

Aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Tumorimmunologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Überwachung des Anti-Tumor-Effekts transgener,  
gegen ein Minor-Histokompatibilitätsantigen gerichteter  
CD4<sup>+</sup>-T-Zellen mittels Biolumineszenz-Bildgebung nach  
adoptivem Transfer im Mausmodell.

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Daniele D'Abundo

aus Berlin

Datum der Promotion: 18.09.2020



## Vorwort

Teilergebnisse dieser Dissertation wurden veröffentlicht in:

Szyska M, Herda S, Althoff S, Heimann A, Russ J, D'Abundo D, Dang TM, Durieux I, Dörken B, Blankenstein T, Na I-K. A Transgenic Dual-Luciferase Reporter Mouse for Longitudinal and Functional Monitoring of T Cells In Vivo. *Cancer Immunol Res* 2018;6:110–120.

Dabei handelt es sich um Teile der im Abschnitt 3.1 erläuterten Ergebnisse. Hierfür wurden die von mir analysierten Daten, aus dem von mir durchgeführten und hier in der Abb. 8 dargestellten Experiment, von meinem Kollegen Dr. Martin Szyska verwendet, um die Abb. 6 (A und B) aus der oben genannten Publikation zu erstellen. Für die vorliegende Dissertation wurden dieselben Daten auf geringfügig andere Art und Weise analysiert und hier in den Abb. 9 und 10 dargestellt.

## Inhaltsverzeichnis

Vorwort.....	III
Zusammenfassung .....	VI
Abstract .....	VIII
Abbildungsverzeichnis.....	X
Tabellenverzeichnis.....	XI
Abkürzungsverzeichnis.....	XII
1. Einleitung.....	1
1.1 Biolumineszenz-Bildgebung zur Überwachung eines ATTs.....	1
1.1.1 Dby als Zielantigen des ATTs.....	2
1.1.2 ML-BLITC-Mäuse als Spendertiere .....	3
1.1.3 MB49 als Modelltumor.....	4
1.1.4 RAG-2 <sup>-/-</sup> -Mäuse als Empfängertiere .....	4
1.2 Laktatazidose .....	5
1.3 Bikarbonat zur Behandlung der Laktatazidose.....	6
1.4 Fragestellung .....	7
2. Material und Methoden.....	9
2.1 Material .....	9
2.2 Methoden .....	12
2.2.1 Kultur, Ernte und Injektion der MB49-Tumorzellen.....	12
2.2.2 Isolation der BLITC-Zellen durch magnetische Zellseparation .....	14
2.2.3 Durchflusszytometrie und Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung .....	15
2.2.4 Adoptiver Transfer der ML-BLITC-Zellen.....	17
2.2.5 In vivo Biolumineszenzmessungen.....	17
2.2.6 T-Zellkultur .....	18
2.2.7 In vitro Biolumineszenz-Experimente .....	19

2.2.8 IFN- $\gamma$ -Messung per Enzym-gekoppelten Immunadsorptionsassay .....	20
2.2.9 Graphen und statistische Analysen .....	21
3. Ergebnisse.....	23
3.1 Verlauf der Biolumineszenzsignale nach einem ATT von ML-BLITC-Zellen .....	23
3.2 Einfluss des Tumolvolumens auf den Verlauf der Biolumineszenzsignale .....	30
3.3 Verlauf der Biolumineszenzsignale bei der Behandlung eines MB49-Rezidivs....	33
3.4 Statistische Beurteilung der in vivo Experimente .....	38
3.5 Milchsäureproduktion des MB49-Tumors in vitro .....	38
3.6 Auswirkung der Laktatazidose auf NFAT-CBR-Signale und IFN- $\gamma$ -Produktion ....	38
4. Diskussion .....	45
5. Fazit.....	51
6. Ausblick .....	53
7. Literaturverzeichnis .....	56
8. Eidesstattliche Versicherung .....	62
9. Lebenslauf .....	63
10. Publikationsliste .....	64
11. Anteilserklärung .....	64
12. Danksagung .....	65

## Zusammenfassung

### **Einleitung**

Die Infusion tumorspezifischer T-Zellen (sog. *adoptiver T-Zell-Transfer* (ATT)) ist eine vielversprechende, jedoch nicht bei allen Behandelten erfolgreiche Krebstherapie. Gründe dafür könnten sein, dass die adoptiv transferierten T-Zellen nicht zum Tumor migrieren oder im Bereich des Tumors nicht aktiviert werden. Die Laktatazidose im Tumormikromilieu ist möglicherweise an letzterem Phänomen beteiligt. Diese Dissertation beschäftigt sich mit einem *dualen Biolumineszenz-Reportersystem*, das es ermöglichen soll adoptiv transferierte T-Zellen in einem Mausmodell in vivo zu überwachen. Des Weiteren soll es aufklären, wie Bikarbonat in vitro auf die Inhibition von T-Zellen durch eine Laktatazidose wirkt.

### **Methodik**

Bei der Biolumineszenz wird im Rahmen einer enzymatischen Reaktion durch sog. Luziferasen Licht freigesetzt. Luziferase-positive CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, die zudem transgene tumorspezifische T-Zell-Rezeptoren besitzen, sollen sich so nach einem ATT per Biolumineszenz-Bildgebung in den Empfängertieren nicht-invasiv detektieren lassen. Die biolumineszenten T-Zellen exprimieren sowohl konstitutiv eine *Renilla Luziferase* (Rluc), als auch eine NFAT-abhängige (*nuclear factor of activated t cells*) *click beetle red Luziferase* (NFAT-CBR). Erstere soll es ermöglichen zu beurteilen, wie und ob die adoptiv transferierten T-Zellen migrieren, expandieren und persistieren. Letztere soll anzeigen, ob sie dabei aktiviert werden.

### **Ergebnisse**

Nach dem ATT in tumortragende Mäuse waren zunächst im gesamten Körper der Tiere keine Biolumineszenzsignale ermittelbar. Innerhalb weniger Tage wurde ein Rluc-Signal in einem tumornahen Lymphknoten ersichtlich, gefolgt von einem Signal im Tumor, welches über einige Wochen hinweg sehr intensiv war. Das NFAT-CBR-Signal war dagegen nur an zwei Tagen intensiv messbar und die übrige Zeit kaum zu detektieren. Der erste Höhepunkt dieses Signals ging der Remission des Tumors dabei um wenige Tage voraus. In vitro wiesen T-Zellen, die in einem laktatazidotischem Milieu aktiviert wurden, stark reduzierte Signale der NFAT-CBR auf und produzierten kein IFN- $\gamma$ . Bikarbonat konnte diese Wirkungen der Laktatazidose verhindern.

## Schlussfolgerungen

Das *duale Biolumineszenz-Reportersystem* ist hervorragend geeignet, um in vivo adoptiv transferierte T-Zellen zu überwachen. Wie und ob die tumorspezifischen T-Zellen migrieren, expandieren und persistieren, macht es genauso erkenntlich, wie ihre Aktivierung. Des Weiteren konnte ermittelt werden, unter welchen Bedingungen diese transgenen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, die gegen ein tumorspezifisches *Minor-Histokompatibilitätsantigen* gerichtet sind, einen Tumorrückgang auslösen. Ob der ATT wirkt, hängt dabei maßgeblich davon ab, wie groß der Tumor zum Zeitpunkt der Behandlung ist und wie stark das Zielantigen durch die Tumorzellen exprimiert wird. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Laktatazidose die Aktivierung dieser T-Zellen hemmt und Bikarbonat dies verhindert.

## Abstract

### **Introduction**

The infusion of tumor-specific T cells (so-called *adoptive cell therapy* (ACT)) is a promising, but not always successful cancer treatment. Possible explanations for this would be that the adoptively transferred T cells do not migrate to the tumor or are not activated within the tumor site. The lactic acidosis within the tumor might contribute to the latter phenomenon. This dissertation focuses on a *dual bioluminescence reporter system*, designed to monitor adoptively transferred T cells in vivo in a mouse model. Additionally, it was used to determine which effect bicarbonate has on the inhibition of T cells by lactic acidosis in vitro.

### **Methods**

Bioluminescence is the emission of light by so-called luciferases through an enzymatic reaction. Luciferase-positive CD4<sup>+</sup> T cells, which additionally possess a transgenic tumor specific T cell receptor, should be detectable non-invasively in the recipient animals after ACT via bioluminescence imaging. The bioluminescent T cells constitutively express a *Renilla luciferase* (Rluc) and a NFAT-dependent (*nuclear factor of activated t cells*) *click beetle red luciferase* (NFAT-CBR). The former should allow monitoring, how and if the adoptively transferred T cells migrate, expand and persist. The latter should reveal whether they are activated.

### **Results**

After ACT in tumor bearing mice at first no bioluminescence was detectable throughout the body of the animals. Within a few days, however, an Rluc signal in a lymph node near the tumor appeared, followed by a signal within the tumor, which was very intense for weeks. The NFAT-CBR signal was intense on two separate days only and otherwise barely detectable. The first peak of this signal occurred a few days before the tumor regressed. In vitro T cells activated in the presence of lactic acid showed strongly reduced NFAT-CBR signals and did not produce IFN- $\gamma$ . Bicarbonate prevented these effects of lactic acid.

### **Conclusions**

The *dual bioluminescence reporter system* is perfectly suited to monitor adoptively transferred T cells in vivo. It reveals how and if tumor-specific T cells migrate, expand

and persist, and whether they are activated. It was also determined under which circumstances transgenic CD4<sup>+</sup> T cells, directed against a tumor specific *minor histocompatibility antigen*, cause tumor regression. Whether the ACT is effective, depends on the size of the tumor at the time of treatment and on the degree of target antigen expression by the tumor cells. Additionally, this dissertation demonstrates that lactic acid inhibits the activation of those T cells and that bicarbonate prevents this.

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Gating zur Bestimmung des Anteils an ML-BLITC-Zellen .....	15
Abb. 2 Gating zur Aufteilung der BLITC-Zellen in T-Zell-Subpopulationen.....	16
Abb. 3 Versuchsaufbau für den ATT von ML-BLITC-Zellen.....	23
Abb. 4 Biolumineszenzsignale adoptiv transferierten ML-BLITC-Zellen .....	24
Abb. 5 Quantifizierung der Biolumineszenzsignale adoptiv transferierter ML-BLITC-Zellen .....	25
Abb. 6 Auswirkung des ATTs der ML-BLITC-Zellen auf das Tumorwachstum.....	26
Abb. 7 Auswirkung des ATTs der ML-BLITC-Zellen auf das Gesamtüberleben .....	26
Abb. 8 Versuchsaufbau zum Vergleich unterschiedlicher Zellzahlen adoptiv transferierter ML-BLITC-Zellen .....	27
Abb. 9 Quantifizierung der Biolumineszenzsignale unterschiedlicher Zellzahlen adoptiv transferierter ML-BLITC-Zellen .....	28
Abb. 10 Auswirkung unterschiedlicher Zellzahlen adoptiv transferierter ML-BLITC- Zellen auf das Tumorwachstum.....	29
Abb. 11 Auswirkung unterschiedlicher Zellzahlen adoptiv transferierter ML-BLITC- Zellen auf das Gesamtüberleben.....	29
Abb. 12 Versuchsaufbau für den ATT von ML-BLITC-Zellen im Einsatz gegen einen großen MB49-Tumor.....	30
Abb. 13 Muster der Biolumineszenzsignale adoptiv transferierter ML-BLITC-Zellen im Einsatz gegen einen großen MB49-Tumor .....	31
Abb. 14 Quantifizierung der Biolumineszenzsignale adoptiv transferierter ML-BLITC-Zellen im Einsatz gegen einen großen MB49-Tumor .....	32
Abb. 15 Auswirkung des ATTs der ML-BLITC-Zellen auf das Tumorwachstum eines großen MB49-Tumors .....	33
Abb. 16 Versuchsaufbau für den ATT von ML-BLITC-Zellen im Einsatz gegen ein MB49-Rezidiv .....	34
Abb. 17 Muster der Biolumineszenzsignale adoptiv transferierter ML-BLITC-Zellen im Einsatz gegen ein MB49-Rezidiv .....	35
Abb. 18 Auswirkung des ATTs der ML-BLITC-Zellen auf das Tumorwachstum des MB49-Rezidivs .....	36
Abb. 19 Detektion der adoptiv transferierten CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen in Tumor und Milz .....	37

Abb. 20 Versuchsaufbau zum Nachweis der Hemmung des NFAT-CBR-Signals durch Milchsäure .....	39
Abb. 21 Auswirkung der Laktatazidose auf NFAT-CBR-Signale .....	40
Abb. 22 Quantifizierung der NFAT-CBR-Signale mono- und polyklonaler BLITC-Zellen .....	41
Abb. 23 Auswirkung der Laktatazidose auf die IFN- $\gamma$ -Produktion.....	43

### Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Liste der verwendeten Chemikalien.....	9
Tab. 2 Liste der verwendeten Lösungen .....	9
Tab. 3 Liste der verwendeten Antikörper .....	10
Tab. 4 Liste der verwendeten Zellkulturmedien .....	11
Tab. 5 Liste der verwendeten Mausstämme.....	11
Tab. 6 Numerische Verteilung der Versuchstiere des in Abb. 3 dargestellten Experiments.....	11
Tab. 7 Numerische Verteilung der Versuchstiere des in Abb. 8 dargestellten Experiments.....	11
Tab. 8 Numerische Verteilung der Versuchstiere des in Abb. 12 dargestellten Experiments.....	12
Tab. 9 Numerische Verteilung der Versuchstiere des in Abb. 16 dargestellten Experiments.....	12
Tab. 10 Liste der verwendeten Geräte .....	12
Tab. 11 Liste der verwendeten Programme.....	12
Tab. 12 Übersicht der verwendeten Fluoreszenzantikörperkombinationen .....	17
Tab. 13 Medienzusammensetzung für die in vitro Biolumineszenz-Experimente .....	20

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
Abb.	Abbildung/-en
APC	Allophycocyanin
APC	<i>antigen-presenting cell</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATT	adoptiver T-Zell-Transfer
BLI	<i>bioluminescence imaging</i>
BLITC	<i>bioluminescence imaging of t cells</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CBR	<i>click beetle red luciferase</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CT	Computertomographie
Cy5.5	Cyanin 5.5
Cy7	Cyanin 7
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
engl.	englisch
FACS™	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	<i>forward scatter</i>
GvHD	<i>graft-versus-host disease</i>
GvT	<i>graft-versus-tumor</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HTS	<i>high-throughput screening</i>
H-Y	Histokompatibilität-Y
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL	Interleukin
IVIS®	<i>in vivo imaging system</i>
MACS™	<i>Magnetic Cell Separation</i>
MEM	<i>minimum essential medium</i>
MDSC	<i>myeloid-derived suppressor cells</i>
mHag	Minor-Histokompatibilitätsantigen
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
ML	Marilyn
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NFAT	<i>nuclear factor of activated t cells</i>
PBA	<i>phosphate buffered saline</i> mit BSA
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PE	Phycoerythrin
PerCP	<i>peridinin chlorophyll protein</i>
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PPI	Protonenpumpeninhibitor
RAG	Rekombination-aktivierendes Gen
Rluc	<i>Renilla luciferase</i>

#### Fortsetzung des Abkürzungsverzeichnisses

Abkürzung	Bedeutung
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
ROI	<i>region of interest</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SSC	<i>side scatter</i>
TAA	tumorassoziertes Antigen
Tab.	Tabelle
TCM	<i>t cell medium</i>
TCR	<i>t cell receptor</i>
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor <math>\beta</math></i>
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TILs	tumorinfiltrierende Lymphozyten
TRAIL	<i>TNF Related Apoptosis Inducing Ligand</i>
Tregs	regulatorische T-Zellen
TSA	tumorspezifisches Antigen



## 1. Einleitung

Die Infusion tumorspezifischer T-Zellen (sog. *adoptiver T-Zell-Transfer* (ATT)) hat sowohl bei hämatologischen als auch bei soliden Krebserkrankungen zu beachtlichen therapeutischen Erfolgen geführt<sup>1,2</sup>. Dass diese Erfolge auch bei Behandelten verzeichnet wurden, bei denen alle anderen therapeutischen Optionen bereits erfolglos ausgeschöpft worden waren, zeigt, wie vielversprechend der ATT ist<sup>2</sup>. Die adoptiv transferierten T-Zellen sind dabei gegen lokal begrenzte und metastasierte Tumorerkrankungen wirksam<sup>1,2</sup>. Des Weiteren ist ihre Wirkung potentiell langanhaltend, da die tumorspezifischen T-Zellen im Organismus des Empfängers in Form eines Immungedächtnisses persistieren können<sup>2,3</sup>. Bei einem relevanten Anteil der Behandelten wirkt der ATT jedoch nur geringfügig oder überhaupt nicht<sup>1,2</sup>. Die Gründe dafür sind vielfältig. Diese Dissertation beschäftigt sich mit zwei Faktoren, die dazu führen können, dass ein ATT unwirksam bleibt. Einerseits ist es möglich, dass die adoptiv transferierten T-Zellen nicht zum Tumor migrieren oder ihn nicht infiltrieren. Dies kann geschehen, wenn die Tumorzellen das Zielantigen oder MHC-Moleküle in zu geringem Maße exprimieren<sup>4-6</sup>. Andererseits kann die therapeutische Wirkung der tumorspezifischen T-Zellen auch ausbleiben, obwohl sie zum Tumor migriert sind und ihn infiltrieren konnten. Dies ist möglich, wenn die T-Zellen innerhalb des Tumormikromilieus nicht aktiviert werden. Dafür können neben den Tumorzellen auch die sie umgebenden Stromazellen und andere im Tumor lokalisierte Immunzellen verantwortlich sein<sup>7-9</sup>. Ein niedriger pH-Wert und eine hohe Laktatkonzentration (sog. Laktatazidose), gelten als bedeutende und verbreitete Eigenschaften des Tumormikromilieus<sup>10</sup>, welche möglicherweise ebenfalls den Effekt eines ATTs entscheidend reduzieren.

### **1.1 Biolumineszenz-Bildgebung zur Überwachung eines ATTs**

Um adoptiv transferierte T-Zellen *in vivo* überwachen zu können, hat unsere Arbeitsgruppe ein Mausmodell entwickelt, dessen Grundlage die Biolumineszenz-Bildgebung (engl. *bioluminescence imaging* (BLI)) ist. Bei der Biolumineszenz wird im Rahmen einer enzymatischen Reaktion Licht freigesetzt. Dafür benötigen die verantwortlichen Enzyme (sog. Luziferasen) ein spezifisches Substrat, Sauerstoff und einige zusätzlich *Adenosintri-phosphat* (ATP)<sup>11</sup>. Die Fähigkeit zur Biolumineszenz konnte von meinen Kolleginnen und Kollegen auf Mäuse übertragen werden. Die T-Zellen der so entstandenen, sog. BLITC-Mäuse ("BioLuminescence Imaging of T Cells") können dadurch nach einem ATT per BLI im Körper der Empfängertiere

## 1. Einleitung

detektiert werden<sup>12</sup>. Die T-Zellen der BLITC-Mäuse exprimieren konstitutiv eine *Renilla Luziferase* (Rluc). Durch wiederholtes BLI der gleichen Maus über einen längeren Zeitraum hinweg wird so ersichtlich, wie und ob die adoptiv transferierten T-Zellen migrieren, expandieren und persistieren<sup>3,12,13</sup>. Zusätzlich exprimieren die T-Zellen der BLITC-Mäuse NFAT-abhängig (*nuclear factor of activated t cells*) eine *click beetle red Luziferase* (CBR)<sup>12,13</sup>. NFAT ist ein Transkriptionsfaktor, dessen Aktivierung die Expression zahlreicher Gene moduliert. Einige davon stehen mit der Aktivierung von T-Zellen in Verbindung, wie etwa die Gene für Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), den Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und das Interleukin-2 (IL-2)<sup>14</sup>. Durch die per NFAT-Aktivierung induzierbare Luziferase sollen also aktivierte T-Zellen mittels BLI identifiziert werden können. Die Kombination beider Luziferasen in einem Mausstamm wurde erdacht, um in vivo überwachen zu können, wie und ob die adoptiv transferierten biolumineszenten T-Zellen (BLITC-Zellen) migrieren, expandieren, persistieren und aktiviert werden. Dieses *duale Biolumineszenz-Reportersystem* soll somit Erkenntnisse über Faktoren ermöglichen, die potentiell entscheidend für den Erfolg eines ATTs sind<sup>12,13</sup>.

### 1.1.1 Dby als Zielantigen des ATTs

Für einen ATT werden T-Zellen eingesetzt, deren T-Zell-Rezeptoren (engl. *T cell receptors* (TCRs)) spezifisch für Antigene sind, die von den Zellen des zu behandelnden Tumors exprimiert werden. In dem für diese Dissertation verwendeten Modell handelt es sich dabei um das sog. *Histokompatibilität-Y-Antigen* (H-Y-Antigen) Dby. H-Y-Antigene sind Produkte Y-chromosomaler Gene und werden von nahezu allen männlichen Zellen exprimiert, nicht jedoch von weiblichen Organismen<sup>15,16</sup>. In der gegenwärtigen klinischen Praxis spielen sie hauptsächlich bei hämatopoetischen Stammzell- und Organtransplantationen<sup>15,17</sup>, sowie habituellen Aborten<sup>17</sup>, eine Rolle. H-Y-Antigene gehören zur Gruppe der sog. *Minor-Histokompatibilitätsantigene* (mHags). Diese stellt eine der vielen Antigengruppen dar, die als Zielantigen eines ATTs infrage kommen. MHags sind T-Zell-Epitope polymorpher Proteine, die durch genetische Polymorphismen entstehen, welche die Aminosäuresequenz eines Proteins verändern<sup>15,18</sup>. Sog. nicht-synonyme Einzelnukleotid-Polymorphismen (engl. *single nucleotide polymorphisms* (SNPs)) sind dabei die häufigste Ursache dieser genetischen Variationen<sup>15</sup>. MHags sind in der gegenwärtigen klinischen Praxis bei hämatopoetischen Stammzell- und Organtransplantationen von Bedeutung<sup>15</sup>. Relevant sind sie vor allem dann, wenn spendende und empfangende Person bezüglich der

## 1. Einleitung

Haupthistokompatibilitätskomplexe (engl. *major histocompatibility complexes* (MHCs)) identisch sind, sich jedoch bei der Expression von mHags unterscheiden<sup>15,17,18</sup>. Als Zielantigen eines ATTs kommen sie in Betracht, wenn Zellen der zu behandelnden Person ein immunogenes mHag exprimieren, welches von den Zellen der spendenden Person nicht exprimiert wird (sog. *mHag-Mismatch*)<sup>15</sup>. Dies kann zur Aktivierung der adoptiv transferierten T-Zellen durch jene Zellen des Empfängers führen, die das mHag exprimieren<sup>15,18</sup>. Handelt es sich dabei um Tumorzellen, werden diese zerstört (sog. *Graft-versus-Tumor- (GvT-) Effekt*)<sup>15</sup>. Wenn nicht-neoplastische Zellen das mHag ebenfalls exprimieren, können die adoptiv transferierten T-Zellen schwere Schäden an gesunden Geweben auslösen (sog. *"on-target off-tumor" Toxizität*)<sup>1,15</sup>. Bei der *"on-target off-tumor" Toxizität* handelt es sich also um eine unerwünschte, antigenspezifische Wirkung der adoptiv transferierten T-Zellen. Sie kann vielfältige Formen annehmen, da ihre Schwere und Lokalisation maßgeblich davon abhängt, wie stark und von welchen Geweben das Zielantigen exprimiert wird<sup>1,7</sup>. Das Auftreten einer *"on-target off-tumor" Toxizität* ist sehr wahrscheinlich, wenn das Zielantigen ubiquitär exprimiert wird und damit lediglich als *tumorassoziiertes Antigen (TAA)* vorliegt<sup>19</sup>. Das Erscheinungsbild der Schäden entspricht dann klinisch dem der sog. Spender-gegen-Empfänger-Reaktion (engl. *Graft-versus-Host Disease (GvHD)*), welche infolge einer allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation auftreten kann. Dabei entstehen in der Akutphase Schäden an Haut, Leber, Gastrointestinaltrakt und anderen Organen. Chronische Reaktionen betreffen verschiedene Organsysteme und können an unterschiedliche Autoimmunerkrankungen erinnern<sup>18</sup>. Eine ausgeprägte *"on-target off-tumor" Toxizität* ist hingegen unwahrscheinlich, wenn das Zielantigen nur von wenigen Geweben exprimiert wird, etwa nur von hämatopoetischen Zellen, und damit als weitgehend *tumorspezifisches Antigen (TSA)* vorliegt<sup>19</sup>. Da diese Dissertation nur Experimente umfasst bei denen das Zielantigen des ATTs als TSA vorlag (siehe Abschnitt 1.1.3 (s. 1.1.3)), spielt das Phänomen der *"on-target off-tumor" Toxizität* eine untergeordnete Rolle.

### 1.1.2 ML-BLITC-Mäuse als Spendertiere

Um die Antigen-spezifität der adoptiv transferierten biolumineszenten T-Zellen gegenüber dem Zielantigen Dby sicherzustellen, wurden die BLITC-Mäuse mit sog. *Marilyn-Mäusen* (ML-Mäusen) gekreuzt. Dabei handelt es sich um RAG-2<sup>-/-</sup>-Tiere (s. 1.1.4), die ausschließlich CD4<sup>+</sup>-T-Zellen mit transgenen Dby-spezifischen TCRs

## 1. Einleitung

besitzen<sup>20</sup>. Diese binden an das H-Y-Antigen Dby, sofern es über H2-A<sup>b</sup>- (d.h. MHC-II-) Moleküle präsentiert wird<sup>16,20</sup>. Da männliche ML-Tiere H-Y-Antigene ubiquitär exprimieren, unterliegen hier die CD4<sup>+</sup>-T-Zellen der negativen Selektion im Thymus<sup>20</sup>. Deshalb wurden nur weibliche ML-Mäuse als Spendertiere für den Transfer der biolumineszenten transgenen H-Y-spezifischen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (sog. ML-BLITC-Zellen) eingesetzt. Da es sich bei Spender- und Empfängertieren um syngene, also genetisch identische, Mäuse handelt, sind identische MHC-Moleküle gewährleistet. CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden dabei für den ATT ausgewählt, da ihnen, aufgrund vielversprechender Ergebnisse in Mausmodellen<sup>16,21</sup> und bei Patientinnen und Patienten<sup>22</sup>, in den letzten Jahren zunehmend ein eigenständiger, von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen unabhängiger, GvT-Effekt zugeschrieben wird<sup>1</sup>. Außerdem konnte ihre Überlegenheit gegenüber adoptiv transferierten CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in einem Mausmodell, in dem ebenfalls H-Y-Antigene als Zielantigene verwendet wurden, gezeigt werden<sup>16</sup>.

### 1.1.3 MB49 als Modelltumor

Bei dem Dby-exprimierenden Tumor, der für das Modell ausgewählt wurde, handelt es sich um die MB49-Tumorzelllinie. Sie ging aus Urothelzellen einer männlichen C57BL/6-Maus hervor, welche durch ein chemisches Karzinogen neoplastisch transformiert wurden<sup>23</sup>. Da die MB49-Tumorzelllinie einem männlichen Organismus entstammt, tragen alle Zellen dieser Zelllinie H-Y-Antigene auf ihrer Oberfläche<sup>15,16</sup>. Dass nur männliche Zellen H-Y-Antigene exprimieren, bietet einen bedeutenden Vorteil für die Untersuchung der erwünschten und unerwünschten Wirkungen eines ATTs. Denn werden die MB49-Tumorzellen syngenen männlichen Tieren injiziert, so exprimieren sowohl die Tumorzellen als auch die meisten anderen Gewebe der Maus die H-Y-Antigene. Diese werden damit zu TAAs. Über diesen Versuchsaufbau lassen sich der GvT-Effekt und die *"on-target off-tumor"* Toxizität eines ATTs gemeinsam untersuchen. Wenn die Injektion bei syngenen weiblichen Mäusen erfolgt, so wie bei allen in dieser Dissertation dargestellten Versuchen, exprimieren nur die Tumorzellen die H-Y-Antigene, wodurch sie zu TSAs werden. So lässt sich der GvT-Effekt eines ATTs getrennt von dem Auftreten einer *"on-target off-tumor"* Toxizität untersuchen.

### 1.1.4 RAG-2<sup>-/-</sup>-Mäuse als Empfängertiere

Als Empfänger des MB49-Tumors und der adoptiv transferierten ML-BLITC-Zellen wurden RAG-2<sup>-/-</sup>-Mäuse eingesetzt. Das RAG-2 Gen ist eines der beiden sog. *Rekombination-aktivierenden Gene* (RAG-1 und -2). Sie spielen eine wichtige Rolle bei

## 1. Einleitung

der V(D)J-Rekombination, welche entscheidend für die Variabilität der Antigen-spezifität von Immunglobulinen und TCRs ist. Nach einem sog. *Knockout* des RAG-2 Gens (RAG-2<sup>-/-</sup>) fehlen reife B- und T-Zellen vollständig. Infolgedessen sind die lymphatischen Organe verändert. Andere Organsysteme sind nicht beeinträchtigt und die RAG-2<sup>-/-</sup>-Mäuse verhalten sich artgerecht. Weil reife B- und T-Zellen fehlen, sind die RAG-2<sup>-/-</sup>-Tiere anfällig für Infektionen. Deshalb müssen sie in einer keimarmen Umgebung gezüchtet und untergebracht werden<sup>24</sup>. RAG-2<sup>-/-</sup>-Mäuse sind besonders gut als Empfänger eines ATTs geeignet, da sie keine eigenen reifen B- und T-Zellen besitzen. Dadurch ist in der "Lymphozyten-Nische" Raum zur Expansion der adoptiv transferierten T-Zellen verfügbar. Ein möglicher GvT-Effekt kann außerdem direkt auf diese Zellen zurückgeführt werden, da eigene, potentiell tumorspezifische T-Zellen fehlen. Des Weiteren ist eine mögliche humorale Immunantwort gegen die Luziferasen ausgeschlossen, da Antikörper-produzierende, reife B-Zellen nicht vorhanden sind.

### 1.2 Laktatazidose

Neben den Möglichkeiten zur Überwachung adoptiv transferierter T-Zellen in vivo, soll in dieser Dissertation auch ermittelt werden, ob das *duale Biolumineszenz-Reportersystem* in vitro die Auswirkung einer Laktatazidose auf die Aktivierung von T-Zellen aufklären kann. Der Grund dafür ist, dass die Laktatazidose im Tumormikromilieu möglicherweise die Wirksamkeit eines ATTs entscheidend reduziert. Die Laktatazidose wird durch die gesteigerte Glykolyserate von Tumorzellen verursacht. Bei der Glykolyse entstehen aus Glukose, neben dem Energieträger ATP, auch Laktat und Protonen. Diese Stoffwechselprodukte werden von den neoplastischen Zellen in den extrazellulären Raum abgegeben<sup>10,25</sup>, weshalb der pH dort auf Werte zwischen 7 und 6 sinken kann<sup>26,27</sup>. Tumorzellen betreiben anders als nicht-neoplastische Zellen auch unter aeroben Bedingungen Glykolyse (sog. Warburg-Effekt/-Phänotyp)<sup>28</sup>. Dieser Phänotyp ist so verbreitet, dass der Schluss nahe liegt, dass er den neoplastischen Zellen einen Überlebensvorteil bietet. Dabei ermöglicht wohl zunächst die anaerobe Glykolyse den ersten Tumorzellen ihren Energiebedarf zu decken, obwohl ihre stetige Proliferation die Distanz zu den regulären Blutgefäßen vergrößert und damit einen Sauerstoffmangel auslöst<sup>10</sup>. An die glykolysebedingte Azidose im Tumormikromilieu können sich die neoplastischen Zellen durch Selektion besser anpassen als das umliegende Gewebe. So können sie etwa bei einem niedrigeren pH-Wert proliferieren, als nicht-neoplastischen Zellen<sup>29</sup>. Die Azidose kann auch selbst mutagen wirken<sup>30</sup> und

## 1. Einleitung

die Invasivität von Tumorzellen<sup>31</sup>, sowie ihre Fähigkeit zu metastasieren, steigern<sup>32</sup>. Diese und andere Vorteile könnten die Ursache dafür sein, dass Tumorzellen auch unter normoxischen Bedingungen eine gesteigerte Glykolyserate, und damit den Warburg-Phänotyp, aufweisen<sup>10</sup>. Einige Untersuchungen deuten bereits auf eine klinische Relevanz dieser Eigenheiten des Tumormikromilieus hin. So korrelierte die Laktatkonzentration im Tumor bei verschiedenen Erkrankungen positiv mit einer Metastasierung<sup>33</sup>, beziehungsweise einem Rezidiv<sup>34</sup>, sowie negativ mit dem Gesamtüberleben der Erkrankten<sup>33,34</sup>. Zudem korrelierte die Laktatkonzentration im Blut der Betroffenen positiv mit dem Ausmaß der Tumorerkrankung<sup>35</sup>.

Bei der Verteidigung des Tumors gegen das zelluläre Immunsystem scheint die Laktatazidose auch bedeutsam zu sein. So proliferieren CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in einem laktatazidotischen Milieu schlechter, produzieren weniger Effektormoleküle, wie etwa Granzym B und Perforin, und sind weniger zytotoxisch<sup>35</sup>. Sie bilden auch wesentlich weniger IFN- $\gamma$ <sup>35-37</sup>, TNF- $\alpha$ <sup>36</sup> und IL-2<sup>35-37</sup>. Die Produktion dieser Substanzen ist unter anderem abhängig von der NFAT-Expression (s. 1.1)<sup>14</sup>. Dass bei einer Laktatazidose weniger Effektormoleküle gebildet werden, könnte durch eine gehemmte NFAT-Expression bedingt sein, die bei polyklonalen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen bereits nachgewiesen wurde<sup>37</sup>. Es wurde auch gezeigt, dass Laktat alleine weder die Effektorfunktion<sup>35-37</sup>, noch die Proliferation<sup>35</sup> oder NFAT-Expression<sup>37</sup> von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen hemmt. Ebenso hemmt eine laktatunabhängige Azidose die Effektorfunktion<sup>35-37</sup> und Proliferation<sup>35</sup> dieser Zellen weniger stark als eine Laktatazidose. Die Laktatazidose im Tumormikromilieu sollte daher als Faktor in Betracht gezogen werden, der den GvT-Effekt eines ATTs reduzieren kann.

### 1.3 Bikarbonat zur Behandlung der Laktatazidose

Die Auswirkungen der Laktatazidose auf die Produktion von IFN- $\gamma$ <sup>35,36</sup> und IL-2<sup>35</sup> konnten in vitro schnell und vollständig aufgehoben werden, wenn die T-Zellen in ein Medium mit neutralem pH-Wert überführt wurden. Dies legt den Gedanken nahe, dass die Inhibition von (transferierten) T-Zellen auch in vivo verhindert beziehungsweise aufgehoben werden könnte, wenn der saure pH-Wert des Tumormikromilieus neutralisiert werden würde. Zudem könnten dadurch Invasivität und Metastasierungspotential der Tumorzellen reduziert werden. Um den pH-Wert im Tumormikromilieu zu erhöhen, gelten Puffer im Vergleich zu alkalisierenden Substanzen als besser geeignet. Letztere würden auch den pH-Wert des Bluts und anderer Gewebe erhöhen, was eine

## 1. Einleitung

Vielzahl an unerwünschten Auswirkungen haben könnte. Puffer hingegen können den pH-Wert in einem bestimmten Bereich, der vom sog.  $pK_S$ -Wert, dem negativen dekadischen Logarithmus der *Dissoziationskonstante einer Säure* ( $K_S$ ), des Puffers abhängig ist, stabilisieren<sup>38</sup>. Liegt dieser in der Nähe des physiologischen pH-Werts des Bluts (pH 7,35-7,45) beziehungsweise von nicht-neoplastischem Gewebe (pH 7,2-7,5)<sup>26,39</sup>, so würde die Zugabe des Puffers den pH-Wert dieser Kompartimente nicht verändern<sup>38,40</sup>. In Geweben mit einem von diesen Normwerten stark abweichenden pH Wert soll sich durch die Pufferzugabe hingegen der pH-Wert an den physiologisch Wert angleichen. Im sauren Tumormikromilieu würde sie also den pH-Wert erhöhen<sup>38,40</sup>. Natriumhydrogencarbonat ( $NaHCO_3$ ,  $pK_S$  6,1), besser bekannt als Bikarbonat, gilt als einer der wichtigsten Bestandteile des physiologischen Puffersystems im Blut von Säugetieren. Da somit kaum unerwünschte Wirkungen zu erwarten sind, scheint es besonders gut geeignet, um den pH-Wert im Tumormikromilieu zu erhöhen<sup>38</sup>. Zudem kann es, in Wasser gelöst, einfach oral verabreicht werden<sup>40-42</sup>, ist kostengünstig und gegen andere Erkrankungen bereits erfolgreich bei Menschen eingesetzt worden<sup>38</sup>.

Die Wirkung von Bikarbonat auf Tumorerkrankungen wurde bereits in Tiermodellen untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass es den extrazellulären pH-Wert von Tumoren dosisabhängig erhöht<sup>31,40-42</sup>. Die Bikarbonatgabe reduzierte außerdem dosisabhängig die Invasivität, das Wachstum<sup>31,41,42</sup>, sowie die Metastasenbildung verschiedener Tumore<sup>40,42</sup>. Die Tiere lebten infolgedessen länger<sup>40</sup> und wiesen weder unerwünschte Wirkungen<sup>40,42</sup> noch einen erhöhten pH-Wert des Bluts auf<sup>40</sup>.

### 1.4 Fragestellung

Die adoptiv transferierbaren Dby-spezifischen biolumineszenten  $CD4^+$ -T-Zellen, der Dby-exprimierenden MB49-Tumor und die  $RAG-2^{-/-}$ -Mäuse als Empfängertiere wurden im Rahmen dieser Dissertation eingesetzt um drei Fragen zu beantworten: Ist das *duale Biolumineszenz-Reportersystem* dazu geeignet adoptiv transferierte T-Zellen in vivo zu überwachen? Welche Möglichkeiten und Grenzen bringt der Einsatz eines mHags als tumorspezifisches Zielantigen für einen ATT mit  $CD4^+$ -T-Zellen mit sich? Und kann das Reportersystem die Inhibition von T-Zellen durch eine Laktatazidose darstellen, und wie beeinflusst Bikarbonat diese Inhibition?



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

**Tab. 1** Liste der verwendeten Chemikalien

Substanz	Hersteller	Artikelnr.
Bikarbonat	Sigma-Aldrich <sup>®</sup>	S8761
BSA	Sigma-Aldrich <sup>®</sup>	A7906
Coelenterazin	Biosynth <sup>®</sup>	C-7002
D-Luziferin	P.J.K. <sup>®</sup>	102133
DMSO	Carl Roth <sup>®</sup>	4720.2
EDTA	Sigma-Aldrich <sup>®</sup>	E5134
FCS	Biochrom <sup>®</sup>	S0115
L-(+)-Milchsäure	Sigma-Aldrich <sup>®</sup>	27714
L-Glutamin	Sigma-Aldrich <sup>®</sup>	G7513
MEM nicht-essentielle Aminosäuren	Sigma-Aldrich <sup>®</sup>	M7145
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich <sup>®</sup>	S8636
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich <sup>®</sup>	P4333
SDS	Carl Roth <sup>®</sup>	CN30.2
Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich <sup>®</sup>	T4299
Tween-20	Sigma-Aldrich <sup>®</sup>	P2287
β-Mercaptoethanol	Life Technologies <sup>™</sup>	21985023

**Tab. 2** Liste der verwendeten Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
10x PBS <sup>1</sup>	-137 mM NaCl -10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -2,7 mM KCl -2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Assaypuffer	-1x PBS -10 % FCS
Erythrozytenlysepuffer (pH 7,4)	-37 mg/l Tetranatrium EDTA -1 g/l KHCO <sub>3</sub> -8,99 g/l NH <sub>4</sub> Cl
MACS <sup>™</sup> -Puffer	-H <sub>2</sub> O -100 ml/l 10x PBS -0,5 % BSA -10 ml/l EDTA
PBA	-1x PBS -0,5 % BSA
Waschpuffer	-1x PBS -0,05 % Tween-20

<sup>1</sup>Die 10x PBS-Lösung wurde vor ihrer Verwendung mit Wasser im Verhältnis 1 : 10 verdünnt.

## 2. Material und Methoden

**Tab. 3 Liste der verwendeten Antikörper**

Ziel- struktur	Fluoro- chrom	Ver- dünnung	Isotyp	Klon	Hersteller	Artikelnr.
B220	- <sup>1</sup>	1:1000 <sup>2</sup>	Rat IgG <sub>2a</sub> , κ	RA3-6B2	BioLegend <sup>®</sup>	103203
CD11b	Pacific Blue	1:1000 <sup>3</sup>	Rat IgG <sub>2b</sub> , κ	M1/70	BioLegend <sup>®</sup>	101223
	- <sup>1</sup>	1:200 <sup>2</sup>	Rat IgG <sub>2b</sub> , κ	M1/70	BioLegend <sup>®</sup>	101203
CD3	PerCP/ Cy5.5	1:200 <sup>3</sup>	Rat IgG <sub>2b</sub> , κ	17A2	BioLegend <sup>®</sup>	100218
	- <sup>4</sup>	1:300 <sup>2</sup>	Armenian Hamster IgG	145-2C11	BioLegend <sup>®</sup>	100331
CD4	BV510	1:500 <sup>3</sup>	Rat IgG <sub>2a</sub> , κ	RM4-5	BioLegend <sup>®</sup>	100559
	APC	1:3200 <sup>3</sup>	Rat IgG <sub>2a</sub> , κ	RM4-5	BD Biosciences <sup>®</sup>	561091
CD8	PE	1:200 <sup>3</sup>	Rat IgG <sub>2a</sub> , κ	53-6.7	BD Biosciences <sup>®</sup>	553032
	APC/Cy7	1:500 <sup>3</sup>	Rat IgG <sub>2a</sub> , κ	53-6.7	BioLegend <sup>®</sup>	100714
CD28	- <sup>4</sup>	1:500 <sup>2</sup>	Syrian Hamster IgG	37.51	BioLegend <sup>®</sup>	102112
Gr-1	Pacific Blue	1:500 <sup>3</sup>	Rat IgG <sub>2b</sub> , κ	RB6-8C5	BioLegend <sup>®</sup>	108430
	- <sup>1</sup>	1:1000 <sup>2</sup>	Rat IgG <sub>2b</sub> , κ	RB6-8C5	BioLegend <sup>®</sup>	108403
IFN-γ	- <sup>5</sup>	1:250 <sup>2</sup>	Rat IgG <sub>1</sub> , κ	R4-6A2	BD Biosciences <sup>®</sup>	554430
	- <sup>1,6</sup>	1:500 <sup>7</sup>	Rat IgG <sub>1</sub> , κ	XMG1.2	BD Biosciences <sup>®</sup>	554410
NK1.1	Pacific Blue	1:300 <sup>3</sup>	Mouse IgG <sub>2a</sub> , κ	PK136	BioLegend <sup>®</sup>	108722
Ter119	Pacific Blue	1:1000 <sup>3</sup>	Rat IgG <sub>2b</sub> , κ	Ter119	BioLegend <sup>®</sup>	116231
	- <sup>1</sup>	1:500 <sup>2</sup>	Rat IgG <sub>2b</sub> , κ	Ter119	BioLegend <sup>®</sup>	116203
Vβ 6	FITC	1:500 <sup>3</sup>	Rat IgG <sub>2b</sub> , λ	RR4-7	BD Biosciences <sup>®</sup>	553193

<sup>1</sup>Bei diesen Antikörpern handelt es sich um biotinylierte Antikörper.

<sup>2</sup>Diese Antikörperlösungen wurden mit PBS verdünnt.

<sup>3</sup>Diese Antikörperlösungen wurden mit PBA verdünnt.

<sup>4</sup>Diese Antikörper wurden zur Stimulation der T-Zellen eingesetzt (s. 2.2.6 und 2.2.7).

<sup>5</sup>Dieser Antikörper wurde für den Enzym-gekoppelten Immunadsorptionsassay eingesetzt, und wird im Text als "Fänger-Antikörper" bezeichnet (s. 2.2.8).

<sup>6</sup>Dieser Antikörper wurde für den Enzym-gekoppelten Immunadsorptionsassay eingesetzt, und wird im Text als "Detektionsantikörper" bezeichnet (s. 2.2.8).

<sup>7</sup>Diese Antikörperlösung wurde mit Assaypuffer verdünnt.

## 2. Material und Methoden

**Tab. 4 Liste der verwendeten Zellkulturmedien**

Medium	Basis des Mediums	Zusätze
MB49-Tumorzellmedium	RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific®) Artikelnr.: 21875-091	-10 % FCS -100 U/ml Penicillin -100 mg/ml Streptomycin
T-Zellmedium	RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific®) Artikelnr.: 21875-091	-0,1 % $\beta$ -Mercaptoethanol -10 % FCS -2 mM L-Glutamin -1 mM Natriumpyruvat -100 mM MEM nicht-essentielle Aminosäuren -100 U/ml Penicillin -100 mg/ml Streptomycin

**Tab. 5 Liste der verwendeten Mausstämme**

Mausstamm	Besonderheiten	Bezugsquelle
Albino-C57BL/6-Rag-2 <sup>-/-1,2</sup>	fehlende Pigmentierung von Fell und Haut <sup>43</sup> , sowie fehlende reife B- und T-Zellen <sup>24</sup> (s. 1.1.2, 1.1.4 und 2.2.5)	Thomas Blankenstein
BLITC <sup>1</sup>	konstitutive Expression einer Renilla Luziferase und NFAT-abhängige Expression einer ClickBeetle red Luziferase (s. 1.1 und 1.1.2)	ChRluc-Mäuse <sup>3</sup> von Thomas Blankenstein wurden mit NFAT-CBR-Mäusen gekreuzt <sup>12</sup>
ML-BLITC <sup>1,2</sup>	fehlende reife B- und T-Zellen, außer transgene H-Y-spezifische CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen, sowie Luziferase-Expression (s. 1.1.2)	ML-Mäuse <sup>20</sup> von Olivier Lantz (Institute Curie, Paris), wurden mit BLITC-Mäusen gekreuzt (s.o.) <sup>12</sup>

<sup>1</sup>Zucht und Haltung der Tiere, sowie die Durchführung der in dieser Dissertation beschriebenen Versuche, wurden durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales genehmigt.

<sup>2</sup>Von diesen Mausstämmen wurden ausschließlich weibliche Tiere verwendet (s. 1.1.2 und 1.1.3).

**Tab. 6 Numerische Verteilung der Versuchstiere des in Abb. 3 dargestellten Experiments**

Gruppe	Anzahl
Therapiegruppe	3
Kontrollgruppe	3
insgesamt	6

**Tab. 7 Numerische Verteilung der Versuchstiere des in Abb. 8 dargestellten Experiments**

Gruppe	Anzahl
Niedrigdosis-Gruppe	3
Hochdosis-Gruppe	3
Kontrollgruppe	3
insgesamt	9

## 2. Material und Methoden

**Tab. 8 Numerische Verteilung der Versuchstiere des in Abb. 12 dargestellten Experiments**

Gruppe	Anzahl
Therapiegruppe	5
Kontrollgruppe	1
insgesamt	6

**Tab. 9 Numerische Verteilung der Versuchstiere des in Abb. 16 dargestellten Experiments**

Gruppe	Anzahl
Rezidivgruppe	3
Vergleichsgruppe	3
insgesamt	6

**Tab. 10 Liste der verwendeten Geräte**

Gerät	Verwendung	Hersteller
FACSAria™ II	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung	BD Biosciences®
FACSCanto™ II	Durchflusszytometrie	BD Biosciences®
pH-Meter (CG 825)	Bestimmung des pH-Werts des verwendeten T-Zellmediums	Schott®
Photometer (SPECTRA Fluor Plus™)	Bestimmung der Substratumsetzung im Zuge des Enzym-gekoppelten Immunadsorptionsassays	Tecan®
RS 2000 Biological System	Bestrahlung der Empfängertiere	RADSOURCE®
Xenogen IVIS® 200	Biolumineszenzmessung	Caliper Life Sciences®

**Tab. 11 Liste der verwendeten Programme**

Programm	Verwendung
GraphPad Prism® 5	graphische Darstellung von Tumorwachstums-, Überlebens- und Biolumineszenzdaten, sowie statistische Auswertung
Living Image® 4.3	graphische Darstellung und Quantifizierung der Biolumineszenzdaten
FlowJo® V10.1	graphische Darstellung und Analyse der Daten aus Durchflusszytometrie und Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung
SoftMax® Pro 5	Analyse der photometrischen Daten aus dem Enzym-gekoppelten Immunadsorptionsassay

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Kultur, Ernte und Injektion der MB49-Tumorzellen

Die MB49-Tumorzellen wurden in Zellkulturflaschen in MB49-Tumorzellmedium (s. Tab. 4) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in der Atmosphäre im Brutschrank kultiviert. Wenn

## 2. Material und Methoden

die Zellen zu 70-80 % konfluent waren (alle 3-4 Tage), wurden sie gesplittet. Sobald nötig wurden die Zellen wie folgt geerntet: Als Erstes wurde das Medium aus der Zellkulturflasche entfernt. Anschließend wurden 5 ml warmes PBS in die Flasche gegeben und diese geschwenkt. Danach wurde die Flüssigkeit erneut entfernt. Daraufhin wurden 800 µl warmes Trypsin-EDTA zugegeben, um die adhären wachsenden MB49-Tumorzellen abzulösen. Dann wurde die Zellkulturflasche erneut geschwenkt und für 4 Minuten im Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert. Als nächstes wurde per Mikroskop beurteilt, ob sich die Zellen vollständig abgelöst hatten. Wenn nicht, erfolgte ein leichtes Klopfen mit der Handfläche gegen den Boden des Gefäßes und anschließend eine neuerliche mikroskopische Beurteilung. Dann wurden 10 ml warmes PBA hinzugegeben und die Zellsuspension mithilfe einer elektronischen Pipettierhilfe durchmischt um eine Einzelzellsuspension zu erzeugen. Danach wurden die Tumorzellen mithilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt und auf die gewünschte Konzentration eingestellt.

Zwecks Tumoringjektion wurden je 10<sup>4</sup> MB49-Tumorzellen in 50 µl PBS aufgenommen. Diese Suspension wurde kurz vor der Injektion mit 50 µl kaltem Matrigel™ (BD Biosciences<sup>®</sup>, Artikelnr.: 356234) gemischt und im Anschluss subkutan in die rechte Flanke der Tiere injiziert. Die Tiere wurden hierfür mit dem Inhalationsanästhetikum Isofluran (cp-pharma<sup>®</sup>, Artikelnr.: 1214) anästhesiert. Matrigel™ ist bei 4 °C flüssig und wird beim Erwärmen auf Körpertemperatur fest. Dadurch verhindert es, dass sich die Tumorzellen vereinzeln und im Körper der Maus verteilen, und ermöglicht somit ein lokales Tumorstadium. Länge und Breite des Tumors wurden in der Regel ab dem 7. Tag nach der Tumoringjektion regelmäßig mithilfe eines Messschiebers bestimmt. Das Volumen des Tumors wurde anschließend mit der Formel (Länge x Breite<sup>2</sup>) / 2 berechnet<sup>12</sup>. Das Gewicht der Tiere wurde ebenfalls regelmäßig kontrolliert. Da dabei keine bedeutsamen Veränderungen auftraten, sind die so ermittelten Gewichtsverläufe der Versuchstiere in dieser Dissertation nicht dargestellt.

Um aufzuklären, wie viel Laktat und welchen pH-Wert MB49-Tumorzellen in vitro erzeugen, wurden 4 x 10<sup>5</sup> MB49-Tumorzellen in 2 ml MB49-Tumorzellmedium in ein 6-Well gegeben. Nach dreitägiger Inkubation im Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) wurde der pH-Wert des Mediums mittels pH-Teststreifen ermittelt. Anschließend wurde die Suspension filtriert (Filter: Carl Roth<sup>®</sup>, Artikelnr.: P667.1) und das Filtrat zur

## 2. Material und Methoden

Bestimmung der Laktatkonzentration an Frau Gerhild Fiolka vom Labor Berlin übergeben.

### 2.2.2 Isolation der BLITC-Zellen durch magnetische Zellseparation

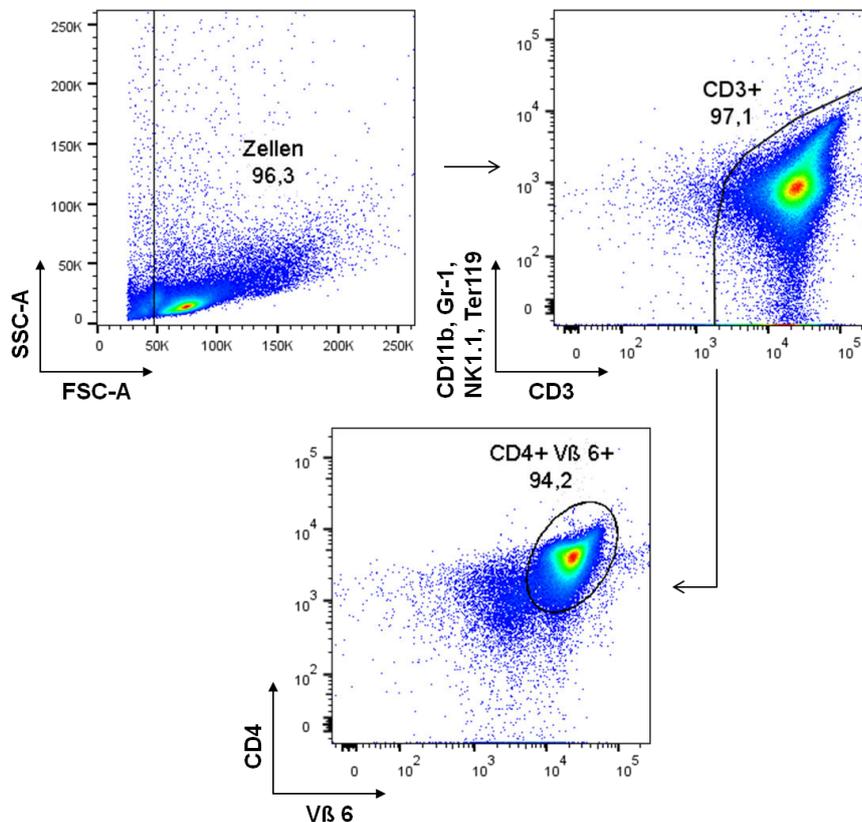
Die monoklonalen ML- und polyklonale BLITC-Zellen wurden mittels negativer Selektion durch magnetische Zellseparation (engl. *Magnetic Cell Separation* (MACS™; Miltenyi Biotec®)) aus Milzen und inguinalen Lymphknoten der Spendermäuse gewonnen. Dafür wurden diese Organe entnommen und die enthaltenen Erythrozyten lysiert. Anschließend wurden die übrigen Zellen mithilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt und zentrifugiert (5 min, 400 G, Raumtemperatur). Danach wurde der Überstand entfernt und die Zellen mit 100 µl kaltem MACS™-Puffer pro 10<sup>7</sup> Zellen resuspendiert. Daraufhin wurden biotinylierte Antikörper gegen B220, CD11b, Gr-1 und Ter119 zugegeben (für nähere Informationen zu diesen Antikörpern s. Tab. 3). Diese binden an B-Zellen, Makrophagen, Granulozyten, NK-Zellen und Erythrozyten, die später in der MACS™-Säule verbleiben sollen. Nach 10-15 Minuten Inkubation bei 4 °C wurde die Zellsuspension mit dem 10-20-fachen des Ausgangsvolumens an MACS™-Puffer verdünnt und erneut zentrifugiert (5 min, 400 G, 4 °C). Als nächstes wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet mit 95 µl kaltem MACS™-Puffer pro 10<sup>7</sup> Zellen resuspendiert. Dann wurden 5 µl Anti-Biotin *Microbeads* (Miltenyi Biotec®, Artikelnr.: 130-090-485) pro 10<sup>7</sup> Zellen zugefügt. Diese binden die biotinylierten Antikörper. So sorgen sie dafür, dass die Zellen, welche durch die Antikörper markiert wurden, aufgrund des magnetischen Feldes in der MACS™-Säule verbleiben. Nach 10-15 Minuten Inkubation bei 4 °C wurde die Zellsuspension wie oben beschrieben verdünnt und zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet mit 500 µl kaltem MACS™-Puffer pro 10<sup>8</sup> Zellen resuspendiert. Bevor die Suspension auf die MACS™-Säule gegeben werden konnte, musste diese in den Magneten gesteckt und ein Filter oberhalb der Säule, sowie eine 26 Gauge Kanüle unterhalb der Säule, angebracht werden. Letztere senkt die Flussgeschwindigkeit und verbessert so das Ergebnis der Prozedur. Außerdem musste die MACS™-Säule mit 3 ml kaltem MACS™-Puffer equilibriert werden. Nach Zugabe der Zellsuspension wurde der Durchfluss in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Sobald kein Durchfluss mehr zu gewinnen war, wurde das Ursprungsgefäß mit 3 ml kaltem MACS™-Puffer ausgewaschen und diese Suspension auf dieselbe MACS™-Säule gegeben. Der Durchfluss wurde in demselben 15 ml Zentrifugenröhrchen aufgefangen.

## 2. Material und Methoden

Als letztes wurde die MACS™-Säule aus dem Magneten entfernt und die in ihr gebundenen Zellen mithilfe von 1 ml kaltem MACS™-Puffer und einem Kolben ausgespült. Die Reinheit der Ursprungssuspension, des Durchflusses und der Suspension aus den vormals in der MACS™-Säule gebundenen Zellen, wurde per Durchflusszytometrie analysiert und verglichen (s. Abb. 1). Die Reinheit der für den ATT eingesetzten ML-BLITC-Zellen lag nach der Prozedur je nach Experiment zwischen 30 und 90 %.

### 2.2.3 Durchflusszytometrie und Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung

Die Abb. 1 zeigt, wie die Reinheit der T-Zellen vor dem ATT per Durchflusszytometrie bestimmt wurde. Hierfür ist die Färbung A aus Tab. 8 verwendet worden.



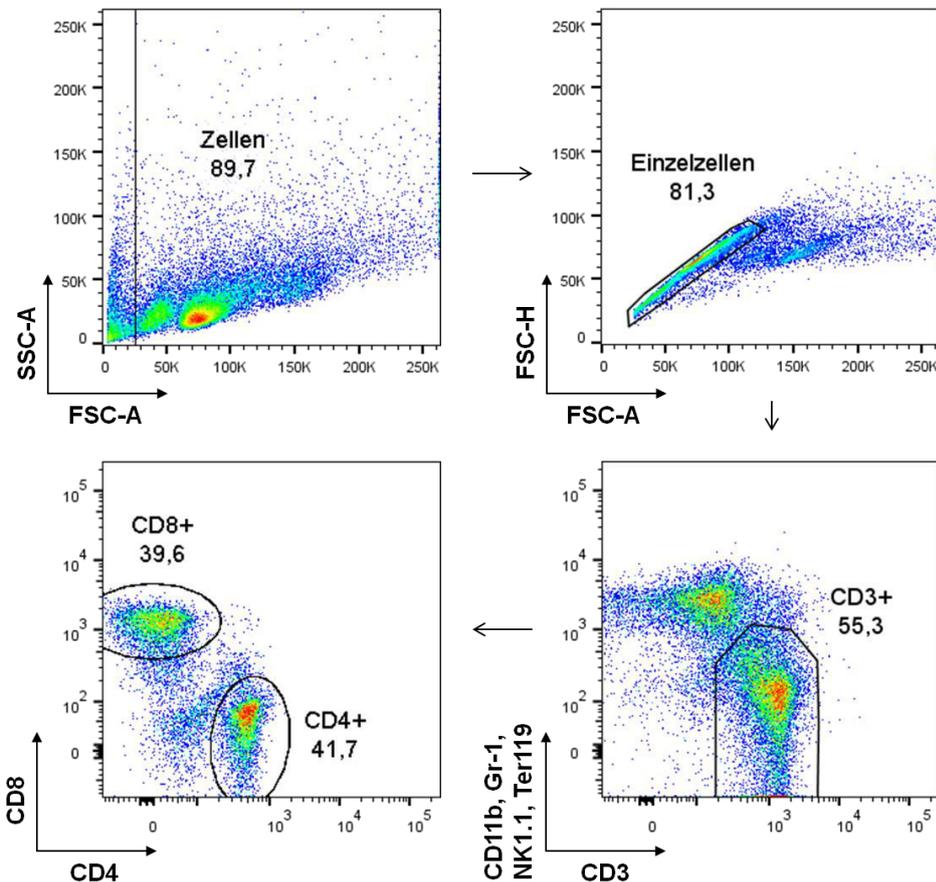
#### Abb. 1 Gating zur Bestimmung des Anteils an ML-BLITC-Zellen

Nach der MACS™ wurde die Reinheit der gewonnenen Zellsuspension mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Dafür wurde eine Probe der Zellsuspension mit den in der Färbung A aus Tab. 8 enthaltenen Antikörpern gefärbt. Anschließend wurde der Anteil der ML-BLITC-Zellen durch die hier exemplarisch dargestellte Gatingstrategie ermittelt.

Für das unter 3.3 beschriebene Experiment wurde ermittelt, zu welchem Anteil Tumore und Milzen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen enthielten. Dafür wurde die Färbung B aus Tab. 8 eingesetzt.

## 2. Material und Methoden

Die polyklonalen BLITC-Zellen wurden durch Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (engl. *Fluorescence-activated Cell Sorting* (FACS™; BD Biosciences®)) in CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen separiert. Hierfür wurde die Färbung C aus Tab. 8 und die in Abb. 2 dargestellte Gatingstrategie verwendet.



**Abb. 2 Gating zur Aufteilung der BLITC-Zellen in T-Zell-Subpopulationen**

Nach einer MACS™ wurde die gewonnene Zellsuspension aus polyklonalen BLITC-Zellen mittels FACS™ in CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen aufgeteilt. Dafür wurde die Zellsuspension mit den in der Färbung C aus Tab. 8 enthaltenen Antikörpern gefärbt und mittels der hier dargestellten Gatingstrategie aufgeteilt.

Im Verlauf der *in vitro* Biolumineszenz-Experimente wurden die Zellen per *Hochdurchsatz-* (engl. *High-Throughput-*) *Screening* (HTS) gezählt. Hierfür wurde die Färbung D aus Tab. 8 kurz vor der Messung um den Fluoreszenzfarbstoff DAPI (Thermo Fisher Scientific®, Artikelnr.: D1306, im Verhältnis von 1 : 2000) ergänzt. Dieser ermöglicht es, tote Zellen zu identifizieren. Anschließend wurde eine Gatingstrategie ähnlich der in Abb. 2 dargestellten verwendet.

## 2. Material und Methoden

**Tab. 12 Übersicht der verwendeten Fluoreszenzantikörperkombinationen**

Zielstruktur	Fluorochrom	Färbung A	Färbung B	Färbung C	Färbung D
CD3	PerCP/Cy5.5	ja	ja	ja	ja
CD4	APC	ja	-	ja	-
	BV510	-	ja	-	ja
CD8	APC/Cy7	-	-	ja	-
	PE	-	-	-	ja
CD11b	Pacific Blue	ja	-	ja	-
Gr-1	Pacific Blue	ja	-	ja	-
NK1.1	Pacific Blue	ja	-	ja	-
Ter119	Pacific Blue	ja	-	ja	-
Vβ 6	FITC	ja	-	-	-

### 2.2.4 Adoptiver Transfer der ML-BLITC-Zellen

Der adoptive Transfer der ML-BLITC-Zellen erfolgte zu den in den Versuchsaufbauten angegebenen Zeitpunkten (s. Abb. 3, 8, 12 und 16). Am selben Tag wurden die Mäuse mit Röntgenstrahlen in zwei Dosen á 1,5 Gray im Abstand von mindestens 4 Stunden bestrahlt, um eine Inflammation im Bereich des Tumors auszulösen. Der ATT erfolgte jeweils unmittelbar nach der zweiten Strahlendosis. Die ML-BLITC-Zellen wurden dafür am selben Tag gewonnen (s. 2.2.2) und in entsprechender Anzahl in 100 µl PBS intravenös in eine Schwanzvene der Mäuse injiziert. Hierfür wurden die Tiere mithilfe eines sog. Restriktors fixiert und die Durchblutung des Schwanzes vor der Injektion durch Eintauchen in warmes Wasser gesteigert. Bei einem Tumolvolumen von 1500 mm<sup>3</sup>, einem Tumordurchmesser von 15 mm, einem Gewichtsverlust von 20 % im Vergleich zum Gewicht am Tag der Tumordinjektion, äußerlichen Anzeichen von Schmerz oder einer beeinträchtigten Motorik wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet. Wenn im Text die Überlebensdauer verschiedener Gruppen verglichen wird, sind die Mediane angegeben.

### 2.2.5 *In vivo* Biolumineszenzmessungen

Die BLITC-Mäuse gingen aus einer in unserem Labor durchgeführten Kreuzung der sog. ChRluc-Mäuse<sup>3</sup> mit den von meinen Kolleginnen und Kollegen etablierten NFAT-CBR-Mäusen hervor<sup>12</sup>. Eine getrennte Analyse der Signale beider Luziferasen der so entstandenen BLITC-Zellen ist dabei aufgrund unterschiedlicher Substratspezifitäten möglich<sup>13</sup>. Die durch Biolumineszenz emittierten Photonen werden in einer lichtdichten Kammer von einem Photonendetektor registriert. Da Säugetierzellen in der Regel kein Licht emittieren, sind die messbaren Photonen beinahe ausschließlich auf

## 2. Material und Methoden

die adoptiv transferierten BLITC-Zellen zurückzuführen. Wegen dieses geringen Hintergrundrauschens ist das BLI sehr sensitiv<sup>11</sup>. Weil sich die Biolumineszenzsignale besser detektieren lassen, wenn Fell und Haut nicht pigmentiert sind, wurden ausschließlich RAG-2<sup>-/-</sup>-Tiere mit einem Albino-C57BL/6-Hintergrund als Empfänger-tiere eingesetzt<sup>11,43</sup>.

Vor dem BLI wurden die Mäuse in einer eigens dafür vorgesehenen Kammer (Teil des XGI-8 Anästhesie-Systems (Caliper Life Sciences<sup>®</sup>)) durch Isofluraninhalation anästhesiert. Um das NFAT-CBR-Signal zu messen, wurde Luziferin (0,3 mg/g Körpergewicht gelöst in PBS) intraperitoneal injiziert. Anschließend wurde die Tiere in die lichtdichte Kammer des Xenogen IVIS<sup>®</sup> ("*in vivo imaging system*") 200 gelegt und fixiert. Die Isoflurananästhesie wurde dort fortgesetzt. 10 Minuten später wurde das Signal der NFAT-CBR für 5 Minuten bei kleinem *Binning* detektiert. Um das Rluc-Signal zu messen, wurde Coelenterazin (100 µg/Maus, zunächst in 10 µl DMSO gelöst, dann mit 90 µl PBS verdünnt) in den retrobulbären Venenplexus injiziert. 3 Minuten später wurde das Signal der Rluc wie oben beschrieben ermittelt. Die Signale wurden daraufhin ihrer Intensität gemäß farblich kodiert (blaue Farbe für schwache, rote für starke Intensität; s. Abb. 4) und digital auf den Körper der Maus projiziert. Dabei diente eine vor dem eigentlichen BLI aufgenommene Photographie als anatomische Referenz für die Lokalisation der Biolumineszenzsignale. Die Biolumineszenzintensität wird in Photonen/s<sup>-1</sup>/cm<sup>-2</sup>/sr<sup>-1</sup> angegeben. Mithilfe der Living Image<sup>®</sup> Software wurden die Biolumineszenzdaten analysiert und quantifiziert.

### 2.2.6 T-Zellkultur

Die T-Zellen, die für *in vitro* Experimente eingesetzt werden sollten, wurden wie unter 2.2.2 beschrieben isoliert und im Falle der polyklonalen BLITC-Zellen in CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen aufgeteilt (s. 2.2.3). Anschließend wurden sie wie folgt kultiviert:

Die CD4<sup>+</sup>-BLITC-Zellen wurden, um eine Proliferation auszulösen, zunächst für 72 Stunden in IL-2-haltigem (PeproTech<sup>®</sup>, Artikelnr.: 200-02; 1 ng/ml) *T-Zell-Medium* (TCM, s. Tab. 4) in einer 96-Well-Flachbodenplatte (10<sup>6</sup> Zellen/ml, 2 x 10<sup>5</sup> Zellen/Well) stimuliert. Dafür war die Platte zuvor für eine Stunde im Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) mit 50 µl einer CD3- und CD28-Antikörperlösung pro Well beschichtet worden (für nähere Informationen zu diesen Antikörpern s. Tab. 3). Nach der Stimulation wurden die Zellen mithilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt, mit PBS gewaschen und

## 2. Material und Methoden

zentrifugiert (5 min, 400 G, 4 °C). Daraufhin wurden sie in IL-15- und -27-haltigem TCM aufgenommen (BioLegend<sup>®</sup>, Artikelnr.: 566304 bzw. 577406; je 50ng/ml;  $5 \times 10^5$  Zellen/ml) und auf eine 96-Well-Rundbodenplatte überführt ( $2 \times 10^5$  Zellen/Well). Dann wurden die Zellen weiter im Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert und ihre Expansion per Mikroskopie überwacht. Die Hälfte des TCMs wurde alle 3-4 Tage entfernt und durch neues IL-15- und -27-haltiges TCM ersetzt.

Die CD8<sup>+</sup>-BLITC-Zellen wurden, um eine Proliferation auszulösen, zunächst für 72 Stunden in IL-2-haltigem TCM (1 ng/ml) in einer 6-Well-Flachbodenplatte ( $10^6$  Zellen/ml, max.  $4 \times 10^6$  Zellen/Well) stimuliert. Dafür war die Platte zuvor für eine Stunde im Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) mit 1 ml einer CD3- und CD28-Antikörperlösung pro Well beschichtet worden. Nach der Stimulation wurden die Zellen mithilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt, mit PBS gewaschen und zentrifugiert (5 min, 400 G, 4 °C). Als nächstes wurden sie in IL-15-haltigem TCM (50 ng/ml) aufgenommen ( $10^6$  Zellen/ml) und auf eine 96-Well-Rundbodenplatte überführt ( $2 \times 10^5$  Zellen/Well). Danach wurden die Zellen weiter im Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert und ihre Expansion per Mikroskopie überwacht. Die Hälfte des TCMs wurde alle 2-3 Tage entfernt und durch neues IL-15-haltiges TCM ersetzt.

### 2.2.7 *In vitro* Biolumineszenz-Experimente

Zu Beginn wurden je  $2 \times 10^5$  BLITC-T-Zellen in 250 µl des entsprechenden, IL-2 haltigen (1 ng/ml) TCMs (s. Tab. 13) aufgenommen und in ein Well einer 96-Well-Rundbodenplatte gegeben. Jede Bedingung lag dabei als Triplet vor. Anschließend wurden die Zellen für etwa 24 Stunden im Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert. Dann wurden sie zur Stimulation auf eine 96-Well-Flachbodenplatte überführt, die zuvor über Nacht bei 4 °C mit 50 µl einer CD3- und CD28-Antikörperlösung pro Well beschichtet worden war (für nähere Informationen zu diesen Antikörpern s. Tab. 3). Die Dauer der Stimulation lag bei etwa 5 Stunden. Daraufhin wurden aus je einem Well pro Triplet 10 µl der Zellsuspension für eine pH-Bestimmung durch pH-Teststreifen abgenommen. Außerdem wurden aus jedem Well 25 µl der Zellsuspension entnommen. Diese Zellen wurden mit den in der Färbung D aus Tab. 8 enthaltenen Antikörpern und DAPI gefärbt, und mittels HTS gezählt. Nach einer starken Zentrifugation (5min, 1000 G) wurden der Überstand abgenommen und bis zur späteren IFN-γ-Detektion bei -20 °C eingefroren. Als nächstes wurden die Zellen mit 200 µl PBS pro Well gewaschen. Im Anschluss an eine weitere starke Zentrifugation wurde das PBS abgesaugt und die Zellen mit 45 µl

## 2. Material und Methoden

*Passive Lysis Buffer* (enthalten im Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System von Promega<sup>®</sup>, Artikelnr.: E1910) pro Well resuspendiert und für 20 Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Danach wurden die Zellen bis zum späteren BLI bei -20 °C eingefroren. Je einem Triplet mit CD4<sup>+</sup>- beziehungsweise CD8<sup>+</sup>-BLITC-Zellen in laktatazidotischem TCM wurden nach 5-stündiger Stimulation 25 µl eines TCMs mit einer Bikarbonatkonzentration von 215,05 mM und einer Milchsäurekonzentration von 12,5 mM pro Well hinzugegeben, um die Azidose in diesen Wells zu neutralisieren. (Die Bikarbonatkonzentration entspricht dem 11-fachen der gewünschten Konzentration (s. "laktathaltiges neutralisiertes TCM" in der Tab. 13), da das zugegebene Volumen ein Elftel des Gesamtvolumens darstellt.) Im Anschluss wurden die Zellen für weitere 16 Stunden stimuliert. Dann wurde der pH-Wert gemessen, die Zellen gezählt, der Überstand abgenommen und die Zellen gewaschen und lysiert, wie oben beschrieben. Für das BLI wurden je 30 µl der aufgetauten Zellsuspension in eine schwarze 96-Well-Flachbodenplatte überführt. Dort wurden pro Well 30 µl des sog. *Luciferase Assay Reagent II* (enthalten im Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System von Promega<sup>®</sup>, Artikelnr.: E1910) zugegeben. 4 Minuten später wurde das Signal der NFAT-CBR für 5 Minuten bei kleinem *Binning* detektiert.

**Tab. 13 Medienzusammensetzung für die in vitro Biolumineszenz-Experimente**

	Milchsäure [mM]	Bikarbonat [mM]	pH-Wert
TCM	-*	-	7,3
laktatazidotisches TCM	12,5 <sup>1</sup>	-	6,4
laktathaltiges neutralisiertes TCM	12,5 <sup>1</sup>	19,55 <sup>1,2</sup>	7,3

<sup>1</sup>Welche Milchsäure- beziehungsweise Bikarbonatkonzentrationen für den jeweils gewünschten pH-Wert notwendig waren, wurde im Vorfeld mithilfe eines pH-Meters ermittelt.

<sup>2</sup>Die Basis des TCMs, RPMI 1640 (s. Tab. 4), enthält bereits 23,8 mM Bikarbonat. Der Übersichtlichkeit halber wird dies in dieser Tab. nicht dargestellt. Stattdessen wird nur angegeben, um welchen Wert diese Bikarbonatkonzentration erhöht wurde. Die tatsächliche Bikarbonatkonzentration in dem laktathaltigen neutralisierten TCM entspricht also der Summe dieser beiden Konzentrationen.

### 2.2.8 IFN- $\gamma$ -Messung per Enzym-gekoppelten Immunadsorptionsassay

Wie viel IFN- $\gamma$  die T-Zellen aus den unter 2.2.7 beschriebenen Versuchen produzierten, wurde mithilfe eines sog. Enzym-gekoppelten Immunadsorptionsassays (engl. *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA)) ermittelt. Hierfür wurde als Erstes eine 96-Well-Flachbodenplatte durch Inkubation mit 50 µl Fänger-Antikörper pro Well über Nacht bei

## 2. Material und Methoden

4 °C beschichtet (für nähere Informationen zu diesem Antikörper s. Tab. 3). Daraufhin wurden die Wells drei Mal mit Waschpuffer gewaschen. Um unspezifische Bindungen zu blockieren, wurden anschließend 200 µl Assaypuffer pro Well aufgetragen. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Platte ausgeschlagen. Als nächstes wurden je 50 µl der Standardreihe (4000 - 62,5 pg IFN-γ/ml schrittweise 1:2 in Assaypuffer verdünnt) pro Well in Duplikaten und der zu testenden Zellkulturüberstände in Triplikaten aufgetragen. Nach 2 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Wells drei Mal gewaschen. Dann wurden 50 µl des Detektionsantikörpers (für nähere Informationen zu diesem Antikörper s. Tab. 3) pro Well zugegeben und die Platte für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde die Wells wieder drei Mal gewaschen und es wurden 50 µl von HRP-gekoppeltem Streptavidin (BD Biosciences<sup>®</sup>, Artikelnr.: 554066; verdünnt 1 : 1000 in Assaypuffer) pro Well hinzugefügt. Im Anschluss an 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Well sechs Mal gewaschen. Daraufhin wurden 50 µl der HRP-Substratlösung (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Artikelnr.: A3219) pro Well zugegeben und die Zellen 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde die Reaktion mit 50 µl 1 % SDS (gelöst in Wasser) pro Well gestoppt. Wie viel von dem Substrat umgesetzt worden war, wurde mithilfe eines Photometers (SPECTRA Fluor Plus<sup>™</sup>; Tecan<sup>©</sup>) bei einer Wellenlänge von 405 nm ermittelt. Die Daten wurden mit dem Programm SoftMax<sup>®</sup> Pro 5 ausgewertet.

### 2.2.9 Graphen und statistische Analysen

Alle Graphen wurden entweder mithilfe von FlowJo<sup>®</sup> oder GraphPad Prism<sup>®</sup> erstellt (s. Tab. 11). Letzteres Programm wurde ebenfalls zur statistischen Analyse der Daten verwendet. Um statistisch signifikante Unterschiede zwischen mehr als zwei Gruppen bestimmen zu können, wurden der *Kruskal-Wallis-* und *Dunn's post hoc Test* durchgeführt.

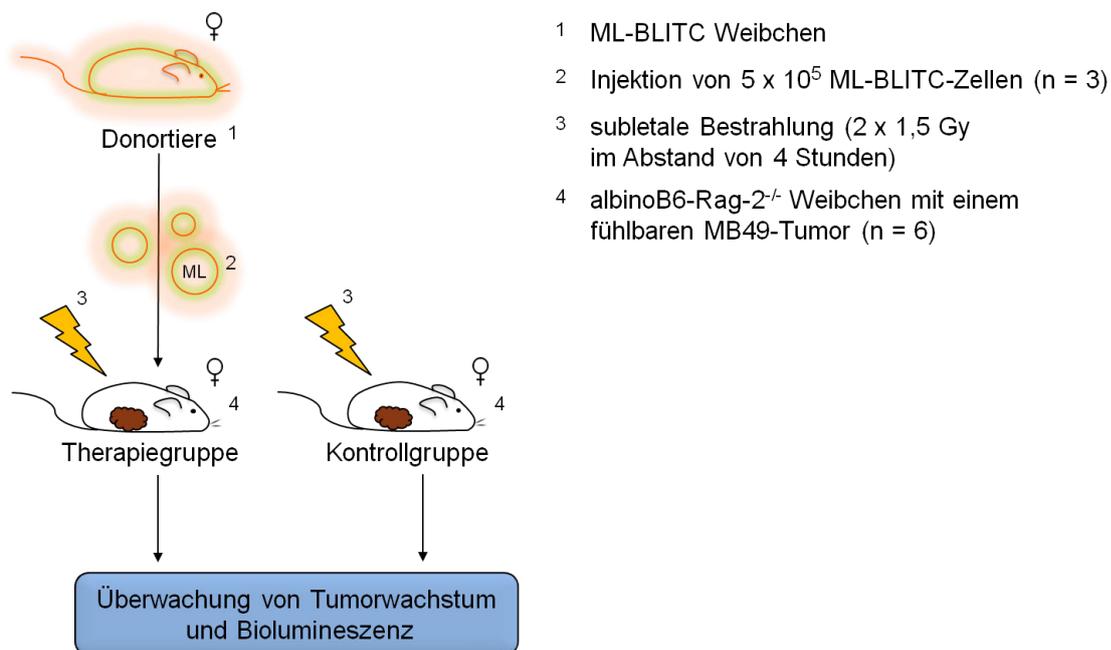


### 3. Ergebnisse

Um das *duale Biolumineszenz-Reportersystem* zu etablieren waren zunächst Experimente notwendig, die belegen sollten, dass sich adoptiv transferierte BLITC-Zellen mittels BLI in vivo überwachen lassen. Im Anschluss sollten die Möglichkeiten und Grenzen des Einsatzes eines H-Y-Antigens als tumorspezifisches Zielantigen für einen ATT mit CD4<sup>+</sup>-T-Zellen untersucht werden. Danach sollte bestimmt werden, ob das Reportersystem die Inhibition von T-Zellen durch eine Laktatazidose darstellen kann, und wie Bikarbonat auf diese Hemmung wirkt.

#### 3.1 Verlauf der Biolumineszenzsignale nach einem ATT von ML-BLITC-Zellen

Als Erstes sollte der räumliche und zeitliche Verlauf der Biolumineszenzsignale nach einem ATT von ML-BLITC-Zellen ermittelt werden. Dafür wurde der in Abb. 3 dargestellte Versuchsaufbau gewählt. Dieser sollte es außerdem ermöglichen, die Auswirkungen eines ATTs von  $5 \times 10^5$  ML-BLITC-Zellen auf das Wachstum des MB49-Tumors, sowie das Überleben der Empfängertiere, zu beurteilen.

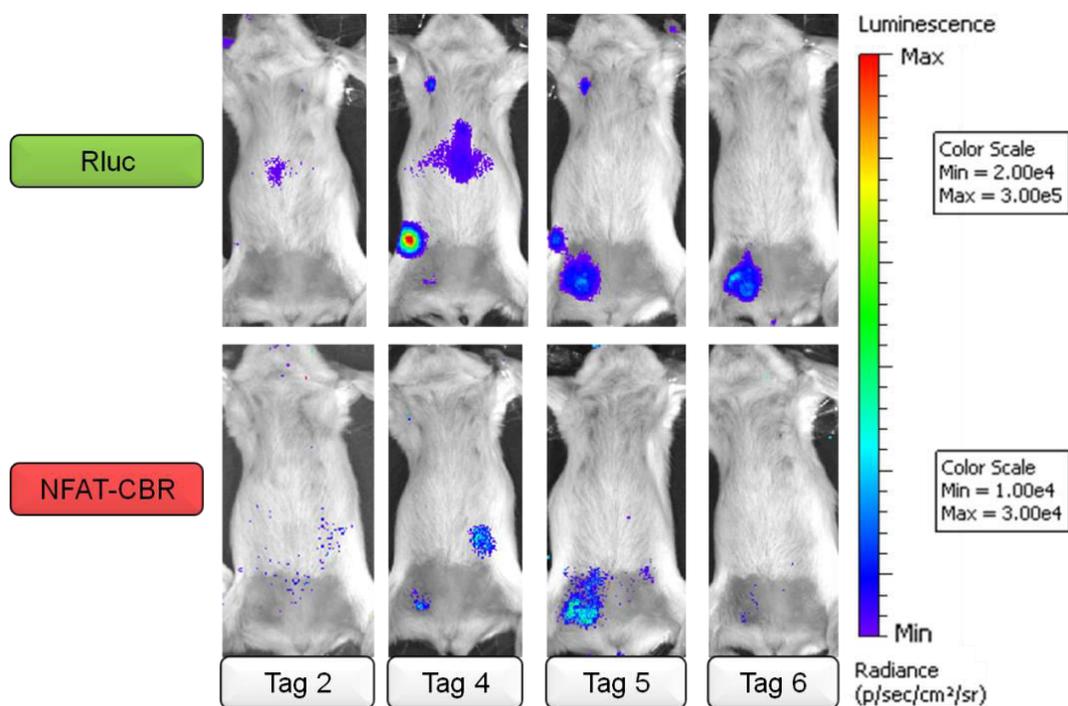


#### Abb. 3 Versuchsaufbau für den ATT von ML-BLITC-Zellen

Sechs AlbinoB6-Rag2<sup>-/-</sup> Weibchen wurden jeweils  $10^4$  MB49-Tumorzellen subkutan injiziert. Nach 7 Tagen wurden alle Tiere subletal bestrahlt (2 x 1,5 Gy im Abstand von 4 Stunden) und drei Mäuse erhielten eine intravenöse Injektion von je  $5 \times 10^5$  ML-BLITC-Zellen. Die numerische Verteilung der Versuchstiere ist unter 2.1 in Tab. 6 dargestellt. Fühlbar meint hier, dass die Tumore kleiner als  $50\text{mm}^3$  waren. Im Verlauf erfolgten in regelmäßigen Abständen die Bestimmung von Tumolvolumen und Gewicht (nicht dargestellt), sowie BLI.

### 3. Ergebnisse

Die Abb. 4 stellt exemplarisch Muster der Biolumineszenzsignale beider Luziferasen an den Tagen 2, 4, 5 und 6 nach dem ATT dar. Am 2. Tag waren noch keinerlei Biolumineszenzsignale erkennbar. Am Tag 4 zeigte sich dann ein starkes Signal der Rluc im Bereich des inguinalen Lymphknotens, der die Lymphe aus dem Bereich des Tumors drainiert (drainierender Lymphknoten), sowie ein schwaches Signal eines ipsilateralen axillären Lymphknotens. Ein eindeutiges Signal der NFAT-CBR war an diesem Tag nicht detektierbar. Am 5. Tag hatte sich das Rluc-Signal auf den Tumor ausgebreitet. Außerdem war dort ein deutliches NFAT-CBR-Signal vorhanden. Am Tag 6 war das Signal der Rluc weiterhin messbar, das der NFAT-CBR jedoch nicht mehr.



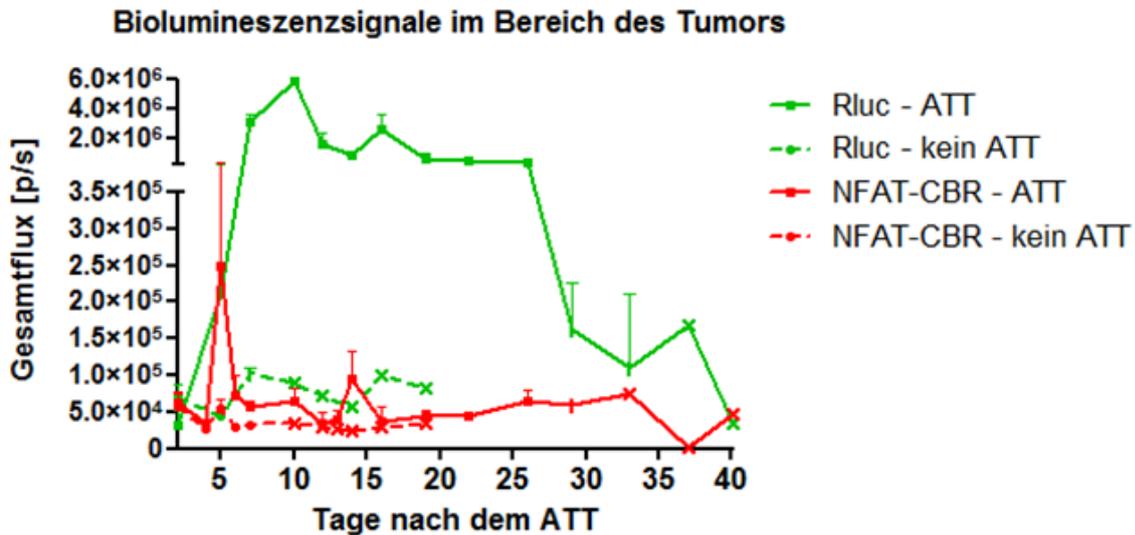
**Abb. 4 Biolumineszenzsignale adoptiv transferierten ML-BLITC-Zellen**

Biolumineszenzbilder einer Maus, der  $5 \times 10^5$  ML-BLITC-Zellen adoptiv transferiert worden waren. Zu sehen sind Signale der Rluc (oben) und der NFAT-CBR (unten) zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem ATT. Die rechts abgebildete Farbskala gilt für alle in dieser Dissertation dargestellten Biolumineszenzbilder. Die ebenfalls rechts angegebenen Minimal- und Maximalwerte gelten für alle Bilder der jeweiligen Reihe.

Die Abb. 5 stellt die Quantifizierung der im Bereich des Tumors gemessenen Biolumineszenzsignale beider Luziferasen für alle Tiere aus diesem Versuch im zeitlichen Verlauf dar. Das Signal der Rluc war dabei über einen längeren Zeitraum hinweg sehr intensiv (s. Abb. 5 Tag 6 bis 26). Das NFAT-CBR-Signal hingegen wies lediglich einen deutlichen Höhepunkt an Tag 5 und eine kleinere Spitze an Tag 14 auf. Die übrige Zeit war es kaum zu detektieren. Bei den Tieren, die keinen ATT erhalten

### 3. Ergebnisse

hatten (sog. Kontrollmäuse), waren im gesamten Verlauf des Experiments keine nennenswerten Biolumineszenzsignale messbar (s. Abb. 5 gestrichelte Linien).

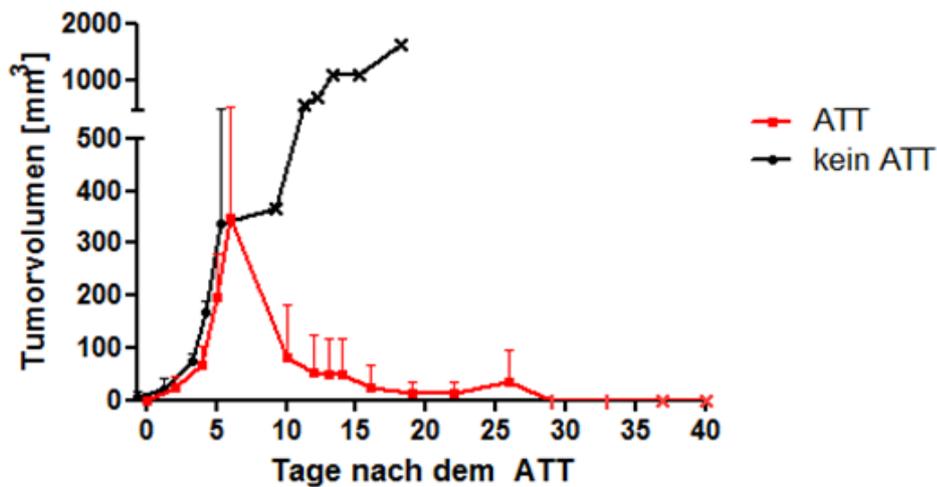


**Abb. 5 Quantifizierung der Biolumineszenzsignale adoptiv transferierter ML-BLITC-Zellen**

Die Biolumineszenzsignale der Mäuse aus dem in Abb. 3 dargestellten Experiment wurden für die beiden Luziferasen Rluc (grüne Linien) und NFAT-CBR (rote Linien) quantifiziert (p/s = Photonen/Sekunde). Dafür wurde eine sog. region of interest (ROI) definiert, welche nur den Tumor umfasste. Zum Vergleich ist neben der Therapiegruppe (durchgezogene Linien) auch die Kontrollgruppe (gestrichelte Linien) dargestellt. Es werden Mittelwerte und Standardabweichung für die drei Tiere aus einer Gruppe abgebildet. Verändert sich das Symbol der Datenpunkte hin zu einem Strich, weist dies auf eine Gruppenstärke von n = 2 bei dieser Messung hin. Ein Kreuz als Symbol der Datenpunkte steht für eine Gruppenstärke von n = 1.

Die Tumorverlaufskurven (Abb. 6) zeigen, dass der Tumor ab dem 6. Tag nach dem ATT remittierte. Bei den Kontrollmäusen war der Tumor anhaltend progredient, bis die Tiere aufgrund der Größe des Tumors getötet werden mussten.

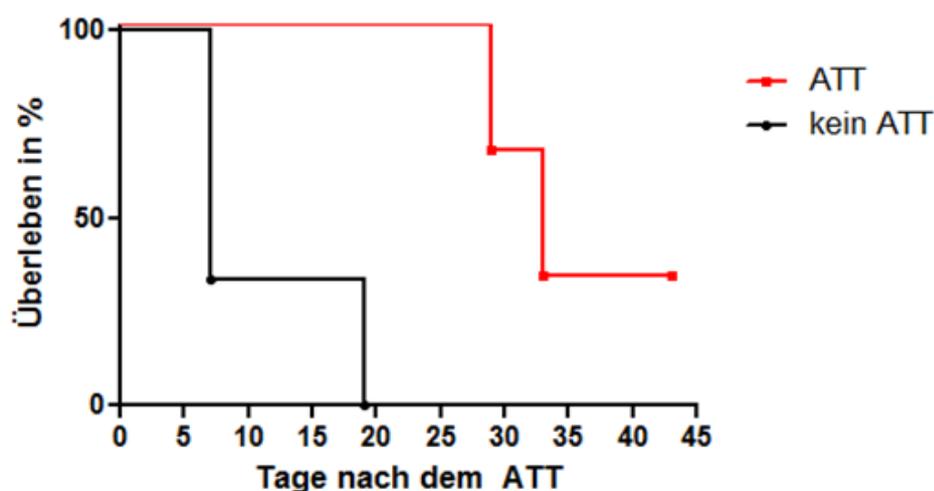
### 3. Ergebnisse



**Abb. 6 Auswirkung des ATTs der ML-BLITC-Zellen auf das Tumorwachstum**

Die Tumorzellvolumina aller Mäuse aus dem in Abb. 3 dargestellten Experiment wurden regelmäßig gemessen. Hier dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung für die drei Tiere aus einer Gruppe. Verändert sich das Symbol der Datenpunkte hin zu einem Strich, weist dies auf eine Gruppenstärke von  $n = 2$  bei dieser Messung hin. Ein Kreuz als Symbol der Datenpunkte steht für eine Gruppenstärke von  $n = 1$ .

Wird das Gesamtüberleben der beiden Gruppen verglichen (s. Abb. 7), stellt sich heraus, dass die Tiere, denen T-Zellen transferiert worden waren, ab dem Zeitpunkt des ATTs im Mittel noch weitere 33 Tage überlebten. Die Kontrolltiere hingegen nur weitere 7 Tage. Erstere wurden dabei jedoch nicht wegen der Größe ihrer Tumor getötet. Stattdessen wurde zwei Tier aufgrund ihres Allgemeinzustands aus dem Versuch genommen und das dritte wurde fälschlicherweise getötet.

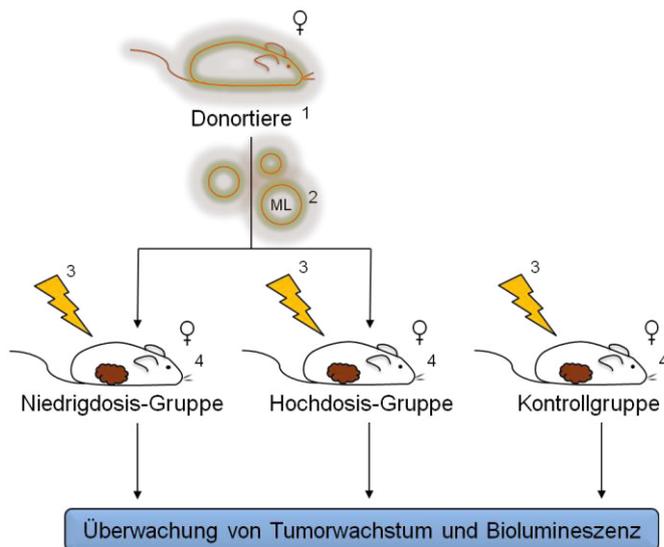


**Abb. 7 Auswirkung des ATTs der ML-BLITC-Zellen auf das Gesamtüberleben**

Diese Kaplan-Meier-Kurve zeigt das Gesamtüberleben der Tiere aus dem in Abb. 3 dargestellten Experiment in Tagen. Die letzte überlebende Maus aus diesem Experiment wurde 43 Tage nach dem ATT fälschlicherweise getötet, weshalb die rote Linie endet, ohne  $y = 0$  zu erreichen.

### 3. Ergebnisse

Als nächstes sollte überprüft werden, ob auch weniger ML-BLITC-Zellen einen GvT-Effekt auslösen können und sich dabei durch das *duale Biolumineszenz-Reportersystem* überwachen lassen. Hierfür wurden  $5 \times 10^4$  ML-BLITC-Zellen (Niedrigdosis-ATT) mit den bisher verwendeten  $5 \times 10^5$  ML-BLITC-Zellen (Hochdosis-ATT) in dem in Abb. 8 dargestellte Versuch verglichen.



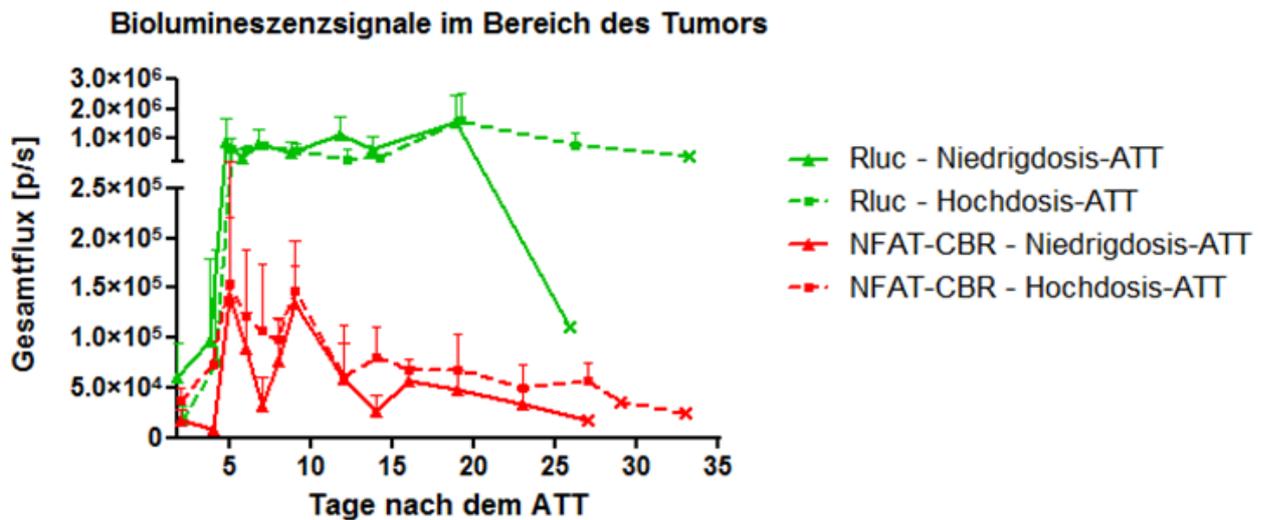
- 1 ML-BLITC Weibchen
- 2 Injektion von  $5 \times 10^4$  (Niedrigdosis-ATT) bzw.  $5 \times 10^5$  ML-BLITC-Zellen (Hochdosis-ATT) (je n = 3)
- 3 subletale Bestrahlung ( $2 \times 1,5$  Gy im Abstand von 4 Stunden)
- 4 albinoB6-Rag-2<sup>-/-</sup>Weibchen mit einem MB49-Tumor von ca. 50 mm<sup>3</sup> Größe (n = 9)

#### Abb. 8 Versuchsaufbau zum Vergleich unterschiedlicher Zellzahlen adoptiv transferierter ML-BLITC-Zellen

Neun AlbinoB6-Rag2<sup>-/-</sup> Weibchen wurden jeweils  $10^4$  MB49-Tumorzellen subkutan injiziert. Nach 9 Tagen wurden alle Tiere subletal bestrahlt ( $2 \times 1,5$  Gy im Abstand von 4 Stunden) und jeweils drei Tiere erhielten eine intravenöse Injektion von je  $5 \times 10^4$  (Niedrigdosis-ATT) oder  $5 \times 10^5$  ML-BLITC-Zellen (Hochdosis-ATT). Die numerische Verteilung der Versuchstiere ist unter 2.1 in Tab. 7 dargestellt. Im Verlauf erfolgten in regelmäßigen Abständen die Bestimmung von Tumolvolumen und Gewicht (nicht dargestellt), sowie BLI.

Die Abb. 9 stellt den Verlauf der Biolumineszenzsignale beider Luziferasen im Bereich des Tumors für beide Zellzahlen im Vergleich dar. Das Signal der Rluc wies bei beiden Gruppen rasch eine hohe Intensität auf, welche über einen längeren Zeitraum hinweg erhalten blieb. In der Niedrigdosis-Gruppe nahm die Signalintensität am Tag 26 nach dem ATT jedoch wieder stark ab. Das NFAT-CBR-Signal erreichte für beide Gruppen erneut zwei Höhepunkte an den Tag 5 und 9, und verfügte die übrige Zeit über eine geringe Intensität.

### 3. Ergebnisse

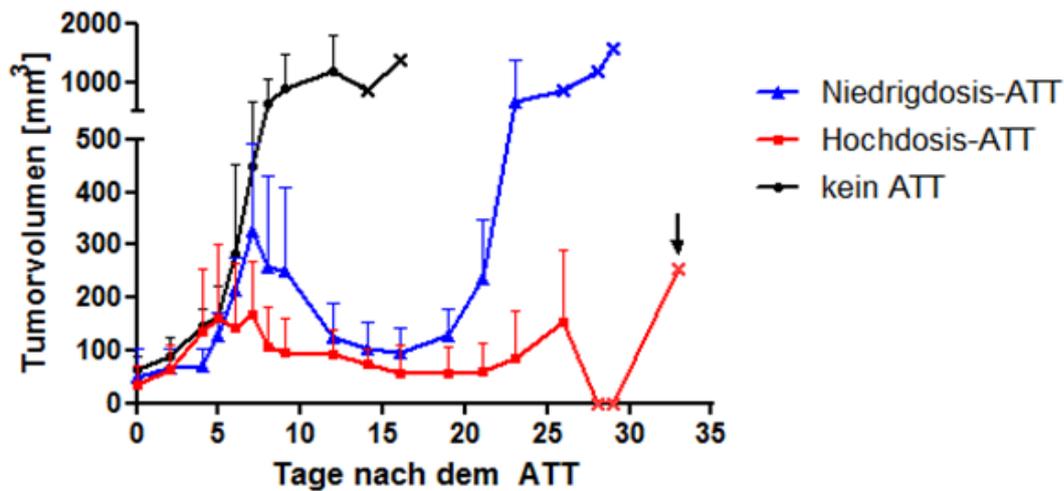


**Abb. 9 Quantifizierung der Biolumineszenzsignale unterschiedlicher Zellzahlen adoptiv transferierter ML-BLITC-Zellen**

Die Biolumineszenzsignale der Mäuse aus dem in Abb. 8 dargestellten Experiment wurden mithilfe einer ROI, welche nur den Tumor umfasste, für die beiden Luziferasen Rluc (grüne Linien) und NFAT-CBR (rote Linien) quantifiziert. Es werden die Biolumineszenzsignale der Niedrigdosis-Gruppe (durchgezogene Linien) mit denen der Hochdosis-Gruppe (gestrichelte Linien) verglichen. Hier dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung für die drei Tiere aus einer Gruppe. Verändert sich das Symbol der Datenpunkte hin zu einem Kreuz, weist dies auf eine Gruppenstärke von  $n = 1$  bei dieser Messung hin.

Die Tumorverlaufskurven zeigen, dass die Tumore in der Niedrigdosis-Gruppe, im Vergleich zu denen in der Hochdosis-Gruppe, bis zum Tag 7 nach dem ATT schneller wuchsen (s. Abb. 10). Außerdem waren sie, nach einer zwischenzeitlich Remission, früher progredient (nach Niedrigdosis-ATT am Tag 16, nach Hochdosis-ATT an Tag 21; s. Abb. 10).

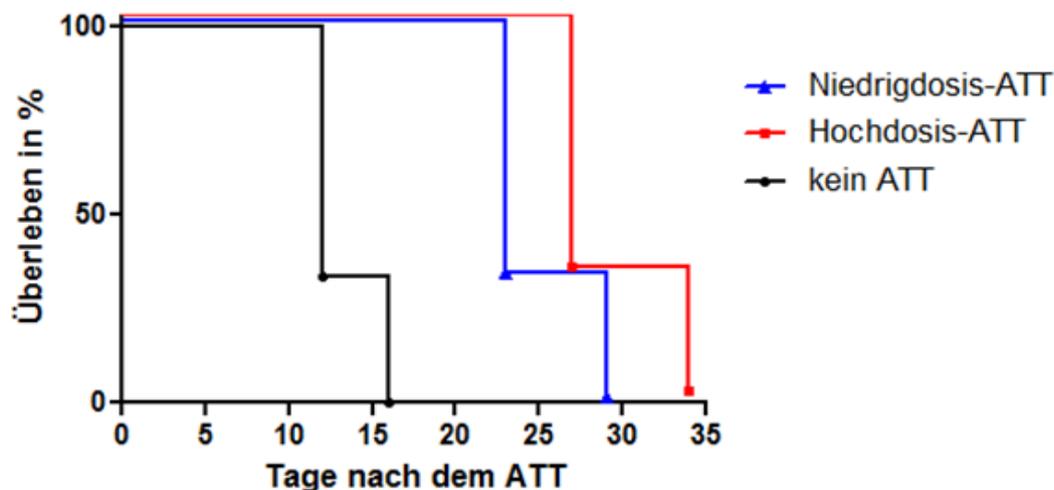
### 3. Ergebnisse



**Abb. 10 Auswirkung unterschiedlicher Zellzahlen adoptiv transferierter ML-BLITC-Zellen auf das Tumorwachstum**

Die Tumorstadien aller Mäuse aus dem in Abb. 8 dargestellten Experiment wurden regelmäßig gemessen. Hier dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung für die drei Tiere aus einer Gruppe. Verändert sich das Symbol der Datenpunkte hin zu einem Kreuz, weist dies auf eine Gruppenstärke von  $n = 1$  bei dieser Messung hin. Der schwarze Pfeil markiert den Tumor, der für den unter 3.3 dargestellten Versuch verwendet wurde.

Bezüglich des Gesamtüberleben lässt sich in Abb. 11 erkennen, dass die Tiere aus der Kontrollgruppe vom Tag des ATTs an im Mittel noch 12 weitere Tage lebten, gegenüber weiteren 23 Tagen nach dem Niedrigdosis-ATT beziehungsweise weiteren 27 Tagen nach dem Hochdosis-ATT.



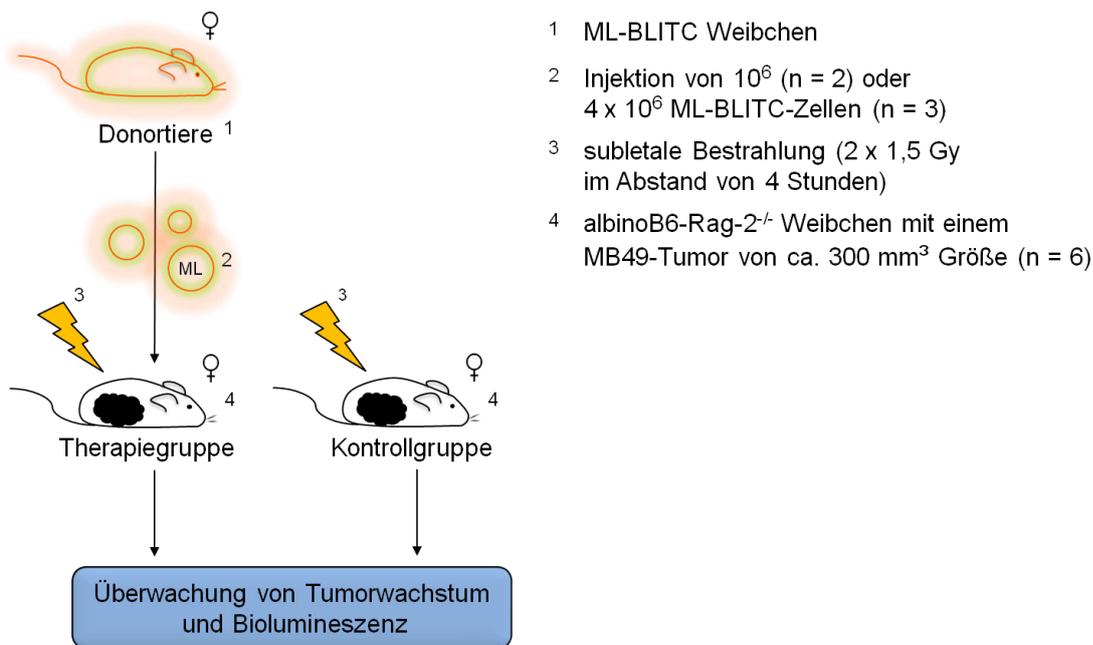
**Abb. 11 Auswirkung unterschiedlicher Zellzahlen adoptiv transferierter ML-BLITC-Zellen auf das Gesamtüberleben**

Diese Kaplan-Meier-Kurve zeigt das Gesamtüberleben aller Mäuse aus dem in Abb. 8 dargestellten Experiment in Tagen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.2 Einfluss des Tumorzvolumens auf den Verlauf der Biolumineszenzsignale

Auf den oben beschriebenen Versuchen aufbauend sollte das *duale Biolumineszenz-Reportersystem* unter Bedingungen eingesetzt werden, die den Effekt adoptiv transferierter T-Zellen reduzieren. Dass die Wirksamkeit eines ATTs mit zunehmender TumorgroÙe zum Zeitpunkt der Behandlung abnimmt, konnten andere Arbeitsgruppen bereits zeigen. Der adoptive Transfer von mehr T-Zellen konnte dabei die Wirksamkeit nicht wieder vollständig herstellen<sup>44</sup>. Der ATT erfolgte im nächsten Versuch deshalb erst, als die Tumore bereits ein Volumen von durchschnittlich 300mm<sup>3</sup> aufwiesen (s. Abb. 12). Sie waren damit deutlich größer als die Tumore aus den bisherigen Experimenten, die zum Zeitpunkt des ATTs über eine Größe von etwa 50mm<sup>3</sup> oder weniger verfügten. Um die Chance auf einen GvT-Effekt zu erhöhen, wurden 10<sup>6</sup> und 4 x 10<sup>6</sup> ML-BLITC-Zellen transferiert.



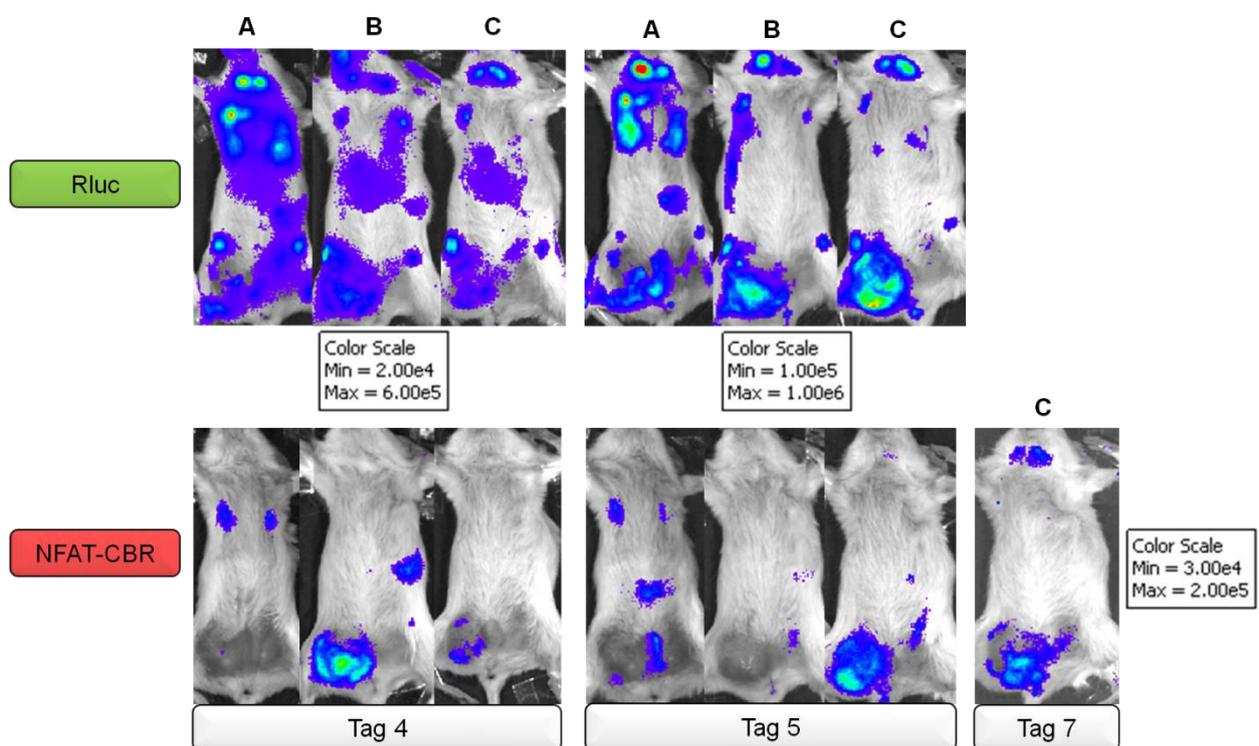
**Abb. 12 Versuchsaufbau für den ATT von ML-BLITC-Zellen im Einsatz gegen einen großen MB49-Tumor**

Sechs albinoB6-Rag2<sup>-/-</sup> Weibchen wurden jeweils 10<sup>4</sup> MB49-Tumorzellen subkutan injiziert. Nach 14 Tagen wurden alle Tiere subletal bestrahlt (2 x 1,5 Gy im Abstand von 4 Stunden). Zwei Mäuse erhielten daraufhin eine intravenöse Injektion von je 10<sup>6</sup> und drei von je 4 x 10<sup>6</sup> ML-BLITC-Zellen. Die numerische Verteilung der Versuchstiere ist unter 2.1 in Tab. 8 dargestellt. Im Verlauf erfolgten in regelmäßigen Abständen die Bestimmung von Tumorzvolumen und Gewicht (nicht dargestellt), sowie BLI.

Die Abb. 13 stellt exemplarisch Aufnahmen der Biolumineszenzsignale aus diesem Versuch dar. Dabei sind drei verschiedene Muster zu erkennen (A, B und C). Zwei Mäuse aus diesem Experiment wiesen lediglich schwache, punktuelle Signale der Rluc im Bereich des Tumors auf, bei eindeutigen Signalen in den Bereichen verschiedener

### 3. Ergebnisse

peripherer Lymphknoten (s. Maus A aus Abb. 13). Bei diesen Tieren war im gesamten Verlauf des Experiments kein eindeutiges NFAT-CBR-Signal im Bereich des Tumors erkennbar. Zwei weitere Mäuse verfügten am Tag 4 nach dem ATT über eindeutige Signale beider Luziferasen im Bereich des Tumors (s. Maus B aus Abb. 13). Das NFAT-CBR-Signal war jedoch bereits einen Tag später wieder erloschen (s. Maus B aus Abb. 13 an Tag 5). Lediglich eine Maus zeigte, nach zunächst schwachen Signalen beider Luziferasen am 4. Tag, deutlich intensivere Signale am Tag 5 und bis zum 7. Tag ein Signal der NFAT-CBR im Bereich des Tumors (s. Maus C aus Abb. 13).



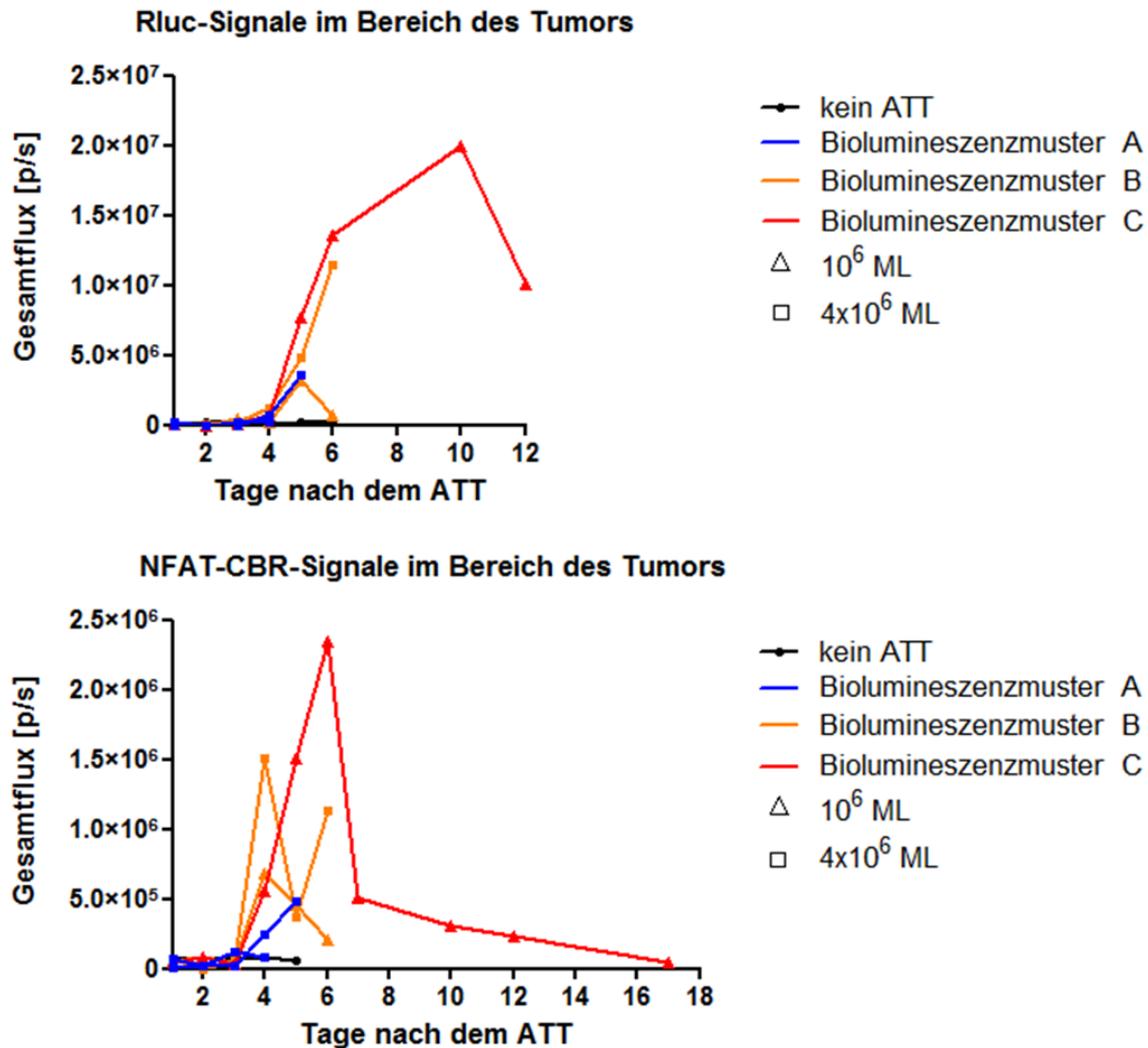
**Abb. 13 Muster der Biolumineszenzsignale adoptiv transferierter ML-BLITC-Zellen im Einsatz gegen einen großen MB49-Tumor**

Biolumineszenzbilder von Mäusen, denen  $4 \times 10^6$  (Maus A und B) oder  $10^6$  (Maus C) ML-BLITC-Zellen adoptiv transferiert worden waren. Zu sehen sind Signale der Rluc (oben) und der NFAT-CBR (unten) zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem ATT. Ist die Skala der Biolumineszenzbilder unterhalb der Bilder dargestellt, gilt sie jeweils für die Bilder darüber. Befindet sie sich rechts, gilt sie für alle Bilder aus dieser Reihe.

Die Quantifizierung der Biolumineszenzsignale aller Tiere aus diesem Versuch unterstützt diese Beobachtungen. So wird ein heterogenes Bild bezüglich der Rluc- (s. Abb. 14A) und der NFAT-CBR-Signale ersichtlich (s. Abb. 14B). Es wird außerdem deutlich, dass die Maus, welche als einzige ein mehrtägiges NFAT-CBR-Signal im Bereich des Tumors aufwies (s. Maus C aus Abb. 13), die übrigen Tiere auch bezüglich

### 3. Ergebnisse

der maximalen Signalintensität beider Luziferasen übertraf (s. rote Linie in Abb. 14A und B).

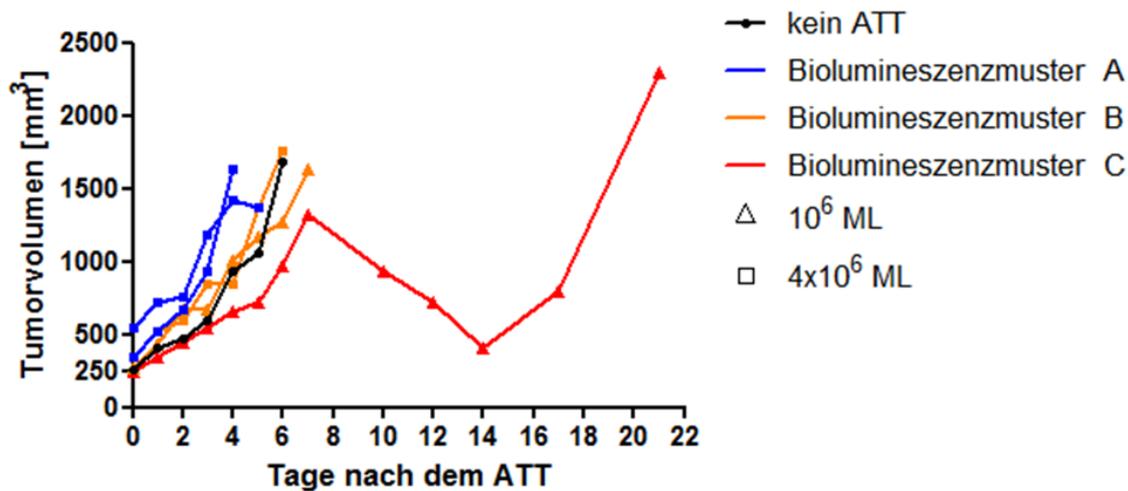


**Abb. 14 Quantifizierung der Biolumineszenzsignale adoptiv transferierter ML-BLITC-Zellen im Einsatz gegen einen großen MB49-Tumor**

Die Biolumineszenzsignale der Tiere aus dem in Abb. 12 dargestellten Versuch wurden mithilfe einer ROI, welche nur den Tumor umfasste, quantifiziert. (A) Rluc-Signal (B) NFAT-CBR-Signal

Die Tumorverlaufskurven (Abb. 15) zeigen lediglich bei einer Maus (Maus C aus Abb. 13) eine vorübergehende Remission des MB49-Tumors. Bei allen anderen Tieren war der Tumor, unabhängig von der Anzahl der injizierten T-Zellen, progredient (s. blaue und orange Linie in Abb. 15). Die Tumore dieser Mäuse wuchsen dabei mit einer ähnlichen Geschwindigkeit, wie der Tumor der Kontrollmaus (s. schwarze Linie in Abb. 15).

### 3. Ergebnisse



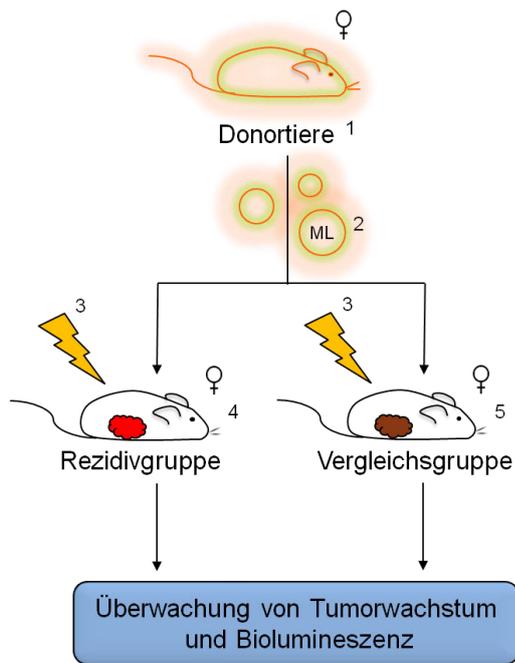
**Abb. 15** Auswirkung des ATTs der ML-BLITC-Zellen auf das Tumorstadium eines großen MB49-Tumors

Die Tumorstadien aller Tiere aus dem in Abb. 12 dargestellten Experiment wurden regelmäßig gemessen.

#### 3.3 Verlauf der Biolumineszenzsignale bei der Behandlung eines MB49-Rezidivs

Als nächstes sollte überprüft werden, wie adoptiv transferierte ML-BLITC-Zellen gegen einen Tumor wirken, der diesen Zellen schon einmal ausgesetzt war. Dabei handelte es sich um den Tumor einer Maus aus den unter 3.1 beschriebenen Versuchen (s. schwarzer Pfeil in Abb. 10). Bei diesem Tier, das  $5 \times 10^5$  ML-BLITC-Zellen erhalten hatte, zeigte sich zunächst ein deutlicher GvT-Effekt der adoptiv transferierten T-Zellen ab dem 7. Tag nach dem ATT. Dieser setzte sich fort, bis ab Tag 16 für 13 Tage klinisch eine komplette Remission des Tumors eingetreten war. Am Tag 33 trat an derselben Stelle ein Rezidiv auf. Es ist also trotz eines starken initialen GvT-Effekts zu einem Rezidiv des MB49-Tumors gekommen. Dieser Rezidivtumor (MB49-Rezidiv) wurde für den im Folgenden beschriebenen Versuch (s. Abb. 16) post mortem entfernt, in Einzelzellsuspension gebracht und in gleicher Zahl und auf gleiche Weise wie die gewöhnlichen MB49-Tumorzellen injiziert.

### 3. Ergebnisse



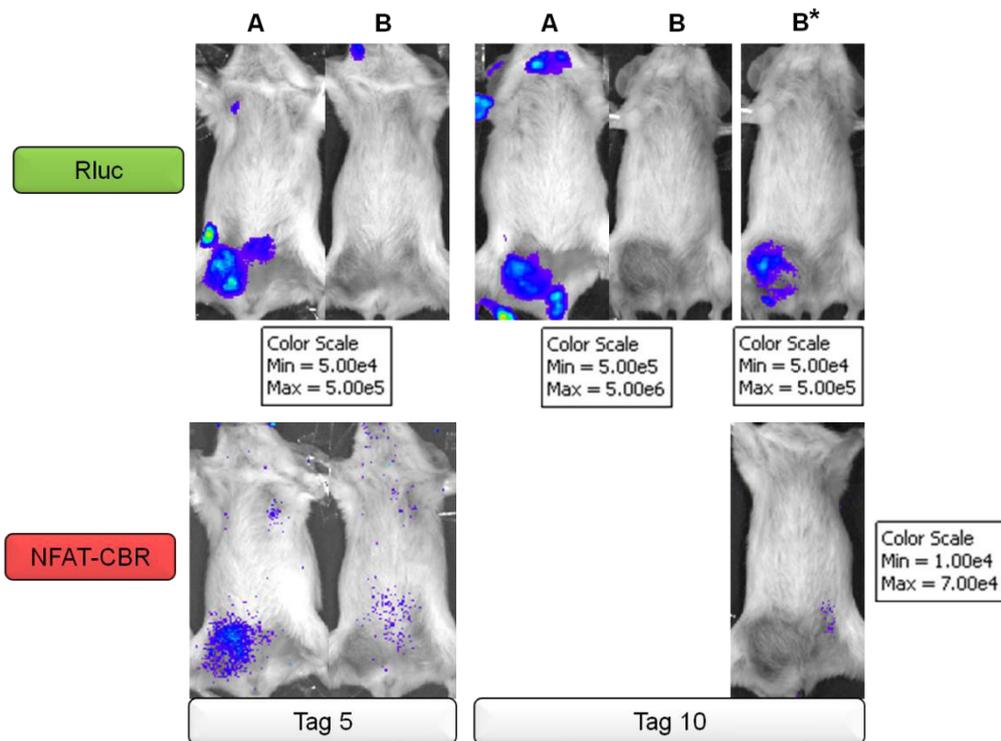
- 1 ML-BLITC Weibchen
- 2 Injektion von  $5 \times 10^4$  ML-BLITC-Zellen ( $n = 6$ )
- 3 subletale Bestrahlung ( $2 \times 1,5$  Gy im Abstand von 4 Stunden)
- 4 albinoB6-Rag-2<sup>-/-</sup> Weibchen mit einem MB49-Rezidivtumor von ca. 75 mm<sup>3</sup> Größe ( $n = 3$ )
- 5 albinoB6-Rag-2<sup>-/-</sup> Weibchen mit einem gewöhnlichen MB49-Tumor von ca. 75 mm<sup>3</sup> Größe ( $n = 3$ )

#### Abb. 16 Versuchsaufbau für den ATT von ML-BLITC-Zellen im Einsatz gegen ein MB49-Rezidiv

Je drei AlbinoB6-Rag2<sup>-/-</sup> Weibchen wurden entweder jeweils  $10^4$  gewöhnliche MB49-Tumorzellen oder  $10^4$  Zellen des MB49-Rezidivs subkutan injiziert. Nach 10 Tagen wurden alle Tiere subletal bestrahlt ( $2 \times 1,5$  Gy im Abstand von 4 Stunden) und erhielten je eine intravenöse Injektion von  $5 \times 10^4$  ML-BLITC-Zellen. Die numerische Verteilung der Versuchstiere ist unter 2.1 in Tab. 9 dargestellt. Im Verlauf erfolgten in regelmäßigen Abständen die Bestimmung von Tumorzellen und Gewicht (nicht dargestellt), sowie BLI.

Die Abb. 17 zeigt exemplarisch Muster der Biolumineszenzsignale aus diesem Experiment. Die Tiere mit dem gewöhnlichen MB49-Tumor wiesen dabei am Tag 5 nach dem ATT die zu erwartenden Signale beider Luziferasen auf (s. Maus A aus Abb. 17 und vgl. Abb. 4 Tag 5). Bei den Mäusen, die die Zellen des MB49-Rezidivs erhalten hatten, waren am Tag 5 keinerlei Biolumineszenzsignale detektierbar (s. Maus B aus Abb. 17). Am Tag 10 war das Rluc-Signal im Bereich des Tumors dieser Tiere so viel schwächer, dass es bei gleicher Skalierung der Biolumineszenzbilder für beide Gruppe nicht ersichtlich ist (s. Maus B aus Abb. 17). Werden die Gruppen separat bei unterschiedlicher Skalierung betrachtet, wird bei der Maus aus der Rezidiv-Gruppe ein schwaches Signal der Rluc erkennbar (s. Maus B\* aus Abb. 17). Allerdings wies keine Maus aus dieser Gruppe zu diesem oder einem anderen Zeitpunkt ein NFAT-CBR-Signal im Bereich des Tumors auf (s. Maus B\* aus Abb. 17). Die Quantifizierung der Biolumineszenzsignale aller Tiere aus diesem Versuch unterstützt diese Beobachtungen (Graph nicht dargestellt).

### 3. Ergebnisse

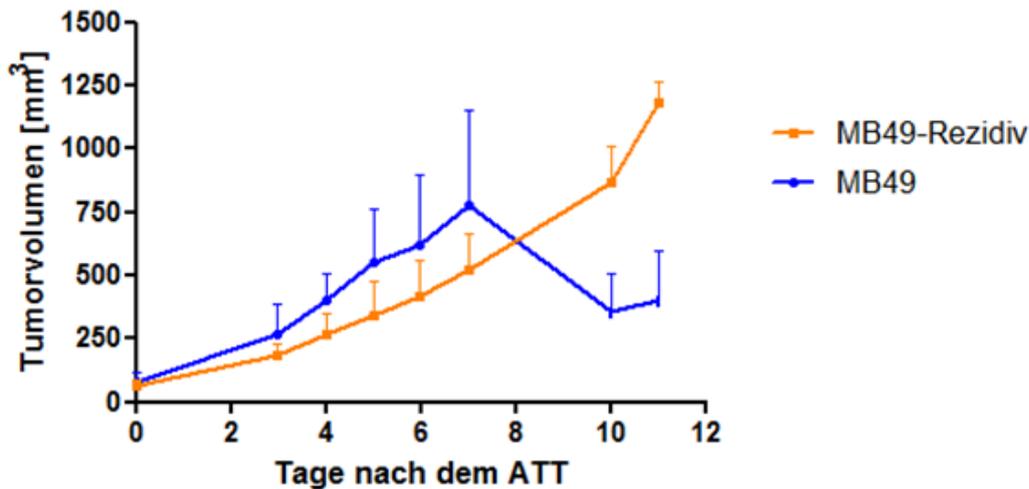


**Abb. 17 Muster der Biolumineszenzsignale adoptiv transferierter ML-BLITC-Zellen im Einsatz gegen ein MB49-Rezidiv**

Biolumineszenzbilder von Mäusen, denen  $5 \times 10^4$  ML-BLITC-Zellen adoptiv transferiert worden waren (Maus A und B) und die entweder einen gewöhnlichen MB49-Tumor (Maus A) oder ein MB49-Rezidiv (Maus B) trugen. Zu sehen sind Signale der Rluc (oben) und der NFAT-CBR (unten) zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem ATT. Ist die Skala der Biolumineszenzbilder unterhalb der Bilder dargestellt, gilt sie jeweils für die Bilder darüber. Befindet sie sich rechts, gilt sie für alle Bilder aus dieser Reihe.

Die MB49-Rezidivtumore waren trotz des ATTs anhaltend progredient, wohingegen die gewöhnlichen MB49-Tumore nach dem ATT remittierten (s. Abb. 18).

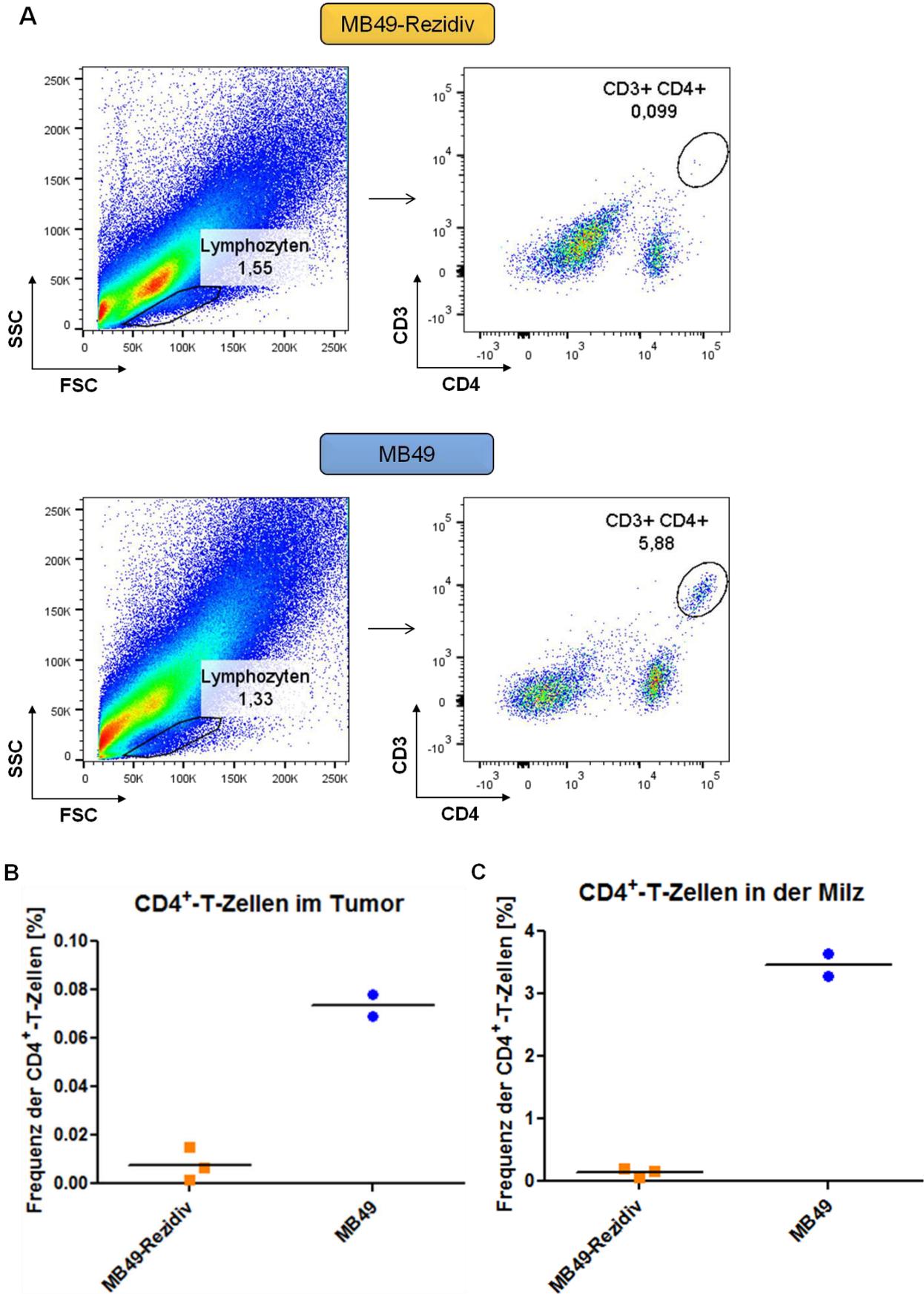
### 3. Ergebnisse



**Abb. 18 Auswirkung des ATTs der ML-BLITC-Zellen auf das Tumorwachstum des MB49-Rezidivs**  
Die Tumorumfänge aller Mäuse aus dem in Abb. 16 dargestellten Experiment wurden regelmäßig gemessen. Hier dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung für die drei Tiere aus einer Gruppe. Verändert sich das Symbol der Datenpunkte hin zu einem Strich, weist dies auf eine Gruppenstärke von  $n = 2$  bei dieser Messung hin.

Um die Ergebnisse des BLIs zu bestätigen wurden die Tiere aus diesem Experiment 10 Tage nach dem ATT getötet und ihre Tumore und Milzen durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 19). In den MB49-Rezidivtumoren konnten nahezu keine  $CD4^+$ -T-Zellen nachgewiesen werden. Demgegenüber waren sie im Tumorgewebe der gewöhnlichen MB49-Tumore eindeutig nachweisbar (s. Abb. 19A und B). Die durchflusszytometrische Analyse der Milzen zeigte vergleichbare Ergebnisse (s. Abb. 19C).

### 3. Ergebnisse



Die Abbildungsbeschriftung zu dieser Abb. befindet sich auf der nächste Seite.

### 3. Ergebnisse

#### **Abb. 19 Detektion der adoptiv transferierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in Tumor und Milz**

(A) Einzelzellsuspensionen von Tumoren und Milzen von insgesamt fünf Tieren aus diesem Experiment wurden mit den in der Färbung B aus Tab. 8 enthaltenen Antikörpern gefärbt. Mittels der hier dargestellten Gatingstrategie wurde dann der Anteil an CD4<sup>+</sup>T-Zellen in diesen Organen ermittelt. Hier abgebildet ist jeweils ein repräsentatives Beispiel einer Tumorzellsuspension eines MB49-Rezidivs und eines gewöhnlichen MB49-Tumors. Eine ähnliche Gatingstrategie wurde auch für die Milzzellsuspensionen angewendet (hier nicht dargestellt). (B) Häufigkeit von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen im Tumor. (C) Häufigkeit von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in der Milz.

#### **3.4 Statistische Beurteilung der in vivo Experimente**

Die bisher dargestellten Experimente dienten vor allem dazu das *duale Biolumineszenz-Reportersystem* zur Überwachung adoptiv transferierter T-Zellen zu etablieren. Deshalb wurden die Möglichkeiten und Grenzen des ATTs unter verschiedenen Bedingungen getestet, anstatt einzelne Versuche mehrfach zu wiederholen. Um hierfür möglichst wenige Mäuse aufzuwenden, wurde in der Regel eine Gruppenstärke von  $n = 3$  eingesetzt. Somit ist die Anzahl der Tiere für eine statistische Auswertung der Ergebnisse zu gering. Die Tendenz, dass ein ATT von ML-BLITC-Zellen den MB49-Tumor bekämpft und das Überleben der Tiere verlängert, ist jedoch deutlich erkennbar (s. Abb. 6,7,10 und 11).

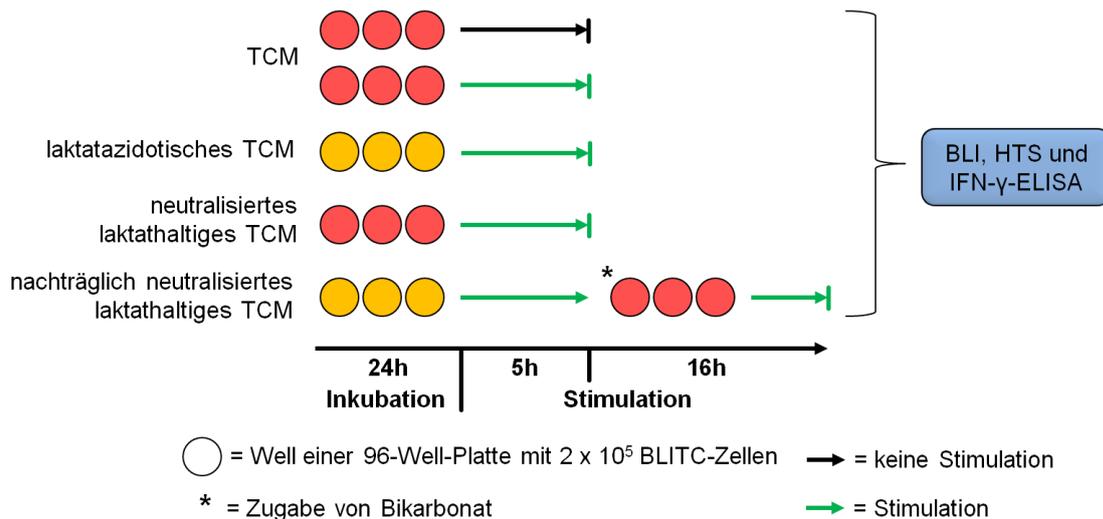
#### **3.5 Milchsäureproduktion des MB49-Tumors in vitro**

Um die Rolle der Laktatazidose in dem hier vorgestellten Modell aufzudecken, sollte zunächst überprüft werden, ob MB49-Tumorzellen *in vitro* eine extrazelluläre Laktatazidose erzeugen können. Dafür wurden MB49-Tumorzellen für drei Tage in MB49-Tumorzellmedium kultiviert (s. 2.2.1). Nach dieser Zeit konnten in dem Medium eine Laktatkonzentration von 12,5mM und ein pH-Wert von 6,7 gemessen werden. Die Laktatkonzentration von zellfreiem MB49-Tumorzellmedium lag unter denselben Kulturbedingungen bei 1,6 mM und der pH-Wert bei 7,3.

#### **3.6 Auswirkung der Laktatazidose auf NFAT-CBR-Signale und IFN- $\gamma$ -Produktion**

Als nächstes sollte geklärt werden, ob sich die Inhibition von T-Zellen durch eine Laktatazidose mithilfe des *dualen Biolumineszenz-Reportersystems* darstellen lässt und wie Bikarbonat auf diese Hemmung wirkt. Dafür wurde der unter 2.2.7 beschriebenen und in Abb. 20 dargestellten Versuchsaufbau gewählt.

### 3. Ergebnisse

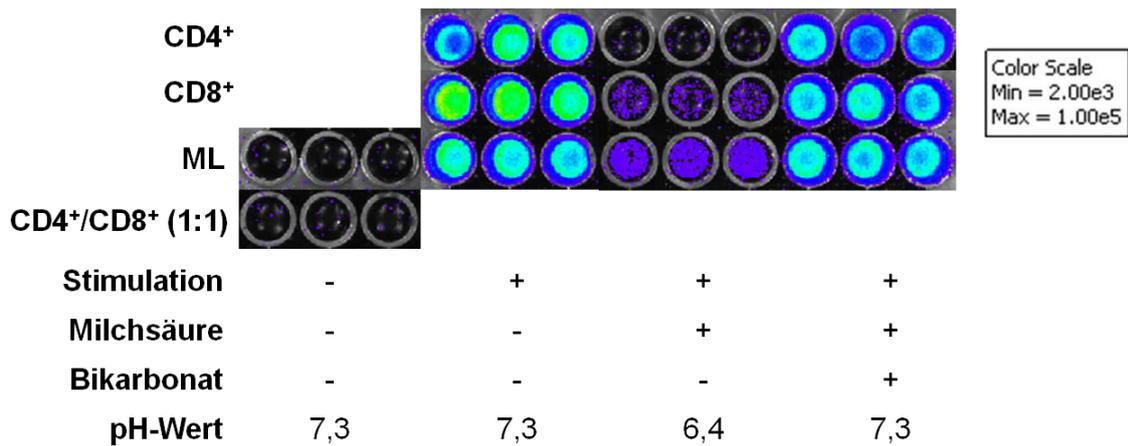


#### Abb. 20 Versuchsaufbau zum Nachweis der Hemmung des NFAT-CBR-Signals durch Milchsäure

Triplets mit  $2 \times 10^5$  Zellen ( $CD4^+$ ,  $CD8^+$  oder ML-BLITC-Zellen) / Well wurden für 24 Stunden in dem entsprechenden TCM (s. Tab. 13) inkubiert. Daraufhin wurden einige der Triplets für 5 Stunden in mit CD3- und CD28-Antikörpern beschichteten Wells stimuliert (grüne Pfeile). Die übrigen Triplets, welche  $CD4^+$  und  $CD8^+$ -BLITC-Zellen im Verhältnis 1 : 1, oder ML-BLITC-Zellen enthielten, wurden nicht stimuliert (schwarzer Pfeil). Bei der Hälfte der Triplets, welche in laktatazidotischem TCM inkubiert und für 5 Stunden stimuliert wurden, erfolgte eine nachträgliche Zugabe von Bikarbonat um die Azidose zu neutralisieren (\*). Daraufhin wurde die Stimulation für weitere 16 Stunden fortgesetzt. Nach Abschluss der Stimulation erfolgten eine Zellzählung, sowie BLI und eine IFN- $\gamma$ -Messung.

Das BLI (s. Abb. 21) zeigt, dass die Laktatazidose das NFAT-CBR-Signal stimulierter BLITC-Zellen deutlich reduzierte. Dies gilt sowohl für die polyklonalen  $CD4^+$  und  $CD8^+$ -BLITC-Zellen, als auch für ML-BLITC-Zellen. Des Weiteren wird ersichtlich, dass Bikarbonat diese Reduktion verhindern konnte, wenn es vor Beginn der Stimulation zum laktatazidotischen TCM hinzugegeben worden war (s. neutralisiertes laktathaltiges TCM in Abb. 20 und die rechte Spalte in Abb. 21). Das gilt für alle untersuchten Zellpopulationen gleichermaßen.

### 3. Ergebnisse

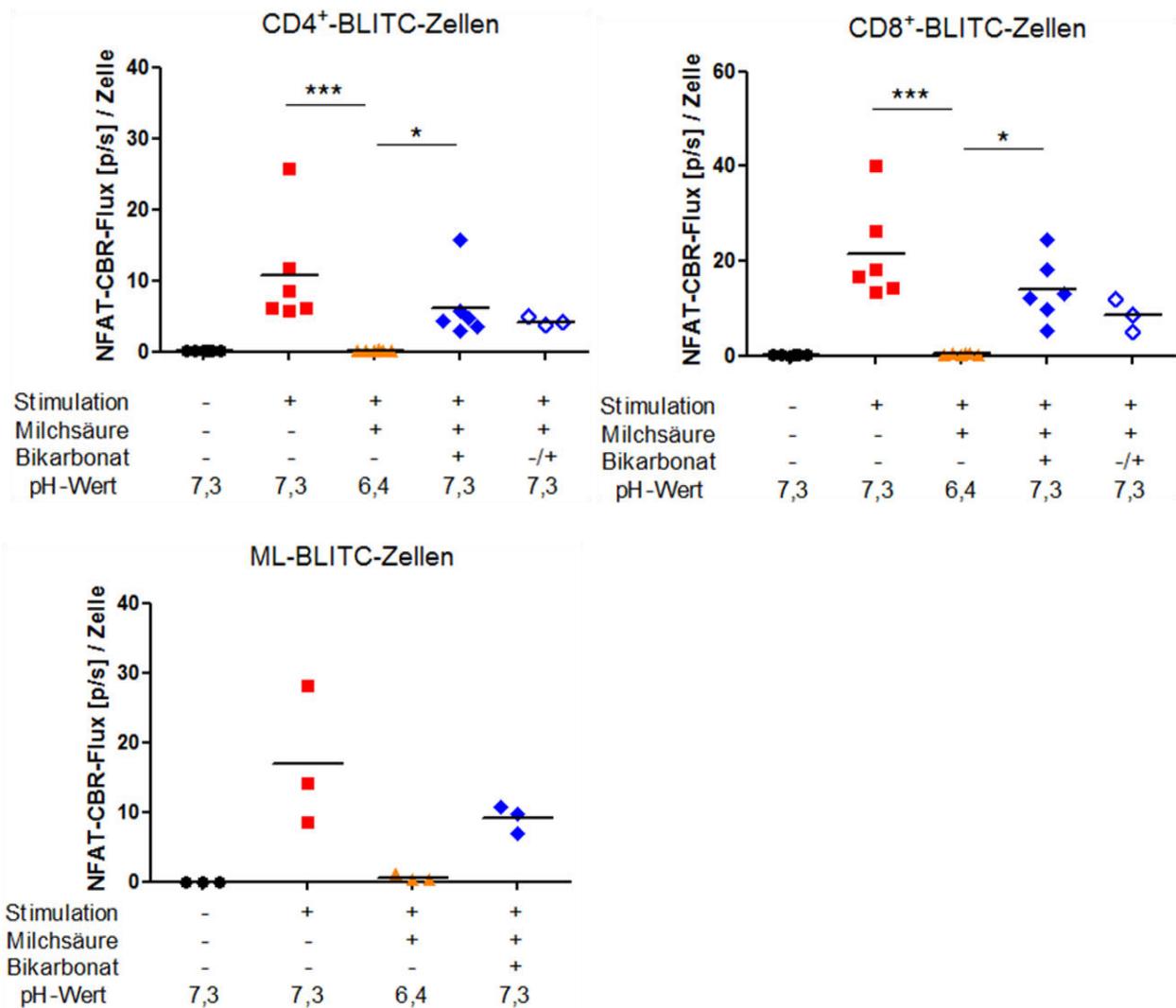


#### Abb. 21 Auswirkung der Laktatazidose auf NFAT-CBR-Signale

Repräsentatives Biolumineszenzbild des NFAT-CBR-Signals von BLITC-Zellen, die wie in Abb. 20 dargestellt, behandelt wurden. Jedes Well enthält  $10^5$  BLITC-Zellen. Die Tab. unterhalb stellt die jeweiligen Bedingungen dar, unter denen die Zellen inkubiert und gegebenenfalls stimuliert worden waren. Ein + zeigt an, dass eine Stimulation stattgefunden hat, oder Milchsäure beziehungsweise Bikarbonat im TCM vorhanden waren. Ein - bedeutet das Gegenteil. Die rechts angegebene Skala der Biolumineszenzbilder gilt für alle abgebildeten Wells. Anders als in Abb. 20 dargestellt, gab es, bei dem hier als Beispiel ausgewählten Experiment, kein Triplet mit nachträglich neutralisiertem laktathaltigem TCM.

Um auszuschließen, dass das Signal der NFAT-CBR im laktatazidotischem TCM abnahm, weil hier auch die Zahl der lebendigen stimulierten Zellen durch verstärkten Zelltod reduziert war, wurde die Anzahl der Zellen in jedem Well bestimmt. Wird die gemessene Biolumineszenzintensität auf die so ermittelte Zellzahl normalisiert, ergeben sich die in der Abb. 22 dargestellten Graphen. Deren Ergebnisse stimmen mit den oben beschriebenen Erkenntnissen aus der visuellen Beurteilung überein. Die Unterschiede in der Biolumineszenzintensität zwischen BLITC-Zellen, die in herkömmlichem oder laktatazidotischem TCM stimuliert wurden, sind statistisch signifikant ( $p < 0,001$  für polyklonale  $CD4^+$ - und  $CD8^+$ -BLITC-Zellen, je  $n = 6$ ; s. Abb. 22). Dies gilt auch für den Unterschied zwischen BLITC-Zellen, die in laktatazidotischem oder laktathaltigem neutralisiertem TCM stimuliert wurden ( $p < 0,05$  für polyklonale  $CD4^+$ - und  $CD8^+$ -BLITC-Zellen, je  $n = 6$ ; s. Abb. 22). Für ML-BLITC-Zellen zeigten sich ähnliche Ergebnisse, die jedoch aufgrund einer zu geringen Anzahl an Wiederholungen nicht auf statistische Signifikanz hin untersucht werden konnten. Des Weiteren stieg das NFAT-CBR-Signal polyklonaler  $CD4^+$ - und  $CD8^+$ -BLITC-Zellen stark an, wenn nach einer Inkubation in laktatazidotischem TCM Bikarbonat zugegeben wurde (s. nachträglich neutralisiertes laktathaltiges TCM in Abb. 20 und offene blaue Symbole in Abb. 22).

### 3. Ergebnisse



**Abb. 22 Quantifizierung der NFAT-CBR-Signale mono- und polyklonaler BLITC-Zellen**

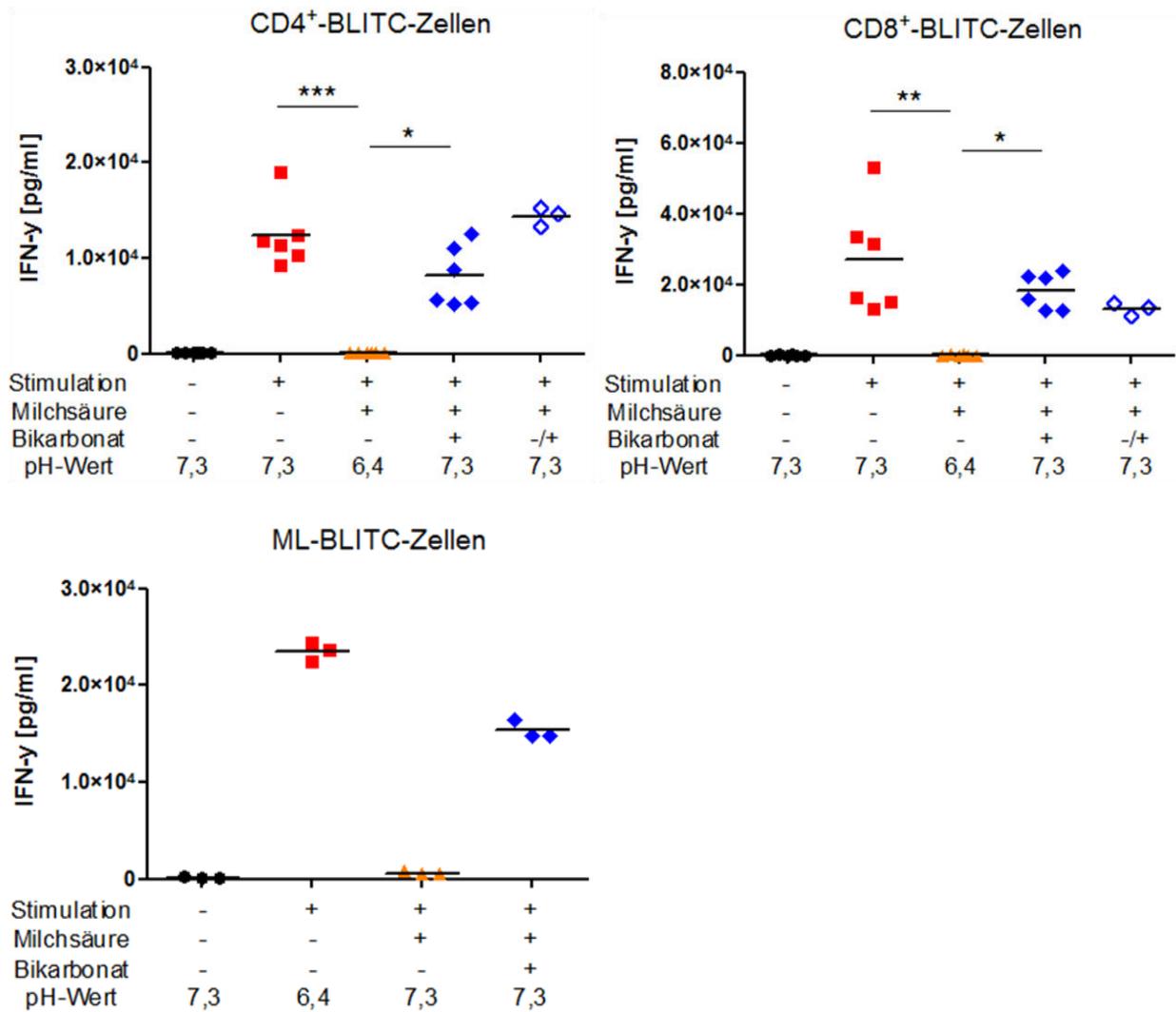
Die NFAT-CBR-Signale der BLITC-Zellen aus dem in Abb. 20 dargestellten Experiment wurden quantifiziert. Dafür wurde für jedes Well für eine ROI definiert. Der so ermittelte Gesamtflux (p/s = Photonen/Sekunde) aller Zellen aus einem Well wurden dann durch die per HTS bestimmte Anzahl der Zellen innerhalb des Wells geteilt. Die Tab. unterhalb stellt die jeweiligen Bedingungen dar, unter denen die Zellen inkubiert und gegebenenfalls stimuliert worden waren. Ein + zeigt an, dass eine Stimulation stattgefunden hat, oder Milchsäure beziehungsweise Bikarbonat im TCM vorhanden waren. Ein - bedeutet das Gegenteil. -/+ steht für die nachträgliche Zugabe von Bikarbonat (s. Abb. 20). Die Abb. zeigt für CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-BLITC-Zellen zwei unabhängige Versuche mit je drei Wells pro Bedingung. Für die ML-BLITC-Zellen ist ein Experiment mit je drei Wells pro Bedingung dargestellt. Zur Analyse der statistischen Signifikanz der Ergebnisse wurden der *Kruskal-Wallis*- und *Dunn's post hoc Test* verwendet. \* = p < 0,05; \*\*\* = p < 0,001

Um zu klären, ob das reduzierte Signal der NFAT-CBR mit einer verringerten Produktion von Effektormolekülen einherging, wurde ermittelt, wie viel IFN- $\gamma$  die Zellen während der oben beschriebenen Versuche produzierten (Abb. 23). Es ist ersichtlich, dass sowohl polyklonale CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-BLITC-Zellen, als auch ML-BLITC-Zellen, die in laktatazidotischem TCM stimuliert wurden, kein IFN- $\gamma$  produzierten. Gleiches galt für alle unstimulierten BLITC-Zellen. In gewöhnlichem TCM und, wenn die Laktatazidose

### 3. Ergebnisse

durch Bikarbonat neutralisiert worden war, produzierten alle untersuchten Zellpopulationen IFN- $\gamma$ . Die Unterschiede in der IFN- $\gamma$ -Produktion von BLITC-Zellen, die in herkömmlichen oder laktatazidotischem TCM stimuliert wurden, sind statistisch signifikant ( $p < 0,001$  für polyklonale CD4<sup>+</sup>-BLITC-Zellen und  $p < 0,01$  für polyklonale CD8<sup>+</sup>-BLITC-Zellen, je  $n = 6$ ; s. Abb. 23). Ebenfalls statistisch signifikant ist der Unterschied zwischen BLITC-Zellen, die in laktatazidotischem oder laktathaltigem neutralisierten TCM stimuliert wurden ( $p < 0,05$  für polyklonale CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-BLITC-Zellen, je  $n = 6$ ; s. Abb. 23). Für ML-BLITC-Zellen zeigten sich ähnliche Ergebnisse, die jedoch aufgrund einer zu geringen Anzahl an Wiederholungen nicht auf statistische Signifikanz hin untersucht werden konnten. Des Weiteren produzierten polyklonale CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-BLITC-Zellen IFN- $\gamma$  in wesentlichen Mengen, wenn nach einer Inkubation in laktatazidotischem TCM Bikarbonat zugegeben wurde (s. offene blaue Symbole in Abb. 23).

### 3. Ergebnisse



**Abb. 23 Auswirkung der Laktatazidose auf die IFN- $\gamma$ -Produktion**

Die Überstände der BLITC-Zellen aus dem in Abb. 20 dargestellten Experiment wurden mittels ELISA auf ihre IFN- $\gamma$ -Konzentration hin untersucht. Die Tab. unterhalb stellt die jeweiligen Bedingungen dar, unter denen die Zellen inkubiert und gegebenenfalls stimuliert worden waren. Ein + zeigt an, dass eine Stimulation durchgeführt wurde, oder Milchsäure beziehungsweise Bikarbonat im TCM vorhanden waren. Ein - bedeutet das Gegenteil. -/+ steht für die nachträgliche Zugabe von Bikarbonat (s. Abb. 20). Die Abb. zeigt für CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-BLITC-Zellen zwei unabhängige Versuche mit je drei Wells pro Bedingung. Für die ML-BLITC-Zellen ist ein Experiment mit je drei Wells pro Bedingung dargestellt. In einigen Wells, in denen BLITC-Zellen in laktatazidotischem TCM stimuliert worden waren und in einigen Wells, die unstimulierte BLITC-Zellen enthielten, war die IFN- $\gamma$ -Konzentration so gering, dass sie durch den ELISA nicht exakt bestimmt werden konnte. Um diese Wells in die statistische Analyse einbeziehen zu können, wurde ihre Konzentration mit 62 pg/ml gleichgesetzt. Dies entspricht dem höchstmöglichen Wert, der unterhalb der niedrigsten Konzentration aus der Standardreihe liegt. Zur Analyse der statistischen Signifikanz der Ergebnisse wurden der *Kruskal-Wallis*- und *Dunn's post hoc Test* verwendet. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$



## 4. Diskussion

Das *duale Biolumineszenz-Reportersystem* ist sehr gut dazu geeignet, adoptiv transferierte T-Zellen *in vivo* zu überwachen, das belegen die in dieser Dissertation aufgeführten Ergebnisse eindeutig. Der Vorzug dieses Ansatzes besteht darin durch den Verlauf des Rluc-Signals schrittweise abbilden zu können, wie die biolumineszenten T-Zellen zum Tumor migrieren und ihn infiltrieren (s. Abb. 4). Durch das Signal der NFAT-CBR wird zusätzlich ersichtlich, wo, wie lange und wie stark die tumorspezifischen T-Zellen aktiviert werden (s. Abb. 4, 5 und 9). Dass die NFAT-CBR-Signale nur transient und nicht dauerhaft detektierbar waren (s. Abb. 4 Tag 5 und 6 und Abb. 5 und 9), deckt sich mit den Erkenntnissen anderer Arbeitsgruppen zur transienten Aktivierung adoptiv transferierter T-Zellen<sup>6</sup>. Ein Grund dafür könnten immunsuppressive Eigenschaften des Tumormikromilieus sein, die die anhaltende Aktivierung der adoptiv transferierten ML-BLITC-Zellen verhindern (mehr dazu unter 1.2 und unten). Wird der Verlauf des Signals der NFAT-CBR mit dem des Tumorumfanges verglichen, fällt auf, dass die adoptiv transferierten ML-BLITC-Zellen stets einige Tage bevor die Remission des Tumors begann am stärksten aktiviert waren (stärkste Aktivierung der T-Zellen meist an Tag 5 nach dem ATT; Tumorremission meist ab Tag 7). Diese Verzögerung entsteht vermutlich dadurch, dass der Tumor nicht sofort remittiert, sobald die ersten Tumorzellen von den adoptiv transferierten ML-BLITC-Zellen getötet wurden. Dies geschieht wahrscheinlich erst, nachdem die getöteten Tumorzellen von Phagozyten aufgenommen und aus dem Bereich des Tumors entfernt worden sind. Welche Rolle der spätere Höhepunkt des NFAT-CBR-Signals für den GvT-Effekt spielt (s. Abb. 5 Tag 14 und Abb. 9 Tag 9), wird aktuell noch von unserer Arbeitsgruppe untersucht. Da der Tumor zu diesem Zeitpunkt in der Regel bereits ein sehr geringes Volumen aufwies, lässt sich die Auswirkung des zweiten Höhepunkts auf die Tumorverlaufskurve schwerer beurteilen.

Wesentliche Unterschiede im zeitlichen Verlauf oder der Intensität der Biolumineszenzsignale konnten bei dem Vergleich des Niedrigdosis- mit dem Hochdosis-ATT nicht festgestellt werden. Es lässt sich also auch eine geringe Anzahl adoptiv transferierter ML-BLITC-Zellen mithilfe des *dualen Biolumineszenz-Reportersystems* exzellent *in vivo* überwachen. Der einzige Unterschied war, dass das Rluc-Signal in der Niedrigdosis-Gruppe am 26. Tag nach dem ATT stark abnahm (s. Abb. 9). Zu besagtem Zeitpunkt wurde diese Gruppe lediglich durch eine Maus

## 4. Diskussion

repräsentiert, welche an diesem Tag ein beträchtliches Tumolvolumen aufwies (s. Abb. 10). Hier scheint das Signal der Rluc im Bereich des Tumors also abzunehmen, weil der ATT versagte. Dieser Tumor konnte also, obwohl er initial von adoptiv transferierten ML-BLITC-Zellen infiltriert wurde, die dort auch aktiviert wurden, und zu einer vorübergehenden Remission des Tumors führten, erneut wachsen und fortan eine ausgiebige Infiltration durch die ML-BLITC-Zellen und deren Aktivierung verhindern. Dies könnte unter anderem dadurch bedingt sein, dass Tumorzellen selektiert wurden, die das tumorspezifische Antigen nicht mehr auf ihrer Oberfläche exprimieren<sup>4-6</sup>. Zudem ist auch eine Apoptose der ML-BLITC-Zellen im Tumormikromilieu denkbar, ausgelöst durch Fas-Ligand<sup>45</sup> oder Tumornekrosefaktor-verwandter Apoptose-induzierender Ligand (engl. *TNF Related Apoptosis Inducing Ligand* (TRAIL))<sup>46</sup>, die von Tumorzellen exprimiert werden können. Im vorangegangenen Experiment nahmen die Biolumineszenzsignale der Rluc im Bereich des Tumors ebenfalls ab (s. Abb. 5 Tag 29). Jedoch erst, nachdem die hier betrachteten Mäuse für mehrere Tage eine vollständige klinische Remission des Tumors zeigten (s. Abb. 6). Dass das Rluc-Signal abnahm, hing hier also wahrscheinlich damit zusammen, dass die Anzahl Tumorzellen stark zurückgegangen war. Es ist davon auszugehen, dass dadurch weniger H-Y-Antigen vorhanden war, weshalb weniger ML-BLITC-Zellen den Tumor infiltrierten.

Des Weiteren bestätigen die hier dargestellten Versuche das therapeutische Potential eines ATTs mit TCR-transgenen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, die gegen ein mHag als TSA gerichtet sind<sup>16</sup>. Dies wird dadurch deutlich, dass die Tumore remittierten und die Empfängertiere länger lebten (s. Abb. 6 und 7). Da der starke GvT-Effekt der adoptiv transferierten T-Zellen bei einem TAA als Zielantigen mit einer erheblichen *"on-target off-tumor"* Toxizität einhergehen könnte, war es erstrebenswert, weniger ML-BLITC-Zellen zu transferieren. Auch weniger T-Zellen führten zu einem eindeutigen GvT-Effekt und einem längeren Gesamtüberleben der Empfängertiere (s. Abb. 10 und 11), bei potentiell weniger *"on-target off-tumor"* Toxizität. Meine Kollegin Stefanie Althoff konnte nachweisen, dass der adoptive Transfer von  $5 \times 10^5$  ML-BLITC-Zellen in männlichen Rag-2<sup>-/-</sup>-Mäusen zu einer tödlichen *"on-target off-tumor"* Toxizität führt, wohingegen der Transfer von  $5 \times 10^4$  ML-BLITC-Zellen nicht tödlich verläuft<sup>12</sup>.

Das *duale Biolumineszenz-Reportersystem* lässt sich zudem gut auf Bedingungen anwenden, unter denen der GvT-Effekt der adoptiv transferierten T-Zellen ausbleibt. Bei dem unter 3.2 dargestellten Versuch war dies der Fall, wenn der Tumor zum Zeitpunkt

## 4. Diskussion

des ATTs ein bestimmtes Volumen bereits überschritten hatte. So wies die einzige Maus, deren Tumor remittierte, zum Zeitpunkt des ATTs den kleinsten Tumor aller Tiere aus diesem Experiment auf ( $< 250 \text{ mm}^3$ , s. rote Linie in Abb. 15). Dass ein ATT gegen einen zu großen Tumor häufig versagt, wird durch die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen bestätigt<sup>44</sup>. Das *duale Biolumineszenz-Reportersystem* hilft aufzuklären, welche Fähigkeiten der adoptiv transferierten T-Zellen so durch die großen Tumore eingeschränkt wurden, dass die Immuntherapie nicht wirken konnte. Bei allen Tieren wurde dabei ersichtlich, dass sich die adoptiv transferierten ML-BLITC-Zellen in den peripheren Lymphknoten, inklusive des drainierenden Lymphknotens, verteilten (s. Abb. 13). Bei einigen Tieren infiltrierten sie auch den Tumor (s. Maus B und C aus Abb. 13). Als Trend ist zu erkennen, dass ein größeres Tumolvolumen zum Zeitpunkt des ATTs mit einer geringeren Infiltration des Tumors durch die adoptiv transferierten T-Zellen und einer schwächeren Aktivierung der ML-BLITC-Zellen einherging. (s. blaue Linien in den Abb. 14A, 14B und 15). Ein großes Tumolvolumen zum Zeitpunkt des ATTs behindert also weder die Expansion, noch die Migration der adoptiv transferierten ML-BLITC-Zellen zu den Lymphknoten, wohl aber die Infiltration des Tumors. Wenn die ML-BLITC-Zellen den Tumor vollständig infiltrierten, wurden sie dort stets auch aktiviert (s. Maus B und C aus Abb. 13). In den meisten Fällen war die Aktivierung jedoch nach einem Tag bereits beendet und der Tumor remittierte nicht (s. Maus B Abb. 13 und orange Linien in Abb. 14B). Bei dem Tier, welches ein prolongiertes NFAT-CBR-Signal im Bereich des Tumors aufwies, war ein deutlicher GvT-Effekt zu beobachten (s. rote Linie in den Abb. 14B und 15). Dieser Versuch unterstreicht also die Bedeutung unterschiedlicher Biolumineszenzmuster und zeigt, dass adoptiv transferierte T-Zellen große Tumore schlechter infiltrieren können und in ihrem Tumormikromilieu nicht dauerhaft aktiviert bleiben. Diese Umstände reduzieren den GvT-Effekt der ML-BLITC-Zellen entscheidend. Ursache dafür könnte sein, dass die Tumorzellen großer Tumore das Zielantigen weniger stark exprimieren<sup>4-6</sup>. Die Expression co-inhibitorischer Rezeptoren (auch Immun-Checkpoints genannt) wie CTLA-4<sup>47</sup> oder PDL-1<sup>48</sup> innerhalb des Tumormikromilieus könnte ebenso eine Rolle spielen. Genauso wie immunsuppressive Zellen des Immunsystems, etwa *regulatorische T-Zellen* (Tregs)<sup>8</sup> oder sog. myeloide Suppressorzellen (engl. *myeloid-derived suppressor cells* (MDSCs))<sup>9</sup>. Milchsäure oder immunsuppressive Zytokine, wie der transformierende Wachstumsfaktor  $\beta$  (engl. *transforming growth factor  $\beta$*  (TGF- $\beta$ ))<sup>49</sup> oder das IL-10<sup>50,51</sup>, die von Tumorzellen ausgeschüttet werden können, könnten auch daran beteiligt sein.

## 4. Diskussion

An dieser Stelle ist es wichtig zu bemerken, dass das Ausmaß der Azidose im Tumormikromilieu mit dem Tumolvolumen zunimmt<sup>27</sup>. Weshalb der Tumor bei zwei Tieren nicht remittierte oder langsamer wuchs (s. Abb. 15), obwohl er stark von ML-BLITC-Zellen infiltriert war, die auch vorübergehend aktiviert wurden (s. Maus bzw. Muster B in den Abb. 13 und 14), wird derzeit von unserer Arbeitsgruppe untersucht. In Anbetracht dessen, dass bei den unter 3.1 dargestellten Versuchen eine eintägige Aktivierung der T-Zellen, welche gemessen an der Intensität des NFAT-Signals wesentlich schwächer ausfiel (s. Abb. 5, 9 und vgl. Abb. 14), sehr wohl zu einem GvT-Effekt führte, liegen zwei Vermutungen nahe: Entweder müssen die ML-BLITC-Zellen um einen großen Tumor zu bekämpfen über einen längeren Zeitraum hinweg aktiviert sein, was bei einem kleineren Tumor nicht notwendig ist, oder die Zellen des großen Tumors waren weniger empfindlich für die Effektormoleküle der adoptiv transferierten T-Zellen. Dass Tumorzellen die Sensibilität für IFN- $\gamma$  verlieren können, wurde bereits beschrieben<sup>52</sup>.

Das unter 3.3 dargestellte Experiment zeigt, dass ein ATT von ML-BLITC-Zellen keinen GvT-Effekt auslöst, wenn die injizierten MB49-Tumorzellen einem Tumor entstammen, der bereits durch einen ersten ATT mit ML-BLITC-Zellen nicht geheilt werden konnte. Auch hier hilft das *duale Biolumineszenz-Reportersystem* dabei, genauer zu bestimmen, welche Fähigkeiten der adoptiv transferierten T-Zellen so durch den Rezidivtumor beeinträchtigt wurden, dass der ATT wirkungslos blieb. Bei den Tieren, die den Rezidivtumor trugen, fehlten Rluc-Signale in den Lymphknoten und im Bereich des Tumors traten sie verspätet auf und waren schwach ausgeprägt (s. Abb. 17). Dies weist darauf hin, dass die adoptiv transferierten ML-BLITC-Zellen in diesen Mäusen schlechter migrierten und expandierten. Die durchflusszytometrische Analyse bestätigte dabei die deutlich verringerte Anzahl an CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in den Tumoren und Milzen dieser Tiere, im Vergleich zu den Mäusen, die den gewöhnlichen MB49-Tumor trugen (s. Abb. 19). Entscheidend dafür, ob adoptiv transferierter T-Zellen expandieren, ist in der Regel, dass das Zielantigen, für welches sie einen spezifischen TCR besitzen, in einem inflammatorischen Kontext präsentiert wird. Dies geschieht über MHC-Moleküle auf der Oberfläche *antigenpräsentierender Zellen* (APCs). In dem hier beschriebenen Fall ist es also notwendig, dass den ML-BLITC-Zellen das H-Y-Antigen Dby durch MHC-II-Moleküle auf APCs der RAG-2<sup>-/-</sup>-Mäuse präsentiert wird. Das H-Y-Antigen kann dabei in den weiblichen Empfängertieren nur von den Tumorzellen stammen. Versuche von Stefanie Althoff konnten zeigen, dass die Zellen des Rezidivtumors im Vergleich zu

## 4. Diskussion

gewöhnlichen MB49-Tumorzellen eine geringere RNA-Expression des H-Y-Antigens Dby aufwiesen, bei vergleichbarer Expression von MHC-mRNA. Da die Tumorzellen weniger H-Y-Antigen exprimierten, kam es zu einem Mangel an spezifischem Antigen für die adoptiv transferierten ML-BLITC-Zellen, weshalb sie nicht expandierten. Dass durch die Konfrontation mit tumorspezifischen T-Zellen Tumorzellen selektiert werden, die das Zielantigen der T-Zellen weniger stark exprimieren, ist ein verbreitetes Phänomen<sup>6</sup>.

Des Weiteren führten die hier dargestellten Experimente zu wichtigen Erkenntnissen über die Rolle der Laktatazidose in dem hier dargestellten Modell. Diesbezüglich konnten die Versuche in 3.5 zeigen, dass MB49-Tumorzellen in vitro eine Laktatkonzentration von etwa 12,5 mM und einen pH-Wert von 6,7 in ihrem Medium erzeugen können. Damit ähneln die Bedingungen im Tumorzellüberstand von MB49-Tumorzellen denen, die die Effektorfunktion von T-Zellen hemmen können<sup>35-37,41,53</sup>. Die unter 3.6 dargestellten Experimente belegen außerdem, dass sich die Inhibition der T-Zellen unter diesen Bedingungen mithilfe des *dualen Biolumineszenz-Reportersystems* darstellen lässt. Zudem belegen sie, dass das Signal der NFAT-CBR mit der Produktion von IFN- $\gamma$  korreliert (vgl. Abb. 22 und 23). Die Resultate der hier dargelegten Versuche entsprechen denen anderer Arbeitsgruppen<sup>35-37,41,53</sup>, ergänzen den Stand der Forschung aber auch um drei Aspekte: So konnte erstmals nachgewiesen werden, dass eine Laktatazidose auch bei mono- und polyklonalen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen die NFAT-Expression hemmt (s. Abb. 22). Außerdem wurde aufgedeckt, dass die Laktatazidose auch die IFN- $\gamma$ -Produktion dieser Zellen reduziert, wenngleich dies für monoklonale CD4<sup>+</sup>-T-Zellen bei einer laktatunabhängigen Azidose bereits beschrieben wurde<sup>41</sup>. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass Bikarbonat der Hemmung durch die Laktatazidose entgegenwirkt (s. Abb. 22 und 23). Die meisten der oben aufgeführten Ergebnisse sind dabei statistisch signifikant (nähere Ausführungen dazu s. 3.6). Aus diesen Erkenntnissen lässt sich schließen, dass eine mögliche Laktatazidose im Tumormikromilieu der MB49-Tumore in vivo die Produktion von IFN- $\gamma$  durch adoptiv transferierte ML-BLITC-Zellen reduziert. Diese Einsicht ist deshalb relevant, da IFN- $\gamma$  als eines der bedeutendsten Effektormoleküle von T-Zellen bei der Vernichtung von Tumorzellen gilt<sup>52,54</sup>. An dieser Stelle ist es wichtig darauf hinzuweisen, dass die Laktatazidose im Tumormikromilieu nicht nur die Effektorfunktion von T-Zellen hemmt. Vielmehr beeinflusst Milchsäure zahlreiche weitere Immunzellen dahingehend,

#### 4. Diskussion

dass sie die Wirksamkeit eines ATTs beeinträchtigen könnten. Für MDSCs<sup>55</sup>, Makrophagen<sup>56</sup>, dendritische Zellen<sup>57</sup> und Tregs<sup>55</sup> wurde dies bereits beschrieben. Es ist also ein Großteil der im Tumormikromilieu befindlichen Immunzellen von den Auswirkungen der Laktatazidose betroffen. Wird die Laktatazidose im Tumormikromilieu reduziert, könnte dies den GvT-Effekt eines ATTs verbessern. Neben Bikarbonat können auch *Protonenpumpeninhibitoren* (PPIs) den pH-Wert im Tumormikromilieu erhöhen. Diese kostengünstigen Medikamente konnten bereits bei anderen Erkrankungen erfolgreich und sicher eingesetzt werden<sup>53</sup>. Bisher wurde in zwei verschiedenen Tumormodellen gezeigt, dass Bikarbonat und PPIs, den GvT-Effekt eines ATTs verbessern<sup>41,53</sup>. Bikarbonat erhöht zudem die Wirksamkeit von Checkpoint-Inhibitoren<sup>41</sup>. Die Laktatazidose im Tumormikromilieu spielt aber nicht nur für die Immuntherapie eine Rolle, sondern auch bei der Anwendung herkömmlicher onkologischer Therapiemodalitäten. So kann sie den Effekt basischer Chemotherapeutika, wie etwa Doxorubicin und Mitoxantron, hemmen<sup>58</sup>. Auch hier konnte bereits belegt werden, dass Bikarbonat und PPIs die Wirksamkeit dieser Substanzen in Mausmodellen verbessern<sup>58,59</sup>.

## 5. Fazit

Die hier aufgeführten Ergebnisse belegen, dass das *duale Biolumineszenz-Reportersystem* hervorragend geeignet ist um in vivo adoptiv transferierte T-Zellen zu überwachen. Es deckt unter unterschiedlichsten Bedingungen nicht nur auf, wie und ob die adoptiv transferierten T-Zellen migrieren, expandieren und persistieren, sondern auch, ob sie dabei aktiviert werden. Für dieses Reportersystem spricht außerdem die Longitudinalität der Messungen, ihre vergleichende Quantifizierbarkeit und, nicht zuletzt die geringfügige Belastung der Versuchstiere. Die beschriebenen Versuche beantworten also eine der Forschungsfragen, aus denen sich die Fragestellung dieser Dissertation zusammensetzt. Des Weiteren zeigen sie die Möglichkeiten und Grenzen des Einsatzes eines mHags als tumorspezifisches Zielantigen für einen ATT mit transgenen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen auf. Diesbezüglich wurde bestätigt, dass adoptiv transferierte, H-Y-spezifische, transgene CD4<sup>+</sup>-T-Zellen einen deutlichen GvT-Effekt auslösen können. Ob der ATT wirkt, hängt dabei maßgeblich davon ab, wie groß der Tumor zum Zeitpunkt der Behandlung ist, und wie stark das Zielantigen durch die Tumorzellen exprimiert wird. Auch die letzte Teilfrage, inwieweit das Reportersystem in vitro die Inhibition von T-Zellen durch eine Laktatazidose darstellen kann, und wie Bikarbonat diese Inhibition beeinflusst, ist vorläufig beantwortet. Die hier dargestellten Versuche haben belegt, dass eine Laktatazidose das NFAT-CBR-Signal reduziert und Bikarbonat dies verhindern und rückgängig machen kann.



## 6. Ausblick

Mithilfe des *dualen Biolumineszenz-Reportersystems* lassen sich nicht nur die adoptiv transferierten T-Zellen selbst überwachen. Zukünftig könnte es auch ermöglichen zu beurteilen, wie sich therapeutische Interventionen zur Verbesserung des GvT-Effekts auf die adoptiv transferierten biolumineszenten T-Zellen auswirken. So könnten durch BLI Erkenntnisse darüber gewonnen werden, ob etwa eine Vakzinierung, Checkpoint-Inhibitoren, PPIs oder Bikarbonat, die Migration der adoptiv transferierten tumorspezifischen T-Zellen beschleunigen, die Dauer ihrer initialen Aktivierung verlängern, oder auf eine andere Art und Weise wirken. Außerdem könnte das Reportersystem dabei helfen zügiger und mit einer reduzierten Anzahl an Versuchstieren den besten Zeitpunkt für eine solche Intervention zu bestimmen<sup>11</sup>. Die Auswahl des idealen zeitlichen Ablaufs der Therapie scheint bei Immuntherapien von besonders großer Bedeutung zu sein<sup>60</sup>. Der beste Zeitpunkt für eine Intervention könnte etwa dann sein, wenn die adoptiv transferierten T-Zellen bereits zum Tumor migriert sind, aber noch bevor ihre initiale Aktivierung beendet ist. Des Weiteren könnte per BLI auch das Zusammenspiel verschiedener Immunzellpopulationen untersucht werden. So ließe sich etwa ermitteln, wie nicht-biolumineszente H-Y-spezifische CD8<sup>+</sup>-T-Zellen oder andere Zellen des Immunsystems, die Wirkung der ML-BLITC-Zellen beeinflussen. Zudem ist es erstrebenswert, die in dieser Dissertation dargestellten Ergebnisse in männlichen Rag-2<sup>-/-</sup>-Tieren, die einen MB49-Tumor tragen, zu überprüfen, in denen das H-Y-Antigen als TAA vorläge. Das *duale Biolumineszenz-Reportersystem* erscheint auch hier gut geeignet um den Verlauf der *"on-target off-tumor"* Toxizität parallel zur Wirkung der adoptiv transferierten T-Zellen auf den Tumor beurteilen zu können. Um die Bedeutung der Laktatazidose für das hier vorgestellte Tumormodell in vivo aufzuklären sind weitere Versuche notwendig. So wäre es sinnvoll den pH-Wert etablierter MB49-Tumore in vivo zu messen und Experimente durchzuführen, die klären, ob Bikarbonat die Wirksamkeit eines ATTs von ML-BLITC-Zellen verbessert.

Das basische Chemotherapeutikum Doxorubicin, kann die Wirksamkeit eines ATTs verbessern, da es unter anderem den MDSC-Anteil im Tumor reduziert<sup>61</sup>. Somit ist eine Dreifachkombination aus ATT, Bikarbonat und Doxorubicin zur Behandlung großer Tumore denkbar. Dabei könnte die Bikarbonatgabe sowohl verhindern, dass die adoptiv transferierten T-Zellen durch die Laktatazidose im Tumormikromilieu gehemmt werden, als auch die Funktionsweise anderer im Tumor vorhandener Immunzellen positiv

## 6. Ausblick

beeinflussen (s. 1.3 und die letzten beiden Abschnitte von 4.). Gleichzeitig könnte Bikarbonat die Wirkung des basischen Chemotherapeutikums Doxorubicin im Tumormikromilieu verstärken und somit eine Dosisreduktion bei gleichbleibendem Effekt ermöglichen (s. letzter Abschnitt von 4.). Diese könnte die unerwünschten Arzneimittelwirkungen der Chemotherapie verringern. Doxorubicin selbst könnte, wenn es in einer niedrigen, immunmodulatorischen Dosis verwendet wird, den MDSC-Anteil im Tumor verringern und somit ebenfalls verhindern, dass die adoptiv transferierten T-Zellen inhibiert werden, ohne die T-Zellen selbst zu schädigen<sup>61</sup>. Diese Dreifachkombination könnte also einen vielversprechenden Therapieansatz darstellen, der zurzeit von unserer Arbeitsgruppe untersucht wird.

Die Frage, ob eine Immuntherapie oder eine Chemotherapie mit Bikarbonat oder PPIs kombiniert werden sollte, wäre zweifellos für jeden Patienten und jede Patientin individuell zu beantworten. Folgende Erkenntnisse können jedoch als Hinweise auf die Häufigkeit des Warburg-Phänotyps interpretiert werden: Bei sehr vielen Betroffenen konnte eine gesteigerte Glukoseaufnahme durch den Tumor mittels PET/CT (Positronen-Emissions-Tomographie/Computertomographie) nachgewiesen werden<sup>10</sup>. Zudem wurden bei verschiedenen Tumorerkrankungen eine Azidose<sup>26,27</sup> und erhöhte Laktatkonzentrationen im Tumor gemessen<sup>33,34</sup>. Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass viele Betroffene von dem Zusatz von Bikarbonat oder PPIs zu den gebotenen onkologischen Therapiemodalitäten profitieren könnten.



## 7. Literaturverzeichnis

1. Rosenberg SA, Restifo NP. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science* 2015;348:62–68.
2. Rosenberg SA, Restifo NP, Yang JC, Morgan RA, Dudley ME. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2008;8:299–308.
3. Charo J, Perez C, Buschow C, Jukica A, Czeh M, Blankenstein T. Visualizing the dynamic of adoptively transferred T cells during the rejection of large established tumors. *Eur J Immunol* 2011;41:3187–3197.
4. Natali PG, Nicotra MR, Bigotti A, Ventura I, Marcenaro L, Giacomini P, Russo C. Selective changes in expression of HLA class I polymorphic determinants in human solid tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:6719–6723.
5. Natali PG, Giacomini P, Bigotti A, Imai K, Nicotra MR, Ng AK, Ferrone S. Heterogeneity in the Expression of HLA and Tumor-associated Antigens by Surgically Removed and Cultured Breast Carcinoma Cells. *Cancer Res* 1983;43:660–668.
6. Zhou G, Lu Z, McCadden JD, Levitsky HI, Marson AL. Reciprocal Changes in Tumor Antigenicity and Antigen-specific T Cell Function during Tumor Progression. *J Exp Med* 2004;200:1581–1592.
7. Ruella M, Kalos M. Adoptive immunotherapy for cancer. *Immunol Rev* 2014;257:14–38.
8. Liyanage UK, Moore TT, Joo H-G, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, Drebin JA, Strasberg SM, Eberlein TJ, Goedegebuure PS, Linehan DC. Prevalence of Regulatory T Cells Is Increased in Peripheral Blood and Tumor Microenvironment of Patients with Pancreas or Breast Adenocarcinoma. *J Immunol* 2002;169:2756–2761.
9. Kusmartsev S, Nagaraj S, Gibrilovich DI. Tumor-Associated CD8+ T Cell Tolerance Induced by Bone Marrow-Derived Immature Myeloid Cells. *J Immunol* 2005;175:4583–4592.
10. Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 2004;4:891–899.
11. O'Neill K, Lyons SK, Gallagher WM, Curran KM, Byrne AT. Bioluminescent imaging: a critical tool in pre-clinical oncology research. *J Pathol* 2010;220:317–327.
12. Szyska M, Herda S, Althoff S, Heimann A, Russ J, D'Abundo D, Dang TM, Durieux I, Dörken B, Blankenstein T, Na I-K. A Transgenic Dual-Luciferase Reporter Mouse for Longitudinal and Functional Monitoring of T Cells In Vivo. *Cancer Immunol Res* 2018;6:110–120.

## 7. Literaturverzeichnis

13. Na I-K, Markley JC, Tsai JJ, Yim NL, Beattie BJ, Klose AD, Holland AM, Ghosh A, Rao UK, Stephan MT, Serganova I, Santos EB, Brentjens RJ, Blasberg RG, Sadelain M, Brink MRM van den. Concurrent visualization of trafficking, expansion, and activation of T lymphocytes and T-cell precursors in vivo. *Blood* 2010;116:18–25.
14. Rao A, Luo C, Hogan PG. TRANSCRIPTION FACTORS OF THE NFAT FAMILY: Regulation and Function. *Annu Rev Immunol* 1997;15:707–747.
15. Spierings E. Minor histocompatibility antigens: past, present, and future. *Tissue Antigens* 2014;84:374–360.
16. Perez-Diez A, Joncker NT, Choi K, Chan WFN, Anderson CC, Lantz O, Matzinger P. CD4 cells can be more efficient at tumor rejection than CD8 cells. *Blood* 2007;109:5346–5354.
17. Popli R, Sahaf B, Nakasone H, Lee JYY, Miklos DB. Clinical impact of H-Y alloimmunity. *Immunol Res* 2014;58:249–258.
18. Shlomchik WD. Graft-versus-host disease. *Nat Rev Immunol* 2007;7:340–352.
19. Bueger M de, Bakker A, Rood JJV, Woude FV der, Goulmy E. Tissue distribution of human minor histocompatibility antigens. Ubiquitous versus restricted tissue distribution indicates heterogeneity among human cytotoxic T lymphocyte-defined non-MHC antigens. *J Immunol* 1992;149:1788–1794.
20. Lantz O, Grandjean I, Matzinger P, Di Santo JP.  $\gamma$  chain required for naïve CD4+ T cell survival but not for antigen proliferation. *Nat Immunol* 2000;1:54–58.
21. Xie Y, Akpınarli A, Maris C, Hipkiss EL, Lane M, Kwon E-KM, Muranski P, Restifo NP, Antony PA. Naive tumor-specific CD4(+) T cells differentiated in vivo eradicate established melanoma. *J Exp Med* 2010;207:651–667.
22. Hunder NN, Wallen H, Cao J, Hendricks DW, Reilly JZ, Rodmyre R, Jungbluth A, Gnjatich S, Thompson JA, Yee C. Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4+ T cells against NY-ESO-1. *N Engl J Med* 2008;358:2698–2703.
23. Summerhayes IC, Franks LM. Effects of Donor Age on Neoplastic Transformation of Adult Mouse Bladder Epithelium In Vitro. *J Natl Cancer Inst* 1979;62:1017–1023.
24. Shinkai Y, Rathbun O Gary, Lam K-P, Oltz EM, Stewart V, Mendelsohn M, Charron J, Datta M, Young F, Stall AM, Alt FW. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 1992;68:855–867.
25. Montcourrier P, Silver I, Farnoud R, Bird I, Rochefort H. Breast cancer cells have a high capacity to acidify extracellular milieu by a dual mechanism. *Clin Exp Metastasis* 1997;15:382–392.
26. Wike-Hooley JL, Haveman J, Reinhold HS. The relevance of tumour pH to the treatment of malignant disease. *Radiother Oncol* 1984;2:343–366.

## 7. Literaturverzeichnis

27. Thistlethwaite AJ, Leeper DB, Moylan DJ, Nerlinger RE. pH distribution in human tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1985;11:1647–1652.
28. Warburg O. On the Origin of Cancer Cells. *Science* 1956;123:309–314.
29. Ober SS, Pardee AB. Intracellular pH is increased after transformation of Chinese hamster embryo fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:2766–2770.
30. Morita T, Nagaki T, Fukuda I, Okumura K. Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells. *Mutat Res Mol Mech Mutagen* 1992;268:297–305.
31. Estrella V, Chen T, Lloyd M, Wojtkowiak J, Cornell HH, Ibrahim-Hashim A, Bailey K, Balagurunathan Y, Rothberg JM, Sloane BF, Johnson J, Gatenby RA, Gillies RJ. Acidity generated by the tumor microenvironment drives local invasion. *Cancer Res* 2013;73:1524–1535.
32. Schlappack OK, Zimmermann A, Hill RP. Glucose starvation and acidosis: effect on experimental metastatic potential, DNA content and MTX resistance of murine tumour cells. *Br J Cancer* 1991;64:663–670.
33. Walenta S, Wetterling M, Lehrke M, Schwickert G, Sundfør K, Rofstad EK, Mueller-Klieser W. High Lactate Levels Predict Likelihood of Metastases, Tumor Recurrence, and Restricted Patient Survival in Human Cervical Cancers. *Cancer Res* 2000;60:916–921.
34. Yokota H, Guo J, Matoba M, Higashi K, Tonami H, Nagao Y. Lactate, choline, and creatine levels measured by vitro <sup>1</sup>H-MRS as prognostic parameters in patients with non-small-cell lung cancer. *J Magn Reson Imaging* 2007;25:992–999.
35. Fischer K, Hoffmann P, Voelkl S, Meidenbauer N, Ammer J, Edinger M, Gottfried E, Schwarz S, Rothe G, Hoves S, Renner K, Timischl B, Mackensen A, Kunz-Schughart L, Andreesen R, Krause SW, Kreutz M. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood* 2007;109:3812–3819.
36. Mendler AN, Hu B, Prinz PU, Kreutz M, Gottfried E, Noessner E. Tumor lactic acidosis suppresses CTL function by inhibition of p38 and JNK/c-Jun activation. *Int J Cancer* 2012;131:633–640.
37. Brand A, Singer K, Koehl GE, Kolitzus M, Schoenhammer G, Thiel A, Matos C, Bruss C, Klobuch S, Peter K, Kastenberger M, Bogdan C, Schleicher U, Mackensen A, Ullrich E, Fichtner-Feigl S, Kesselring R, Mack M, Ritter U, Schmid M, Blank C, Dettmer K, Oefner PJ, Hoffmann P, Walenta S, Geissler EK, Pouyssegur J, Villunger A, Steven A, Seliger B, Schreml S, Haferkamp S, Kohl E, Karrer S, Berneburg M, Herr W, Mueller-Klieser W, Renner K, Kreutz M. LDHA-Associated Lactic Acid Production Blunts Tumor Immunosurveillance by T and NK Cells. *Cell Metab* 2016;24:657–671.
38. Silva AS, Yunes JA, Gillies RJ, Gatenby RA. The Potential Role of Systemic Buffers in Reducing Intratumoral Extracellular pH and Acid-Mediated Invasion. *Cancer Res* 2009;69:2677–2684.

## 7. Literaturverzeichnis

39. Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P. Blood Flow, Oxygen and Nutrient Supply, and Metabolic Microenvironment of Human Tumors: A Review. *Cancer Res* 1989;49:6449–6465.
40. Robey IF, Baggett BK, Kirkpatrick ND, Roe DJ, Dosesco J, Sloane BF, Hashim AI, Morse DL, Raghunand N, Gatenby RA, Gillies RJ. Bicarbonate Increases Tumor pH and Inhibits Spontaneous Metastases. *Cancer Res* 2009;69:2260–2268.
41. Pilon-Thomas S, Kodumudi KN, El-Kenawi AE, Russell S, Weber AM, Luddy K, Damaghi M, Wojtkowiak JW, Mulé JJ, Ibrahim-Hashim A, Gillies RJ. Neutralization of Tumor Acidity Improves Antitumor Responses to Immunotherapy. *Cancer Res* 2016;76:1381–1390.
42. Ibrahim-Hashim A, Robertson-Tessi M, Enriquez-Navas PM, Damaghi M, Balagurunathan Y, Wojtkowiak JW, Russell S, Yoonseok K, Lloyd MC, Bui MM, Brown JS, Anderson ARA, Gillies RJ, Gatenby RA. Defining Cancer Subpopulations by Adaptive Strategies Rather Than Molecular Properties Provides Novel Insights into Intratumoral Evolution. *Cancer Res* 2017;77:2242–2254.
43. Townsend D, Witkop CJ, Mattson J. Tyrosinase subcellular distribution and kinetic parameters in wild type and c-locus mutant C57BL/6J mice. *J Exp Zool* 1981;216:113–119.
44. Hanson HL, Donermeyer DL, Ikeda H, White JM, Shankaran V, Old LJ, Shiku H, Schreiber RD, Allen PM. Eradication of Established Tumors by CD8+ T Cell Adoptive Immunotherapy. *Immunity* 2000;13:265–276.
45. Strand S, Hofmann WJ, Hug H, Müller M, Otto G, Strand D, Mariani SM, Stremmel W, Krammer PH, Galle PR. Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells--a mechanism of immune evasion? *Nat Med* 1996;2:1361–1366.
46. Grimm M, Kim M, Rosenwald A, von Rahden B, Tsaui I, Meier E, Heemann U, Germer C-T, Gasser M, Waaga-Gasser AM. Tumour-mediated TRAIL-Receptor expression indicates effective apoptotic depletion of infiltrating CD8+ immune cells in clinical colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2010;46:2314–2323.
47. Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of Antitumor Immunity by CTLA-4 Blockade. *Science* 1996;271:1734–1736.
48. Blank C, Brown I, Peterson AC, Spiotto M, Iwai Y, Honjo T, Gajewski TF. PD-L1/B7H-1 Inhibits the Effector Phase of Tumor Rejection by T Cell Receptor (TCR) Transgenic CD8+ T Cells. *Cancer Res* 2004;64:1140–1145.
49. Gorelik L, Flavell RA. Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells. *Nat Med* 2001;7:1118–1122.
50. Matsuda M, Salazar F, Petersson M, Masucci G, Hansson J, Pisa P, Zhang QJ, Masucci MG, Kiessling R. Interleukin 10 pretreatment protects target cells from tumor- and allo-specific cytotoxic T cells and downregulates HLA class I expression. *J Exp Med* 1994;180:2371–2376.

## 7. Literaturverzeichnis

51. Zhou J, Ye F, Chen H, Lv W, Gan N. The Expression of Interleukin-10 in Patients with Primary Ovarian Epithelial Carcinoma and in Ovarian Carcinoma Cell Lines. *J Int Med Res* 2007;35:290–300.
52. Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ, Schreiber RD. Demonstration of an interferon  $\gamma$ -dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:7556–7561.
53. Calcinotto A, Filipazzi P, Grioni M, Iero M, Milito AD, Ricupito A, Cova A, Canese R, Jachetti E, Rossetti M, Huber V, Parmiani G, Generoso L, Santinami M, Borghi M, Fais S, Bellone M, Rivoltini L. Modulation of Microenvironment Acidity Reverses Anergy in Human and Murine Tumor-Infiltrating T Lymphocytes. *Cancer Res* 2012;72:2746–2756.
54. Dunn GP, Ikeda H, Bruce AT, Koebel C, Uppaluri R, Bui J, Chan R, Diamond M, White JM, Sheehan KCF, Schreiber RD. Interferon- $\gamma$  and cancer immunoediting. *Immunol Res* 2005;32:231–245.
55. Husain Z, Huang Y, Seth P, Sukhatme VP. Tumor-Derived Lactate Modifies Antitumor Immune Response: Effect on Myeloid-Derived Suppressor Cells and NK Cells. *J Immunol* 2013;191:1486–1495.
56. Colegio OR, Chu N-Q, Szabo AL, Chu T, Rhebergen AM, Jairam V, Cyrus N, Brokowski CE, Eisenbarth SC, Phillips GM, Cline GW, Phillips AJ, Medzhitov R. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature* 2014;513:559.
57. Gottfried E, Kunz-Schughart LA, Ebner S, Mueller-Klieser W, Hoves S, Andreesen R, Mackensen A, Kreutz M. Tumor-derived lactic acid modulates dendritic cell activation and antigen expression. *Blood* 2006;107:2013–2021.
58. Raghunand N, Mahoney BP, Gillies RJ. Tumor acidity, ion trapping and chemotherapeutics. II. pH-dependent partition coefficients predict importance of ion trapping on pharmacokinetics of weakly basic chemotherapeutic agents. *Biochem Pharmacol* 2003;66:1219–1229.
59. Luciani F, Spada M, De Milito A, Molinari A, Rivoltini L, Montinaro A, Marra M, Lugini L, Logozzi M, Lozupone F, Federici C, Iessi E, Parmiani G, Arancia G, Belardelli F, Fais S. Effect of Proton Pump Inhibitor Pretreatment on Resistance of Solid Tumors to Cytotoxic Drugs. *JNCI J Natl Cancer Inst* 2004;96:1702–1713.
60. Rescigno M, Avogadri F, Curigliano G. Challenges and prospects of immunotherapy as cancer treatment. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer* 2007;1776:108–123.
61. Alizadeh D, Trad M, Hanke NT, Larmonier CB, Janikashvili N, Bonnotte B, Katsanis E, Larmonier N. Doxorubicin eliminates myeloid-derived suppressor cells and enhances the efficacy of adoptive T-cell transfer in breast cancer. *Cancer Res* 2014;74:104–118.



## 8. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Daniele D'Abundo, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: 'Überwachung des Anti-Tumor-Effekts transgener, gegen ein Minor-Histokompatibilitätsantigen gerichteter CD4<sup>+</sup>-T-Zellen mittels Biolumineszenz-Bildgebung nach adoptivem Transfer im Mausmodell.' selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## 9. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## 10. Publikationsliste

1. Szyska M, Herda S, Althoff S, Heimann A, Russ J, D'Abundo D, Dang TM, Durieux I, Dörken B, Blankenstein T, Na I-K. A Transgenic Dual-Luciferase Reporter Mouse for Longitudinal and Functional Monitoring of T Cells In Vivo. *Cancer Immunol Res* 2018;6:110–120.

## 11. Anteilserklärung

Ich, Daniele D'Abundo, hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Szyska M, Herda S, Althoff S, Heimann A, Russ J, D'Abundo D, Dang TM, Durieux I, Dörken B, Blankenstein T, Na I-K. A Transgenic Dual-Luciferase Reporter Mouse for Longitudinal and Functional Monitoring of T Cells In Vivo. *Cancer Immunol Res* 2018;6:110–120.

Beitrag im Einzelnen:

Gemeinsam mit meiner Kollegin Stefanie Althoff habe ich den hier in der Abb. 8 dargestellten Versuch geplant. Die Biolumineszenzmessungen, sowie die Bestimmung des Tumorzvolumens und die regelmäßige Begutachtung der Mäuse, einschließlich Gewichtsbestimmungen, erfolgten durch mich. Die Analyse der Daten erfolgte ebenfalls durch mich. Mein Kollege Dr. Martin Szyska hat diese dann zur Erstellung der Abb. 6 (A und B) aus der oben genannten Publikation verwendet.

---

Unterschrift, Datum und Stempel der betreuenden Hochschullehrerin

---

Unterschrift des Doktoranden

## 12. Danksagung

Ich danke Frau Prof. Dr. Il-Kang Na sehr dafür, dass ich in ihrer Arbeitsgruppe am *Experimental and Clinical Research Center* promovieren durfte. Sie war während der gesamten Zeit eine Inspiration für mich. Größter Dank gebührt auch Frau Dr. Stefanie Herda und Herrn Dr. Martin Szyska, die mich exzellent und unermüdlich betreut haben. Meinen Kolleg\*innen Stefanie Althoff, Tra My Dang, Andreas Heimann und Josephine Ruß danke ich herzlich dafür, dass sie mich stets beraten und durch ihre positive Art motiviert haben. Frau Karolin Pawletta danke ich besonders für die hervorragende Pflege der Mäuse. Großer Dank gebührt auch Frau Gerhild Fiolka und Herrn Prof. Dr. Kai Kappert vom Labor Berlin. Besonders wichtig ist mir, mich bei meiner Familie und meinen Freunden herzlichst zu bedanken, die mich in jeder erdenklichen Weise unterstützt haben.