplification of virus-induced antimelanoma T-cell reactivity by high-dose interferon-alpha2b: implications for cancer vaccines. *Clin Cancer Res* 9:4347-4355.