

Der Einfluss von
Immuncheckpointinhibitoren auf die
T-Zellantwort von Kindern,
Jugendlichen und Erwachsenen

Clara Aign
Experimentelle Pädiatrie und Neonatologie
Universitätsklinik Magdeburg

Unter Betreuung von
Prof. Dr. Monika Brunner-Weinzierl
Dr. Aditya Arra

08.02.2022



Abstract

Immuncheckpointinhibitoren gewinnen in den letzten Jahren an Bedeutung in der Therapie maligner Erkrankungen. Diese Immuntherapien wirken auf zellulärer Ebene und sollen eine Immunantwort gegen den Tumor auslösen und verstärken. Therapeutische Effekte gehen jedoch mit komplexen, immunvermittelten Nebenwirkungen einher, den sogenannten Immune-related Adverse Events, welche Autoimmunerkrankungen ähneln. [1] Immuncheckpointinhibitoren wie Ipilimumab gegen CTLA-4 und Nivolumab gegen PD-1 sind bei erwachsenen Patienten bereits zur Therapie des Malignen Melanoms, nichtkleinzelliger Lungenkarzinome, Nierenzellkarzinomen und Plattenepithelskarzinomen zugelassen. Im pädiatrischen Bereich hingegen werden sie bis jetzt nur zögerlich verwendet. [2] Mittels humaner *in vitro* Modelle konnte bisher gezeigt werden, dass sich die T-Zellantworten von Neonaten, Kleinkindern und Erwachsenen unter Immuncheckpointblockade bezüglich Proliferation und Zytokinproduktion sehr unterscheiden. [3] Detaillierte Studien über die Wirkung auf Immunzellen von Teenagern fehlen jedoch. Da sich das Immunsystem abhängig von Alter und auch Geschlecht unterscheidet, muss präklinisch die zelluläre Wirkung von Immuntherapien besonders im Alter von 12 bis 18 Jahren untersucht werden, um das Potential aber auch mögliche Risiken der Therapie für diese Patientengruppe abschätzen zu können. Aufgrund der starken und entwicklungsabhängigen Reaktion der T-Zellen von Kleinkindern und Neonaten auf eine Immuncheckpointblockade nehme ich an, dass insbesondere Teenager und ältere Kinder *in vitro* eine stärkere T-Zellproliferation und Zytokinproduktion entwickeln als Erwachsene. Klinische Studien zeigen eine bessere Wirkung der Tumorthherapie mit Immuncheckpointinhibitoren bei Männern [4], weshalb ich davon ausgehe, dass T-Zellen von männlichen Probanden auch *in vitro* stärker auf Checkpointblockade reagieren als die Zellen weiblicher Probanden. Um die Wirkung verschiedener Immuncheckpointinhibitoren auf das Immunsystem von Kindern (5-9) und Jugendlichen (12-18) zu verstehen, sollen im Rahmen meiner Promotionsarbeit die Unterschiede zwischen den Altersgruppen und abhängig vom biologischen Geschlecht analysiert und mit denen von Erwachsenen verglichen werden. Mit Hilfe eines *in vitro* Modells werden isolierte T-Zellen antigenspezifisch aktiviert und in Hinblick auf die Expression von Aktivierungsmarkern, Produktion von Zytokinen und Proliferation nach Immuncheckpointblockade mit anti-CTLA-4-, anti-PD-1- oder anti-PDL1-Antikörpern verglichen. Die Ergebnisse des Projekts werden zeigen, ob Immuncheckpointinhibitoren geschlechterspezifisch einzusetzen sind und ob auch Kinder und Jugendliche von einer Therapie mit diesen profitieren könnten.

Einleitung

Das Immunsystem

Das Immunsystem dient der Abwehr von körperfremden Antigenen und körpereigenen, entarteten Zellen. Dabei wird zwischen dem angeborenen und dem adaptiven, erworbenen Immunsystem unterschieden. Das phylogenetisch ältere, angeborene Immunsystem dient der schnellen, unspezifischen Pathogenerkennung und –abwehr. Das adaptive Immunsystem reagiert antigenspezifisch und hat die Fähigkeit, Gedächtniszellen zu bilden, sodass die Immunreaktion bei einer erneuten Infektion mit dem gleichen Pathogen deutlich schneller verläuft. Eine wichtige Rolle spielen dabei antigenpräsentierende Zellen (Dendritische Zellen, Makrophagen), B- und T-Zellen und die durch B-Zellen gebildeten Antikörper. [4]

Es gibt zytotoxische CD8+ T-Zellen und CD4+ T-Helferzellen. Letztere koordinieren durch verschiedene Zytokinmilieus antigenentsprechende Immunantworten. Anhand der Zytokinmuster können die T-Helferzellen unter anderem in Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 und regulatorische T-Zellen eingeteilt werden. [5] (siehe Abb. 1)

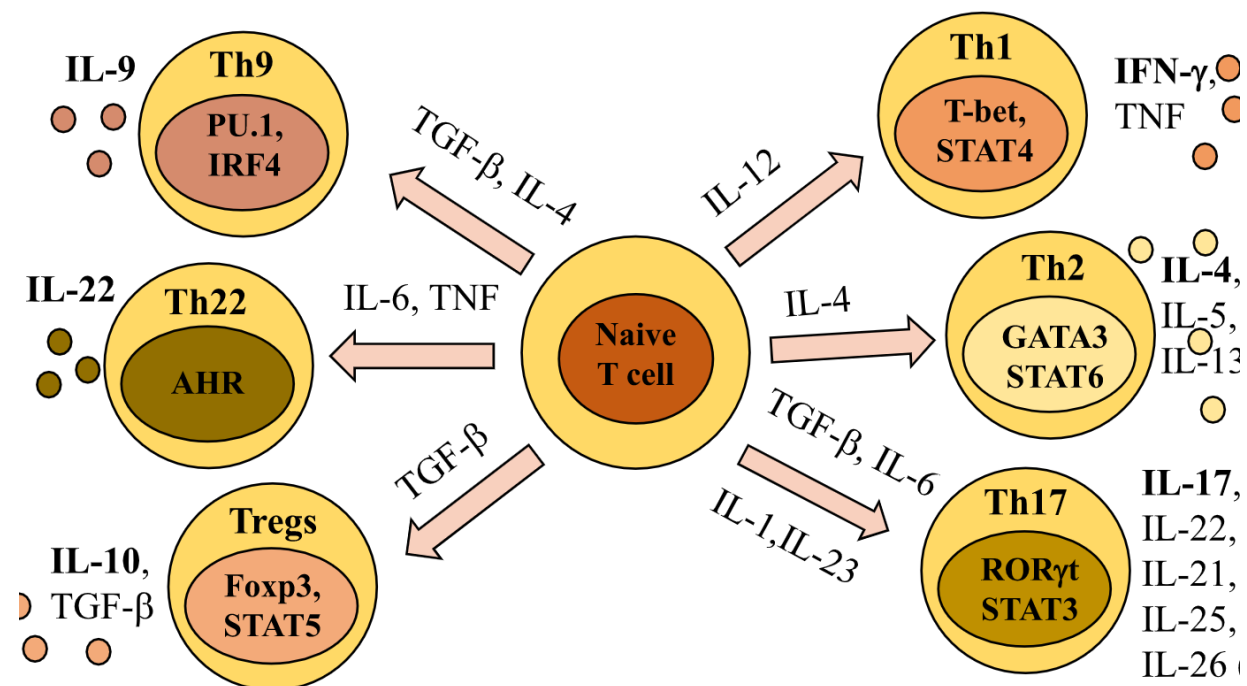


Abb. 1: Naive T-Zellen entwickeln sich abhängig vom Zytokinmilieu in eine der Th-Subpopulationen, welche sich durch exprimierte Zytokine und Transkriptionsfaktoren unterscheiden. [5]

Die Hauptaufgabe des Immunsystems besteht darin, Selbst- und Fremdantigene zu unterscheiden. Dabei ist es wichtig, dass eine gewisse Selbsttoleranz besteht, damit keine körpereigenen Strukturen angegriffen werden.



Immuncheckpoints

Das Immunsystem besitzt Kontrollpunkte, sogenannte Immuncheckpoints, welche die Immunreaktion begrenzen und damit eine überschießende Reaktion verhindern. Dadurch entsteht eine Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen und autoimmune Prozesse können verhindert werden. [6] Zu diesen Immuncheckpoints gehören CTLA-4 und PD-1, die aktivierungsinduziert auf der Oberfläche von T-Zellen exprimiert werden.

CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4) hat strukturelle Ähnlichkeit mit dem T-Zelloberflächenprotein CD28. Zur Aktivierung von T-Lymphozyten ist zum einen das Binden des T-Zellrezeptors an den MHC-Komplex auf der antigenpräsentierenden Zelle notwendig und zum anderen die Costimulation durch Interaktion von CD28 und CD80/CD86. Durch Aktivierung der Lymphozyten wird CTLA-4 hochreguliert und bindet mit höherer Affinität an CD80/CD86 als CD28, wodurch die T-Zellantwort vermindert wird. [7] Über eine intrazelluläre Signalkaskade wirkt diese Interaktion auf die Proteintranslation und vermindert beispielweise die Produktion des proinflammatorischen Zytokins IL-2 [8]. Außerdem beeinflusst CTLA-4 die Motilität der T-Lymphozyten, indem die Sensibilität der Chemokinrezeptoren CCR5 und CCR7 gesteigert wird. Das führt zum Homing der Zellen in die Keimzentren und zum Austritt aus den Blutgefäßen in Richtung Verletzung und Entzündung. [9]

Auch PD-1 (programmed cell death protein 1) wird auf der Zelloberfläche von aktivierten T-Zellen exprimiert. Durch Bindung an den PD-1 Liganden (PDL) kommt es zur Inhibition der T-Zellen. PD-L2 wird von aktivierten Dendritischen Zellen und Makrophagen exprimiert, während PD-L1 auf Gewebe durch inflammatorische Mediatoren hochreguliert wird. [10] Tumorzellen können PD-L1 exprimieren, um sich dem Immunsystem zu entziehen. [11]

Immunevasionsmechanismen von Tumoren

Tumoren können sich durch unterschiedliche Mechanismen ein immunsuppressives Milieu schaffen. Tumorassoziierte Antigene werden über MHC-Moleküle der Klasse I dem Immunsystem präsentiert. Tumorzellen können die Exprimierung dieser MHC-Moleküle verringern, wodurch das Immunsystem den Tumor schwerer erkennt. [12] Durch Überexpression von inhibitorischen Rezeptoren, also Immuncheckpoints wie CTLA-4 und PD-1 auf T-Zellen und deren Liganden wie PDL1 auf Tumorzellen, kommt es zur T-Zell Ermüdung und damit zu einer verminderten T-Zell-Antwort. [13]

Pädiatrische Tumore unterscheiden sich von adulten Tumoren vor allem in der Mutationslast und entstehen eher aus embryonalen als aus epithelialen Zellen. [14] Die Mutationsrate ist in pädiatrischen Tumoren geringer, weswegen es weniger tumorassoziierte Neoantigene gibt, welche auf MHC I Molekülen präsentiert werden. Folglich ist es für das Immunsystem schwieriger, die Tumoren zu erkennen und adäquat zu reagieren. Die tumorspezifische Immunantwort ist somit geringer ausgeprägt als bei Erwachsenen. [1]



Einflüsse auf das Immunsystem

Sowohl das biologische Geschlecht als auch das Alter nehmen Einfluss auf die das Immunsystem. Frauen zeigen eine stärkere Immunantwort auf Infekte und Impfungen als Männer. Dies geht jedoch einher mit einer höheren Inzidenz an Autoimmunerkrankungen. [16] Die weiblichen Geschlechtshormone, vor allem Östrogen, beeinflussen T- und B-Lymphozyten in Entwicklung, Proliferation und Aktivierung auf molekularer Ebene. Testosteron hingegen wirkt eher supprimierend auf das Immunsystem, weshalb die Verläufe von Infektionserkrankungen bei Männern oft gravierender sind. [17] Nach einer *in vitro* Stimulation zeigen Frauen mehr aktivierte CD4+ und CD8+ T-Zellen und eine gesteigerte Proliferation. Auch die Th-Subgruppen sind abhängig vom biologischen Geschlecht. So ist die Th1- und Th2-Antwort bei Frauen stärker ausgeprägt und die Th17-Antwort bei Männern. [18]

Abhängig vom Alter verändert sich das Immunsystem kontinuierlich. Während sich die T-Zellen bei Neugeborenen eher in Richtung Foxp3+CD25+ regulatorische T-Zellen entwickeln und damit Selbsttoleranz fördern [19], steigt in den ersten Lebensjahren der Anteil an T-Gedächtniszellen. Ab dem dritten Lebensjahr werden die T-Lymphozyten funktionaler, indem sie bei nicht-antigenspezifischer Stimulation multiple Zytokine produzieren können. [20] Ab der Pubertät kommt es durch den Einfluss von Sexualhormonen, vor allem Testosteron, zu einer Involution des Thymus, wodurch der Anteil neuer naiver T-Zellen mit zunehmendem Alter sinkt. [21] Mit steigendem Alter verschlechtern sich üblicherweise die Immunfunktionen. Durch diese Immunseneszenz steigt die Sterberate durch Infektionskrankheiten ab dem 50. Lebensjahr stark an, bei Frauen nach der Menopause. Durch epigenetische und Umwelteinflüsse verändern sich die Chromatinstruktur, Histonmodifikation und die DNA-Methylierung, wodurch die Immunantwort beeinflusst wird. Dies betrifft überwiegend die T-Zellen. Im Alter wird die T-Zellantwort von einer Th2-Antwort dominiert, außerdem gibt es mehr regulatorische T-Zellen und weniger naive T-Zellen. Auch die CD8+ T-zellen sinken. Durch vermehrte Gewebeschäden kommt es zu einer chronischen Antigenstimulation, weshalb die Immunzellen nicht mehr adäquat auf neue Antigene reagieren können. Sowohl die Pathogenabwehr als auch das Erkennen von körpereigenen, entarteten Zellen wird dadurch eingeschränkt. [22]

Immuncheckpointinhibitoren

Immuncheckpointinhibitoren können die Immunbremse durch PD-1 und CTLA-4 lösen und damit die Immunantwort steigern. Ipilimumab, ein aCTLA-4-Antikörper, und Nivolumab, ein aPD-1-Antikörper, werden mittlerweile zur Tumorthherapie bei Erwachsenen, beispielsweise bei malignem Melanom oder nichtkleinzelligen Lungenkarzinom, genutzt. (siehe Abb. 2) Checkpointinhibitoren werden in der Pädiatrie hingegen bisweilen nur zögerlich getestet und genutzt. [2] Eine Tumorthherapie mit Immuncheckpointinhibitoren hat weniger direkt zytotoxische Nebenwirkungen als eine klassische Chemotherapie, was weniger Langzeitfolgen für pädiatrische Patienten bedeuten könnte. [16] Jedoch kommt es durch die fehlende Regulation des Immunsystems zu immunogenen Nebenwirkungen, die Autoimmunkrankheiten ähneln, sogenannten Immune-related Adverse Events. [1]

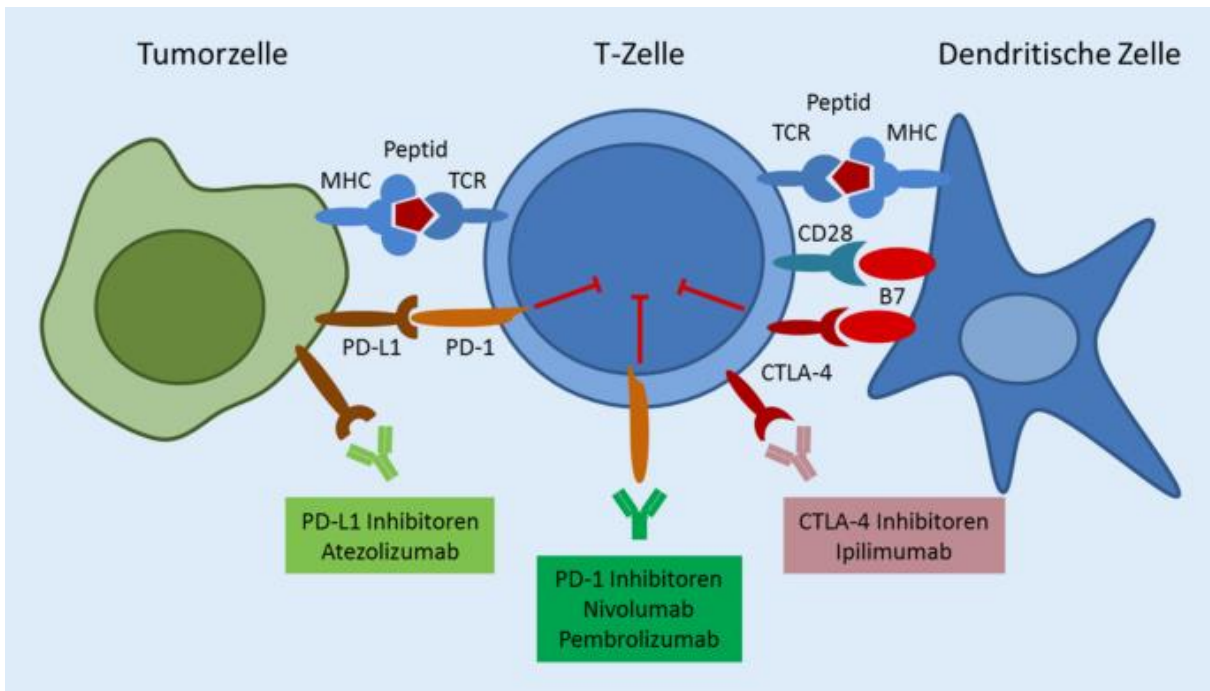


Abb. 2: Tumorzellen und dendritische Zellen präsentieren der T-Zelle ein Antigen. Durch Binden des T-Zellrezeptors an den MHC-Komplex und die Interaktion zwischen CD28 und B7 (CD80/86) wird die T-Zelle aktiviert. Die Immuncheckpoints PD-1 und CTLA-4 hemmen die T-Zelle, indem sie an PDL-1 bzw. B7 binden. Diese Immunbremse kann durch Immuncheckpointinhibitoren gelöst werden. (24)

Mausmodelle zeigen, dass durch eine CTLA-4 Blockade die Proliferation der T-Zellen gesteigert wird und die Immunreaktion in Richtung Th1-Antwort tendiert. Die proinflammatorischen Zytokine IL-2 und IFN γ werden vermehrt gebildet, während IL-4, ein Th2-assoziiertes Zytokin, weniger produziert wird. [8]

Mit einem *in vitro* Modell mit Zellen aus Nabelschnurblut und adulten Blutproben wurde gezeigt, dass eine Blockade von CTLA-4 dazu führt, dass vermehrt die Zytokine IL-8, IFN γ , IL-17 und IL-10 von aktivierten T-Zellen gebildet werden. Bei Neugeborenen und jungen Kindern ist zwar der Anteil an T-Zellen (CD40L+CD4+), die multiple Zytokine produzieren, ohne Checkpointblockade höher als bei Erwachsenen. Durch eine Blockade von CTLA-4 konnte der Anteil in adulten Zellen jedoch deutlich erhöht werden. Durch Behandlung mit einem anti-CTLA-4-Antikörper kam es bei den T-Zellen von Neugeborenen zu einer stärkeren Proliferation im Gegensatz zu denen von Erwachsenen. Immuncheckpoint-Inhibitoren zeigen dementsprechend altersabhängige Wirkungen. [3]

Auch das biologische Geschlecht nimmt Einfluss auf die Wirksamkeit von Immuncheckpointinhibitoren. Die Therapie maligner Erkrankungen damit zeigt bei Männern eine stärkere Wirkung als bei Frauen. Frauen haben zwar von Grund auf eine stärkere adaptive Immunantwort, bei Männern kann diese durch Hemmung der inhibitorischen Signale über CTLA-4 und PD-1 jedoch besser gesteigert werden. [4]



Fragestellung

Ausgehend vom aktuellen Forschungsstand soll sich in diesem Projekt mit der Frage auseinandergesetzt werden, worin sich die T-Zell-Antwort nach Immuncheckpointblockade in unterschiedlichen Altersgruppen und abhängig vom Geschlecht unterscheidet. Dafür wurde ein *in vitro* Modell zur antigenspezifischen Stimulation von T-Zellen mit *S. aureus* entwickelt, wobei Zellen von Kindern (5-12 Jahre), Jugendlichen (12-18 Jahre) und Erwachsenen analysiert und in Hinblick auf das Geschlecht verglichen werden. Bei den erwachsenen Spendern werden außerdem die Gruppen der unter 40- mit über 50-Jährigen verglichen, um den Einfluss der Immunseneszenz auf Antigenstimulation und Immuncheckpointblockade zu untersuchen.

Für die Immuncheckpointinhibition werden vier Therapieansätze verglichen, um die zellulären Auswirkungen unterschiedlicher Antikörper und Kombinationen zu analysieren. Dafür wird ein Antikörper gegen CTLA-4 und gegen PD-1 genutzt, eine Blockade von PD-1 und PDL-1 und außerdem eine Mehrfachblockade von CTLA-4, PD-1 und PDL-1. Um die Rollen verschiedener Th-Subpopulationen nach Immuncheckpointblockade zu verstehen, werden diese anhand der Zytokinmuster unterschieden. Für Th1-Zellen werden die Zytokine IFN γ , IL-8, TNF α und IL-2 gemessen, für Th2 IL-4, IL-5 und IL-13 und für die Th9-Zellen IL-9. Für die Th17 Zellen werden IL-17a und IL-17f und IL-22, für die Th22 Zellen IL-22 genutzt.

Methodik

Als Patientenmaterial werden Gewebeproben (Adenoide bzw. Tonsillen) von Kindern und Jugendlichen verwendet, welche aufgrund einer Hyperplasie chirurgisch entfernt werden müssen. Diese Proben werden vom Institut für Hals-Nasen-Ohren Heilkunde der Universitätsklinik Magdeburg bereitgestellt. Als Kontrollproben dienen Blutspenden von Erwachsenen aus dem Institut für Transfusionsmedizin.

Periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC's) werden aus den Blutproben mittels Dichtegradientenzentrifugation auf Pancoll isoliert. Mithilfe von CD14 MicroBeads werden am AutoMACS pro (Miltenyi Biotec, Deutschland) Monozyten aus den PBMC's isoliert. Aus dem Gewebe werden mononukleäre Zellen durch mechanische Dissoziation mit einem 70 μ m Zellsieb (BD Biosciences, US) und darauffolgender Dichtegradientenzentrifugation auf Pancoll gewonnen. CD4 MicroBeads dienen der Isolation von T-Zellen aus den Blutproben und Adenoiden bzw. Tonsillen. Um die Reinheit der Zellisolate zu überprüfen, wird ein MACS-Check am FACS-Gerät (BD LSRFortessa) durchgeführt. Dabei werden bei den T-Zellen die Oberflächenmoleküle CD3, CD4 und CD45 mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt, bei den Monozyten CD14, CD16 und CD45. Das Ziel ist eine Reinheit von etwa 98%. Die isolierten Monozyten werden mit hitzeinaktiviertem *S. aureus* Lysat (200 μ g/ml) über Nacht aktiviert. Die T-Zellen werden über Nacht bei 37°C gelagert.

Am nächsten Tag werden die T-Zellen im Verhältnis 2:1 (200 000 T-Zellen auf 80 000 Monozyten) zu den Monozyten gegeben und für vier Tage kultiviert. Davor werden die CTLA-4- und PD1- Signalkaskaden inhibiert, indem die T-Zellen mit anti-CTLA-4-, anti-PD1-, anti-PDL-1-Antikörpern oder Kontrollisotypen für 30min bei 37°C inkubiert werden. Außerdem



werden die T-Lymphozyten mit CFSE (Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester) markiert, um die Proliferation am vierten und am sechsten Tag zu messen. Die Reifung der Monozyten wird anhand der Expression der Oberflächenmoleküle CD14, CD16 und HLA-DR am Durchflusszytometer gemessen. Außerdem werden die Monozyten fixiert, um intrazellulär IL-1 β und IL-6 zu messen. Dafür werden sie für 5h mit *S. aureus* Lysat restimuliert und die Zytokinausschüttung wird durch Brefaldin A und Monensin inhibiert. Mithilfe des Miltenyi Inside Stain Kit werden die Monozyten nach Protokoll des Herstellers fixiert und danach die Zytokine IL-1 β und IL-6 intrazellulär gefärbt.

Am vierten Tag der Kultur werden die Zellen erneut stimuliert, indem sie für 5h bei 37°C mit *S. aureus* Lysat (200 μ g/ml), Brefaldin A (1:1000) und Monensin (1:3000) inkubiert werden. Daraufhin werden die Oberflächenmarker CD3, CD4, CD137, CD25 und SLAMF7 gefärbt und der Fc γ -Rezeptor geblockt. Die Expression der Oberflächenmoleküle wird dann durchflusszytometrisch gemessen. Die Zellen für die intrazelluläre Messung werden mit dem Miltenyi Inside Stain Kit fixiert. Die fixierten Zellen werden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern in Inside Perm (Miltenyi Biotec) gefärbt. Die Zytokine IL-8, IL-17a, IL-4, IL-10, IFN γ , IL-9, IL-22, IL-2, TNF α , IL-13 und IL-17f werden intrazellulär gefärbt und am Durchflusszytometer gemessen. Die Proliferation der CFSE-markierten Zellen wird am vierten und am sechsten Tag gemessen, indem sie außerdem mit anti-CD3- und anti-CD4-Antikörpern markiert werden. Am FACS wird dann der Anteil der Zellen mit wenig CFSE gemessen.

Bei jeder untersuchten Probe werden sowohl die Überstände der Monozyten als auch die der T-Zellen am vierten Tag nach Stimulation abgenommen und eingefroren, sodass nach Abschluss der Experimente in diesen Überständen bereits sezernierte Zytokine mittels Multiplex-Immunoassay-Verfahren (LEGENDplex, Biolegend) gemessen werden können. Dazu werden die Überstände mit Antikörper-beladenen, fluoreszierenden Mikrosphären inkubiert, welche die jeweiligen Zytokine binden. Durch Färbung mit Detektionsantikörpern können die einzelnen Zytokine dann am Durchflusszytometer gemessen werden.

Arbeitsplan

Im Oktober 2021 habe ich angefangen ein Versuchsprotokoll für das Projekt zu entwickeln und habe dafür vorhandene Protokolle angepasst und verbessert. Unter anderem wurden verschiedene Konzentrationen vom *S. aureus* Lysat und der verschiedenen Immuncheckpointinhibitoren getestet. Die Methodik ist so weit etabliert und die Studie durch die Ethik-Kommission der OVGU (Votum 164/18) genehmigt, sodass im Februar angefangen werden kann Patientenmaterial zu sammeln, um die Ergebnisse als Datensatz zu verwenden. Geplant ist, in jeder Alters- (5-9, 12-18, <40, >50 Jahre) und Geschlechtsgruppe (m/w) 10 Proben zu sammeln, sodass insgesamt 80 Proben untersucht werden. Die Experimente dauern jeweils 8 Tage, wobei pro Experiment etwa 3 Proben zeitgleich analysiert werden können. Der angestrebte Datensatz sollte somit bis August 2022 erreicht werden. Anschließend werden mithilfe eines Immunoassays die sezernierten Zytokine in den gesammelten Überständen der verschiedenen Patientengruppen gemessen.

Die mithilfe der Durchflusszytometrie erhobenen Daten werden mit dem Programm „FlowJo“ ausgewertet. Dabei wird die T-Zellantwort von antigenspezifisch aktivierten T-Zellen mit oder ohne Immuncheckpointblockade (anti-CTLA-4, anti-PD-1, anti-PD-1/PDL-1, anti-CTLA-4/PD-1/PDL-1 oder Isotyp-Kontrolle) mit einer unstimulierten Kontrollprobe verglichen. Die intrazelluläre Messung von Zytokinen erfolgt abhängig vom Aktivierungsmarker CD137 und unter Berücksichtigung der Th-Subpopulationen. Die Daten sollen einen statistisch relevanten Vergleich der Immunantwort von Kindern, Jugendlichen, jungen und älteren Erwachsenen abhängig vom biologischen Geschlecht ermöglichen. Die statistische Auswertung erfolgt mithilfe der Programme Graphpad Prism bzw. SPSS.

Erste Ergebnisse

Die ersten Daten wurden anhand adulter Blutproben erhoben. Aus einem Blutkegel (Leukozytenreduktions-Kegel) wurden Monozyten und T-Zellen mithilfe des AutoMACS isoliert. Die Monozyten wurden über Nacht mit *S. aureus* Lysat aktiviert und dienen am nächsten Tag als antigenpräsentierende Zellen der Stimulation der T-Lymphozyten. Um die Aktivierung der T-Zellen zu messen, wurden am vierten Tag der Kokultur Oberflächenmoleküle fluoreszenzgefärbt und am Durchflusszytometer (FACS Fortessa, BD Biosciences) gemessen. Zellen mit Immuncheckpointblockade zeigen dabei eine stärkere Expression der Aktivierungsmarkern CD25 (IL-2-Rezeptor) und CD137 (TNF-Rezeptor). (Abb. 3)

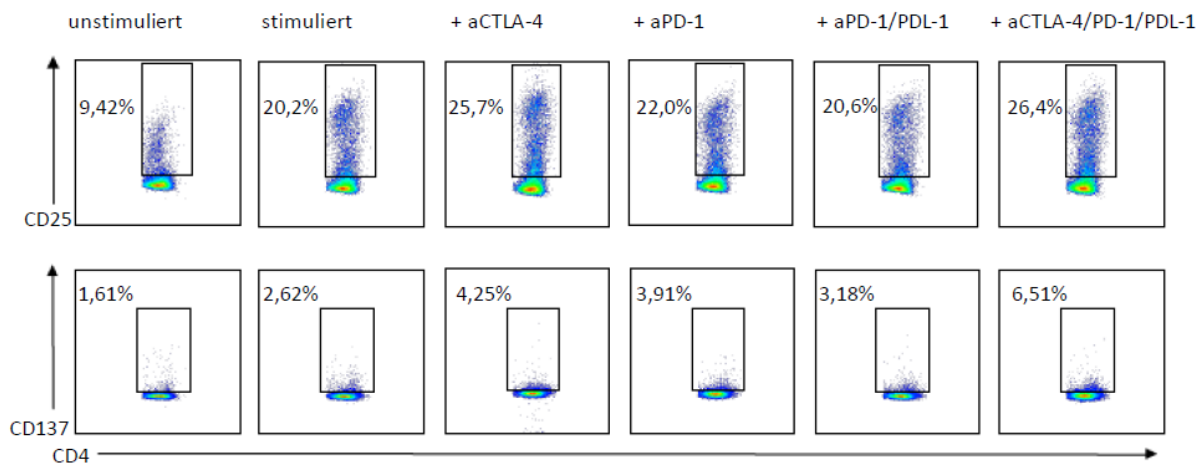


Abb. 3: Adulte T-Helferzellen wurden nach Inkubation mit Immuncheckpointinhibitoren oder der Isotyp-Kontrolle durch mit *S. aureus* Lysat beladene Monozyten aktiviert. Am vierten Tag wurde die Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD137 auf den CD4+ T-Helferzellen gemessen. Die Blockade von CTLA-4 und die dreifache Blockade von CTLA-4, PD-1 und PDL-1 haben den größten Effekt und steigern die Expression von CD25 auf 25,7 bzw. 26,4% (stimulierte Kontrolle: 20,2%) und die Expression von CD137 auf 4,35 bzw. 6,51 % (stimulierte Kontrolle: 2,62%).

Außerdem wurden vor der Stimulation der T-Zellen diese mit CFSE markiert, um am vierten und sechsten Tag nach initialer Stimulation die Proliferation zu messen. (Abb. 4) T-Zellen mit Immuncheckpointblockade proliferieren dabei mehr als Zellen ohne eine Checkpointblockade.

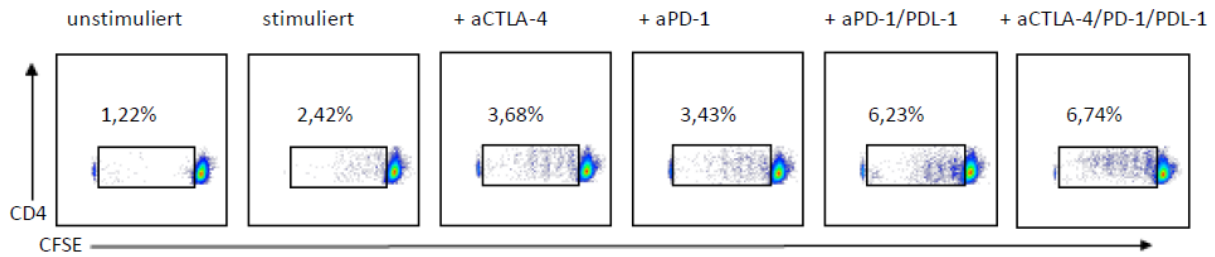


Abb. 4: Adulte T-Zellen wurden vor der Stimulation mit CFSE markiert. Am vierten Tag wurde die Proliferation anhand der Farbstoffverdünnung gemessen. 2,42% der stimulierten Zellen sind am vierten Tag proliferiert, während 3,68% der stimulierten Zellen mit CTLA-4 Blockade proliferierten und 6,74 % der stimulierten Zellen mit einer kombinierten Blockade von CTLA-4, PD-1 und PDL-1.

Erwartungen

Ich erwarte, dass sich die Wirkung von Immuncheckpointinhibitoren auf antigenspezifische T-Zellen in den verschiedenen Patientengruppen unterscheidet, da sich das Immunsystem alters- und geschlechtsabhängig verändert. Ausgehend vom aktuellen Forschungsstand nehme ich an, dass die antigenspezifische T-Zellreaktion von Kindern und Jugendlichen durch Immuncheckpointinhibition hinsichtlich Zytokinproduktion und Proliferation besser gesteigert werden kann als bei Erwachsenen. Wahrscheinlich sprechen vor allem Th1-Zellen auf die Immuncheckpointblockade an und exprimieren ihre Zytokine vermehrt. Der Effekt der Blockade sollte bei älteren Erwachsenen (>50 Jahre) nicht so ausgeprägt sein wie bei Jugendlichen oder Kindern, da bei Älteren eine Th2-Antwort dominiert und diese nicht durch eine Checkpointblockade gesteigert wird. Außerdem erwarte ich, dass die T-Zellantwort männlicher Probanden mit Immuncheckpointinhibition besser steigerbar ist als die weiblicher Probanden.

Von meinem Projekt erhoffe ich mir mithilfe eines humanen *in vitro* Modells die zellulären Mechanismen einer Blockade der Immuncheckpoints CTLA-4 und PD-1 in unterschiedlichen Patientengruppen besser zu verstehen. Damit soll dazu beigetragen werden, bereits präklinisch das Risiko-Nutzen-Profil einer Therapie mit Immuncheckpointinhibitoren besser abschätzen zu können und somit den klinischen Einsatz von Immuncheckpointinhibitoren in der Pädiatrie neu zu evaluieren.



Literaturverzeichnis

- [1] Khan S, Gerber DE. Autoimmunity, Checkpoint Inhibitor Therapy and Immune-related Adverse Events: A Review. *Seminars in cancer biology* 2020; 64:93-101.
- [2] Park J A, Cheung NV. Limitations and opportunities for immune checkpoint inhibitors in pediatric malignancies. *Cancer Treatment reviews* 2017; 58: 22-33.
- [3] Arra A, Pech M, Brunner-Weinzierl M C. Immune-checkpoint blockade of CTLA-4 (CD152) in antigen-specific human T-cell responses differs profoundly between neonates, children, and adults. *Oncoimmunology* 2021; 10(1): 1938475
- [4] Botticelli A, Onesti CE, Marchetti P. The sexist behavior of immune checkpoint inhibitors in cancer therapy?. *Oncotarget* 2017; 8(59): 99336-99346.
- [5] Nicholson L B. The immune system. *Essays in Biochemistry* 2016; 69(3): 275-30.
- [6] Raphael I, Nalawade S, Eagar TN, Forsthuber TG. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine* 2015; 74(1): 5-17.
- [7] Walker LSK. Treg and CTLA-4: Two intertwining pathways to immune tolerance. *Journal of Autoimmunity* 2013; 45(100): 49-57.
- [8] Rowshanravan B, Halliday N, Sansom DM. CTLA-4: a moving target in immunotherapy. *Blood* 2018; 131(1): 58-67.
- [9] Brunner MC, Chambers CA, Chan FK, Hanke J, Winoto A, Allison JP. CTLA-4-Mediated Inhibition of Early Events of T Cell Proliferation. *The Journal of Immunology* 1999; 162(10): 5813-5820.
- [10] Brunner-Weinzierl M C, Rudd C E. CTLA-4 and PD-1 Control of T-Cell Motility and Migration: Implications for Tumor Immunotherapy. *Frontiers in Immunology* 2018; 9: 2737.
- [11] Iwai Y, Hamanishi J, Honjo T. Cancer immunotherapies targeting the PD-1 signaling pathway. *Journal of Biomedical Science* 2017; 24:26.
- [12] Cha J, Chan L, Hung M. Mechanisms controlling PD-L1 expression in cancer. *Molecular cell* 2019; 76(3): 359-370.
- [13] Garrido F, Ruiz-Cabello F, Aptsiauri N. Rejection versus escape: the tumor MHC dilemma. *Cancer immunology, immunotherapy* 2017; 66(2): 259-271.
- [14] Peggs KS, Quezada SA, Allison JP. Cell intrinsic mechanisms of T-cell inhibition and application to cancer therapy. *Immunological Reviews* 2008; 224: 141-65.
- [15] Hutzen B, Ghonime M, Cassady K A. Immunotherapeutic Challenges for Pediatric Cancers. *Molecular Therapy Oncolytics* 2019; 15: 38-48.
- [16] Moulton V R. Sex Hormones in Acquired Immunity and Autoimmune Disease. *Frontiers in Immunology* 2018; 9: 2279.
- [17] Jaillon S, Berthenet K, Garlanda C. Sexual Dimorphism in Innate Immunity. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* 2019; 56: 308-321.
- [18] Klein SL, Flanagan KL. Sex differences in immune responses. *Nature Reviews Immunology* 2016. 16: 626-638.
- [19] Mold JE, Venkatasubrahmanyam S, McCune JM. Fetal and adult hematopoietic stem cells give rise to distinct T cell lineages in humans. *Science* 2010; 330(6011): 1695-1699.
- [20] Knolle J, Pierau M, Brunner-Weinzierl MC. Children From the Age of Three Show a Developmental Switch in T-Cell Differentiation. *Frontiers in Immunology* 2020; 11: 1640.
- [21] Weiskopf D, Weinberger B, Grubeck-Loeben B. The aging of the immune system. *Transplant International* 2009; 22(11): 1041-1050.
- [22] Ray D, Yung R. Immune Senescence, Epigenetics and Autoimmunity. *Clinical immunology* 2018; 196: 59-63.
- [23] Hutzen B, Paudel SN, Cripe T. Immunotherapies for pediatric cancer: current landscape and future perspectives. *Cancer and Metastasis reviews* 2019; 38: 573-594.
- [24] Lode HN. Tumorimmuntherapie in der pädiatrischen Onkologie. *Der Onkologe* 2021; 27: 474.