

**Etablierung und Evaluierung einer kombinierten
Immuntherapie im murinen RIP1-Tag2
Inselzellkarzinommodell
und deren Einfluss auf den *in vivo*
Glukosemetabolismus der Milz**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Barbara Franziska Schörg
aus Kirchheim unter Teck

Tübingen
2021

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

02.11.2021

Dekan:

Prof. Dr. Thilo Stehle

1. Berichterstatter/-in:

Prof. Dr. Bernd J. Pichler

2. Berichterstatter/-in:

Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	7
Tabellenverzeichnis	10
Abkürzungsverzeichnis	11
SI-Einheiten.....	16
Danksagung.....	17
1 Einleitung.....	20
1.1 Maligne Tumore	20
1.1.1 Entstehung und Eigenschaften maligner Tumore.....	20
1.1.2 Tumorantigene	23
1.2 Das Immunsystem	24
1.2.1 Das angeborene Immunsystem.....	24
1.2.2 Das adaptive Immunsystem	26
1.3 Immuntherapien	31
1.3.1 Adoptive T-Zell-Therapien	32
1.3.2 Immuncheckpoints.....	38
1.3.2.1 PD-1 und PD-L1	40
1.3.2.2 LAG-3	42
1.3.3 Immuncheckpoint-Inhibitor-Therapien	44
1.4 Präklinische Mausmodelle	47
1.4.1 Das RIP1-Tag2 Inselzellkarzinommodell.....	47
1.4.2 <i>Stat1</i> -knock-out Mäuse.....	49
1.5 Funktionelle und molekulare Bildgebung	51
1.5.1 Positronen-Emissions-Tomografie.....	51
1.5.1.1 Detektion von PET-Signalen.....	53
1.5.1.2 Bildrekonstruktion	54
1.5.1.3 Fehlerkorrektur	55
1.5.1.4 PET-Tracer und das Tracer Prinzip	56
1.5.1.5 ¹⁸ F- Fluoro-Desoxy-Glucose	57

1.5.2	Magnetresonanztomografie.....	58
1.5.2.1	Prinzip und Funktionsweise einer MRT	58
1.5.2.2	Gradientenspulen und Sequenzen	60
1.6	Monitoring von Immuntherapien und Detektion des Therapieerfolgs	61
2	Fragestellung	64
3	Material und Methoden	66
3.1	Geräte	66
3.2	Verbrauchsmaterialien	67
3.3	Antikörper.....	67
3.3.1	Therapeutische <i>in vivo</i> Antikörper	67
3.3.2	Antikörper für die Zellkultur.....	68
3.3.3	Fluoreszierende Antikörper für die Durchflusszytometrie	68
3.3.4	Antikörper für die Histologie	70
3.4	Synthetische Oligonukleotide	71
3.5	Nährmedien und Puffer	72
3.5.1	Nährmedium zur Kultivierung von T-Zellen (T-Zellmedium)	72
3.5.2	Sonstige Puffer und Lösungen	73
3.6	Versuchstiere	73
3.6.1	Zucht- und Haltungsbedingungen	73
3.6.2	Mauslinien	74
3.6.2.1	C3H	74
3.6.2.2	RIP1-Tag2	74
3.6.2.3	RT2xStat1 ^{-/-}	74
3.6.2.4	Tag2-TCR	74
3.6.3	Genotypisierung transgener Mauslinien	75
3.7	Zellkultur	76
3.7.1	Bestimmung der Zellzahl.....	77
3.7.2	Isolation muriner CD4 ⁺ Zellen und APCs aus Organen des lymphatischen Systems.....	77
3.7.3	Spezifische Aktivierung und Polarisierung von CD4 ⁺ T-Zellen	79
3.8	Kombinierte Immuntherapie im RT2-Mausmodell mit fortgeschrittenen Inselzellkarzinomen.....	81

3.8.1	Immunezelldepletion mittels Niedrigdosis-Ganzkörperbestrahlung	82
3.8.2	Intraperitoneale Injektion therapeutischer Tag2-Th1-Zellen	82
3.8.3	Intraperitoneale Injektion des therapeutischen Antikörpercocktails	82
3.9	Checkpoint-Inhibitor-Therapie in RT2-Mäusen.....	83
3.10	Therapiemonitoring	83
3.10.1	Blutglukosemessungen	83
3.10.2	Gewichtskontrollen	84
3.10.3	Abbruchkriterien	84
3.11	Bildgebende Verfahren	85
3.11.1	Intravenöse Injektion von ¹⁸ F-FDG	86
3.11.2	Vorbereitung der Versuchstiere für die Bildgebung	87
3.11.3	Messung des Glukosemetabolismus mittels ¹⁸ F-FDG PET	88
3.11.3.1	Dynamische ¹⁸ F-FDG PET-Scans	88
3.11.3.2	Statische ¹⁸ F-FDG PET-Scans	88
3.11.4	Magnetresonanztomografie.....	89
3.11.4.1	Darstellung der Inselzellkarzinome	89
3.11.4.2	Aufnahmen zur anatomischen Co-Lokalisation des PET Signals.....	89
3.11.4.3	Bildrekonstruktion und Analyse.....	90
3.12	<i>Ex vivo</i> Analysen.....	90
3.12.1	Blutentnahmen	91
3.12.2	Organentnahmen.....	91
3.12.3	Kryokonservierung von Organen.....	91
3.12.4	Konservierung von Organen in Paraffin.....	92
3.12.5	Histologie.....	92
3.12.5.1	Anfertigen von Paraffinschnitten	92
3.12.5.2	Anfertigen von Kryoschnitten	92
3.12.5.3	Hämatoxilin und Eosin-Färbung.....	92
3.12.5.4	Immunhistochemische Färbungen.....	93
3.12.5.5	Immunfluoreszenz und Quantifizierung der Signale ..	94
3.12.5.6	Detektion und Quantifizierung der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidaseaktivität	95
3.13	Durchflusszytometrie (FACS).....	96
3.13.1	Vorbereitung und Färbung der Proben.....	96
3.13.2	Analyse im Durchflusszytometer und Auswertung der Signale ...	98

3.13.2.1	„Gating“-Strategie innerhalb der Multifarbenanalyse.....	100
3.14	Statistische Analysen.....	102
4	Ergebnisse.....	104
4.1	Wirksamkeit einer kombinierten Immuntherapie im fortgeschrittenen murinen RT2-Inselzellkarzinommodell	104
4.1.1	Einfluss der kombinierten Immuntherapie auf den Blutglukosespiegel von RT2-Mäusen	105
4.1.2	Einfluss der kombinierten Immuntherapie auf die Überlebensrate von RT2-Mäusen	106
4.1.3	Effekte der initialen Niedrigdosis-Ganzkörperbestrahlung innerhalb der kombinierten Immuntherapie	108
4.1.4	Einfluss der kombinierten Immuntherapie auf das Tumorstadium.....	113
4.2	Wirkmechanismen einer kombinierten Immuntherapie im fortgeschrittenen murinen RT2-Inselzellkarzinommodell.....	116
4.2.1	Histologische Untersuchungen des Pankreasgewebes und der drainierenden Lymphknoten von RT2-Mäusen	116
4.2.2	Immunfluoreszenz der Inselzellkarzinome zur Identifizierung der Tumorseneszenz.....	120
4.2.3	Untersuchung der T _H 1-Zell-vermittelten Seneszenz-Induktion im fortgeschrittenen murinen RT2-Inselzellkarzinommodell	122
4.2.3.1	Einfluss der kombinierten Immuntherapie auf den Blutglukosespiegel von RT2xStat1 ^{-/-} -Mäusen	123
4.2.3.2	Einfluss der kombinierten Immuntherapie auf die Überlebensrate von RT2xStat1 ^{-/-} -Mäusen	124
4.2.3.3	Histologische Untersuchungen der Inselzellkarzinome von RT2xStat1 ^{-/-} -Mäusen	125
4.2.3.4	Immunfluoreszenz und SA-β-Gal-Aktivität der Inselzellkarzinome aus RT2xStat1 ^{-/-} -Mäusen zur Analyse der Seneszenz-Induktion	126
4.2.4	Untersuchung der Immunzellpopulationen in der Milz von RT2-Wildtyp- und RT2xStat1 ^{-/-} -Mäusen nach Kombinationstherapie.....	128
4.2.5	Untersuchung der Tumorantigen-Expression im fortgeschrittenen Inselzellkarzinom nach Kombinationstherapie.....	130
4.3	Zelluläre Charakterisierung des Tumor-Mikromilieus und der lymphatischen Organe	132

4.3.1	Globale Analyse der Immunzellpopulationen im TME und den lymphatischen Organen.....	133
4.3.2	Untersuchung der lokalen T-Zell-Antwort im TME	135
4.3.2.1	T-Zellphänotypen.....	136
4.3.2.2	CD8 ⁺ Subpopulationen	137
4.3.2.3	CD4 ⁺ Subpopulationen	141
4.3.3	Untersuchung der lokalen Immunantwort im PLK	146
4.3.3.1	T-Zellphänotypen.....	146
4.3.3.2	CD8 ⁺ Subpopulationen	148
4.3.3.3	CD4 ⁺ Subpopulationen	150
4.3.4	Untersuchung der systemischen Immunantwort in der Milz	155
4.3.4.1	T-Zellphänotypen.....	155
4.3.4.2	CD8 ⁺ Subpopulationen	157
4.3.4.3	CD4 ⁺ Subpopulationen	159
4.4	Untersuchung des Glukosemetabolismus in der Milz zur Beurteilung des Ansprechens auf IC-basierte Immuntherapien	163
4.4.1	Untersuchung der Dynamik der ¹⁸ F-FDG-Anreicherung in der Milz naiver RT2-Mäuse.....	163
4.4.2	Anreicherung von ¹⁸ F-FDG in der Milz von RT2-Mäusen nach Kombinationstherapie.....	164
4.4.3	<i>Ex vivo</i> Analysen der Milz.....	166
4.4.3.1	Durchflusszyometrische Analyse der Milz	166
4.4.3.2	Histologische Untersuchungen der Milz.....	168
4.4.4	Anreicherung von ¹⁸ F-FDG in der Milz von RT2-Mäusen nach exklusiver Checkpoint-Inhibitor-Therapie	170
4.4.5	<i>Ex vivo</i> Analysen der Milz und des drainierenden Lymphknotens	172
5	Diskussion.....	175
5.1	Wirksamkeit einer kombinierten Immuntherapie im fortgeschrittenen murinen RT2-Inselzellkarzinommodell	175
5.1.1	Einfluss der Niedrigdosisganzkörperbestrahlung	178
5.1.2	Bewertung des Tumorwachstums	182
5.2	Wirkmechanismen einer kombinierten Immuntherapie im fortgeschrittenen murinen RT2-Inselzellkarzinommodell.....	185
5.2.1	Einfluss auf die Rückbildung von Blutgefäßen	185
5.2.2	T _H 1-Zell-vermittelte Seneszenz-Induktion	187
5.3	Modulation des TMEs und der peripheren Immunzelllandschaft.....	193
5.3.1	Globale Bewertung der Leukozytenpopulationen	194

5.3.2	T-Zellen im TME	197
5.3.3	Therapeutische T _H 1-Zellen	199
5.3.4	Endogene CD4 ⁺ T-Zellen	201
5.3.5	Regulatorische T-Zellen	203
5.3.6	CD8 ⁺ T-Zellen.....	204
5.3.7	Implikation für die molekulare Bildgebung.....	210
5.4	Beurteilung des Therapieansprechens anhand des Glukosemetabolismus in der Milz.....	213
5.4.1	Die Bedeutung der Milz im Kontext von Immuntherapien.....	214
5.4.2	¹⁸ F-FDG-Aufnahme in der Milz unter Checkpoint-basierter Immuntherapie	215
5.4.3	Bedeutung der ¹⁸ F-FDG-PET Aufnahme in der Milz von Mäusen für die Klinik	221
6	Zusammenfassung	223
7	Erklärung	226
8	Erklärung zum Eigenanteil	227
9	Publikationsverzeichnis	229
9.1	Publikationen in wissenschaftlichen Fachzeitschriften	229
9.2	Teilnahme an wissenschaftlichen Konferenzen	230
9.2.1	Wissenschaftliche Vorträge	230
9.2.2	Präsentationen wissenschaftlicher Poster	231
10	Literaturverzeichnis	233
11	Anhang.....	248

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Die "Hallmarks of Cancer" nach D. Hanahan und R.A. Weinberg.	22
Abb. 2: Genetische Modifikationen peripherer Lymphozyten aus Patientenblut.	35
Abb. 3: Schematische Darstellung eines chimären Antigenrezeptors (CAR) der dritten Generation.....	36
Abb. 4: Immunmodulation von T-Zellen über Immuncheckpoints.	40
Abb. 5: Zeitlicher Verlauf der Entwicklung und Einführung von anti-CTLA-4, anti-PD-1 und anti-PD-L1 mAbs in der Klinik.....	45
Abb. 6: Gesamtüberlebensrate von Patienten mit metastasiertem Melanom unter IC-Inhibitor-Therapie.	46
Abb. 7: Mehrstufige Karzinogenese in RT2-Mäusen.	48
Abb. 8: IFN- γ Signalweiterleitung in der Zelle.....	50
Abb. 9: Grundprinzip der PET.....	54
Abb. 10: Darstellung verschiedener Koinzidenzereignisse während eines PET-Scans.	56
Abb. 11: Grundprinzip der Magnetresonanztomografie.	60
Abb. 12: Organe des lymphatischen Systems der Maus.	78
Abb. 13: Behandlungsschema von RT2-Mäusen innerhalb der Kombinationstherapie.....	81
Abb. 14: Kleintier PET-Scanner.....	85
Abb. 15: 7 T Magnetresonanztomograph.	86
Abb. 16: Aufbau der Tierliegen.	87
Abb. 17: „Gating“-Strategie zur Differenzierung von CD3 ⁺ Subpopulationen am LSR-II.	99
Abb. 18: Blutglukosespiegel von RT2-Mäusen unter Kombinationstherapie.	106
Abb. 19: Überlebensrate von RT2-Mäusen unter Kombinationstherapie.....	107
Abb. 20: Einfluss der Niedrigdosis-Ganzkörperbestrahlung auf den Blutglukosespiegel von RT2-Mäusen unter Kombinationstherapie.	109
Abb. 21: Änderung des Körpergewichts während des Behandlungsverlaufs.....	110
Abb. 22: Verteilung der T-Zellpopulationen in Blut und den sekundär lymphatischen Organen von RT2-Mäusen nach Kombinationstherapie mit oder ohne vorangehender Immunzelldepletion.....	113
Abb. 23: <i>In vivo</i> Darstellung des Tumorwachstums mittels Magnetresonanztomografie (MRT).....	114
Abb. 24: Histologische Analyse von Pankreasgewebe und PLK aus RT2-Mäusen nach Kombinationstherapie.	117

Abb. 25: Immunhistochemische Färbungen von Pankreasgewebe und PLK aus RT2-Mäusen nach Kombinationstherapie.	118
Abb. 26: CD3-, CD31- (PECAM-1) und PD-L1-Expression im murinen RT2-Inselzellkarzinom.....	119
Abb. 27: Immunfluoreszenz von Inselzellkarzinomen aus RT2-Mäusen.....	121
Abb. 28: Blutglukosespiegel von RT2xStat1 ^{-/-} -Mäusen unter Kombinationstherapie.....	123
Abb. 29: Überlebensrate von RT2xStat1 ^{-/-} -Mäusen unter Kombinationstherapie. ..	124
Abb. 30: Histologische Färbungen von Pankreasgewebe aus RT2- und RT2xStat1 ^{-/-} -Mäusen.	125
Abb. 31: CD3-Immunhistochemie von Inselzellkarzinomen aus RT2- und RT2xStat1 ^{-/-} -Mäusen.	126
Abb. 32: Immunfluoreszenz von Inselzellkarzinomen aus RT2xStat1 ^{-/-} -Mäusen. ...	127
Abb. 33: Aktivität von SA-β-Gal in Inselzellkarzinomen nach Kombinationstherapie in RT2- und RT2xStat1 ^{-/-} -Mäusen.....	128
Abb. 34: T-Zellpopulationen in der Milz von RT2- und RT2xStat1 ^{-/-} -Mäusen nach Kombinations-therapie.	129
Abb. 35: CD3-Immunhistochemie der Tag2-Expression auf Inselzellkarzinomen aus RT2- und RT2xStat1 ^{-/-} -Mäusen.....	131
Abb. 36: Behandlungsschema und Versuchsablauf zur Durchflusszytometrie.	132
Abb. 37: Analyse der lokalen und systemischen Immunantwort nach Kombinationstherapie in RT2-Mäusen.	134
Abb. 38: T-Zell Phänotypen im TME.....	137
Abb. 39: Differenzierte Analyse der CD8 ⁺ T-Zellen im TME mit Fokus auf die Aktivierung und Effektor-/Gedächtnis-Funktion.	138
Abb. 40: Differenzierte Analyse der CD8 ⁺ T-Zellen im TME mit Fokus auf die PD-1 und TIM-3-Expression.	140
Abb. 41: Differenzierte Analyse der CD4 ⁺ T-Zellen im TME mit Fokus auf die CD69-Expression und Effektor-/Gedächtnis-Subpopulationen.....	143
Abb. 42: Differenzierte Analyse der CD4 ⁺ T-Zellen im TME mit Fokus auf die PD-1-Expression.	144
Abb. 43: Differenzierte Analyse der CD4 ⁺ T-Zellen im TME mit Fokus auf die Co-Expression von PD-1 und TIM-3.	144
Abb. 44: Differenzierte Analyse der CD4 ⁺ T-Zellen im TME mit Fokus auf T _{regs}	146
Abb. 45: T-Zell Phänotypen in den Lymphknoten.....	147
Abb. 46: Differenzierte Analyse der CD8 ⁺ T-Zellen in den Lymphknoten mit Fokus auf die CD69-Expression und Effektor-/Gedächtnis-Subpopulationen.	148

Abb. 47: Differenzierte Analyse der CD8 ⁺ T-Zellen in den Lymphknoten mit Fokus auf die PD-1 und TIM-3-Expression.....	150
Abb. 48: Differenzierte Analyse der CD4 ⁺ T-Zellen in den Lymphknoten mit Fokus auf die Effektor-/Gedächtnis-Funktion.	152
Abb. 49: Differenzierte Analyse der CD4 ⁺ T-Zellen in den Lymphknoten mit Fokus auf die CD69-Expression und auf T _{regs} -	153
Abb. 50: Differenzierte Analyse der CD4 ⁺ T-Zellen in den Lymphknoten mit Fokus auf die PD-1 und TIM-3-Expression.....	155
Abb. 51: T-Zellphänotypen in der Milz.	156
Abb. 52: Differenzierte Analyse der CD8 ⁺ T-Zellen in der Milz mit Fokus auf die CD69-Expression und Effektor-/Gedächtnis-Subpopulationen.....	157
Abb. 53: Differenzierte Analyse der CD8 ⁺ T-Zellen in der Milz mit Fokus auf die PD-1- und TIM-3-Expression.....	158
Abb. 54: Differenzierte Analyse der CD4 ⁺ T-Zellen in der Milz mit Fokus auf die Effektor-/Gedächtnis-Funktion.....	160
Abb. 55: Differenzierte Analyse der CD4 ⁺ T-Zellen in der Milz mit Fokus auf die CD69-Expression und T _{regs} -	161
Abb. 56: Differenzierte Analyse der CD4 ⁺ T-Zellen in der Milz mit Fokus auf die PD-1- und TIM-3-Expression.....	162
Abb. 57: ¹⁸ F-FDG Anreicherung in der Milz naiver RT2-Mäuse.....	164
Abb. 58: Versuchsaufbau zur Untersuchung des Glukosemetabolismus in der Milz nach Kombinationstherapie.....	165
Abb. 59: Nichtinvasive PET/MRT-Bildgebung der ¹⁸ F-FDG Aufnahme der Milzen von RT2-Mäusen nach vierwöchiger Behandlung.	166
Abb. 60: Immunzellpopulationen in der Milz von RT2-Mäusen nach vierwöchiger Immun-therapie.	168
Abb. 61: Immunhistochemie von Milzen aus RT2-Mäusen nach Kombinationstherapie.....	170
Abb. 62: Verlauf des Blutglukosespiegels von RT2-Mäusen unter exklusiver CIT.	171
Abb. 63: Nichtinvasive PET/MRT-Bildgebung der ¹⁸ F-FDG-Akkumulation in der Milz von RT2-Mäusen unter CIT.....	172
Abb. 64: T-Zellpopulationen im PLK von RT2-Mäusen nach CIT.	173
Abb. 65: Entwicklung eines Diabetes mellitus in RT2-Mäusen.....	248
Abb. 66: PD-1 Expression im PLK von RT2-Mäusen nach CIT.....	248

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Übersicht über ausgewählte klinische Studien innerhalb der T-Zell Therapie zur Behandlung maligner Tumore.	34
Tab. 2:	Auflistung gängiger Positron-emittierender Radionuklide für die PET.	52
Tab. 3:	Auflistung der verwendeten Geräte.	66
Tab. 4:	Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien.	67
Tab. 5:	Auflistung der in den <i>in vivo</i> Studien eingesetzten Antikörper.	68
Tab. 6:	Auflistung der in der Zellkultur eingesetzten Antikörper.	68
Tab. 7:	Auflistung der verwendeten Antikörper für die Durchflusszytometrie am LSR-II.	69
Tab. 8:	Auflistung der verwendeten Antikörper für die Durchflusszytometrie am LSR Fortessa.	70
Tab. 9:	Auflistung der primären Antikörper für die Immunhistochemie.	71
Tab. 10:	Auflistung der Antikörper für die Immunfluoreszenz.	71
Tab. 11:	Auflistung der synthetischen Oligonukleotide für Genotypisierungen.	72
Tab. 12:	Zusätze für das T-Zellmedium.	72
Tab. 13:	Sonstige Puffer und Lösungen.	73
Tab. 14:	PCR-Reaktionsmix für die Genotypisierung transgener Mauslinien.	76
Tab. 15:	Temperaturprogramm für die Genotypisierung transgener Mauslinien.	76
Tab. 16:	Zusätze zur Kultivierung von Tag2-Th1-Zellen.	80
Tab. 17:	Parameter der T2-gewichteten „3D-turbo spin echo“ Sequenzen für MRT-Aufnahmen.	89
Tab. 18:	„Gating“-Strategie zur Identifikation unterschiedlicher Immunzellpopulationen.	100
Tab. 19:	„Gating“-Strategie zur Differenzierung von T-Zell-Subpopulationen.	101
Tab. 20:	„Gating“-Strategie zur näheren Charakterisierung der CD4- und CD8-Subpopulationen.	102
Tab. 21:	Detaillierte Statistik zur quantitativen Bestimmung der p16 ^{Ink4a} und Ki67 Signale.	122
Tab. 22:	Detaillierte Statistik zur durchflusszytometrischen Analyse von Milz und PLK aus RT2-Mäusen nach CIT.	174

Abkürzungsverzeichnis

%ID/cm ³	Prozent der injizierten Dosis pro Kubikzentimeter
¹⁸ F-FDG	¹⁸ F-Fluoro-Desoxy-Glucose
a.u.	Willkürliche Einheiten (engl. " <i>Arbitrary Units</i> ")
ACT	adoptiver Zelltransfer (engl. " <i>Adoptive Cell Transfer</i> ")
ADAM	Metalloprotease (engl. " <i>a Disintegrin and Metalloproteinase Domain-containing Protein</i> ")
ALK	axillärer Lymphknoten
APC	Allophycocyanin
APC-Cy7	Allophycocyanin-Cyanin 7
ASDCL	Acetatchloresterase
AUC	Fläche unter der Kurve (engl. " <i>Area Under the Curve</i> ")
BGO	Bismuth-Germanat
CD	Differenzierungsmerkmal einer Zelle (engl. " <i>Cluster of Differentiation</i> ")
CD62L	L-Selektin
CTLA-4	Zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Antigen 4 (engl. " <i>Cytotoxic T-Lymphocyte-associated Protein 4</i> ") (CD152)
CTL	zytotoxische T-Zelle (engl. " <i>Cytotoxic T Lymphocyte</i> ")
CIT	Checkpoint-Inhibitor-Therapie
CXCL	CXC-Ligand (Chemokin)
CXCL9	IFN- γ -induziertes Chemokin (auch MIG)
CXCL10	IFN- γ -induziertes Protein 10 (auch IP-10)
DAMPs	Gefahr-assoziierte molekulare Strukturen (engl. " <i>Danger Associated Molecular Patterns</i> ")
DC	Dendritische Zelle (engl. " <i>Dendritic Cell</i> ")
DMEM	Zellkulturmedium (engl. „ <i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i> ")
DNA	Deoxyribonukleinsäure (engl. " <i>Desoxyribonucleic Acid</i> ")
ERBB2IP	engl. " <i>ErbB2 Interacting Protein</i> "
EMA	Europäische Arzneimittelbehörde (engl. " <i>European Medicines Agency</i> ")
FACS	Durchflusszytometrie (ugs.; engl. " <i>Fluorescent Activated Cell Sorting</i> ")
FCS	fötales Kälberserum (engl. „ <i>Fetal Calf Serum</i> ")
FDA	US-Amerikanische Lebens- und Arzneimittelbehörde (engl. " <i>U. S. Food and Drug Administration</i> ")

FBP	gefilterte Rückprojektion (engl. " <i>Filtered Back Projection</i> ")
FMO	Fehlfarbenkontrolle für die Durchflusszytometrie (engl. " <i>Fluorescent Minus One</i> ")
FoxP3	" <i>Forkhead-Box</i> "-Protein P3
FOV	Sichtfeld eines Scanners (engl. " <i>Field of View</i> ")
FSC	vorwärts gestreutes Licht (engl. " <i>Forward Scatter</i> ")
GAS	Gamma-aktivierbare Gensequenz
H&E	Hämatoxylin & Eosin
H3K9me3	Trimethyliertes H3 Histon
HEV	postkapilläre Venole (engl. " <i>High Endothelial Venule</i> ")
hi	hohe Expressionsrate eines Zelloberflächenproteins (engl. „ <i>high</i> “)
HP1 γ	Heterochromatin Protein 1 Gamma
<i>i.p.</i>	intraperitoneal
<i>i.v.</i>	intravenös
IC	Immuncheckpoint (ugs. Checkpoint)
ICB	IC-Blockade
IFGR	IFN- γ Rezeptor
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-2	Interleukin-2
IP-10	IFN- γ induziertes Protein 10 (CXCL10)
iRECIST	" <i>Immune-Related</i> " RECIST
IR	Interferon Regulationsfaktor
ISG	Interferon-stimuliertes Gen
IVC	individuell ventilierte Käfige (engl. „ <i>Individually Ventilated Cages</i> “)
JAK	Januskinase
LAG-3	Lymphozyten Aktivierungsgen 3 (engl. „ <i>Lymphocyte Activation Gene 3</i> “) (CD223)
LCMV	lymphozytäres Choriomeningitis Virus
LK	Lymphknoten
lo	geringe Expressionsrate eines Zelloberflächenproteins (engl. „ <i>low</i> ““)

LOR	Koinzidenzlinie (engl. " <i>Line of Response</i> ")
LPS	Lipopolysaccharid
LSO	Luthetiumoxyorthosilikat
mAb	monoklonaler Antikörper (engl. " <i>Monoclonal Antibody</i> ")
MACS [®]	Magnetische Zellsortierung (engl. " <i>Magnetic Activated Cell Sorting</i> ")
MAGE-1	Melanom-assoziiertes Antigen 1 (engl. " <i>Melanom-Associated Antigen 1</i> ")
MAR	Maus-anti-Ratte
MHC	Haupthistokompatibilitäts-Komplex (engl. " <i>Major Histocompatibility Complex</i> ")
MIG	IFN- γ -induziertes Chemokin (engl. " <i>Monokine Induced by Gamma-Interferon</i> ") (auch CXCL9)
MPO	Myeloperoxidase
MRT	Magnetresonanztomograph bzw. Magnetresonanztomografie
n.d.	nicht definiert
NaCl	Natriumchlorid
Neutrophile	ugs. für neutrophile Granulozyten
NF-K β	Transkriptionsfaktor (engl. " <i>Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of Activated B-Cells</i> ")
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
\emptyset 2Gy	Scheinbestrahlung
ORR	Gesamt-Ansprechquote auf eine Therapie (engl. " <i>Overall Response Rate</i> ")
OS	Gesamt-Überlebensrate (engl. " <i>Overall Survival</i> ")
OSEM	iteratives Verfahren zur Bildrekonstruktion (engl. " <i>Ordered Subset Expectation Maximization</i> ")
p16 ^{Ink4a}	Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor 2A (engl. " <i>Cyclin-Dependent Kinase (CDK) Inhibitor 2A</i> ", ein Inhibitor von CDK4)
p21 ^{Cip1}	Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor 1 (engl. " <i>Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 1</i> ")
p53	Tumorsuppressorprotein 53
PAMPs	Pathogenen-assoziierte molekulare Strukturen (engl. " <i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i> ")
PBS	Phosphat-gepufferte Lösung (engl. " <i>Phosphat-buffered Saline</i> ")
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (" <i>Polymerase Chain Reaction</i> ")

PE	Phycoerythrin
PECAM-1	Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül (engl. " <i>Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule</i> ") (CD31)
PEG	Polyethylenglykol
PD-1	Programmierter Zelltod-Rezeptor (engl. " <i>Programmed cell Death 1</i> ") (CD279)
PD-L1	PD-1 Ligand 1 (engl. " <i>Programmed cell Death 1 Ligand 1</i> ") (CD274)
PD-L1/LAG-3	Antikörpercocktail aus anti-PD-L1 und anti-LAG-3 mAbs
PD-L2	PD-1 Ligand 2 (engl. " <i>Programmed cell Death 1 Ligand 2</i> ") (CD273)
PET	Positronen-Emissions-Tomografie
pHP1 γ	phosphoryliertes HP1 γ
PLK	peripankreatischer Lymphknoten
pMHC	Peptid-MHC-Komplexe (pMHC-I bzw. pMHC-II)
PMMA	Polymethylmethacrylat
PMT	Photoelektronenvervielfacher (engl. " <i>Photomultiplier Tube</i> ")
PRRs	Mustererkennung Rezeptoren (engl. " <i>Pattern Recognition Receptors</i> ")
Rb	Retinoblastomprotein
RECIST	Kriterien für die Bewertung des Ansprechens der Behandlung bei soliden Tumoren (engl. " <i>Response Evaluation Criteria of Solid Tumors</i> ")
RF-Puls	Radiofrequenzpuls
RIP1	Rateninsulinpromotor
RPMI	Zellkulturmedium (engl. " <i>Roswell-Park-Memorial-Institute 1640 Medium</i> ")
RT2	RIP1-Tag2 (murines Inselzellkarzinommodell)
SA- β -Gal	Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase
ScFv	künstlich hergestelltes Antikörperfragment (engl. " <i>Single Chain Variable Fragment</i> ")
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (engl. " <i>Standard Error of the Mean</i> ")
Sham	Scheinbehandlung
SSC	seitwärts gestreutes Licht (engl. " <i>Sidewards Scatter</i> ")
STAT	Transkriptionsfaktor (engl. " <i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i> ")
SV40	Simian Virus 40
TA	Tumorantigen

Tag2	großes T-Antigen
Tcf1	Transkriptionsfaktor (engl. " <i>T Cell Factor 1</i> ")
T _{ex}	final inhibierte T-Zelle (engl. " <i>Terminally Exhausted T Cell</i> ")
T _{sc}	T-Zelle mit Stammzell-ähnlichen Eigenschaften (engl. " <i>Stem cell-like T cell</i> ")
Tfh	T-Follikuläre Helferzellen
Th1	T-Helferzelle vom Typ 1
Th17	T-Helferzelle vom Typ 17
Th2	T-Helferzelle vom Typ 2
T _H 1-Zelle	IFN- γ produzierende Tag2-spezifische Th1-Zelle
TILs	Tumor-infiltrierende T-Zellen (engl. " <i>Tumor-Infiltrating Lymphocytes</i> ")
T _{reg}	regulatorische T-Zelle
TLRs	Toll-artige Rezeptoren (engl. " <i>Toll-Like Receptors</i> ")
TME	Mikromilieu eines Tumors (" <i>Tumor Microenvironment</i> ")
TNF	Tumor Nekrosefaktor
TNFR1	TNF-Rezeptor 1
TP53	Tumorsuppressorgen von p53
V	Volumen
UV	Ultraviolett
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (engl. " <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> ")
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl- β -D-Galactopyranosid
VOI	Betrachtungsvolumen (engl. " <i>Volume of Interest</i> ")

SI-Einheiten

Bq	Bequerel
cm ³	Kubikzentimeter
eV	Elektronenvolt
Gy	Gray
h	Stunden
k	Kilo
L	Liter
M	Mega
m	milli
M	Molar
MHz	Megahertz
min	Minuten
n	nano
s	Sekunden
T	Tesla
μ	mikro

Danksagung

Zu allererst möchte ich Herrn Professor Dr. Bernd Pichler für die Möglichkeit danken, meine Doktorarbeit am Institut für Präklinische Bildgebung und Radiopharmazie der Werner Siemens-Stiftung in Tübingen durchzuführen. Somit ermöglichte er mir einen neuen fachlichen Fokus auf die biomedizinische Forschung mit starkem Bezug zu translationalen Fragestellungen zu setzen und einen umfangreichen Eindruck von der präklinischen Forschung zu erhalten. Auch für die Möglichkeit, an internationalen Konferenzen teilzunehmen, dort meine eigenen Erkenntnisse in internationalen Fachkreisen zu diskutieren und Kontakte zu knüpfen bin ich Professor Dr. Bernd Pichler sehr dankbar. Mein besonderer Dank gilt der enormen Mühe und Zeit, die er in meine fachliche und berufliche Entwicklung investiert hat und das Vertrauen, das er meiner Arbeit entgegengebracht hat. Nicht zuletzt dadurch habe ich enorme wissenschaftliche Freiräume genossen, die ich in meine Dissertation und den daraus entstandenen Projekten einbringen konnte.

Dr. med. Manfred Kneilling möchte ich für die außerordentliche Betreuung dieser Arbeit danken. Er hatte zu jeder Zeit ein offenes Ohr für meine Fragen, bot Hilfe und konstruktive Kritik bei der Versuchsplanung und ermutigte mich immer mit seinem unerschütterlichen Enthusiasmus. Auch für das Angebot, meine Arbeit Korrektur zu lesen und die damit verbundene Geduld und Zeit die er aufgewendet hat, möchte ich mich herzlich bedanken. Nicht zuletzt möchte ich mich auch für das tolle freundschaftliche Verhältnis bedanken was ungemein zum guten Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Danken möchte ich auch Herrn Professor Dr. Hans-Georg Rammensee für die Möglichkeit des fachlichen Austauschs mit Doktoranden außerhalb des Werner Siemens Imaging Centers im Rahmen des Forschungsverbundes „SFB685 - Immuntherapie“, für das tolle Klima, dass durch Seminare und Tagungen gefestigt wurde und, nicht zuletzt, für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit.

Weiter möchte ich Professor Dr. med. Martin Röcken für eine sehr gelungene und fruchtbare Kooperation danken. Auch seinen Mitarbeitern aus der Hautklinik des Universitätsklinikums Tübingen, vor allem Ellen Brenner, Birgit Fehrenbacher und

Renate Nordin, aber auch allen anderen Mitarbeitern, die mit ihrer tatkräftigen fachlichen Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich herzlich danken.

Zudem möchte ich meinen Kooperationspartnern Professor Dr. med. Letitia Quintanilla-Martinez de Fend und ihren Mitarbeitern am Institut für Pathologie für die fachliche Unterstützung, durch die ich sehr viel lernen durfte, danken. Auch Professor Dr. Martin Eichner, Dr. med. vet. Franz Iglauer und Dr. Carsten Calaminus, die an den Tierversuchsanträgen und statistischen Gutachten dieser Arbeit beteiligt waren, gilt mein Dank.

Weiter möchte ich mich herzlich bei den Mitarbeitern der Radiopharmazie für die qualitativ hochwertige ^{18}F -FDG-Produktion, welche für diese Arbeit von wesentlicher Bedeutung war, sowie den technischen Angestellten der präklinischen Bildgebung, die mich immer tatkräftig in der Durchführung meiner Experimente unterstützt haben, bedanken. Hervorheben möchte ich hier vor allem Daniel Bukala, Maren Harant, Linda Schramm und Sandro Aidone, die mir durch ihre exzellente Praxiserfahrung wertvolle Hilfe und Ratschläge boten.

Besonderer Dank gilt auch meinen Kollegen Dr. med. Dominik Sonanini und Dr. med. Johannes Schwenck für die anregenden und sehr zielführenden, fachlichen Diskussionen. Zudem danke ich der ganzen Arbeitsgruppe um Dr. med. Manfred Kneilling für das sehr persönliche, hilfsbereite und inspirierende Arbeitsklima, wodurch auch gemeinsame nationale sowie internationale Konferenzreisen neben dem akademischen Austausch in sehr schöner Erinnerung geblieben sind.

Ein großer Dank gilt des Weiteren allen Mitarbeitern des Werner Siemens Imaging Centers, die immer zu einer angenehmen, freundlichen und hilfsbereiten Arbeitsatmosphäre beitragen. Vor allem möchte ich mich bei Fabian Schmid und Roman Mehling, Dr. Mario Amend und Dr. Julia Schmitt für das freundschaftliche Umfeld, die Aufmunterung im oft stressigen Laboralltag, den Ansporn und den Glauben an mich und meine Arbeit bedanken.

Allen Tierpflegern, besonders Isabel Sehnke, möchte ich ein herzliches Dankeschön für die großartige Unterstützung in der Betreuung und Pflege der Versuchstiere aussprechen.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei meinen Freunden für Ihre große Teilnahme, ihre Geduld und die stets aufbauenden Worte.

Abschließend möchte ich mich noch von ganzem Herzen bei meinen Eltern und meinen Geschwistern bedanken, die mich in jeglichen Situationen unterstützt haben, mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat zu Seite standen und immer an mich und meine Fähigkeiten geglaubt haben.

1 Einleitung

1.1 Maligne Tumore

Maligne Tumore, umgangssprachlich als Krebs bezeichnet, sind bösartige Geschwülste und zählen neben den Herz-Kreislaufkrankungen mit einem Anteil von knapp 25% zu den häufigsten Todesursachen in Deutschland (Statistisches Bundesamt, 2019).

Maligne Tumore entstehen durch die Entartung körpereigener Zellen und treten daher aus den unterschiedlichsten Geweben hervor. Charakterisiert durch ihre hohe Zellteilungsfähigkeit unterliegen sie meist starkem Wachstum und sind zudem durch eine hohe Mutationsrate schnell anpassungsfähig. Durch die große Anzahl unterschiedlichster Tumorarten, deren hoher Mutationsneigung und der Fähigkeit zur Metastasierung stellen maligne Tumore somit eine der größten Herausforderungen für Medizin und Forschung hinsichtlich der Entwicklung erfolgreicher und neuer Behandlungskonzepte für Tumorkranke dar^{1,2}.

1.1.1 Entstehung und Eigenschaften maligner Tumore

Zu Beginn einer Tumorerkrankung steht meist eine Zelle, deren Wachstum nicht mehr durch die zelleigenen Regulationsmechanismen kontrolliert werden kann. Grund dieser Fehlregulation sind Mutationen im Bereich bestimmter Gene, sogenannter Proto-Onkogene oder Tumor-Suppressorgene, welche für die Regulation des Zellzyklus zuständig sind. Diese Mutationen können durch externe chemische und physikalische Einflüsse wie Nikotin, Dioxine, UV- und Radiostrahlung, aber ebenso durch Stress, Alkohol und Virusinfektionen verursacht werden. Auch familiäre genetische Veranlagungen spielen eine wesentliche Rolle³.

Ein häufiges und sehr gut erforschtes Tumor-Suppressorgen ist TP53 welches in den meisten Tumoren modifiziert vorliegt⁴. Das daraus resultierende Protein p53 ist ein Transkriptionsfaktor, welcher den Zellzyklus normaler Zellen verlangsamt, um DNA-Reparaturen zu erleichtern oder nach dessen starken Anhäufung in der Zelle über weitere Mechanismen zu einer Induktion des programmierten Zelltods (Apoptose)

führt. Eine Mutation von p53 äußert sich meist im Verlust der Proteinfunktion, woraufhin der Zellzyklus außer Kontrolle gerät: Die Zelle ist nicht mehr in der Lage, DNA-Schäden zu reparieren und in Folge dessen können weitere Genmutationen auftreten. Aufgrund des Verlustes der Apoptose-Fähigkeit kann es schließlich zur Ausbildung von Tumoren kommen⁵.

Der Funktionsverlust von p53 ist nur einer von vielen Prozessen, welcher maßgeblich zur Krebsentstehung beitragen kann und weit am Anfang einer mehrstufigen Karzinogenese steht. Maligne Tumore sind das Ergebnis mehrerer, sich addierender Mutationen, welche die Fehlregulation einer Zelle graduell vorantreiben und ab einem kritischen Punkt nicht mehr kontrolliert werden können⁶. Hanahan und Weinberg haben bereits 2000 sechs physiologische Modifikationen einer Zelle bzw. einem Verbund maligner Zellen definiert, welche grundlegend zur Tumorentstehung beitragen und gleichzeitig die mehrstufige Entwicklung der Karzinogenese charakterisieren.

Dazu zählen (1) die Unabhängigkeit der Zelle von externen Wachstumssignalen und damit eine gesteigerte Zellproliferation, (2) die Inhibition von Signalen, welche die Proliferation unterdrücken, (3) die Repression des programmierten Zelltods (Apoptose-Resistenz), (4) ein unbegrenztes Potential zur Replikation (Zellteilung), (5) die Neubildung von Blutgefäßen (Angiogenese) und schließlich (6) die Eigenschaft zur Invasion in fremde Gewebe und damit die Ausbildung von Metastasen¹ (**Abb. 1**). 2011 wurden diese klassischen „*Hallmarks of cancer*“, ebenfalls von Hanahan und Weinberg, um zwei weitere Charakteristika, welche erst durch die intensive Erforschung des Tumorstoffwechsels und der Mikroumgebung des Tumors festgelegt werden konnten, ergänzt: (7) Tumore sind in der Lage, ihren Stoffwechsel an ihr schnelles Wachstum und ihre Umgebung anzupassen und (8) können zudem einer gegen den Tumor gerichteten (anti-tumoralen) Immunantwort entgehen².

Darüber hinaus wurden zwei Phänomene definiert, welche maßgeblich zur Ausbildung dieser Eigenschaften beitragen und die dynamischen Prozesse des Tumorwachstums unterstützen. Diese definieren sich erstens durch die Instabilität des Genoms, was sich in einer hohen genetischen Variabilität maligner Zellen und dadurch einer hohen Anpassungsfähigkeit der Tumorzellen an externe Bedingungen bemerkbar macht und zweitens begünstigen pro-inflammatorische Immunzellen

durch die Sezernierung pro-inflammatorischer Mediatoren und Wachstumsfaktoren die Modulation der extrazellulären Matrix und die Ausbildung von Blutgefäßen und schaffen so Nischen, in denen ideale Bedingungen für maligne Zellen und deren Entwicklung herrschen² (Abb. 1).

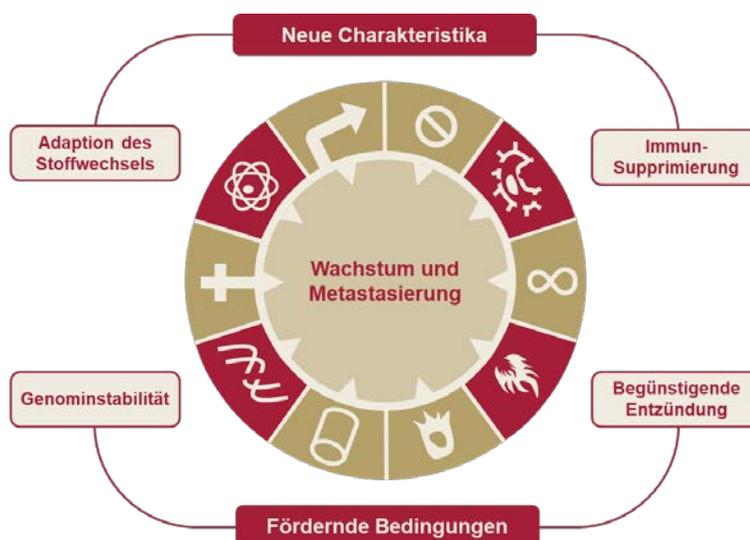


Abb. 1: Die "Hallmarks of Cancer" nach D. Hanahan und R.A. Weinberg. Zu den klassischen Eigenschaften, welche das Wachstum und die Metastasierung von malignen Zellen begünstigen, zählen eine gesteigerte Zellproliferation durch die Unabhängigkeit von Wachstumsfaktoren, die Insensitivität gegenüber inhibitorischen Signalen, eine unbegrenzte Proliferationsfähigkeit, die Fähigkeit zur Metastasierung und Angiogenese und eine hohe Apoptose-Resistenz (braune Symbole, im Uhrzeigersinn). Zu den neuen Eigenschaften zählen die Stoffwechseladaption um das Wachstum zu sichern und die Fähigkeit einer Zerstörung durch anti-tumorale Immunzellen zu entgehen (rote Symbole oben). Die Bedingungen, welche die Ausbildung dieser Eigenschaften unterstützen, sind die Instabilität des eigenen Genoms und die Ausbildung einer Nische durch pro-inflammatorische Zellen in der Mikroumgebung des Tumors (rote Symbole, unten) (modifiziert nach D. Hanahan und R.A. Weinberg, 2011)².

Heutzutage wird ein Tumor also nicht mehr als ein reiner entarteter Gewebeverband angesehen, welcher sich im Idealfall durch eine Resektion entfernen oder durch Bestrahlungen und Chemotherapeutika verkleinern und behandeln lässt; ein Tumor ist vielmehr ein komplexes Gewebesystem, bestehend aus malignen Zellen und einem einzigartigen Mikromilieu, dem „*Tumor microenvironment*“ (TME).

Das TME besteht aus vielen unterschiedlichen Zelltypen. Diese stellen unter anderem die Blutversorgung und damit den erhöhten Nährstoffbedarf sicher oder bilden ein Stützgewebe, das sogenannte Stroma. Einige in das Tumorgewebe einwandernde Immunzellen können zudem das Tumorstadium fördern. Der

gegenseitige Einfluss von Immunzellen und malignen Tumorzellen ist von zentraler Bedeutung für diese Arbeit und wird später näher erläutert.

1.1.2 Tumorantigene

Der menschliche Körper verfügt über zahlreiche Mechanismen um einer Entstehung und dem Wachstum maligner Tumore entgegenzuwirken. Angefangen bei der Reparatur von DNA-Schäden bis hin zur Ausbildung einer anti-tumoralen Immunantwort werden Tumore an ihrer Progression gehindert und im besten Fall vom Körper selbst eliminiert. Bei der Ausbildung einer anti-tumoralen Immunantwort spielen Tumor-spezifische oder Tumor-assoziierte Antigene, kurz Tumorantigene (TAs), eine zentrale Rolle.

TAs unterscheiden sich zunächst in ihrem Ursprung voneinander: Sie können in Folge von Genmutationen als vermeintlich körperfremde Genprodukte auftreten (Tumor-spezifische Antigene), in übermäßiger Zahl exprimiert werden (Tumor-assoziierte Antigene) oder entstammen stillgelegten Genen aus der Embryonalentwicklung, welche aufgrund von Fehlregulierungen wieder exprimiert werden („*Cancer/Testis*“-Antigene)⁷. Zudem gelten einige virale Proteine als TAs, so beispielsweise einzelne Genprodukte des humanen Papillomavirus⁸ oder das große T-Antigen („*Large T-Antigen*“, Tag2) des Simian Virus 40 (SV40)⁹.

TAs befinden sich innerhalb einer Zelle oder als Oberflächenproteine auf der Zellmembran, lokal in der extrazellulären Matrix oder im Blutkreislauf. Im Idealfall werden sie von den Zellen des Immunsystems als „fremd“ bzw. „anormal“ erkannt und lösen dadurch eine anti-tumorale Immunantwort aus.

Vor allem die im Blut zirkulierenden TAs werden in der molekularen Diagnostik als Tumormarker herangezogen. Seit 1991 erstmals das Gen eines humanen TAs, das „*Melanoma Antigen 1*“ (MAGE-1), welches von Immunzellen als fremd erkannt wurde, von Boon und van der Bruggen erfolgreich kloniert werden konnte¹⁰, tragen TAs maßgeblich zur Entwicklung von personalisierten Immuntherapien bei. Vor allem Zell-basierte Immuntherapien und Vakzinierungsstrategien profitieren von dieser Entdeckung und der damit verbundenen Entwicklung molekularer Methoden zur Detektion und Klonierung neuartiger TAs. Heutzutage sind bereits Tausende von TAs bekannt und stehen mit Informationen zu deren Herkunft und Gensequenz

weitgehend in allgemein zugänglichen Datenbanken zur Verfügung¹¹. Dadurch wird ein ständig wachsendes Wissen geschaffen, was enorm zur Entwicklung neuer, personalisierter Immuntherapien beiträgt.

1.2 Das Immunsystem

Das Immunsystem stellt eine wichtige Komponente bei der Behandlung von malignen Tumoren dar. Es kann einerseits zur Bekämpfung entarteter Zellen beitragen, andererseits aber auch deren Wachstum und Entwicklung fördern².

Das Immunsystem wird grob in zwei Bereiche eingeteilt: Das angeborene und das adaptive Immunsystem. Das angeborene Immunsystem ist von Geburt an vorhanden und verfügt, anders als das adaptive Immunsystem, über keine Spezifität und kein immunologisches Gedächtnis. Angefangen bei physikalischen Barrieren wie der Haut, chemischen Barrieren wie der Magensäure und biologischen Barrieren wie die Enzyme in der Tränenflüssigkeit und letztendlich den im Blut zirkulierenden und in Geweben persistierenden Immunzellen stellt die angeborene Immunität die erste Barriere gegenüber Pathogenen dar.

Zu den zellulären Komponenten des Immunsystems zählen unter anderem Makrophagen, Dendritische Zellen („*Dendritic Cells*“, DCs), Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und neutrophile Granulozyten (kurz: Neutrophile)³.

1.2.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem zeichnet sich durch eine schnelle und unspezifische Erkennung endogener Alarmsignale und exogener Pathogene aus. Zur Erkennung dienen den ständig im Körper patrouillierenden Immunzellen molekulare Strukturen, welche in Folge von Infektionen, DNA-Fehlsynthesen oder falsch gefalteten Proteinen in der Zelle und auf der Zelloberfläche auftreten können oder von beschädigten Zellen in den extrazellulären Raum entlassen werden. Durch solche „*Danger*“- oder „*Pathogen-associated Molecular Patterns*“ (DAMPs/PAMPs) sind Zellen des angeborenen Immunsystems (wie Makrophagen, NK-Zellen und Neutrophile), wie auch Endothelzellen¹², in der Lage, zwischen physiologisch intakten Zellen und infizierten oder gar fehlregulierten Zellen sowie Pathogenen zu

unterscheiden^{13,14}. Die Erkennung dieser molekularen Fingerabdrücke (beispielsweise Oligosaccharid-Fragmente von Hyaluronsäure, mitochondriale DNA - reich an unmethylierten CpG Dinukleotiden - oder hochkonservierte pathogene Peptidstrukturen von Viren und Bakterien oder anderen Mikroben) erfolgt über spezielle Rezeptoren, die „*Pattern Recognition Receptors*“ (PRRs)¹⁴.

PRRs werden zunächst unterteilt in lösliche, membranständige und intrazelluläre Rezeptoren. Lösliche PRRs können nach deren Bindung eine Komplement-Kaskade auslösen, woraufhin die Oberfläche von Pathogenen mit Antikörpern und Proteinen des Komplementsystems benetzt wird (Opsonierung) um eine Phagozytose durch phagozytierende Zellen anzuregen.

Die wohl prominentesten membranständige PRRs sind die Toll-like Rezeptoren (TLRs), welche für die Induktion von Entzündungsreaktionen und die Aktivierung des adaptiven Immunsystems verantwortlich sind. Heute zählt man etwa 13 Rezeptoren zur Familie der TLRs. TLR4, ein sehr gut erforschter PRR, erkennt das bakterielle Lipopolysaccharid (LPS). Die Aktivierung von TLR4 löst eine Signalkaskade aus, an deren Ende über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors „*Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of activated B-Cells*“ (NF-κB) proinflammatorische Zytokine, wie z.B. der Tumor Nekrose Faktor (TNF) und Chemokine gebildet und ausgeschüttet werden. Über Chemotaxis werden weitere Immunzellen angelockt. Dies führt zudem zu einer gesteigerten Expression co-stimulierender Zelloberflächenmoleküle (wie CD80 und CD86), welche essentiell für die Sezernierung weiterer Zytokine und letztendlich für die Aktivierung des angeborenen wie auch des adaptiven Immunsystems sind^{15,16}.

Über dieses System werden fehlprogrammierte bzw. infizierte Zellen und Pathogene von physiologisch intakten Zellen abgegrenzt und von Zellen des angeborenen Immunsystems eliminiert. Die als verdächtig detektierten Zellen oder Pathogene werden schließlich von Neutrophilen, DCs oder Makrophagen phagozytiert und im Zellinneren prozessiert. Anschließend werden spezifische Peptidsequenzen, welche nun als Antigene dienen, über den Haupthistokompatibilitätskomplex der Klasse II („*Major histocompatibility complex-II*“, MHC-II) auf der Zelloberfläche präsentiert. Die aktivierten Antigen-präsentierenden Zellen (APCs), vorwiegend DCs, wandern nun in den drainierenden Lymphknoten, wo das an MHC-II gebundene Antigen den T-

Lymphozyten (T-Zellen) präsentiert wird. Die Erkennung des Antigens durch T-Zellen ist der erste Schritt vieler feinregulierter Prozesse zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems und zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses³.

Neben MHC-II, dessen Expression hauptsächlich auf „professionelle“ APCs wie Makrophagen, DCs, Neutrophile und B-Zellen beschränkt ist, exprimieren alle kernhaltigen Zellen MHC der Klasse I (MHC-I). Über MHC-I werden hauptsächlich endogene Peptidfragmente an der Zelloberfläche präsentiert und stellen folglich ein Abbild des zelleigenen Proteoms dar. Über diese Peptid/MHC-I-Komplexe (pMHC-I) können NK- und zytotoxische T-Zellen körpereigene, intakte Zellen von Virus-infizierten oder fehlprogrammierten Zellen unterscheiden. Um einer Immunantwort zu entgehen, reduzieren Tumorzellen oder von Viren infizierte Zellen wiederum oftmals ihre MHC-I-Expression. Diese reduzierte Expression kann von NK-Zellen registriert werden und bereits eine zytotoxische Immunantwort auslösen („*Missing Self*“ Hypothese)¹⁷. Indem sie die Zelloberflächenexpression von MHC-I quantitativ überprüfen, werden NK-Zellen also, im Gegensatz zu zytotoxischen T-Zellen, Antigen-unabhängig aktiviert.

1.2.2 Das adaptive Immunsystem

Das adaptive Immunsystem wird grob in zwei Bereiche unterteilt: Die humorale Antwort, die durch die Sezernierung von Antikörpern durch Plasmazellen gekennzeichnet ist, und die zelluläre Immunantwort, die hauptsächlich durch spezialisierte T-Lymphozyten vermittelt wird.

B- und T-Zellen werden wie alle Zelltypen des Blutes (inklusive Thrombozyten und Erythrozyten) aus den gleichen pluripotenten hematopoetischen Stammzellen im Knochenmark gebildet. Während B-Zellen im Knochenmark verweilen, wandern T-Zellen für ihre Reifung aus dem Knochenmark in den Thymus („*Thymus-derived cells*“)¹⁸. Die Bezeichnung „B-Zellen“, aus welchen später die Antikörper-bildenden Plasmazellen hervorgehen, stammt ursprünglich von ihrem Bildungsort in der *Bursa fabricii* bei Vögeln, einem Organ, welches in Säugetieren nicht vorhanden ist. Heute wird der Begriff jedoch vielmehr auf den englischen Ausdruck „*Bone marrow-derived cells*“, zurückgeführt³.

Alle T-Zellen besitzen das für sie typische Zell-Differenzierungsmerkmal („*Cluster of differentiation*“, CD) CD3. CD-Moleküle sind meist membranständige Glykoproteine, welche zellspezifisch exprimiert werden. Über die Charakterisierung von CD-Molekülen lassen sich verschiedene Funktionen und Entwicklungsstufen von lebenden Zellen bestimmen, was die Differenzierung in funktionelle Phänotypen erleichtert. So werden T-Zellen nach ihrer Reifung weiter in CD4-positive (+) und CD8⁺ T-Zellen unterteilt. CD8⁺ T-Zellen sind durch ihren zytotoxischen Charakter gekennzeichnet. Da CD4⁺ T-Zellen unter anderem durch die Sezernierung von Zytokinen weitere Immunzellen rekrutieren können, werden diesen Zellen primär Helferfunktionen zugeschrieben. Des Weiteren vermitteln CD4⁺ T-Zellen die Aktivierung Antikörper-produzierender B-Zellen³.

T-Zellen zirkulieren nach deren Bildung und Reifung in den primären lymphatischen Organen (Knochenmark und Thymus) ständig zwischen Lymphe und Blut. Diese Zirkulation wird durch die Expression von Zelladhäsionsmolekülen wie L-Selektin (CD62L) gesteuert. Die Bindung von L-Selektin an beispielsweise CD34 auf Endothelzellen oder GlyCAM-1 in den postkapillären Venolen („*High endothelial venules*“, HEVs) ermöglicht es den zirkulierenden T-Zellen, die Blutbahn zu verlassen und in die sekundären lymphatischen Organe wie Milz und Lymphknoten einzuwandern¹⁹. Treffen sie dort auf ein passendes Antigen, welches ihnen meist durch DCs präsentiert wird, beginnen sie in spezielle Effektorzellen zu differenzieren. Nach deren Differenzierung und exponentieller Proliferation wandert ein Teil der T-Effektorzellen schließlich über das Blut zum Ort der Entzündung¹⁴.

Die hohe Spezifität, mit welcher T-Zellen passende Antigene erkennen, resultiert aus einer Reihe genetischer Rekombinationen des T-Zellrezeptors („*T cell receptor*“, TCR) im Thymus. Ein TCR besteht aus zwei Proteinuntereinheiten, welche durch zahlreiche genetische Rekombinationen zufällig angeordnet werden. Dadurch entsteht eine enorme Vielfalt an verschiedenen Rezeptoren, wobei jede Zelle nur eine einzige Kombination beinhaltet und dadurch nur ein einziges Antigen spezifisch binden kann. Die so hochspezialisierten T-Zellen werden vor dem Verlassen des Thymus zunächst körpereigenen Antigenen gegenübergestellt. T-Zellen, welche die passenden Rezeptoren für diese „selbst-Antigene“ aufweisen, werden unmittelbar

eliminiert. Daher bleiben für die klonale Expansion nur die Zellen übrig, welche auf fremde Antigene spezialisiert sind²⁰.

Die Antigenerkennung von T-Zellen erfolgt nach dem „Schlüssel-Schloss-Prinzip“, folglich erkennt jeder TCR nur ein bestimmtes Antigen, welches den T-Zellen über MHC-Moleküle auf (professionellen) APCs präsentiert wird. Zur vollständigen Aktivierung von T-Zellen sind neben der Bindung des TCRs an pMHC jedoch weitere Signale notwendig. So stabilisiert die Bindung der CD4- bzw. CD8-Co-Rezeptoren auf T-Zellen an MHC-I/II die Interaktion zwischen dem TCR und pMHC. Zudem wird eine Co-Stimulation durch APCs benötigt. Diese Co-Stimulation wird über die Bindung von Rezeptoren und Liganden der B7-Familie, CD80 und CD86, vermittelt: CD80 bzw. CD86 auf APCs interagiert mit CD28 auf T-Zellen. Die dritte Ebene in der Aktivierung von T-Zellen bilden Zytokine wie Interferon- γ (IFN- γ) und Interleukin-2 (IL-2) welche von den T-Zellen selbst, aber auch von weiteren an der Immunantwort beteiligten Zellen ausgeschüttet werden und die Immunantwort verstärken. Diese mehrstufige Aktivierung verhindert eine unspezifische Aktivierung von T-Zellen und somit Autoimmunität. Die T-Zellaktivierung resultiert in der Bildung von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B, dem nukleären Faktor aktivierter T-Zellen (NFAT) und dem Aktivator-Protein 1 (AP-1). Diese induzieren wiederum Gene, welche für die Ausbildung von Effektorfunktionen und der Zellproliferation, aber auch für die Induktion von Apoptose zuständig sind¹⁵.

CD8⁺ T-Zellen erkennen Antigene, die über MHC-I präsentiert werden und sind in der Lage, ihre Zielzellen effektiv zu zerstören. Daher werden sie auch zytotoxische T-Zellen („*Cytotoxic T cells*“, CTLs) genannt. Eine wichtige Funktion von CD8⁺ T-Zellen ist neben der Sekretion von IFN- γ die Sezernierung von Perforin und Granzymen. Perforin vermittelt die Bildung von Poren in der Plasmamembran der Zielzelle. Granzyme können daraufhin in die Zelle eindringen und Apoptose induzieren²¹. In vielen Tumorentitäten wurden CTLs als wichtige Tumor-infiltrierende Zellpopulationen identifiziert und in klinischen Studien mit einer günstigen Prognose von Tumorpatienten assoziiert^{22,23}.

Im Gegensatz zu CD8⁺ T-Zellen erkennen CD4⁺ T-Zellen Antigene, welche von professionellen APCs, vorwiegend DCs, über MHC-II präsentiert werden²⁴. Zudem üben CD4⁺ T-Zellen meist keine zytotoxischen Funktionen aus, sind jedoch für die

Ausbildung einer effektiven und dauerhaften anti-tumoralen Immunantwort unabdingbar²⁵. Aktivierte CD4⁺ T-Zellen können viele unterschiedliche Funktionen erfüllen und werden daher in mehrere Phänotypen unterteilt. Die Differenzierung hängt stark von der T-Zellstimulierung, den Co-Stimulierenden Molekülen sowie dem sie umgebenden Zytokinmilieu ab³.

IFN- γ sezernierende CD4⁺ T-Zellen (T-Helferzellen vom Typ 1; Th1-Zellen) sind wichtige Effektorzellen innerhalb von anti-tumoralen und anti-viralen Immunantworten. Durch die Sekretion von TNF und IFN- γ aktivieren sie CTLs und regulieren deren Differenzierung, verstärken die MHC-II-Expression auf APCs und steigern die Aktivität von Makrophagen. Die Polarisierung von Th1-Zellen wird über IL-12, IFN- γ und IL-2 vermittelt und ist abhängig von einer hohen Antigenlast auf den APCs³.

Th2-Zellen vermitteln durch die Stimulation von B-Zellen, die daraufhin zu Antikörperproduzierenden Plasmazellen differenzieren, vor allem humorale Immunantworten und die Abwehr von vielzelligen Parasiten wie Helminthen. Durch die Beteiligung an der humoralen Immunantwort sind sie jedoch auch zentrale Elemente bei der Ausbildung entzündlicher Krankheiten wie dem Asthma bronchiale. Die Polarisierung von Th2-Zellen wird über IL-4, ein Zytokin, welches gleichzeitig die Polarisierung von Th1-Zellen hemmt, vermittelt und wiederum durch IL-12 gehemmt²⁶.

Neben Th1- und Th2-Zellen gibt es noch weitere bedeutende CD4⁺ T-Zellphänotypen wie Th17-Zellen oder Follikuläre T-Helferzellen (Tfh). Th17-Zellen zeichnen sich durch die Produktion von IL-17 aus und spielen eine wichtige Rolle in der Aktivierung von Neutrophilen. Tfh-Zellen sind wiederum an der humoralen B-Zellantwort beteiligt^{27,28}.

Einen weiteren wichtigen Phänotyp stellen die regulatorischen T-Zellen (T_{regs}) dar. T_{regs} sind gekennzeichnet durch die Expression des Transkriptionsfaktors „*Forkhead-Box*“-Protein P3 (FoxP3), welcher in veränderter Form Autoimmunkrankheiten verursachen kann²⁹. T_{regs} sorgen für eine Homöostase der Immunantworten. So vermögen sie den Körper vor chronischen Entzündungen zu schützen, sind dadurch jedoch auch in der Lage, anti-tumorale Immunantworten zu unterdrücken^{30,31}.

Neben ihren Funktionen zur Initiierung, Aufrechterhaltung und Regulation adaptiver Immunantworten können $CD4^+$ T-Zellen auch zytotoxische Fähigkeiten ausbilden, indem sie sich derselben Mechanismen wie $CD8^+$ T-Zellen bedienen. Somit stellen sie ein interessantes neues Forschungsgebiet innerhalb der Entwicklung neuer T-Zell-basierter Immuntherapien dar. Zytotoxische $CD4^+$ T-Zellen können aus allen $CD4^+$ T-Zell-Subtypen entstehen, die meisten $CD4^+$ CTLs sind jedoch auf die Th1-Linie zurückzuführen³².

Nach einer erfolgreichen adaptiven Immunantwort wird die Aktivität der beteiligten Immunzellen wieder heruntergefahren. Die meisten Immunzellen leiten ihren programmierten Zelltod ein. Ein geringer Anteil bleibt jedoch in Form von Gedächtniszellen im Gewebe zurück, zirkuliert im Blut oder persistiert im lymphatischen System, beispielsweise den Lymphknoten. Diese Zellen bilden das immunologische Gedächtnis und können durch erneuten Kontakt mit den entsprechenden Antigenen schnell wieder aktiv und teilungsfähig werden und folglich unmittelbar eine sekundäre adaptive Immunantwort auslösen. Das adaptive Immunsystem zeichnet sich also durch eine enorme Spezifität und ein immunologisches Gedächtnis aus³.

In manchen Fällen bleibt das Immunsystem jedoch trotz erfolgreicher Immunantwort aktiv und es kommt zu chronischen Entzündungsprozessen. Solche andauernden, fehlgeleiteten Immunantworten können einerseits, gegen körpereigene Antigene gerichtet, zu Autoimmunerkrankungen führen und andererseits eine maligne Transformation von Geweben bewirken. Zum Beispiel kann es nach einer chronischen Pankreatitis zur Ausbildung von Pankreaskarzinomen kommen³³.

Um eine Überstimulation von Immunzellen zu verhindern, werden bei längerer Aktivität und andauerndem Antigenkontakt unter anderem spezielle Rezeptoren, sogenannte Immuncheckpoints (ICs, ugs. Checkpoints), auf der Zelloberfläche ausgebildet. Sobald diese an ihre entsprechenden Liganden binden, wird die Immunantwort unterbrochen. Die Immunzellen werden in Folge dessen in ihrer Funktion gehemmt und schließlich apoptotisch. Durch diese regulatorischen Eigenschaften werden ICs mittlerweile als zentrale Elemente von Immunantworten angesehen. Vor allem bei der Entwicklung neuartiger Krebstherapien spielen diese

molekularen Schnittstellen heutzutage eine bedeutende Rolle und werden im Abschnitt 1.3.2 eingehender beschrieben.

1.3 Immuntherapien

Immuntherapien gegen Krebs konnten seit der erfolgreichen Etablierung in der Klinik rasante Fortschritte erzielen. Ohne die Ergebnisse aus intensiver, jahrzehntelanger Grundlagenforschung in Bereichen wie der Zellbiologie, der Immunologie und Virologie, aber auch der Biotechnologie und dem eingehenden Bestreben zahlreicher Forschergruppen, das Immunsystem als therapeutische Möglichkeit zur Behandlung maligner Erkrankungen heranzuziehen, wären diese Entwicklungen, welche das Feld der Krebstherapien revolutioniert haben, kaum möglich gewesen.

Dass Immunität nicht einfach nur im Körper entsteht, sondern auch durch externe Stimuli vermittelt werden kann, haben Emil von Behring und Shibasaburo Kitasato bereits 1893 im Labor von Robert Koch demonstriert. Dort haben sie durch die Verabreichung eines Serums, welches ein anti-Toxin enthielt, Immunität gegen Diphtherie in Tieren auslösen können³⁴. Eine anti-tumorale Immunreaktion wurde jedoch erstmals von William B. Coley beschrieben: Durch die Injektion einer Mixtur bakterieller Toxine konnte er das Volumen inoperabler Sarkome deutlich reduzieren³⁵. Seitdem wurden zahlreiche Ansätze zur Immuntherapie erforscht und für klinische Behandlungen zugelassen.

Während konventionelle Therapieformen zur Behandlung maligner Tumore wie die Chemo- und Strahlentherapie die Eigenschaften von Tumoren nutzen, um beispielsweise zielgerichtet deren Proliferation zu hemmen, werden Immuntherapien meist systemisch eingesetzt und regen die körpereigene Abwehr an. Immuntherapien haben dabei sehr verschiedene Angriffspunkte: Einige wirken sehr spezifisch und richten sich gegen definierte TAs. Andere Konzepte sind darauf ausgerichtet, durch die Aktivierung verschiedenster Immunzellpopulationen eine breite anti-tumorale Immunreaktion auszulösen oder zu verstärken und dabei möglichst wenig gesundes Gewebe zu zerstören.

Die Behandlungskonzepte von Immuntherapien sind dabei so zahlreich wie die Mechanismen, anhand derer Tumore versuchen sich einer Immunantwort zu

entziehen. Neben der Behandlung mit entzündungsfördernden Zytokinen wie IL-2, einer der ersten immuntherapeutischen Ansätze, welcher die Proliferation von T-Zellen stimuliert, oder Vakzinierungsstrategien mit TAs, werden beispielsweise T-Zellen verschiedener Spezifität aus Tumorbiopsien oder dem Blut isoliert, *in vitro* vermehrt und wieder in den Patienten injiziert, um Tumorzellen im Körper zielgerichtet zu bekämpfen^{36,37}. Zudem bedient man sich onkolytischer Viren, welche durch genetische Modifikationen exklusiv Tumorzellen infizieren, zerstören und zudem eine spezifische Immunreaktion gegen verbleibende Tumorzellen auslösen können³⁸.

Immuntherapien haben sich in den letzten Jahren für Patienten von vielversprechenden therapeutischen Optionen zu sehr erfolgreichen Therapieformen etabliert. Einige Behandlungen, wie beispielsweise Antikörper-basierte Therapien, sind bereits durch die US-Amerikanische Lebens- und Arzneimittelbehörde („U. S. Food and Drug Administration“, FDA) und die Europäische Arzneimittel-Agentur („European Medicines Agency“, EMA) als Behandlung erster Wahl zugelassen; viele weitere Konzepte werden noch - alleine oder in Kombination mit konventionellen Therapieformen (wie der Bestrahlung, der Chemotherapie oder weiteren zielgerichteten Therapieformen, wie beispielsweise die Behandlung mit BRAF-Inhibitoren) - klinisch erprobt.

1.3.1 Adoptive T-Zell-Therapien

Adoptive T-Zell-Therapien sind neben der Blockade von ICs vielversprechende Therapieansätze, welche bereits herausragende Tumorregressionen in einer Vielzahl von Tumorentitäten wie dem Lymphom, der Leukämie und dem Neuroblastom erzielen konnten. Diese hochpersonalisierten Therapieformen zeichnen sich durch einen adoptiven Transfer von T-Zellen aus („*Adoptive cell transfer*“, ACT) und konnten bei vereinzelt Patienten mit fortgeschrittenem metastasiertem Melanom und bei der Behandlung von B-Zell-Lymphomen zum Teil dauerhafte klinische Erfolge erzielen³⁶.

Die Entdeckung des T-Zell Wachstumsfaktors IL-2 im Jahr 1976 erleichterte die *in vitro* Kultivierung von T-Zellen und damit die Entwicklung von adoptiven T-Zell Therapien ungemein. Durch den Einsatz von IL-2 in T-Zellkulturen konnten diese ex

vivo ohne den Verlust von Effektorfunktionen kultiviert werden. Zudem wurde durch die intravenöse Injektion von IL-2 die Effektivität eines ACTs in experimentellen Tiermodellen, wie dem murinen Lymphom (FBL-3), deutlich gesteigert^{39,40}. Nachdem zudem gezeigt wurde, dass Tumor-spezifische T-Zellen, isoliert aus Biopsien von Melanom-Metastasen (somit Tumor-infiltrierende Lymphozyten, TILs), maligne Zellen *in vitro* gezielt erkennen⁴¹, konnten Rosenberg *et al.* 1988 erstmals durch eine Kombination aus einer Immunzelldepletion, einem Transfer von zuvor aus Metastasen isolierten und anschließend *in vitro* kultivierten TILs und einer Injektion von IL-2, klinische Erfolge in Patienten mit metastasiertem Melanom erzielen⁴².

Ein weiterer Meilenstein in der Entwicklung von ACTs wurde 2002 erreicht, als Dudley *et al.* durch eine kombinierte, nicht-myeloablative (das blutbildende Knochenmark nicht vollständig eliminierende) Chemotherapie zur Immunzelldepletion vor der Verabreichung von TILs die Regression von Melanom-Metastasen fördern konnten. Zudem konnte die Persistenz der transferierten T-Zellen in den Patienten noch Monate nach deren Verabreichung beobachtet werden⁴³.

Die genauen Wirkmechanismen einer Immunzelldepletion sind bis heute noch nicht vollständig geklärt. Niedrige Ansprechquoten von ACTs sind meist mit einer Infiltration von anti-inflammatorischen bzw. regulatorischen Immunzellen, wie Makrophagen, T_{regs} und myeloiden Suppressorzellen, in das randständige Tumor-Gewebe assoziiert. Diese Immunzellpopulationen können durch eine Strahlen- oder Chemotherapie reduziert werden⁴⁴⁻⁴⁷. Des Weiteren werden durch eine Immunzelldepletion die Zytokine IL-7 und IL-15, welche unter anderem die Homöostase von T-Zellen regulieren, im Serum erhöht. In Abwesenheit der endogenen zellulären Gegenspieler stehen diese Zytokine schließlich den transferierten T-Zellen zur Verfügung, was deren Proliferation und Überleben fördern kann⁴⁸⁻⁵⁰.

Als Goldstandard innerhalb der zellulären Immuntherapien werden heute meist TA-spezifische CD8⁺ CTLs eingesetzt. Eine Kombinationstherapie, bestehend aus einer initialen Immunzelldepletion und TA-spezifischen CTLs, erreichte bei Patienten mit metastasiertem Melanom Ansprechquoten von bis zu 50%^{51,52} (Tab. 1).

Zur Gewinnung TA-spezifischer CTLs für den adoptiven Transfer werden zunächst Tumorbiopsien gewonnen, zerkleinert und *in vitro* unter Zugabe von IL-2 kultiviert. Durch die für die TILs günstigen *in vitro* Bedingungen sterben die Tumorzellen ab, so dass nach ca. zwei bis drei Wochen reine T-Zellkulturen vorliegen, welche dann auf ihre Tumor-spezifische Zytotoxizität getestet werden. Die zytotoxischen Kulturen werden anschließend weiter expandiert und *in vitro* aktiviert. Nach weiteren zwei bis drei Wochen erhält man so bis zu 1×10^{11} TA-spezifische CTLs zur individuellen Behandlung der Patienten³⁶.

Tab. 1: Übersicht über ausgewählte klinische Studien innerhalb der T-Zell Therapie zur Behandlung maligner Tumore. Die ORR („*Objective response rate*“) bezeichnet die die Objektive Ansprechrate und stellt ein Maß für eine klinisch relevante Reduktion der TumorgroÙe dar. CLL: chronische lymphatische Leukämie; ALL: akute lymphatische Leukämie. (Tabelle modifiziert nach Rosenberg und Restifo, 2015)³⁶.

Zelltyp	Jahr	Tumorentität	Antigen	Patienten	ORR
TILs	1998	Melanom	<i>exome Mutationen</i>	20	55%
	1994	Melanom	<i>exome Mutationen</i>	86	34%
	2002	Melanom	<i>exome Mutationen</i>	13	46%
	2011	Melanom	<i>exome Mutationen</i>	93	56%
	2012	Melanom	<i>exome Mutationen</i>	31	48%
	2012	Melanom	<i>exome Mutationen</i>	12	38%
	2013	Melanom	<i>exome Mutationen</i>	57	40%
	2014	Zervixkarzinom (Gebärmutterhalskrebs)	<i>exome Mutationen</i>	9	33%
	2014	Cholangiokarzinom (Gallengangkrebs)	mutiertes ERB2	1	-
<i>in vitro</i> Sensibilisierung	2008	Melanom	NY-ESO-1	9	33%
	2014	Leukämie	WT-1	11	-
CAR T cells	2010	Lymphom (Lymphdrüsenkrebs)	CD19	1	100%
	2011	CLL (chronische lymphatische Leukämie)	CD19	3	100%
	2013	ALL (akute lymphatische Leukämie)	CD19	5	100%
	2014	ALL	CD19	30	90%
	2014	Lymphom	CD19	15	80%
	2014	ALL	CD19	16	88%
	2014	ALL	CD19	21	67%
	2011	Neuroblastom	GD2	11	27%
genetisch veränderte TCRs	2011	Synovialsarkom	NY-ESO-1	6	67%
	2006	Melanom	MART-1	11	45%

Aufgrund der schlechten Zugänglichkeit mancher Tumore können TILs nicht aus allen Patienten isoliert werden. Eine Alternative bietet die Isolation von T-Zellen aus den drainierenden Lymphknoten oder dem peripheren Blut. Ganz neue Möglichkeiten zur Erzeugung TA-spezifischer CTLs eröffnet zudem der Einsatz genetisch modifizierter T-Zellen, welche nach deren *in vitro* Manipulation einen hoch-affinen TA-spezifischen TCR exprimieren. Die Spezifität dieser Zellen wird durch einen Gentransfer, kodierend für konventionelle alpha-beta TCRs oder für sogenannte chimäre Antigenrezeptoren (CARs), erreicht (Abb. 2).

CARs wurden 1989 erstmals von Gross *et al.* als gentechnisch hergestellte funktionelle Rezeptoren mit Antikörperspezifität beschrieben⁵³. Da sie neben der Spezifität für ein definiertes Zelloberflächenprotein via eines Antikörperfragments („*Single chain variable fragment*“, ScFv), das den extrazellulären Teil bildet, auch Transmembran- und intrazelluläre Signaldomänen zur Aktivierung (CD3-zeta) und Co-Stimulation (CD28) enthalten, können sie völlig unabhängig von der Antigenpräsentation über MHCs aktiviert werden⁵⁴ (Abb. 3).

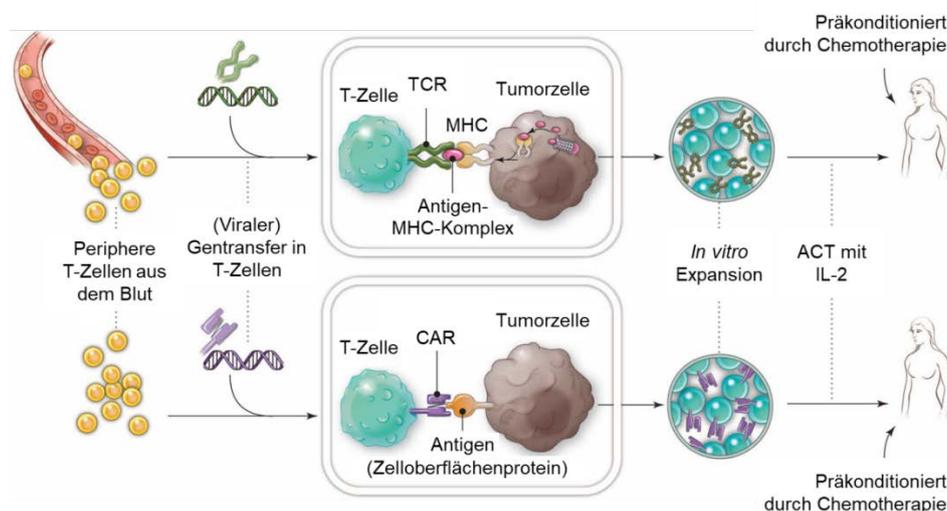


Abb. 2: Genetische Modifikationen peripherer Lymphozyten aus Patientenblut. Um einen adoptiven T-Zelltransfer zur Behandlung möglichst vieler Tumorentitäten zu ermöglichen, wurden mit Hilfe gentechnischer Methoden neue Techniken entwickelt um spezifische T-Zellen zu generieren. Dabei gibt es zwei Möglichkeiten: Durch einen Gentransfer mittels viraler Vektoren oder neuerer Techniken wie dem CRISPR/Cas-System wird die Information zur Expression entweder eines konventionellen TCRs, spezifisch für ein definiertes TA, welches über MHC auf der Zelloberfläche präsentiert wird (oben), oder eines chimären Antigenrezeptors (CAR), welcher ein bestimmtes Zelloberflächenprotein auf der Tumorzelle erkennt, zur Expression auf der Zelloberfläche in die zu transferierenden T-Zellen eingefügt. Nach einer *in vitro* Expansion werden die transgenen T-Zellen in

die Patienten, welche vorher einer Immunzelldepletion ausgesetzt wurden, transferiert (modifiziert nach Rosenberg und Restifo, 2015)³⁶.

Neben der Auswahl des spezifischen Ziel-Antigens der transgenen TCRs oder CARs spielt die Selektion des T-Zell Phänotyps eine wesentliche Rolle. Präklinische Studien konnten zeigen, dass CTLs, welche in ihrer Differenzierung noch nicht weit fortgeschritten waren oder Funktionen zentraler T-Gedächtniszellen erfüllten, nach deren adoptiven Transfer eine stärkere anti-tumorale Antwort hervorriefen und länger in der Zirkulation nachweisbar waren, als beispielsweise T-Effektor/Gedächtniszellen^{55,56}.

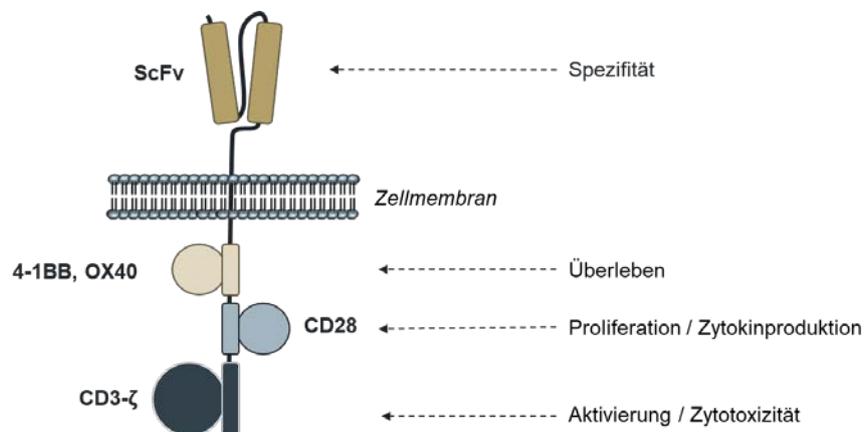


Abb. 3: Schematische Darstellung eines chimären Antigenrezeptors (CAR) der dritten Generation. Während die erste Generation an CARs lediglich den extrazellulären Teil, die ScFv-Domäne, und eine intrazelluläre Signaldomäne (CD3-zeta) beinhaltete, wurden die zweite und dritte Generation an CARs, so wie sie heutzutage klinisch zum Einsatz kommen, zusätzlich mit Domänen zur Steigerung der Effektorfunktion ausgestattet. Dabei wurden Aktivierungsdomänen (CD3-zeta, erste Generation) und Domänen zur Kostimulation und Förderung von T-Zellfunktionen (CD28 und 4-1BB bzw. OX40) eingebracht (zweite bzw. dritte Generation) (modifiziert nach Casucci und Bondanza, 2011)⁵⁴.

Obwohl der Fokus von ACTs weitgehend auf einem Transfer von CD8⁺ T-Zellen liegt, besitzen auch CD4⁺ T-Zellen enormes Potenzial, eine anti-tumorale Immunantwort zu induzieren. Experimentelle Studien konnten bereits für TA-spezifische Th1-, Th2- und Th17-Zellen starke, gegen murine Tumore gerichtete Effekte demonstrieren⁵⁷⁻⁶⁰. Dass CD4⁺ T-Zellen gegenüber CTLs sogar stärkere anti-tumorale Effekte vermitteln können, konnten Perez-Diez *et al.* bereits in mehreren murinen Tumormodellen

zeigen⁶¹. Die anti-tumorale Wirkung der TA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen konnte in Verbindung mit NK-Zellen sogar noch gesteigert werden⁶¹.

Speziell in Bezug auf TA-spezifische Th1-Zellen (TA-Th1) wurde deren anti-tumorale Wirkung experimentell unter anderem bereits in einem murinen endogenen Inselzellkarzinommodell, RIP1-Tag2, welches im Folgenden noch genauer erläutert wird (1.4.1), und in einem murinen, A20-Ovalbumin-spezifischen intradermalen Lymphommodell beschrieben^{57,58,62,63}. In Kombination mit einer durch das Chemotherapeutikum Cyclophosphamid induzierten Immunzelldepletion und einem ACT von Ovalbumin-spezifischen Th1-Zellen konnten Chamoto *et al.* eine komplette Eradikation von Lymphomen erreichen⁵⁸. Im RIP1-Tag2 Inselzellkarzinommodell konnte das Wachstum von frühen bis mäßig fortgeschrittenen Tumoren nach einer initialen Ganzkörperbestrahlung zur Immunzelldepletion mittels wiederholten ACTs von TA-Th1-Zellen verzögert und das Überleben der Versuchstiere so verlängert werden. Müller-Hermelink *et al.* konnten zeigen, dass die transferierten TA-Th1-Zellen eine IFN- γ - und TNF-Rezeptor-1 (TNFR1)-abhängige Reduktion der Angiogenese induzierten und dadurch in der Lage waren, die mehrstufige Entwicklung der Inselzellkarzinome zu verzögern⁶². Zudem konnte in weiterführenden Arbeiten gezeigt werden, dass die Therapie zu einer Verringerung der Tumor-Zellproliferation und zur Induktion einer IFN- γ - und TNF-abhängigen Seneszenz in den Tumorzellen führt⁶⁴.

Dass die Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen stark von der Antigenpräsentation via MHC-II abhängt, jedoch experimentelle adoptive CD4⁺ T-Zell Therapien auch bereits erfolgreich gegen MHC-II negative Tumore eingesetzt wurden, zeigt das enorme Potential von CD4⁺ T-Zell-basierten Immuntherapien⁶¹. Die genauen Wirkmechanismen adoptiv transferierter CD4⁺ T-Zellen sind jedoch bisher nicht vollständig erforscht. Neben der Rekrutierung und Differenzierung von Makrophagen und einer Hemmung der Tumorzellproliferation wird vermutet, dass die transferierten CD4⁺ T-Zellen die Aktivierung von CTLs erleichtern. Ebenso sollen CD4⁺ T-Zellen das Tumorstroma beeinflussen und eine erfolgreiche Angiogenese blockieren^{57,62,64-66}.

Auch am Patienten konnten bereits Erfolge mittels CD4⁺ T-Zell-basierter Immuntherapien erreicht werden: Beispielsweise konnten Hunder *et al.* innerhalb

einer klinischen Fallbeobachtung durch die Behandlung mit TA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen eine komplette Tumorremission bei einem Patienten mit metastasiertem malignem Melanom demonstrieren⁶⁷. Des Weiteren konnten Tran *et al.* nach einem Transfer „*erb2 interacting Protein*“ (ERBB2IP)-spezifischer Th1-Zellen in einen Patienten mit metastasiertem Cholangio- (Gallengangs) Karzinom wiederholt das Fortschreiten des Karzinoms eindämmen⁶⁸.

1.3.2 Immuncheckpoints

Das Immunsystem schützt nicht nur vor dem Eindringen und einer Ausbreitung von Pathogenen oder der Ausbildung maligner Tumore, sondern bewahrt den Körper auch vor einer gegen sich selbst gerichteten Immunreaktion. Neben der Erkennung von Oberflächenrezeptoren und -Merkmalen, welche gesunde, körpereigene Zellen von fremden oder außer Kontrolle geratenen Zellen abgrenzen, verfügt das Immunsystem über weitere Mechanismen, eine Immunantwort im Gleichgewicht zu halten. Gerät das Immunsystem dennoch außer Kontrolle, können sich chronische Entzündungen ausbilden, welche wiederum die Transformation maligner Zellen fördern⁶⁹. Um ein Gleichgewicht zwischen einer effektiven Immunantwort und einer Überstimulation des Systems zu schaffen, können aktivierte Immunzellen unter anderem durch die Ausbildung spezieller Zelloberflächenrezeptoren, sogenannter Immuncheckpoints (ICs), und deren Bindung an entsprechende Liganden auf benachbarten Zellen, z. B. malignen Zellen oder APCs, inhibiert werden.

Die „*T cell exhaustion*“, womit die Inhibierung von T-Effektorzellen gemeint ist, ist ein weitläufiger Begriff und beschreibt im Wesentlichen einen allgemeinen Funktionsverlust von T-Zell-Effektor-Funktionen, ausgelöst durch eine chronische Antigenpräsenz und dauerhafte Stimulation des TCRs. Diese Inhibierung von T-Zellen wurde erstmalig in einem murinen Infektionsmodell mit Lymphozytären-Choriomeningitis-Viren (LCMV) entdeckt⁷⁰ und bald sowohl als allgemeines Phänomen in zahlreichen murinen Krankheitsmodellen als auch im Rahmen von chronisch entzündlichen Erkrankungen beim Menschen beobachtet⁷¹⁻⁷³.

Der Funktionsverlust ist gekennzeichnet durch eine Expression inhibierender ICs auf der Zelloberfläche, welche meist direkt nach der Aktivierung von T-Zell-Effektorfunktionen einsetzt und erfordert die Bindung an korrespondierende

Liganden. Dies äußert sich in einer Verringerung der T-Zelleffektorfunktionen und einer Veränderung des Genexpressionsmusters, welches sich deutlich von dem funktioneller T-Effektor- und Gedächtniszellen abgrenzen lässt^{74,75}.

Die Inhibierung wirkt sich neben einer reduzierten Ausschüttung von Zytokinen wie IL-2 oder IFN- γ , auch auf die Zellproliferation und Zytotoxizität aus. Bei andauernder Inhibierung wird letztendlich der programmierte Zelltod (Apoptose) eingeleitet⁷⁶.

Eine T-Zelle verfügt, wie auch andere Immunzellen, über mehrere ICs. Diese unterliegen jeweils unterschiedlichen Regulationsmechanismen. Der wohl bekannteste IC, das „*cytotoxic T-Lymphocyte-associated Protein 4*“ (CTLA-4), wird beispielsweise sehr früh nach der T-Zellaktivierung exprimiert und bindet die Liganden B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86) auf APCs mit höherer Affinität als der co-stimulierende Rezeptor CD28. Durch die Unterbrechung der Co-Stimulation von CD28 und weiteren CTLA-4-vermittelten Signalprozessen werden unter anderem die Zellproliferation und die IL-2 Sekretion verringert⁷⁷. Die zentrale Bedeutung von ICs und ihre Rolle bei der Regulation von Autoimmunität und Selbsttoleranz wurden bereits anhand zahlreicher Studien in Mäusen mit fehlender Expression verschiedener ICs demonstriert. Diese Mäuse entwickelten Autoimmunreaktionen, die, je nach Phänotyp, sehr stark ausgeprägt waren und sogar zum Tod führen konnten⁷⁸⁻⁸².

ICs werden im Bereich von Virusinfektionen und vor allem innerhalb der Tumorforschung eine bedeutende Rolle zugeschrieben. Tumore können durch die Expression von IC-Liganden an die ICs Tumor-infiltrierender Immunzellen binden, deren Effektor-Funktionen beeinflussen und so einer erfolgreichen anti-tumoralen Immunantwort entgehen. Mittels einer Blockade von ICs durch monoklonale Antikörper (mAbs), können die inhibierenden Signale blockiert und T-Zellen in Folge dessen reaktiviert werden (**Abb. 4**).

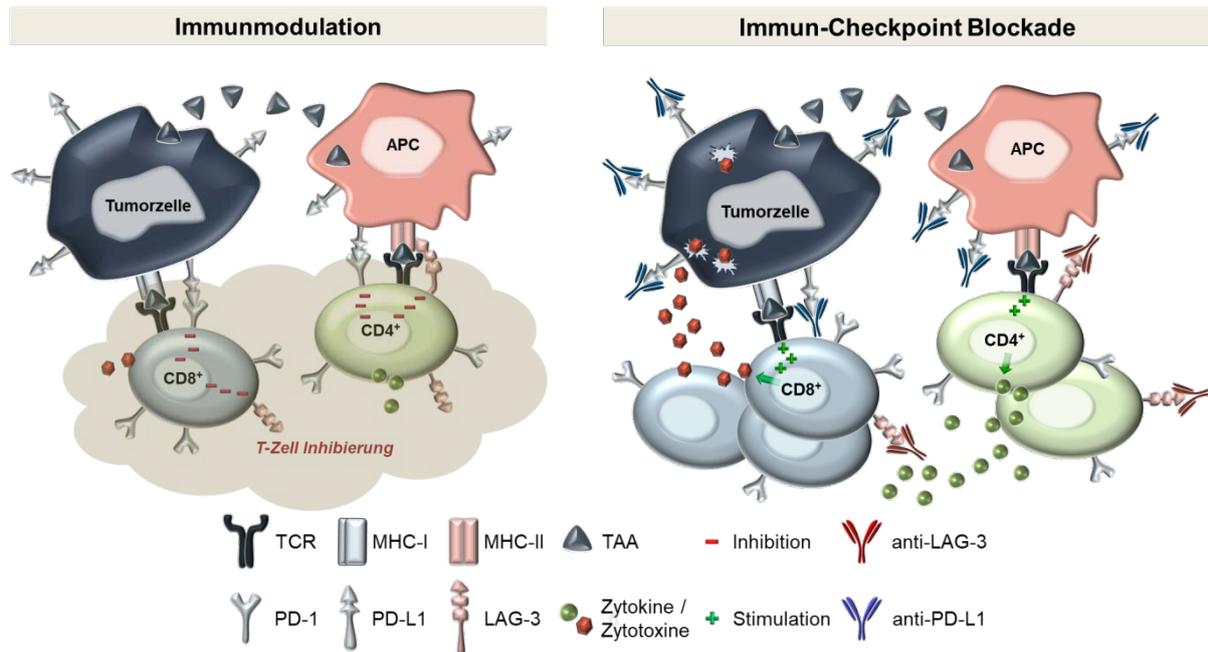


Abb. 4: Immunmodulation von T-Zellen über Immuncheckpoints. Durch die Ausbildung von ICs wie CTLA-4, „Programmed cell death protein 1“ (PD-1) oder „Lymphocyte activation gene 3“ (LAG-3) und deren Bindung an entsprechende Liganden auf APCs, wie DCs und Makrophagen, werden aktivierte T-Zellen in ihren Effektorfunktionen gehemmt. IC-Liganden können auch von nicht-hematopoetischen Zellen und Tumorzellen exprimiert werden. Vor allem Tumorzellen nutzen diesen Mechanismus, um einer erfolgreichen anti-tumoralen Immunantwort zu entkommen. Die dadurch inhibierten Effektorfunktionen, wie verringerte Zytokin- bzw. Zytotoxinproduktionsraten, können durch eine Antikörper-vermittelte Blockade von ICs wiederhergestellt und gesteigert werden. Mit einer Reaktivierung von Immunzellfunktionen kann auch die Proliferationsrate erhöht werden. Die Antikörper-vermittelte Blockade von ICs stellt einen wichtigen Bereich innerhalb moderner Immuntherapien gegen maligne Tumore dar.

1.3.2.1 PD-1 und PD-L1

Das 1992 von der Arbeitsgruppe um Tasuku Honjo entdeckte Transmembranprotein „Programmed cell death protein 1“ (PD-1) gehört zur Familie der Immunglobuline und ist neben CTLA-4 einer der meist erforschten ICs⁸³. PD-1 wird im Gegensatz zur sehr frühen Expression von CTLA-4 etwas später nach T-Zellaktivierung induziert und bindet an den „Programmed cell death Ligand-1“ und -2 (PD-L1 bzw. PD-L2).

PD-1 wird sehr selektiv auf der Zelloberfläche hämatopoetischer Zellen wie T-Zellen, NK- und NK T-Zellen, B-Zellen, Monozyten und DC-Subpopulationen exprimiert^{84,85} und liegt nicht, wie beispielsweise CTLA-4, bereits in intrazellulären Vesikeln gespeichert vor, sondern wird erst durch Aktivierung des T- bzw. B-Zellrezeptors transkriptiv induziert. Im Gegensatz zur relativ schnellen Zelloberflächenexpression von CTLA-4 ist PD-1 daher extrazellulär erst innerhalb von 24 h nach

T-Zellaktivierung nachweisbar⁸⁶. Eine Ausnahme bilden jedoch T_{regs}, welche durchaus in der Lage sind, PD-1 intrazellulär zu speichern und sich dadurch von aktivierten T-Effektorzellen abgrenzen lassen⁸⁷. Des Weiteren kann die Expression von PD-1 durch Zytokine wie IL-2, IL-7, IL-15 und IL-21 stimuliert werden⁸⁸.

Im Normalfall wird die Expression von PD-1 mit Schwinden des Antigens wieder herunterreguliert. Behält die Zelle jedoch aufgrund wiederholter und dauerhafter Antigenstimulation ein hohes PD-1 Level, wird ein epigenetisches Programm induziert, das letztendlich zur Inhibition bis hin zur Apoptose der aktivierten T-Zelle führt⁷⁵.

Im Gegensatz zu PD-1 ist die Expression von dessen Liganden PD-L1 breiter gefächert. PD-L1 (CD274 oder B7-H1), ebenfalls ein Transmembranprotein, wird auf T-Zellen, B-Zellen, DCs, Makrophagen, mesenchymalen Stammzellen und Mastzellen, aber auch in nicht-hämatopoetischen Geweben wie der Lunge und dem Herzen exprimiert. Daher ist PD-L1 auch auf vielen malignen Tumorzellen zu finden^{84,89}.

Die konstitutive Expression von PD-L1 wird hauptsächlich durch IFN- γ , aber auch durch andere Zytokine wie TNF hochreguliert^{90,91}. Außerdem können Wachstumsfaktoren wie der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor („*Vascular endothelial growth factor*“, VEGF) einen Einfluss auf die Expression von PD-L1 haben^{92,93}. Bindet nun IFN- γ an seinen Rezeptor, werden über die Phosphorylierung von Januskinasen (JAK1 und JAK2) „*Signal Transducers and Activators of Transcription*“ (STAT)-Proteine (STAT1 / STAT2 / STAT3), ebenfalls über Phosphorylierungen, aktiviert und bilden in Folge dessen Dimere. Anschließend wandern diese Transkriptionsfaktoren in den Zellkern und induzieren unter anderem die Expression des Interferon Regulationsfaktors 1 (IRF1), welcher wiederum nach Bindung an den PD-L1-Promotor dessen Transkription induziert⁹¹. Das während einer Immunantwort ausgeschüttete IFN- γ führt also zu einer erhöhten Expression von PD-L1 auf Tumorzellen und im TME und letztendlich, nach Aktivierung des PD-1/PD-L1 Signalwegs, zu einer Inhibition der anti-tumoralen T-Zellantwort.

In aktivierten T-Zellen führt die Bindung von PD-L1 an PD-1 zu einer Phosphorylierung der zytoplasmatischen PD-1-Domäne, welche durch die Tyrosinphosphatasen SHP-2 vermittelt wird. Daraufhin werden Signalmoleküle des

TCRs dephosphoryliert, was wiederum zu einer Verringerung wichtiger T-Zell-Effektorfunktionen, wie der Zytokinproduktion oder der Bildung und Ausschüttung von Zytotoxinen, führt⁸⁴. Weiter kann die Expression von Proteinen, welche die Zellproliferation hemmen und die Ausbildung von Apoptose-Signalen fördern, stimuliert werden. Zudem führt die Aktivierung des PD-1/PD-L1 Signalwegs zur Steigerung der T-Zell-Motilität. Die erhöhte Motilität verkürzt den Kontakt der T-Zellen zu APCs und Tumorzellen und reduziert somit die Wahrscheinlichkeit eines erfolgreichen Angriffs gegen den Tumor⁷⁵. Sogar der Stoffwechsel wird durch die Aktivierung des PD-1/PD-L1 Signalwegs moduliert und von einer erhöhten Glykolyserate auf eine hohe Fettsäureoxidation umgestellt⁸⁶.

T_{regs} hingegen werden durch die Bindung von PD-L1 an PD-1 stimuliert. Die Expression von FoxP3 wird gesteigert, wie auch die immunsuppressiven Eigenschaften der T_{reg} Population. Die Aktivierung der PD-1/PD-L1 Signalachse kann sogar die Polarisierung naiver T-Zellen zu T_{regs} fördern⁹⁴.

Über die intrazelluläre PD-L1 Signalweiterleitung ist bisher nicht viel bekannt. PD-L1 besitzt lediglich eine kleine intrazelluläre Domäne mit drei konservierten Aminosäuremotiven, welche vermutlich anti-apoptotische Signale vermitteln und der Zelle so einen Überlebensvorteil verschaffen^{95,96}.

1.3.2.2 LAG-3

Das Zelloberflächenprotein „*Lymphocyte activation gene 3*“ (LAG-3 bzw. CD223), wie PD-1 und CTLA-4 ein Mitglied der Immunglobulin-Familie, wurde 1990 durch Triebel *et al.* entdeckt und zunächst als Marker aktivierter T- und NK-Zellen, später aber auch aktivierter B-Zellen, beschrieben^{97,98}. Seit gezeigt wurde, dass LAG-3 neben einer stimulierenden Wirkung auf T_{regs} in der Lage ist, T-Effektorzellen zu inhibieren, zählt das Transmembranprotein zu einem der wichtigsten ICs^{71,99,100}.

LAG-3 besitzt vier extrazelluläre Domänen und weist trotz geringer Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz (ca. 20% Homologie) eine hohe morphologische Ähnlichkeit zum CD4-Rezeptor auf⁹⁷. Daher besitzt LAG-3 eine hohe Affinität zum Antigen-präsentierenden MHC-II Komplex, welche sogar etwa 100-mal höher ist als die des CD4-Rezeptors^{101,102}. Jedoch konkurriert LAG-3 nicht wie bisher

angenommen mit dem CD4-Rezeptor um die Bindung an MHC-II, um eine kompetitive Hemmung durch eine Blockade zu induzieren, sondern bindet selektiv an stabile pMHC-II Komplexe¹⁰³. Durch die Bindung von LAG-3 an pMHC-II werden aktivierte CD4-vermittelte T-Effektorfunktionen inhibiert, die Funktion von T_{regs} hingegen wird verstärkt^{99,104}.

Darüber hinaus unterliegen auch die Effektorfunktionen von CD8⁺ T-Zellen durch eine vermehrte Zelloberflächenexpression von LAG-3 einer CD4-unabhängigen, negativen Regulation¹⁰⁵. Die wohl sehr vielseitigen molekularen Mechanismen der Immunzell-Inhibierung durch LAG-3-vermittelte Signale, vor allem in Abhängigkeit spezifischer Zelltypen wie CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, sind jedoch noch weitgehend unbekannt^{103,105}.

Auch die genauen Mechanismen der LAG-3-vermittelten Signaltransduktion sind bis heute nicht vollständig geklärt. Der intrazelluläre Teil von LAG-3 unterscheidet sich stark von dem anderer inhibierender ICs. Er enthält drei konservierte Domänen, welche unter anderem die Co-Lokalisation von LAG-3 mit dem TCR und den Co-Rezeptoren, beispielsweise CD4 und CD28, an der Zelloberfläche unterstützen. Eine der drei Domänen enthält ein einzigartiges, hochkonserviertes KIEELE-Aminosäuremotiv und trägt essentiell zur Signalweiterleitung bei, indem es die T-Zelle davon, abhält in die Synthesephase (S-Phase) des Zellzyklus einzutreten. Somit wird die Vergrößerung der T-Zellpopulation eingedämmt^{106,107}.

Die Expression von LAG-3 ist sehr streng organisiert und wird durch verschiedene Mechanismen moduliert: Im Gegensatz zum CD4-Rezeptor, welcher konstitutiv auf der Zelloberfläche exprimiert wird, wird LAG-3, wie auch CTLA-4, vermehrt in intrazellulären Vesikeln gespeichert und erst nach der T-Zellaktivierung schnell an die Zelloberfläche transportiert¹⁰⁸. Membranständiges LAG-3 wird wiederum durch die zwei Metalloproteinasen „*a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein*“ 10 (ADAM10) und ADAM17 reguliert, indem diese LAG-3 von der Zelloberfläche abspalten und in die Blutzirkulation entlassen¹⁰⁹. Die Rolle der löslichen, zirkulierenden LAG-3 Proteine ist jedoch bis dato nur unzureichend untersucht.

Die spezifische, Antigen-abhängige Erkennung von pMHC-II und die Feinregulation der Zelloberflächenexpression machen LAG-3 zu einem besonders effektiven Regulator von T-Zell Funktionen. Darüber hinaus agiert LAG-3 in enger Synergie mit PD-1. In LAG-3/PD-1-defizienten (*Lag-3^{-/-}/Pdcd-1^{-/-}*) Mäusen entwickelten sich durch die fehlende Expression von LAG-3 und PD-1 letale Autoimmunkrankheiten, welche nach zehn Wochen in ca. 80% der Mäuse zum Tod führten. Dagegen wurden in Mäusen mit nur einem einzigen Knock-out während des gesamten Beobachtungszeitraums keine Symptome von Autoimmunreaktionen festgestellt⁸².

Durch die starke Synergie mit PD-1, die strengen Regulationsmechanismen und der Tatsache, dass die Expression von LAG-3 häufig zeitgleich mit anderen ICs wie CTLA-4 und PD-1 hochreguliert wird und mit dem Grad der T-Zellermüdung korreliert, hat der IC LAG-3 ein großes Interesse als therapeutisches Ziel eingenommen^{71,110}.

1.3.3 Immuncheckpoint-Inhibitor-Therapien

Die Blockade von ICs mittels monoklonalen Antikörpern (sogenannte IC-Inhibitoren) stellt einen der wichtigsten Bereiche innerhalb der Immuntherapien dar. Die Erforschung der zugrundeliegenden Mechanismen und Etablierung der ersten Antikörper-basierten Immuntherapien durch James P. Allison und Tasuku Honjo wurde 2018 mit dem Nobelpreis für Medizin und Physiologie ausgezeichnet.

Allison konnte 1996 erstmals zeigen, dass eine Blockade von CTLA-4 das Wachstum muriner Tumore verringert und war maßgeblich an der Entwicklung und klinischen Translation von Ipilimumab, einem anti-CTLA-4 mAb welcher 2011 erstmals in den USA und der Europäischen Union zur Behandlung des metastasierten Melanoms zugelassen wurde, beteiligt¹¹¹. Nach heutigem Stand der Wissenschaft zeigen ca. 22% der Melanompatienten unter Ipilimumab-Behandlung eine dauerhaftes Ansprechen^{112,113}.

Fast zeitgleich veröffentlichte Tasuku Honjo 1992 seine ersten Arbeiten zu dem neu entdeckten Zelloberflächenrezeptor PD-1⁸³. Er und sein Team demonstrierten in den darauf folgenden Jahren eindrucklich, dass auch PD-1 ein negativer Regulator von Immunzellfunktionen ist und als eine Art Bremse auf eine andauernde Immunreaktion

wirkt, jedoch einer völlig anderen Expressionsdynamik und anderen Regulationsmechanismen als CTLA-4 unterliegt^{81,114}. Auch die Antikörper-vermittelte Blockade von PD-1 offenbarte sich als ein vielversprechender therapeutischer Ansatz zur Bekämpfung maligner Tumore mit Ansprechquoten von bis zu 40%^{115,116} (**Abb. 5**).

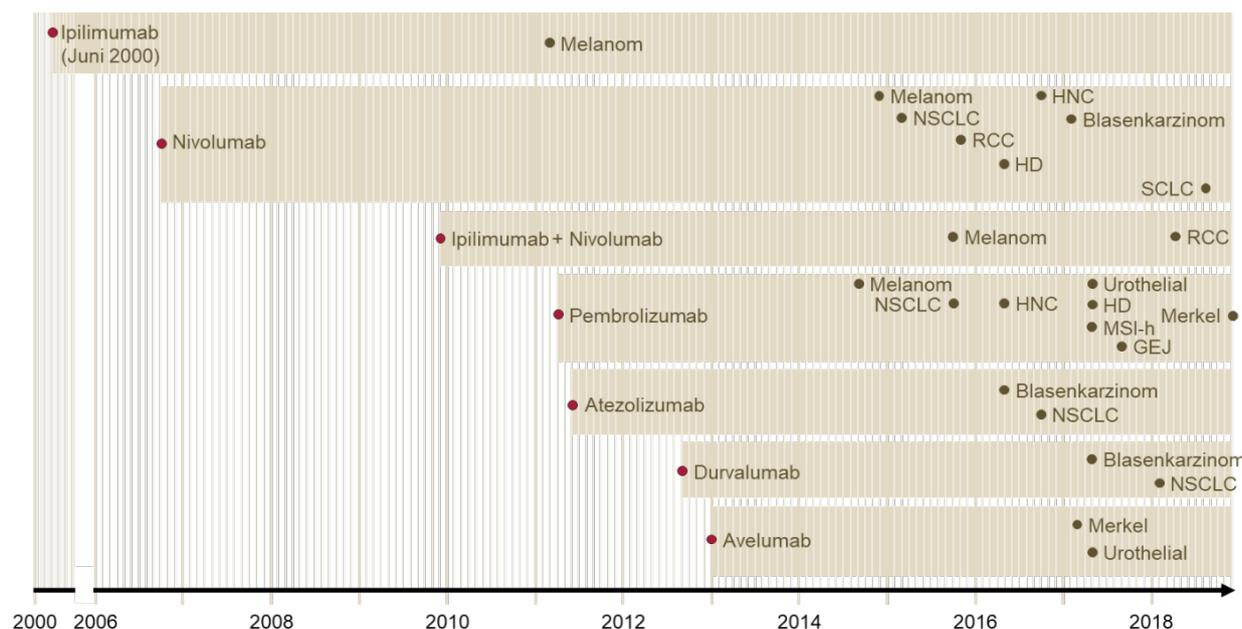


Abb. 5: Zeitlicher Verlauf der Entwicklung und Einführung von anti-CTLA-4, anti-PD-1 und anti-PD-L1 mAbs in der Klinik. Dargestellt sind die Zeitpunkte der ersten klinischen Studien (rote Symbole) bis hin zur Zulassung der jeweiligen Antikörper durch die Arzneimittelbehörde in den USA („U. S. Food and Drug Administration“, FDA; braune Symbole) in verschiedenen Tumorentitäten. CTLA-4-blockierende Antikörper: Ipilimumab; PD-1-blockierende Antikörper: Nivolumab; Pembrolizumab; PD-L1-blockierende Antikörper: Atezolizumab, Durvalumab, Avelumab. GEJ: Magenkarzinom; HD: Hodgkin Lymphom; HNC: Kopf-Hals-Karzinom; Merkel: Merkelzellkarzinom; MSI-h: solide Tumore mit genomischer Mikrosatelliteninstabilität; NSCLC: nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom; RCC: Nierenkarzinom; SCLC: kleinzelliges Lungenkarzinom. Stand 12/2018 (modifiziert nach Ribas *et al.*, 2018)¹¹⁶.

Seit ihrer Einführung als Immuntherapeutikum gegen maligne Tumore haben IC-Inhibitoren das Feld der Immuntherapie revolutioniert. Dennoch ist die Ansprechquote auf diese Antikörper-basierte Immuntherapien sehr limitiert, der Therapieverlauf schwer vorhersehbar und nicht selten mit hohen Nebenwirkungen, meist entzündlichen Immunreaktionen, verbunden.

Durch die Vielzahl an ICs und deren unterschiedlichen physiologischen und temporären Expressionsmustern wurden in den letzten Jahren vermehrt

Kombinationstherapien mit IC-Inhibitoren erforscht und bereits erfolgreich getestet. Die wohl prominenteste Kombinationstherapie setzt sich zusammen aus Ipilimumab (anti-CTLA-4 mAb in geringerer Dosierung als im Rahmen einer Monotherapie) und Nivolumab (anti-PD-1 mAb). Diese Kombination wurde über fünf Jahre an Patienten mit metastasiertem Melanom getestet und zeigte im Vergleich zu Patienten unter Monotherapie eine deutliche Verbesserung des progressionsfreien Überlebens und des Gesamt-Überlebens („Overall survival“, OS)¹¹⁷ (Abb. 6).

Da aber insbesondere Kombinationstherapien mit hohen Nebenwirkungen verbunden sind und auch vermehrt Therapieresistenzen auftreten, wird weiterhin am Einsatz neuartiger IC-Inhibitoren, wie anti-LAG-3 mAb und an neuen Kombinationen geforscht. Im Jahr 2018 wurden alleine für die Blockade von LAG-3 24 laufende klinische Studien gezählt¹⁰³.

Die in dieser Arbeit untersuchte experimentelle Kombinationstherapie beinhaltete neben einem adoptiven T-Zelltransfer die Antikörper-vermittelte Blockade von PD-L1 und LAG-3 eine Kombination an IC-Inhibitoren, welche bereits erfolgreich zur Behandlung von chronischen Virusinfektionen in Mäusen eingesetzt wurde^{71,118}.

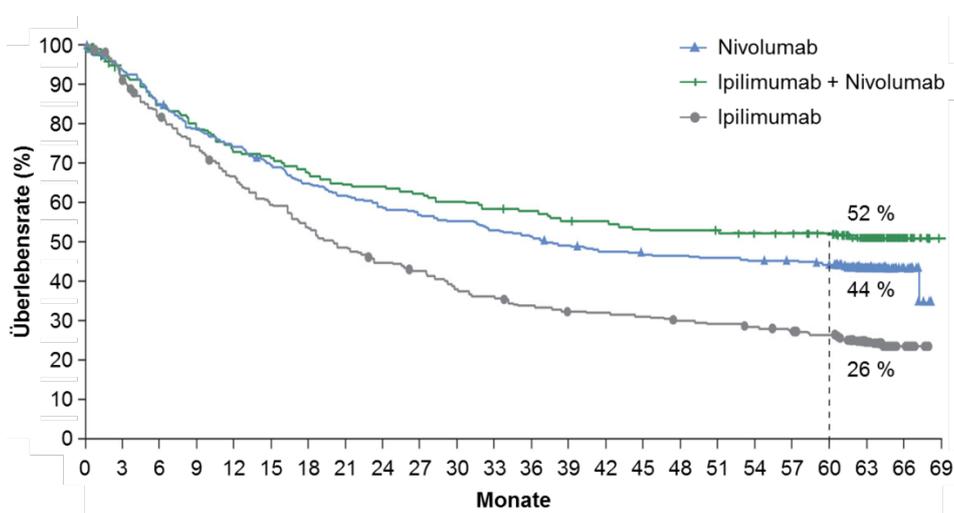


Abb. 6: Gesamtüberlebensrate von Patienten mit metastasiertem Melanom unter IC-Inhibitor-Therapie. Die Patienten (n=314 - 316) wurden entweder mit Ipilimumab (anti-CTLA-4 mAb), Nivolumab (anti-PD-1 mAb) oder einer Kombination aus beiden Antikörpern behandelt. Die Gesamtüberlebensrate (OS) definiert den Zeitraum zwischen der Randomisierung der Patienten und dem Tod bzw. einem Behandlungsabbruch. Das mittlere OS unter Ipilimumab-Behandlung betrug 19,9 Monate und unter Nivolumab-Behandlung 36,9 Monate. Unter kombinierter Behandlung mit beiden Antikörpern wurde das mittlere OS im Rahmen der Studie noch nicht erreicht. Nach 60 Monaten standen immer noch 52% der Patienten unter Beobachtung (modifiziert nach Larkin *et al.* 2019)¹¹⁷.

Dass die kombinierte Blockade von PD-L1 und LAG-3 auch eine anti-tumorale Immunantwort in präklinischen Tumormodellen verstärken kann und dadurch das Fortschreiten der Tumorerkrankung verlangsamt wird, wurde bereits durch Goding *et al.* gezeigt¹¹⁹. Die Arbeitsgruppe hat dabei nicht nur herausgefunden, dass diese kombinierte IC-Inhibition eine Reduktion des Tumorwachstums erzielt und somit das Überleben der Mäuse verlängert wird, sondern auch, dass durch die Kombinationsbehandlung eine vorangehende Depletion von T_{regs} vernachlässigt werden kann¹¹⁹. Ob die Kombination der beiden IC-Inhibitoren die Wirkung einer T-Zell-basierten Immuntherapie in einem fortgeschrittenen Tumormodell ebenso verbessert, ist bisher nicht bekannt und soll im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

1.4 Präklinische Mausmodelle

Maligne Tumore sind *in vitro* durch ihre Komplexität schwer zu untersuchen. Zum einen stellen Tumore keinen homogenen Gewebeverband dar, welcher sich leicht modellieren lässt. Zum anderen lassen sich die Bildung von Blutgefäßen und die Ausbildung eines TMEs *in vitro* schwer nachahmen. Daher werden zur Untersuchung und Weiterentwicklung neuer Therapieansätze häufig murine Tumormodelle herangezogen.

1.4.1 Das RIP1-Tag2 Inselzellkarzinommodell

Das transgene RIP1-Tag2 (RT2) Mausmodell wurde 1985 von Douglas Hanahan entwickelt¹²⁰. In diesem endogenen Inselzellkarzinommodell wird das „*Large T-Antigen*“ (Tag), ein Onkogen des Simian-Virus 40 (SV40), unter der Kontrolle des Ratten-Insulinpromotors (RIP1) in allen Inselzellen, genauer den β -Zellen des Pankreas, exprimiert. In Folge dessen werden die Tumorsuppressoren p53 und Retinoblastomprotein (Rb) inhibiert, was in einer malignen Transformation der Langerhans'schen Inseln resultiert¹²¹. Diese Transformation äußert sich in einer mehrstufigen Karzinogenese, die bereits in der vierten Lebenswoche mit der Ausbildung von hyperplastischen Inseln beginnt. Ungefähr ab der siebten bis achten Lebenswoche tritt vermehrt Angiogenese ein. Daher wird das RT2-Mausmodell auch

sehr häufig im Rahmen von Angiogenese-Studien verwendet^{122,123}. Ab der achten Lebenswoche kann die Bildung kleiner Karzinome beobachtet werden, die sich nun mittels Magnetresonanztomografie (MRT) bildlich darstellen lassen¹²⁴. Letztendlich resultiert diese Entwicklung in der zwölften bis 14. Lebenswoche in stark vaskularisierten, soliden Inselzellkarzinomen^{122,125}. Die Mäuse sterben schließlich aufgrund einer gesteigerten und mit dem Tumorwachstum korrelierenden Insulinsekretion im Alter von 14 bis 15 Wochen an einer Unterzuckerung (Hypoglykämie) (Abb. 7).

Da dieses transgene Inselzellkarzinommodell im Gegensatz zu exogenen Tumormodellen (beispielsweise subkutane Tumore) viel eher in der Lage ist, die natürliche Entstehung und maligne Transformation von Zellen nachzuahmen, eignet es sich sehr gut für experimentelle Immuntherapie-Studien.

Das RT2-Mausmodell wurde bereits des Öfteren zur Erforschung adoptiver T-Zell-Therapien herangezogen. Beispielsweise konnte das Überleben von RT2-Mäusen durch die Verabreichung von *in vitro* aktivierten Leukozyten aus der Milz von 14 auf 24 Wochen verlängert werden - jedoch kam es durch eine Zerstörung der Inselzellen zur Ausbildung eines massiven Diabetes mellitus¹²⁶.

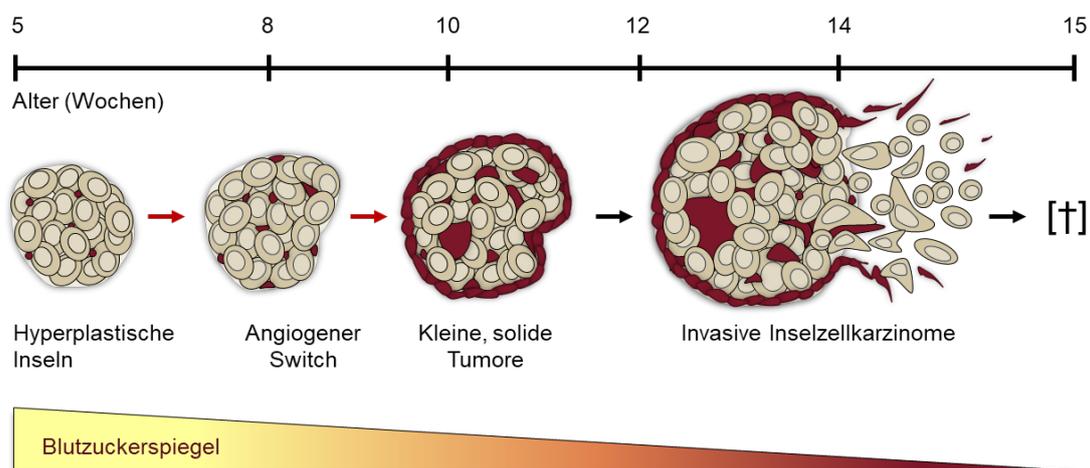


Abb. 7: Mehrstufige Karzinogenese in RT2-Mäusen. RT2-Mäuse entwickeln im Alter von vier bis fünf Wochen kleine hyperplastische Langerhans'sche Inseln. Nach einem angiogenen „Switch“ in der achten Lebenswoche entwickeln sich ca. 3% der Inseln zu kleinen soliden Tumoren welche sich in den folgenden Wochen weiter zu invasiven Inselzellkarzinomen ausbilden. Mit Zunahme der Tumormasse steigt auch die Insulinsekretion was zu einem stetig sinkenden Blutglukosespiegel führt (modifiziert nach Bergers *et al.* 1999)¹²².

Weniger aggressiv zeigten sich Studien zur Therapie mit IFN- γ produzierenden, Antigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen (TA-Th1), welche in diesem Mausmodell von der Arbeitsgruppe um Prof. Röcken (Universitäts-Hautklinik Tübingen) etabliert wurden. Mit einem Therapiebeginn in der fünften Lebenswoche konnte die mittlere Überlebensrate durch die wiederholte Verabreichung von 10⁷ TA-Th1-Zellen nach einer initialen Immunzelldepletion auf 30 Wochen gesteigert werden⁶². Die Entwicklung eines Diabetes mellitus wurde hierbei nicht beobachtet und auch eine Apoptose-Induktion der Tumorzellen blieb aus. Die Wirkung der TA-Th1-Zellen wurde über die Zytokine IFN- γ und TNF vermittelt und führte zu einer maßgeblichen Eindämmung des Tumorwachstums. Die Unterbrechung der IFN- γ - und TNF-Signalwege (durch die Verabreichung eines anti-IFN- γ mAb bzw. Studien in TNF-Rezeptor-defizienten RT2-Mäusen) führte nicht nur zu einem Wirkungsverlust der TA-Th1-basierten Immuntherapie, sondern äußerte sich sogar in einer Beschleunigung des Tumorwachstums^{62,64}.

1.4.2 *Stat1*-knock-out Mäuse

Knock-out Mausstämme sind gekennzeichnet durch die Stilllegung eines oder mehrerer definierter Gene. Durch die Verwendung von Knock-Out Mäusen lässt sich die Funktion einzelner Proteine innerhalb eines Signalwegs besonders gut erforschen. Im Gegensatz zur Arbeit mit Knock-Out Zelllinien können durch die Verwendung von Knock-Out Mäusen die Auswirkungen des Funktionsverlustes eines bestimmten definierten Proteins innerhalb eines Gewebes und letztendlich dessen Auswirkungen auf den gesamten Organismus erforscht werden.

Stat1-Knock-Out (*Stat1*^{-/-}) Mäuse besitzen eine homozygote Unterbrechung des *Stat1*-Gens. Dies führt folglich zu einem kompletten Funktionsverlust der STAT1 Proteine. STAT1 Proteine spielen als Transkriptionsfaktoren innerhalb des JAK-STAT Signalwegs für die intrazelluläre Signaltransduktion von Typ-I (IFN- α und - β) und Typ-II (IFN- γ) Interferonen eine wesentliche Rolle. Daher eignen sich diese Mäuse hervorragend, um die Rolle von IFN- γ -vermittelten intrazellulären Signalen zu analysieren (**Abb. 8**)¹²⁷.

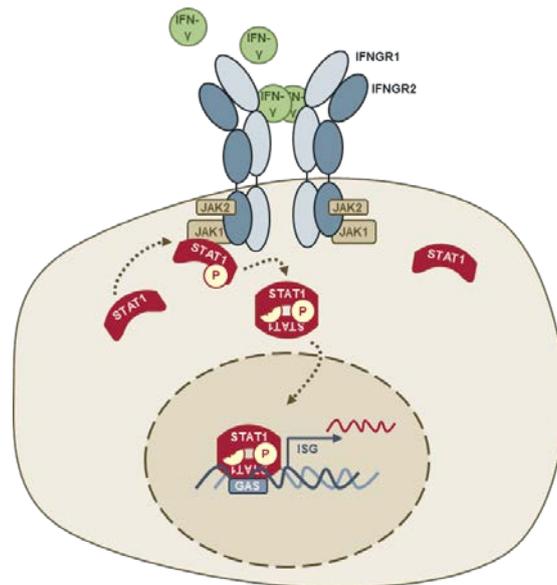


Abb. 8: IFN- γ Signalweiterleitung in der Zelle. Die Bindung von IFN- γ -Dimeren an einen Komplex aus Interferon-Gamma-Rezeptoren (IFGR) induziert die gegenseitige Phosphorylierung der Rezeptor-assoziierten JAKs. Dies führt wiederum zur Bindung und Phosphorylierung von STAT1-Proteinen. Nach deren Dissoziation vom Rezeptor dimerisieren jeweils zwei STAT1-Proteine über die Phosphotyrosine miteinander und können dadurch in den Zellkern translokieren. Dort binden sie an Gamma-aktivierbare Gensequenzen (GAS) und treiben die Translation pro-inflammatorischer Gene (Interferon-stimulierte Gene, ISG) an.

Das pro-inflammatorische Zytokin IFN- γ , welches erstmalig *in vitro* für seine antiviralen Eigenschaften bekannt wurde, ist eines der wichtigsten Immunstimulierenden Zytokine. IFN- γ wird hauptsächlich von NK- und T-Zellen sezerniert, fördert die Aktivierung und Polarisierung von T-Zellen und Makrophagen, reguliert die Zelloberflächenexpression von pMHC-Komplexen und hält ein homöostatisches Gleichgewicht zwischen einzelnen Immunzellpopulationen aufrecht. Durch die IFN- γ induzierte Produktion von Chemokinen werden zudem Effektorzellen rekrutiert¹²⁸. Darüber hinaus kann IFN- γ die Entwicklung von T_{regs} fördern und malignen Zellen durch dessen Eigenschaften zur Aufrechterhaltung der Immun-Homöostase und durch die Induktion von PD-L1 auf Tumorzellen einen Überlebensvorteil verschaffen^{91,129,130}.

Die Analyse von IFN- γ -vermittelten Signalen kann maßgeblich zum Verständnis von Immuntherapien beitragen. Zahlreiche Studien konnten bereits Zusammenhänge zwischen defekten Interferon-Signalwegen, einer Therapieresistenz und einer damit verbundenen Tumorprogression darlegen. Magusto *et al.* haben gezeigt, dass ein Nichtansprechen auf eine IC-basierte Immuntherapie in Mäusen mit einer defektem

IFN- γ Signalweiterleitung assoziiert ist¹³¹. Weiter kann sich in Folge einer T-Zell-basierten, anti-tumoralen Immunantwort in Tumorzellen ein Zytokin-induzierter Wachstumsarrest (Seneszenz) ausbilden. Die Rolle von IFN- γ auf die Seneszenz-Induktion in malignen Zellen wurde im Kontext der TA-Th1-basierten Immuntherapie eingehend von der Arbeitsgruppe Röcken in RT2-Mäusen mit defektem STAT1-Signalweg (RT2xStat1^{-/-}-Mäuse) untersucht⁶⁴. Obwohl bereits weitläufig bekannt ist, dass die Ausbildung von Seneszenz einen maßgeblichen Beitrag zur Tumorkontrolle leisten kann, sind die zugrunde liegenden Mechanismen noch weitgehend unbekannt¹³².

1.5 Funktionelle und molekulare Bildgebung

Die funktionelle und molekulare Bildgebung umfasst Techniken in Klinik und Forschung, anhand derer sich physiologische und molekulare Prozesse sowie anatomische Strukturen meist unter der Verwendung kleinster Markersubstanzen (Moleküle oder Antikörper), bildlich darstellen lassen.

In der präklinischen Forschung unterscheidet man zwischen nicht-invasiven und invasiven Methoden zur funktionellen und molekularen Bildgebung. Invasive Methoden erfordern die Isolation kleinster Gewebeproben als Ausgangsmaterial für die geplanten Untersuchungen, was letztendlich mit Schmerzen für die Versuchstiere einhergeht oder gar deren vorherige Euthanasie erfordert. Zu den nicht-invasiven Methoden zählen unter anderem die Positronen-Emissions-Tomografie (PET), die Magnetresonanztomografie (MRT) und die optische Bildgebung. Charakteristisch für diese Methoden sind neben einer schmerzfreien Prozedur auch die Möglichkeit, Versuchstiere über einen längeren Zeitraum wiederholt zu beobachten, was Aufschluss über physiologische Prozesse im lebenden Organismus gibt und gleichzeitig zu einer Reduktion der Versuchstierzahl führt.

1.5.1 Positronen-Emissions-Tomografie

Die PET ist ein nicht invasives, bildgebendes Verfahren der Nuklearmedizin, welches meist physiologische Prozesse im Körper sichtbar macht und klinisch derzeit hauptsächlich zur Detektion von Tumoren herangezogen wird. Dabei werden

radioaktiv markierte, biologisch wirksame Substanzen, sogenannte Radiotracer, in den Patienten injiziert und nach einer für den jeweiligen Radiotracer spezifischen Verteilungszeit im Körper im PET-Scanner detektiert. Ein PET-Scan wird meist mit einer Computertomografie (CT) oder MRT kombiniert, um die ermittelten Signale in einem anatomischen Zusammenhang darzustellen. Präklinisch wird die PET zur Entwicklung neuer Radiotracer und zur Beurteilung neuer Therapiekonzepte herangezogen. Auch hier wird bei Bedarf mit einer CT oder MRT kombiniert.

Ein PET-Tracer zeichnet sich dadurch aus, dass ein einzelnes Atom oder eine funktionelle Gruppe innerhalb eines Moleküls durch ein radioaktives Isotop ausgetauscht wird (z. B. ^{18}F , ^{64}Cu , ^{11}C). Durch den radioaktiven Zerfall der entsprechenden Isotope können die PET-Tracer anhand spezieller Detektoren im PET-Scanner lokalisiert werden. **Tab. 2** bietet einen Überblick über die gängigsten Radionuklide und deren Halbwertszeit.

Tab. 2: Auflistung gängiger Positron-emittierender Radionuklide für die PET. Die Positronen-Energie bestimmt den Weg, den ein Positron vor der Annihilation im Gewebe zurücklegt und limitiert die Ortsauflösung einer Aufnahme mittels hochauflösender PET Systeme (modifiziert nach Cherry, 2001)¹³³.

Radionuklid	Halbwertszeit	max. β^+ Energie (MeV)	Anteil β -Zerfall (%)
^{11}C	20,3 min	0,96	99,80
^{13}N	9,8 min	1,19	99,80
^{15}O	122,0 s	1,72	99,90
^{18}F	109,8 min	0,64	96,70
^{64}Cu	12,7 h	0,65	19,00
^{68}Ga	68,1 min	1,83	88,00

Seit der Entwicklung der PET von Michel Ter-Pogossian und Michael E. Phelps im Jahre 1975 wurde die Technik kontinuierlich weiterentwickelt und hinsichtlich der Sensitivität, welche heute im pico- bis femto-molaren Bereich liegt¹³⁴, weiter verbessert¹³³. Auch die Palette an verfügbaren Radiotracern hat sich zusehends vergrößert. Dadurch wird die PET nicht mehr nur zur molekularen Bildgebung metabolischer Prozesse, wie beispielsweise des Glukosestoffwechsels von benignen und malignen Geweben mittels kleiner radiomarkierter Zuckermoleküle

herangezogen, sondern auch zur Detektion einzelner Zelltypen mittels hochmolekularer Tracer, wie zum Beispiel radiomarkierte Antikörper.

1.5.1.1 Detektion von PET-Signalen

In Folge des radioaktiven Zerfalls eines Tracers emittiert der Atomkern ein positiv geladenes Positron (β^+ -Zerfall). Sobald das Positron auf ein Elektron trifft, kommt es zu einer Annihilation (**Abb. 9a**). Die Strecke, die das Positron dabei zurücklegt, wird als Positronen-Reichweite bezeichnet. Während der Annihilation werden Positron und Elektron in zwei γ -Quanten (Photonen) mit einer Energie von je 511 keV konvertiert und in nahezu gegensätzliche Richtungen gelenkt ($180^\circ \pm \theta$)¹³³. In Folge der Annihilation bewegen sich die Photonen mit Lichtgeschwindigkeit durch das Gewebe und erreichen beide im Idealfall die Detektoren des PET-Scanners (**Abb. 9b**), abhängig von der Distanz, welche das jeweilige Photon vom Ort der Annihilation bis zum Detektor zurücklegt, annähernd zur gleichen Zeit¹³³.

Die PET-Detektoren bestehen aus mehreren Blöcken von Szintillationskristallen, häufig bestehend aus Bismuth-Germanat (BGO) oder Lutetiumoxyorthosilikat (LSO), welche an Photosensoren gekoppelt und zur Erzeugung tomographischer Bilder ringförmig um das Sichtfeld des Scanners angeordnet sind (**Abb. 9b**)¹³⁵. Sobald die hochenergetischen γ -Quanten auf die Detektoren treffen, werden sie von den Szintillationskristallen gestoppt, wodurch die Kristalle wiederum angeregt werden. Durch diese Anregung werden mehrere Photonen frei, welche eine niedrigere Energie besitzen und mittels des Photosensors detektiert werden können. Hierfür werden häufig klassische Lichtsensoren, sogenannte „*Photomultiplier Tubes*“ (PMTs), eingesetzt. Deren Funktionsprinzip beruht darauf, aus den Photonen des Szintillationskristalles ein elektrisches Signal zu erzeugen und zu verstärken. Diese Konvertierung von Photonen in elektrische Ladungsträger (Photoelektrischer Effekt) und die gleichzeitig starke Signalverstärkung ermöglicht, mithilfe von nachgeschalteten Verstärkern und Messelektronik, die Messung eines elektrischen Signals¹³⁵. Das Signal enthält die Informationen zur Energie und zum Detektionszeitpunkt der ursprünglichen γ -Quanten, welche die Grundlagen zur Rekonstruktion der Daten in ein quantitatives, dreidimensionales Bild bilden.

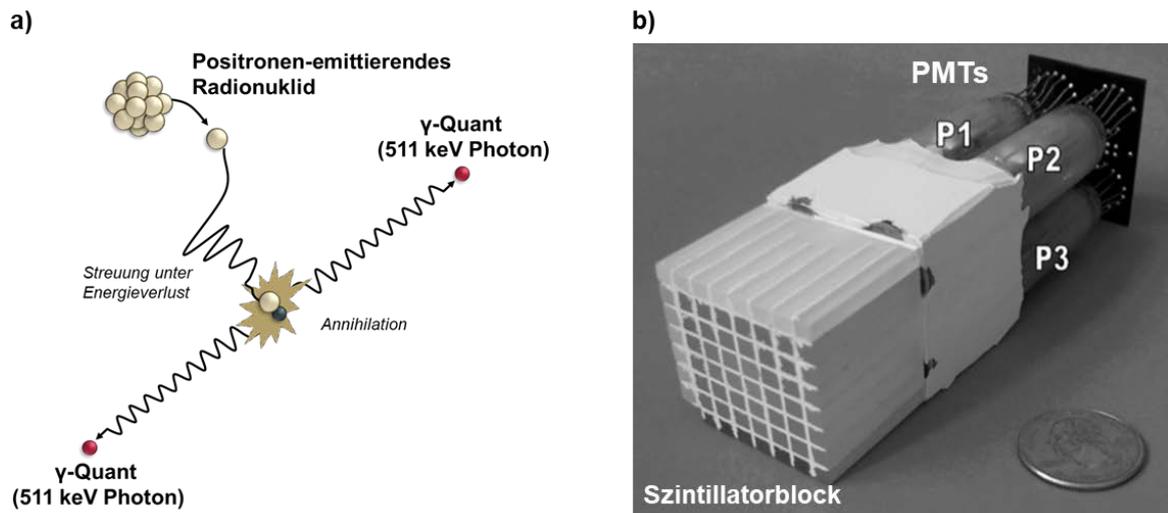


Abb. 9: Grundprinzip der PET. (a) Während der Atomkern eines Radionuklids zerfällt, wird ein Positron emittiert (β^+ Zerfall). Das Positron wandert eine kurze Distanz unter Energieverlust durch organisches Gewebe. Nachdem ein Positron auf ein Elektron trifft und mit diesem annihiliert, werden zwei Photonen mit einer Energie von jeweils 511 keV frei, welche in nahezu entgegengesetzte Richtungen fliegen (modifiziert nach S. Cherry, 2001)¹³³. **(b)** Abbildung eines PMT-Bismuth-Germanat-Blockdetektors eines klinischen PET-Systems (modifiziert nach Pichler *et al.*, 2008)¹³⁵.

1.5.1.2 Bildrekonstruktion

Wie bereits oben erwähnt, wird der Radiotracer in den Patienten oder das Versuchstier injiziert und akkumuliert aufgrund seiner biochemischen Eigenschaften in verschiedenen Geweben. Nach einer festgelegten Verteilungszeit, definiert durch eine gesättigte Gewebsakkumulation, wird der Patient bzw. der Versuchorganismus in das zentrale Sichtfeld („*Center field of view*“, FOV) des PET-Scanners gefahren, wo die Annihilation detektiert wird. Sobald nun zwei γ -Quanten innerhalb eines kleinen Zeitfensters nahezu zur gleichen Zeit (bei Kleintier-PET-Scannern in der Regel zwischen sechs bis zwölf ns) auf den Detektor treffen, wird das Ereignis als sogenannte Koinzidenz registriert. Davon ausgehend, dass eine Koinzidenz aus ein und derselben Annihilation entstammt, wird eine Koinzidenzlinie („*Line of Response*“, LOR), eine fiktive Linie zwischen den beiden Kristallen, die das koinzidente Paar von γ -Quanten detektiert haben, angenommen¹³⁶. Zur Rekonstruktion der Daten werden die über die gesamte Scanzeit erfassten LORs aller Koinzidenzereignisse schließlich anhand ihrer radialen und „angulären“ Eigenschaften sortiert. Das daraus resultierende zweidimensionale Histogramm, auch als Sinogramm bezeichnet, wird dann mittels komplexer Rekonstruktionsalgorithmen zu einem dreidimensionalen,

tomografischen Bild rekonstruiert. Dabei stellen die „*Filtered back projection*“ (FBP) oder „*Ordered subset expectation maximization*“ (OSEM) zwei der am häufigsten verwendeten Methoden dar, wobei das iterative Konzept hinter OSEM im Vergleich zum analytischen Verfahren via FBP eine bessere Bildqualität liefert^{136,137}.

Das aus einer PET rekonstruierte Bild repräsentiert letztendlich die molekulare Verteilung des Radiotracers im lebenden Organismus. Die Signalstärke, welche zur Datenauswertung herangezogen wird, richtet sich dabei nach der Menge des angereicherten Radiotracers; je höher die Akkumulation, desto mehr β -Zerfall tritt auf und desto mehr Photonen werden detektiert, was sich in einer erhöhten Signalstärke äußert.

1.5.1.3 Fehlerkorrektur

Neben der Detektion wahrer Koinzidenzereignisse treten auch Fehler aufgrund der sogenannten Compton-Streuung auf. Hierbei werden die γ -Quanten, bevor sie die PET-Detektoren erreichen, durch das umliegende Gewebe unter Energieverlust von ihrer ursprünglichen Flugbahn abgelenkt. Die aus dieser Streuung („*Scatter*“) ermittelte LOR stimmt folglich nicht mehr mit der wahren LOR überein und führt zu einem Messfehler. Genau wie die Detektion von Zufallsereignissen („*Random events*“) führt eine Streuung zwar zu koinzidenten Ereignissen, welche jedoch nicht für die Rekonstruktion verwendet werden dürfen und daher zum überwiegenden Teil verworfen werden¹³⁸ (**Abb. 10**). Der Verlust von Ereignissen durch Streuung oder direkter Absorption mittels Photoeffekt äußert sich in einer Fehlinterpretation der Signalstärke und Akkumulation des Radiotracers, vor allem aus tieferen Regionen des zu scannenden Organismus. Zudem können Streuungsfehler ein starkes Hintergrundrauschen auf den rekonstruierten Bildern verursachen und müssen daher korrigiert werden.

Zur Korrektur der Schwächung wird meist eine Transmissionsmessung mittels einer um das Objekt rotierenden Radioquelle (z. B. ^{57}Co oder ^{68}Ge) durchgeführt, um die Schwächungs- und Streuungseigenschaften des Objekts zu messen, was als Grundlage zur Schwächungskorrektur von Zufallsereignissen dient^{139,140}.

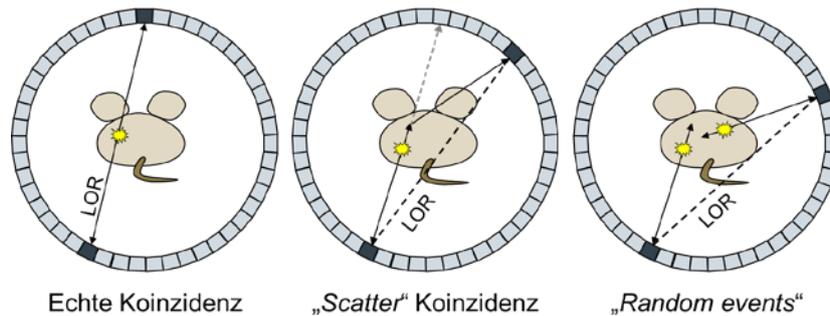


Abb. 10: Darstellung verschiedener Koinzidenzereignisse während eines PET-Scans. Neben einer echten Koinzidenz können durch Streuung („Scatter“) und Zufallsereignisse („Random events“) falsche Koinzidenzen detektiert werden und so zu Messfehlern führen (modifiziert nach Cherry *et al.*, 2006)¹³⁸.

Darüber hinaus treten weitere physikalische Faktoren auf, welche die Bildqualität beeinträchtigen können und nicht unwesentlich für die quantitative Auswertung der detektierten Signale sind. Durch leicht untereinander abweichende Strukturen der Kristalle, bedingt durch deren Herstellung, kann sich die Sensitivität zwischen den einzelnen Detektorpaaren minimal unterscheiden. Mittels einer Messung von Radiophantomen, welche eine bekannte Menge an Radioaktivität innerhalb einer definierten, meist zylindrischen Form enthalten, kann dieser Fehler korrigiert werden (Normalisierung)¹⁴¹.

Da die Elektronik der Detektoren zu langsam ist, um alle Ereignisse zu prozessieren, kommt es vor allem bei einer hohen Aktivitätsmenge zu einem Signalverlust. Diese durch die sogenannte Totzeit nicht erfassten Koinzidenzereignisse können mittels einem statistischen Verfahren („*Dead Time Correction*“) teilweise korrigiert werden¹³⁷. Um zudem die Totzeit eines Systems zu verringern, können Verbesserungen der nachgeschalteten Elektronik in Form von zeitlich komprimierten Signalen sowie einer schnelleren Datenverarbeitung vorgenommen werden.

1.5.1.4 PET-Tracer und das Tracer Prinzip

Zur Herstellung von metabolischen Radiotracern werden meist kurzlebige Radionuklide wie ^{15}O , ^{13}N , ^{11}C und ^{18}F verwendet. Antikörper und Proteine hingegen werden oft an ^{64}Cu -gekoppelte Chelatoren gebunden, welche sich durch die längere Halbwertszeit des radioaktiven Kupfers *in vivo* sehr gut, bis zu 48 h, detektieren

lassen¹⁴². Radionuklide mit noch längeren Halbwertszeiten wie ⁸⁹Zr ermöglichen die Erweiterung von Detektionszeitpunkten auf mehr als 96 h^{143,144}.

Neben einer hohen Stabilität der Radiomarkierung stellen eine geringe physiologische Toxizität und die weitgehende Erhaltung der ursprünglichen biologischen Funktion der Tracer die wichtigsten Anforderungen für deren Herstellung dar. Daher ist es von enormer Bedeutung, die Pharmakokinetik bei der Etablierung neuer Tracer zu berücksichtigen.

Weiter werden Radiotracer in sehr kleinen Dosen verabreicht, was eine physiologische Veränderung oder Beeinträchtigung des zu analysierenden Stoffwechselprozesses verhindern soll. Dieses von Georg de Hevesy entwickelte Tracer-Prinzip¹⁴⁵ wurde im Jahre 1943 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet.

1.5.1.5 ¹⁸F- Fluoro-Desoxy-Glucose

¹⁸F-Fluoro-Desoxy-Glucose (¹⁸F-FDG) ist ein radiomarkiertes Glukosemolekül und der im Patienten weltweit am häufigsten zur Detektion maligner Tumore eingesetzte PET-Tracer. Nach seiner Verabreichung wird ¹⁸F-FDG, wie auch die natürlich vorkommende Glukose, über Glukosetransporter (hauptsächlich GLUT-1) vom Blut in die Zellen transportiert und dort durch die Hexokinase zu Glukose-6-Phosphat (G6P) phosphoryliert. Im Gegensatz zur natürlichen Glukose kann ¹⁸F-FDG durch die fehlende Hydroxylgruppe an C-2 nicht weiter verstoffwechselt werden. Die relativ geringe Konzentration der Glukose-6-Phosphatase in der Zelle, welche die Dephosphorylierung von ¹⁸F-FDG-6-P katalysieren kann, sorgt dafür, dass ¹⁸F-FDG-6-P in der Zelle zurückgehalten wird und sich in Folge dessen in Zellen mit hohem Energiebedarf anreichert¹⁴⁶⁻¹⁴⁸.

¹⁸F-FDG wird jedoch nicht nur zur Detektion maligner Tumore und deren Metastasen, welche einen erhöhten Energiebedarf aufweisen, eingesetzt. Vielmehr wird es auch innerhalb der neurologischen Forschung und zur Darstellung des Glukosemetabolismus im Myokard angewendet^{149,150}. Durch die relativ weit verbreitete Anwendung in Klinik und Forschung ist ¹⁸F-FDG einer der am besten erforschten PET Tracer. ¹⁸F-FDG dient als Goldstandard zur Diagnose von Krankheiten und wird zudem zur Beurteilung von Tumorstadien und des

Behandlungsverlaufs verwendet¹³³. Im Rahmen von Immuntherapien maligner Erkrankungen wird ^{18}F -FDG zur Detektion von Läsionen, aber auch als neues, zusätzliches Kriterium zur Beurteilung des Therapieerfolgs herangezogen¹⁵¹.

1.5.2 Magnetresonanztomografie

Die MRT ist eine Weiterentwicklung der Kernspin-Resonanz-Spektroskopie von Paul Lauterbur und Peter Mansfield aus dem Jahr 1970, welche 2003 mit dem Nobelpreis für Medizin und Physiologie ausgezeichnet wurde. Die ersten Magnetresonanzbilder wurden 1973 generiert und waren wegweisend für die medizinische MRT¹⁵². Wie auch die PET ist die MRT eine nicht invasive Bildgebungsmodalität, welche jedoch unter Verwendung nicht-ionisierender Strahlung detaillierte morphologische und anatomische Bilder liefert. Da die MRT einen herausragenden Weichteilkontrast liefert, wird diese routinemäßig unter anderem zur Untersuchung des Gehirns, der Wirbelsäule, der Gelenke, der Muskulatur und zur Detektion von malignen Geweben verwendet. Anders als die PET, liefert eine MRT-Aufnahme jedoch keinerlei Informationen über Stoffwechselprozesse und weist zudem eine viel geringere Sensitivität auf^{134,135}.

Das Grundprinzip der MRT ist darauf begründet, dass der menschliche Körper zu ca. 70% aus Wasser besteht und wird im Folgenden nach van Geuns *et al.* beschrieben¹⁵³.

1.5.2.1 Prinzip und Funktionsweise einer MRT

Wasserstoffkerne erzeugen innerhalb eines Magnetfeldes ein magnetisches Dipolmoment (kurz: magnetisches Moment), welches wiederum, um eine anatomische Standardaufnahme zu erzeugen, in ein elektrisches Signal umgewandelt und detektiert werden kann. Darüber hinaus lassen sich jedoch auch andere Elemente wie ^{13}C , ^{17}O , ^{19}F oder ^{31}P , welche ebenfalls ein magnetisches Moment erzeugen, als Grundlage für eine MRT-Messung verwenden¹⁵³.

Wasserstoffkerne (Protonen) besitzen natürlicherweise einen Eigendrehimpuls („Spin“) und verfügen dadurch über ein magnetisches Moment. In Abwesenheit eines Magnetfeldes sind Protonen zufällig im Raum orientiert, wodurch sich deren

magnetische Momente gegenseitig aufheben. Befinden sie sich jedoch, wie beispielsweise während einer MRT, in einem starken Magnetfeld, richten sich die Protonen parallel oder antiparallel zum Magnetfeld aus. Da sich mehr Protonen parallel (einem energetisch günstigeren Zustand) als antiparallel zum Magnetfeld ausrichten und sich daher nicht alle magnetischen Momente aufheben lassen, tritt eine Netto-Magnetisierung auf. Diese lässt sich in einem gedachten dreidimensionalen Feld als Vektor in Richtung des Magnetfelds, welches die Z-Achse bildet, darstellen und wird als Längsmagnetisierung bezeichnet¹⁵³.

Während die Protonen im Magnetfeld ausgerichtet sind, kreisen sie um die Richtung des externen Feldes (Präzession) (**Abb. 11a**). Die Frequenz der Präzession, auch als Larmorfrequenz bezeichnet, ist abhängig von der Feldstärke des externen Magnetfelds und dem gyromagnetischen Faktor eines Teilchens (z. B. für Wasserstoffprotonen bei 1,5 T: 63,75 MHz/T). Wird nun zusätzlich zum Magnetfeld ein kurzer Radiofrequenzpuls (RF-Puls) angelegt, welcher der Larmorfrequenz der Protonen entspricht, werden diese durch die Resonanz angeregt und richten sich senkrecht zum Magnetfeld aus. Die Längsmagnetisierung nimmt folglich ab. Der RF-Puls führt außerdem dazu, dass sich die minimal unterschiedlich präzidierenden Protonen synchronisieren, folglich in Phase zueinander sind und sich nicht mehr gegenseitig aufheben. Dadurch entsteht eine weitere Magnetisierung, welche im dreidimensionalen Feld auf der X/Y-Ebene liegt. Man spricht daher auch von einem 90° Puls, welcher eine Transversalmagnetisierung verursacht. Da die Transversalmagnetisierung nicht mehr auf der Z-Achse des Magnetfelds liegt, lässt sich diese messen. Lässt der kurze RF-Puls nach, Relaxieren die Protonen in ihren ursprünglichen Zustand. Dies äußert sich, bedingt dadurch, dass die Protonen wieder außer Phase geraten und sich im Magnetfeld ausrichten, in einer Abnahme der Transversalmagnetisierung (Transversale Relaxation) und einer Zunahme der Längsmagnetisierung (Longitudinale Relaxation).

Die Zeit, welche für die jeweilige Relaxation benötigt wird, wird folgendermaßen definiert: T1 beschreibt die Zeit, in der sich 63% der Längsmagnetisierung wieder erholt haben. T2 beschreibt wiederum die Zeit, in der die Transversalmagnetisierung um 63% abgenommen hat, also nur noch 37% der Protonen in Phase sind (**Abb. 11b**).

Die bei der Relaxation frei gewordene Energie kann durch elektromagnetische Induktion einer Empfängerspule gemessen und für die Bildrekonstruktion verwendet werden. Dabei wird die gemessene Spannung in einem Phasen-Frequenz-Diagramm aufgetragen und mittels einer Fourier-Transformation in ein anatomisches Bild übersetzt¹⁵³.

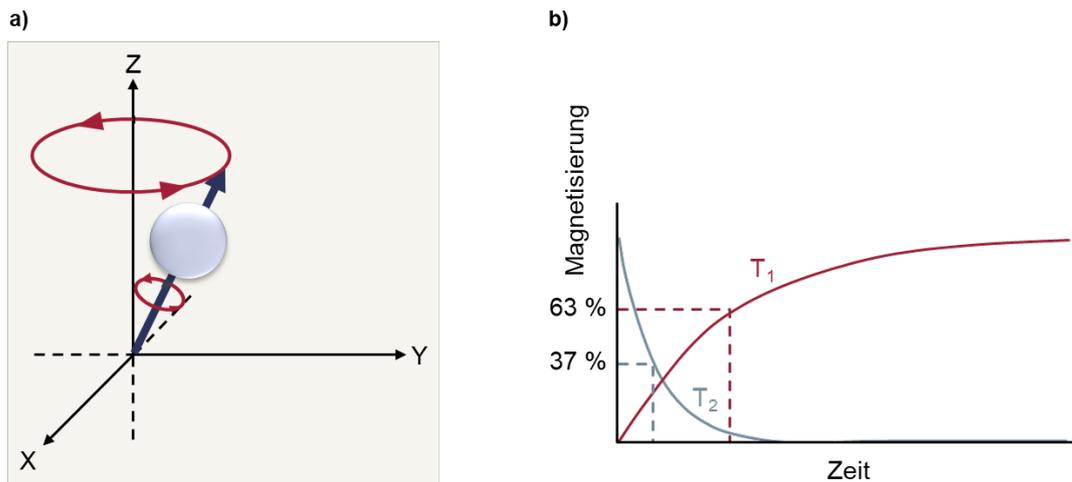


Abb. 11: Grundprinzip der Magnetresonanztomografie. (a) In einem externen Magnetfeld richten sich Protonen an den Feldlinien, welche in einem fiktiven dreidimensionalen Feld der Z-Achse entsprechen, aus. Neben der Eigenrotation („Spin“) kreisen sie im Magnetfeld um die Z-Achse (Präzession) mit einer individuellen, von der magnetischen Feldstärke abhängigen Larmorfrequenz. (b) Darstellung des zeitlichen Verlaufs von longitudinaler und transversaler Relaxation, bezogen auf die ursprüngliche prozentuale Magnetisierung. T₁ entspricht dabei der Zeit, in der 63% der Längsmagnetisierung wiederhergestellt sind, wohingegen T₂ den Zeitpunkt darstellt, zu dem nur noch 37% der Transversalmagnetisierung vorhanden sind (modifiziert nach van Geuns *et al.*, 1999)¹⁵³.

Die Zeitkonstanten T₁ und T₂ unterscheiden sich je nach Wasser- und Fettgehalt unterschiedlicher Gewebe, bedingt durch eine unterschiedliche Protonendichte. Die Relaxation braucht beispielsweise in Wasser viel länger als in Fett. Durch diese Eigenschaften lassen sich unterschiedliche Gewebe voneinander abgrenzen und anatomisch darstellen¹⁵³.

1.5.2.2 Gradientenspulen und Sequenzen

Um den Ursprung eines Signals zu lokalisieren, werden sogenannte Gradientenspulen eingesetzt. Diese Spulen werden zusätzlich zum Magnetfeld angelegt und schaffen einen Gradienten in alle drei Richtungen (X/Y/Z). Dadurch

werden die Protonen an jedem Gitterpunkt (Voxel) mit einer individuellen Larmofrequenz ausgestattet. Da jedes Voxel nun eine einzigartige Kombination an Frequenz und Phase besitzt und nur auf einen bestimmten RF-Puls in seinem eigenen Resonanzbereich reagiert, ist es möglich, den exakten Ursprung eines Signals zu detektieren¹⁵³.

Wird nur ein einzelner RF-Puls ausgesendet, fällt das Signal durch die relativ zügige Relaxation sehr schwach aus. Um das Signal zu verstärken und damit den Bildkontrast zu erhöhen, kann ein weiterer RF-Puls von 180°, welcher die relaxierenden Protonen erneut in Phase bringt, ausgesendet werden. Die resultierende verlängerte Relaxationszeit wird als Echozeit (TE) bezeichnet. TR bezeichnet die Repetitionszeit und wird durch die Zeitspanne zwischen der Aussendung zweier 90° RF-Pulse definiert¹⁵³.

Ein MRT-Messprotokoll kann durch eine spezifische Auswahl von TR und TE und wiederholten Abfolgen einer Sequenz unterschiedliche Gewebeeigenschaften hervorheben. Zur Darstellung wasserreicher Gewebe werden lange TR- und TE-Zeiten gewählt, so dass die Protonen ausreichend Zeit haben, zu relaxieren, bevor der nächste 90° RF-Puls angelegt wird und folglich ein stärkeres Signal detektiert werden kann. Man spricht daher auch von einer T2-gewichteten Sequenz (Wasser erscheint hell). T1-gewichtete Sequenzen verhalten sich konträr (kurze TR und TE) und eignen sich gut zur Darstellung von Fettgewebe (Fett erscheint hell)¹⁵³.

1.6 Monitoring von Immuntherapien und Detektion des Therapieerfolgs

Trotz dem Erfolg, den Immuntherapien seit ihrer Integration in die klinische Routine verzeichnen, steht die Forschung immer noch vor großen Herausforderungen. Die sehr prominenten IC-Inhibitoren Ipilimumab und Nivolumab sind beim metastasierten Melanom beide als Erstlinientherapie zugelassen und erzielen in Form von Monotherapien mittlerweile Ansprechquoten von bis zu 40%. Durch deren Kombination kann die Ansprechrate sogar auf bis zu 60% gesteigert werden¹⁵⁴. Jedoch stellen ein schnell voranschreitendes Tumorwachstum bei Nicht-Ansprechern und das Auftreten von nicht zwingend mit einem Therapie-Misserfolg verknüpften Nebenwirkungen bei vielen Patienten ein großes Problem dar^{155,156}.

Eine möglichst frühzeitige Identifizierung von Nicht-Ansprechern auf die zudem sehr kostenintensiven Immuntherapien ist daher nicht nur für die Patienten selbst, sondern auch für das gesamte Gesundheitssystem von enormer Bedeutung^{157,158}. Bis heute stehen jedoch noch keine zuverlässigen Biomarker zur Verfügung, anhand derer ein Therapieversagen im Verlauf schneller erfasst und die Risikostratifikation vor Beginn einer Therapie verbessert werden kann. Zahlreiche Studien widmen sich daher der Identifizierung von Biomarkern, welche eng mit einem Behandlungserfolg verknüpft sein können.

Eine Vielzahl an Studien hat gezeigt, dass eine hohe Expression von PD-L1 in vielen soliden Tumor-Geweben mit einem schnelleren Wachstum und einem schlechteren Gesamtüberleben assoziiert ist^{159,160}. Daher scheint gerade für solche Tumore die therapeutische Blockade der PD-1/PD-L1-Achse, oder anderer ICs eine rationale Behandlungsmethode darzustellen. In der Praxis führt dies jedoch nicht zwingend zum Erfolg. Zudem ist für die Klassifizierung der PD-L1-Expression eine Tumor-Biopsie erforderlich, welche immer mit einem invasiven Eingriff verbunden ist. Aus Mangel an zuverlässigen Alternativen bleibt die Beurteilung der PD-L1-Expression auf Tumoren derzeit die Methode der Wahl zur Risikostratifizierung⁸⁹. Dies verdeutlicht den enormen Bedarf an der Entwicklung neuer und vor allem nicht invasiver diagnostischer Methoden.

Im Gegensatz zu konventionellen Therapieformen, wie der Chemo- und Radiotherapie, oder zielgerichteten Therapien, welche spezifisch gegen Tumorzellen oder deren Stoffwechsel wirken, greifen Immuntherapien das Tumorstoffwachstum nur indirekt an, indem sie beispielsweise die Immunogenität von Tumoren modulieren. Dies kann kurzfristig sogar zu einer Vergrößerung des Tumorstoffwachstums führen. In diesen Fällen versagen klassische Kriterien zur Bewertung des Behandlungsverlaufs („*Response evaluation criteria of solid tumors*“, RECIST)¹⁶¹, welche die durch radiologische Verfahren, wie der MRT oder CT, ermittelte Tumorstoffgröße, oder durch nuklearmedizinischen Methoden wie der PET, ermittelte metabolische Parameter wie den Glukosemetabolismus und die Tumorstoffgröße berücksichtigen. Eine so genannte Pseudoprogression von Tumoren tritt mit einer Rate von ca. 7% vor allem in Patienten mit malignen Melanom unter Checkpoint-Inhibitor-Therapie (CIT) auf¹⁶². Daher wurden Methoden wie RECIST mittlerweile für die Bewertung von

Immuntherapien durch eine engmaschigere Kontrolle und strengere Bewertung des Tumorwachstums („*immune-related*“ RECIST, iRECIST) angepasst^{162,163}.

Heutzutage häufen sich zudem Belege, dass eine erfolgreiche Immuntherapie systemische Reaktionen hervorruft, welche primäre und sekundäre lymphatische Organe wie das Knochenmark und die Milz einschließen. Tatsächlich ist über die Beteiligung dieser Organe an der Initiierung und Aufrechterhaltung einer anti-tumoralen Antwort bisher nur wenig bekannt und auch das komplexe Zusammenspiel der einzelnen Immunzellpopulationen untereinander ist bisher weitgehend unerforscht¹⁶⁴.

Im Gegensatz zu einer Analyse von Immunzellpopulationen, Zytokinen und Chemokinen im Blut von Patienten zur Feststellung des Immunstatus vor und während einer Therapie, ermöglicht die molekulare Bildgebung eine zeitliche und räumliche Quantifizierung zielgerichteter molekularer Marker im ganzen Körper. Der Einsatz radiomarkierter Antikörper ermöglicht die Detektion verschiedenster Immunzellpopulationen in Organen des Immunsystems, wie auch im Tumor, zu verschiedenen Zeitpunkten. Darüber hinaus bieten metabolische Marker wie ¹⁸F-FDG die Möglichkeit, molekulare Informationen zu erfassen.

2 Fragestellung

Das Ziel dieser Dissertation war die Etablierung und Evaluierung einer kombinierten Immuntherapie, bestehend aus einer initialen Niedrig-Dosis-Ganzkörperbestrahlung, einem adoptiven Transfer von IFN- γ produzierenden Tag2-spezifischen CD4⁺ Th1-Zellen (T_H1-Zellen) und der Antikörper-vermittelten Blockade der ICs PD-L1 und LAG-3. Neben der Bewertung des Therapieansprechens, molekularen und zellulären Analysen des TMEs und der sekundär lymphatischen Organe, sollte zudem mittels PET und MRT unter dem Einsatz des Radiomarkers ¹⁸F-FDG ein systemischer Therapieeffekt auf den Glukosemetabolismus in der Milz untersucht werden.

Hierzu sollten folgende Fragestellungen beantwortet werden:

- Welche Wirkung hat eine T_H1-Zell-basierte Immuntherapie in RT2-Mäusen mit fortgeschrittenen Inselzellkarzinomen und kann die Blockade der ICs PD-L1 und LAG-3 den Therapieeffekt verstärken?

Hierzu wurden Kurz- und Langzeitbehandlungen angesetzt, um das Therapieansprechen über den Einfluss auf die Blutglukose und auf die mittlere Überlebensrate der Versuchstiere zu bewerten. Weiter wurde die Therapie mittels MRT überwacht, um das Tumorwachstum nicht invasiv *in vivo* zu verfolgen.

- Welche Wirkmechanismen liegen dem Therapieerfolg zugrunde?

Aufgrund von intensiven Vorarbeiten im frühen RT2-Inselzellkarzinommodell wurde der Therapieeinfluss auf die Induktion eines Wachstumsarrests in Tumorzellen nun auch an fortgeschrittenen Tumoren untersucht. Dazu wurden die behandelten Tumore aus RT2xStat1^{-/-}-Mäusen mittels Immunfluoreszenz-Färbungen auf Zellproliferation (Ki67) und Expression der Seneszenzmarker p16 und β -Gal untersucht und den Ergebnissen aus den RT2-Wildtyp-Mäusen gegenübergestellt.

- Wie verhalten sich die adoptiv transferierten T_H1-Zellen unter der Kombinationstherapie und welchen Einfluss hat die Behandlung auf die Zusammensetzung der endogenen Immunzellpopulationen und die Induktion verschiedener T-Zellphänotypen?

Dazu wurde eine aufwendige Multifarben-Analyse am Durchflusszytometer durchgeführt, anhand derer die Verteilung der transferierten T_H1-Zellen und der endogenen Immunzellen im TME und den sekundär lymphatischen Organen untersucht wurde.

- Lässt sich der Therapieerfolg neben der Bewertung des Tumorwachstums auch anhand systemischer Effekte, beispielsweise einem veränderten Metabolismus der Milz, charakterisieren?

Um dies zu untersuchen, wurde der Glukosestoffwechsel der Milz vor und während einer T_H1-Zell- und IC-basierten Immuntherapie zu unterschiedlichen Zeitpunkten mittels ¹⁸F-FDG-PET nicht invasiv *in vivo* analysiert. Die Milz wurde zudem *ex vivo* auf die Zusammensetzung definierter Immunzellpopulationen analysiert.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in **Tab. 3** aufgeführt. Aus dieser Tabelle abweichende Geräte sind gesondert im Text vermerkt.

Tab. 3: Auflistung der verwendeten Geräte.

Gerät	Typ	Hersteller
Atempad	Graseby®	Graseby (Watford, GB)
Brutschrank	Heracell 150i	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
digitales Mikroskop	Nikon Eclipse 80i	Nikon Instruments Europe B.V. (Amsterdam, NE)
Dosiskalibrator	Capintec CRC-15R	Capintec Inc. (Florham Park, NJ, USA)
Durchflusszytometer	LSR-II	BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)
Durchflusszytometer (Multicolor)	LSR Fortessa	BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)
Entwässerer	Leica TP 1020	Leica Microsystems (Wetzlar, DE)
Gammazelle	Gammacell® 1000 Elite	Nordion Inc. (Ottawa, CAN)
"Gating"-Einheit (Atmung)	<i>n.d.</i>	SAInstruments (Stony Brook, NY, USA)
Glukosemessgerät	HemoCue® Glucose 201+	Radiometer GmbH (Krefeld, DE)
Immunostainer	<i>n.d.</i>	Ventana Medical Systems (Tucson, AZ, USA)
Infrarot-Wärmelampe	InfraPhil HP3616	Pilips (Amsterdam, NL)
Kleintier-MRT	7 T (ClinScan bzw. Biospec)	Bruker Biospin (Ettlingen, DE)
Kleintier-PET Scanner	Inveon PET	Siemens Preclinical Solutions (Knoxville, TN, USA)
konfokales Lasermikroskop	LSM 800	Carl Zeiss (Oberkochen, DE)
Kryostat	Frigocut 700	Leica Microsystems (Wetzlar, DE)
MACS Separator	QuadroMACS™	Milteny Biotec GmbH (Bergisch Gladbach, DE)
Maus-Ganzkörperspule	35 mm	Bruker Biospin (Ettlingen, DE)
Multifuge	Heraeus Multifuge 3SR Plus	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Neubauer Zählkammer	0,100 nm Tiefe	Hecht GmbH & Co KG (Sondheim, DE)
Paraffinausgießstation	Leica EG 1150	Leica Microsystems (Wetzlar, DE)
Ratten-Ganzkörperspule	72 mm	Bruker Biospin (Ettlingen, DE)
Röntgenröhre	Gulmay RT225	Glumay (Chertsey, UK)
Schüttelinkubator	MaxQ™ 6000	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Sterilbank	Hera Safe KS	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Thermocycler	peqSTAR	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen, DE)
Thermomixer	Thermomixer R	Eppendorf AG (Hamburg, DE)
Tischzentrifuge	Mikro 220R	Hettich AG (Bäch, CH)

3.2 Verbrauchsmaterialien

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Materialien sind in **Tab. 4** aufgeführt. Aus dieser Tabelle abweichende Materialien sind gesondert im Text vermerkt.

Tab. 4: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Material	Typ	Hersteller
24-Well Flachbodenplatte	24 Wells	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, DE)
6-Well Flachbodenplatte	6 Wells	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, DE)
96-Well Flachbodenplatte	96 Wells	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, DE)
Bluecap (40 µm)	BD Falcon™ Röhrchen mit Zellfilterkappe (40 µm)	BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)
Detektions Kit für die Histologie	iVIEW DAB Detection Kit	Ventana Medical Systems (Tucson, AZ, USA)
Detektions Kit für die Histologie	BasicDAB Detection Kit	Ventana Medical Systems (Tucson, AZ, USA)
EDTA-Mikrovetten	1,5 ml	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Einbettmedium	Tissue-Tek® O.C.T.™	Sakura Finetek (Alphen aan den Rijn, NL)
Falcon	BD Falcon™ 50 ml Tube	BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)
Glukose-Küvetten	HemoCue® Glucose 201+ Küvetten	Radiometer GmbH (Krefeld, DE)
Insulinspritzen	BD Plastipak (40 U)	BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)
Insulinspritzen	BD Plastipak (20 U)	BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)
Kapillaren	25 µl	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt, DE)
Kryoröhrchen	CRYO.S™ (1,5 ml)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, DE)
LS-Säule	LS	Milteny Biotec GmbH (Bergisch Gladbach, DE)
Reaktionsgefäße	1,5 ml	Eppendorf AG (Hamburg, DE)
Spritzenkanüle	Sterican 25 G (0,5 x 25 mm)	Braun AG (Melsungen, DE)
Spritzenkanüle	Sterican 30 G (0,3 x 12 mm)	Braun AG (Melsungen, DE)
Spritzenkolben	BD Plastipak 1 ml	BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)
Zellkulturflasche	Cellstar™ 100 ml	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, DE)
Zellsieb (70 µm)	BD Falcon™ 70 µm cell strainer	BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)

3.3 Antikörper

3.3.1 Therapeutische *in vivo* Antikörper

Alle in dieser Arbeit verwendeten therapeutischen Antikörper und deren Isotyp-Kontrollen für die *in vivo* Studien zur Immuntherapie wurden von BioXCell (West Lebanon, NH, USA) bezogen und sind in **Tab. 5** aufgelistet.

Tab. 5: Auflistung der in den *in vivo* Studien eingesetzten Antikörper.

Antikörper	Klon	Isotyp	
anti-PD-L1 mAb	10F.9G2	IgG2b	therapeutischer mAb
anti-LAG-3 mAb	C9B7W	IgG1	therapeutischer mAb
anti-keyhole limpet hemocyanin (KLH) mAb	LTF-2	IgG2b	Isotyp-Kontrolle
anti-horseradish peroxidase (HRP) mAb	HRPN	IgG1	Isotyp-Kontrolle

3.3.2 Antikörper für die Zellkultur

Soweit nicht anderweitig beschrieben, wurden alle in der Zellkultur eingesetzten Antikörper aus Hybridom-Überständen gewonnen und sind in **Tab. 6** aufgelistet.

Tab. 6: Auflistung der in der Zellkultur eingesetzten Antikörper.

Antikörper	Klon	Herkunft
anti-CD4 mAb	Gk1.5	ATCC (Manassas, VA, USA)
anti-CD8 mAb	5367.2	ATCC (Manassas, VA, USA)
MAR	MAR 18.5	ATCC (Manassas, VA, USA)
anti-IL-4 mAb	11B11	Dr. Jürgen Brück (Universitäts-Hautklinik Tübingen)

3.3.3 Fluoreszierende Antikörper für die Durchflusszytometrie

Alle in dieser Arbeit verwendeten fluoreszierenden Antikörper für die Durchflusszytometrie und deren Bezugsquellen sind in **Tab. 7** und **Tab. 8** aufgelistet. Die Tabellen bieten eine Übersicht über die Zusammenstellung der Antikörpercocktails („*Panels*“), wie sie in den einzelnen *ex vivo* Experimenten eingesetzt wurden. Jedes „*Panel*“ enthielt zudem den nicht-fluoreszierenden Antikörper anti-CD16/32, welcher die Fc-Rezeptoren auf der Zelloberfläche von Immunzellen blockiert und somit unspezifische Bindungen der fluoreszierenden Antikörper verhindern sollte.

Die Analysen wurden an Durchflusszytometern der Typen LSR-II (für max. 8 Farben) und LSR Fortessa (Multifarbenanalyse, für max. 18 Farben) durchgeführt. Eine detaillierte Beschreibung der durchflusszytometrischen Analysen befindet sich unter **Abschnitt 3.13**.

Tab. 7: Auflistung der verwendeten Antikörper für die Durchflusszytometrie am LSR-II. Die Antikörper wurden vorwiegend kommerziell bezogen. Lediglich der Antikörper zur Detektion des transgenen T-Zellrezeptors, Tag2-TCR (Klon 9H5.1) wurde freundlicherweise von I. Förster zur Verfügung gestellt und in eigener Herstellung mit dem entsprechenden Fluorochrom konjugiert („*PE-Conjugation Kit Lightning-Link®*“, Abcam, Cambridge, GB).

Ziel-Antigen	Fluorochrom	Klon	Hersteller
Alle			
CD16/32 (FC Block)	ohne	93	Biolegend (San Diego, CA, USA)
Panel A			
CD3	V450 (Pacific Blue)	500A2	BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)
CD45.2	V500 (Pacific Orange)	104	BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)
CD8	FITC	53-6.7	BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)
Tag2-TCR	PE	9H5.1	I. Förster <i>et al.</i> (Immunity, 1955)
CD25	APC	PC61.5	eBioscience Inc., San Diego, CA, USA)
CD69	PE-Cy7	H1.2F3	eBioscience Inc., San Diego, CA, USA)
CD4	APC-Cy7	GK1.5	eBioscience Inc., San Diego, CA, USA)
Panel B			
Gr-1	V450 (Pacific Blue)	RB6-8C5	eBioscience Inc., San Diego, CA, USA)
CD45.2	V500 (Pacific Orange)	104	BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)
B220	FITC	RA3-6B2	eBioscience Inc., San Diego, CA, USA)
Ly6G	PE	1A8	BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)
Ly6C	APC	AL-21	BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)
CD11b	PE-Cy7	M1/70	BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)
CD19	APC-Cy7	1D3	eBioscience Inc., San Diego, CA, USA)
Panel C			
CD8	V450 (Pacific Blue)	53-6.7	Biolegend (San Diego, CA, USA)
CD45.2	V500 (Pacific Orange)	104	BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)
PD-1	FITC	29F.1A12	Biolegend (San Diego, CA, USA)
LAG-3	PE	C9B7W	Biolegend (San Diego, CA, USA)
CD25	APC	PC61.5	BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)
PD-L1	PE-Cy7	10F.9G2	Biolegend (San Diego, CA, USA)
CD4	APC-Cy7	GK1.5	BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)

Tab. 8: Auflistung der verwendeten Antikörper für die Durchflusszytometrie am LSR Fortessa.

Die Antikörper wurden vorwiegend kommerziell bezogen. Lediglich der Antikörper zur Detektion des transgenen T-Zellrezeptors, Tag2-TCR (Klon 9H5.1) wurde freundlicherweise von I. Förster zur Verfügung gestellt und in eigener Herstellung mit dem entsprechenden Fluorochrom konjugiert („PE-Conjugation Kit Lightning-Link®“, Abcam, Camebridge, GB).

Ziel-Antigen	Fluorochrom	Klon	Hersteller
Alle			
CD16/32 (FC Block)	ohne	93	Biolegend (San Diego, CA, USA)
freie Amine (tote Zellen)	Zombie NIR™	-	Biolegend (San Diego, CA, USA)
Panel D			
Ly-6C	PE/Cy7	HK1.4	Biolegend (San Diego, CA, USA)
PD-L1 (CD274 / B7-H1)	BV 605	10F.9G2	Biolegend (San Diego, CA, USA)
Ly-6G	FITC	1a8	Biolegend (San Diego, CA, USA)
MHC-II (I-A/I-E)	PerCP	M5/114.15.2	Biolegend (San Diego, CA, USA)
CD11c	APC	N418	Biolegend (San Diego, CA, USA)
CD11b	BV 510	M1/70	Biolegend (San Diego, CA, USA)
CD69	BV 650	H1.2F3	Biolegend (San Diego, CA, USA)
B220 (CD45R)	BV 785	RA3-6B2	Biolegend (San Diego, CA, USA)
CD3	BV 421	145-2C11	Biolegend (San Diego, CA, USA)
NKp46 (CD335)	PE	29A1.4	Biolegend (San Diego, CA, USA)
Panel E			
Tag2-TCR	PE	9H5.1	I. Förster <i>et al.</i> (Immunity, 1955)
CD8	Alexa Fluor 700	53-6.7	Biolegend (San Diego, CA, USA)
CD3	FITC	500A2	Biolegend (San Diego, CA, USA)
CD44	BV 510	IM7	Biolegend (San Diego, CA, USA)
TIM-3 (CD366)	BV 605	RMT3-23	Biolegend (San Diego, CA, USA)
PD-1 (CD279)	BV 711	29F.1A12	Biolegend (San Diego, CA, USA)
CD127 (IL-7 Ra)	BV 785	A7R34	Biolegend (San Diego, CA, USA)
CD62L	PE/Cy7	MEL-14	Biolegend (San Diego, CA, USA)
CD4	PerCP	GK1.5	Biolegend (San Diego, CA, USA)
LAG-3 (CD223)	APC	C9B7W	Biolegend (San Diego, CA, USA)
CD25	BV 421	PC61	Biolegend (San Diego, CA, USA)
CTLA-4 (CD152)	PE/Dazzle	UC10-4B9	Biolegend (San Diego, CA, USA)

3.3.4 Antikörper für die Histologie

Alle in dieser Arbeit verwendeten primären Antikörper für die Färbung von Paraffinschnitten und deren Bezugsquellen sind in **Tab. 9** aufgelistet. Die

Sekundärantikörper entstammen den jeweiligen Detektionskits für die Histologie (Tab. 4). Die Antikörper für Immunfluoreszenzfärbungen sind in Tab. 10 aufgeführt.

Tab. 9: Auflistung der primären Antikörper für die Immunhistochemie.

Antikörper	Klon	Verdünnung	Hersteller
anti-CD3 mAb	SP7	1:200	DCS Diagnostics GmbH & Co. KG (Hamburg, DE)
anti-CD4 mAb	<i>n.d.</i>	1:100	Sino Biological Inc. (Peking, CN)
anti-B220 mAb	RA3-6B2	1:50	BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)
anti-CD31 mAb	<i>n.d.</i>	1:25	Abcam (Cambridge, GB)
anti-PD-L1 mAb	E1L3N	1:50	Cell Signaling Technology (Cambridge, GB)
anti-MPO mAb	<i>n.d.</i>	gebrauchsfertig	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
anti-Tag2 mAb	PAb 101	1:200	eigene Herstellung

Tab. 10: Auflistung der Antikörper für die Immunfluoreszenz.

Antikörper	Wirt	Verdünnung	Hersteller
Primärantikörper			
anti-p16Ink4a	Hase	1:100	Bio-Rad AbD Serotec GmbH (Puchheim, DE)
anti-Ki67	Ratte	1:100	eBioscience Inc., San Diego, CA, USA)
anti-p21 ^{CIP1}	Ratte	1:100	Abcam (Cambridge, GB)
anti-CD20	Ziege	1:50	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)
anti-CD3	Hase	1:150	DCS Diagnostics GmbH & Co. KG (Hamburg, DE)
Sekundärantikörper			
anti-Hase-Cy3	Esel	1:500	Dianova GmbH (Hamburg, DE)
anti-Ratte-Alexa647	Esel	1:500	Dianova GmbH (Hamburg, DE)
anti-Ratte-Cy3	Esel	1:500	Dianova GmbH (Hamburg, DE)
anti-Ziege-Cy3	Esel	1:500	Dianova GmbH (Hamburg, DE)
anti-Hase-Alexa488	Esel	1:500	Dianova GmbH (Hamburg, DE)

3.4 Synthetische Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten synthetischen Oligonukleotide (Primer) zur Genotypisierung transgener Mauslinien mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden von Eurofins (Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg, DE) bezogen und sind in Tab. 11 aufgelistet.

Tab. 11: Auflistung der synthetischen Oligonukleotide für Genotypisierungen.

Bezeichnung	Gen	Sequenz (5' - 3')	T_m (°C)
RIP1-Tag2-SV1	Tag2	GGA CAA ACC ACA ACT AGA ATG CAG TG	63,2
RIP1-Tag2-SV5	Tag2	CAG AGC AGA ATT GTG GAG TGG	59,8
Tag-TCR-IF2-1k	Tag2-TCR	TAT AAT TAG CTT GGT CCC AGA GC	58,9
Tag-TCR-IF9-1k	Tag2-TCR	CTG AAG TGC AGT TAT GAG GAC AGC	62,7

3.5 Nährmedien und Puffer

Alle zur Isolation und Verarbeitung von Zellen aus murinen Geweben eingesetzten Medien und Puffer sind im Folgenden beschrieben. Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS, Dulbecco's „Phosphat-buffered Saline“; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) wurde vorwiegend nach Zusatz von fötalem Kälberserum (FCS) zur Isolation von CD4⁺ Zellen und in der Durchflusszytometrie eingesetzt. FCS wurde stets vor Gebrauch für 30 min bei 56°C hitzeinaktiviert.

3.5.1 Nährmedium zur Kultivierung von T-Zellen (T-Zellmedium)

Zur Kultivierung von antigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen wurde Dulbecco's „modified eagles“ Medium (DMEM; Biochrom AG, Berlin, DE) verwendet und mit den in **Tab. 12** aufgelisteten Zusätzen versehen.

Tab. 12: Zusätze für das T-Zellmedium.

Zusatz	Konzentration	Hersteller
Hyclone™ Fötales Kälberserum (FCS) (hitzeinaktiviert)	10%	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)- Ethansulfonsäure (HEPES)-Pufferlösung	10 mM	Biochrom AG (Berlin, DE)
Natrium-Pyruvat	1 mM	Biochrom AG (Berlin, DE)
Minimales Essentielles Medium (MEM) Aminosäurelösung	1%	Gibco (Eggenstein, DE)
Penicillin-Lösung	100 U/ml	Gibco (Eggenstein, DE)
Streptomycin	100 µg/ml	Gibco (Eggenstein, DE)
β-Mercaptoethanol	0,05 mM	Sigma Aldrich (Steinheim, DE)

3.5.2 Sonstige Puffer und Lösungen

Tab. 13: Sonstige Puffer und Lösungen.

Puffer / Lösung	Zusammensetzung	Verwendung	Herkunft
RPMI-1640	Roswell-Park-Memorial-Institute 1640 Medium (ohne Zusätze)	Kryokonservierung	Biochrom AG (Berlin, DE)
Hyclone™ Fötale Kälberserum	hitzeinaktiviert	Zusatz zu Nährmedien	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Kollagenase-Verdaumedium	RPMI-1640 mit FCS (2%), Kollagenase D (1 mg/ml) und DNase I (100 µg/ml)	Kollagenase-Verdau	Kollagenase D: Roche AG (Basel, CH) DNase I: Roche AG (Basel, CH)
ACK Lysepuffer		Erythrozytenlyse	Lonza (Walkesville, MD, USA)
Komplement-Lösung	Kaninchenkomplement (gelöst in 1 ml H ₂ O und 9 ml PBS); steriltfiltriert	T-Zellkultur	Cedarlane (Burlington, CAN)
MACS-Puffer	PBS/1% FCS	T-Zell-Isolation	
FACS-Puffer	PBS/1% FCS (zur Fixierung von Antikörperfärbungen mit 0,5% Roti®-Histofix)	Durchflusszytometrie	
Gewebe-Lysepuffer	KCl (50 mM), MgCl ₂ (1,5 mM), Tris (10 mM, pH 8,3), NP40 (0,45 %), Tween 20 (0,45 %)	Genotypisierung (PCR)	
Roti®-Histofix:	Phosphat-gepufferte 4,5% Formaldehydlösung	Fixierung von Geweben	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Waschpuffer (Histologie)	PBS mit BSA (0,05 %), Tween-20 (0,05 %)	Histologie	Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)

3.6 Versuchstiere

Alle in dieser Arbeit verwendeten Tiere stammen aus eigenen Zuchten, den Zuchten der Universitäts-Hautklinik Tübingen, oder aus den Tierhaltungen des Forschungs- und Verfügungsgebäudes (FORS) der Universität Tübingen.

3.6.1 Zucht- und Haltungsbedingungen

Die Tiere wurden unter spezifisch-pathogenfreien Bedingungen in individuell ventilierten Käfigen („*Individually ventilated cages*“, IVCs) vom „*Typ 2 Long*“ (eigene Tierhaltung), oder unter spezifisch-pathogenfreien Bedingungen in Käfigen mit Filterhauben (alle übrigen Tierhaltungen), jeweils bei standardisierten Haltungsbedingungen (22 ± 1 °C Raumtemperatur, 50 ± 10 % relative Luftfeuchtigkeit und 12h Tag-Nacht-Rhythmus) gehalten. Den Tieren stand Futter und Wasser *ad libitum* zur Verfügung. Alle Versuche wurden vom Regierungspräsidium Tübingen genehmigt (R12/14) und gemäß dem geltenden Tierschutzrecht durchgeführt.

3.6.2 Mauslinien

3.6.2.1 C3H

C3H-Mäuse (besitzen den MHC-Haplotyp H2k) und wurden zur Zucht transgener Mauslinien auf C3H-Hintergrund herangezogen.

3.6.2.2 RIP1-Tag2

Die in dieser Arbeit verwendete transgene RT2-Mauslinie (1.4.1) stammt ursprünglich aus dem Labor von Douglas Hanahan¹²⁰ und basiert genetisch auf einem C3H-Hintergrund (Rückkreuzung von genetischem C57BL/6-Hintergrund über zwölf Generationen). Die Mäuse wurden eigens für die Studien zur Immuntherapie gezüchtet. Dabei wurde jeweils ein transgenes RT2-Männchen mit einem C3H Weibchen verpaart. Die daraus resultierenden Würfe wurden mittels Schwanzspitzen- oder Ohrbiopsie auf das Vorhandensein des TAs Tag2 genotypisiert (3.6.3). Innerhalb der *in vivo* Studien wurden ausschließlich RT2-Weibchen eingesetzt.

3.6.2.3 RT2xStat1^{-/-}

Stat1^{-/-} (129S6/SvEv-Stat1^{tm1Rds}) Mäuse (Taconic Biosciences, Rensselaer, NY, USA) (1.4.2) wurden ursprünglich durch die Arbeitsgruppe Röcken (Universitäts-Hautklinik Tübingen) kommerziell erworben und über mehr als zwölf Generationen auf einen genetischen C3H-Hintergrund rückgekreuzt⁶⁴. Zur Zucht der doppelt-transgenen RT2xStat1^{-/-}-Mäuse (RT2xStat1^{-/-}) wurden transgene, heterozygote RT2-Weibchen mit homozygoten Stat1^{-/-}-Männchen verpaart. Die Verpaarungen und Genotypisierungen wurden von der Arbeitsgruppe Röcken durchgeführt. Die daraus resultierenden, doppelt-transgenen RT2xStat1^{-/-} Weibchen wurden freundlicherweise für die Studien innerhalb dieser Arbeit durch die Arbeitsgruppe Röcken zur Verfügung gestellt.

3.6.2.4 Tag2-TCR

Tag2-TCR Mäuse dienten als Spendertiere für die *in vitro* Kultivierung von TA-spezifischen (Tag2-) Th1-Zellen (T_{H1}).

Tag2-TCR Mäuse basieren ebenfalls auf einem genetischen C3H-Hintergrund und wurden eigens für die Studien innerhalb dieser Arbeit gezüchtet. Dabei wurde jeweils ein transgenes Tag2-TCR Männchen mit einem C3H Weibchen (C3H) verpaart. Die daraus resultierenden Würfe wurden mittels Schwanzspitzen- oder Ohrbiopsie auf das Vorhandensein des transgenen TCRs genotypisiert (3.6.3). Zur Kultivierung von T_H1-Zellen wurden ausschließlich weibliche Spendertiere verwendet.

3.6.3 Genotypisierung transgener Mauslinien

RT2- und Tag2-TCR Mäuse wurden eigens für die Studien dieser Arbeit gezüchtet und mittels Polymerase-Kettenreaktion („*Polymerase chain reaction*“, PCR) auf das Vorhandensein des gewünschten Transgens genotypisiert.

Mittels einer PCR werden spezifische DNA Sequenzen vervielfältigt und über eine elektrophoretische Auftrennung zur Detektion sichtbar gemacht. Ein speziell auf das jeweilige Primerpaar (kurze, zur DNA komplementäre Oligonukleotide) abgestimmtes Hitzeprogramm sorgt unter Einsatz einer hitzestabilen DNA-Polymerase und sich wiederholenden Temperaturzyklen für die Denaturierung der DNA, die Anlagerung (Annealing) der Primer und die anschließende Elongation des DNA-Stranges. Durch mehrere Wiederholungen der Temperaturzyklen wird der gesuchte DNA-Abschnitt so stark vervielfältigt, dass er via Gelelektrophorese sichtbar gemacht werden kann.

Mit Ausnahme der Oligonukleotide (Tab. 11) wurden alle für die Genotypisierung eingesetzten Reagenzien und Puffer über die VWR International GmbH (Darmstadt, DE) bezogen.

Zur Genotypisierung wurden den Mäusen zunächst entweder Ohr- oder Schwanzspitzenbiopsien entnommen. Um die darin enthaltene DNA für die PCR zugänglich zu machen, wurden die Biopsien für 45 min auf einem Thermomixer bei 56 °C in Gewebe-Lysepuffer (Tab. 13) mit 0,5 mg/ml Proteinase K aufgelöst. Zur Deaktivierung der Proteinase K wurden die Proben nochmals für 5 min bei 96 °C auf dem Thermomixer geschüttelt und anschließend in einer Tischzentrifuge für 2 min bei 13.000 rpm zentrifugiert.

2,5 µl vom Überstand des jeweiligen Lysats, was als DNA-Vorlage diente, wurden zum PCR-Reaktionsansatz der jeweiligen Mauslinie (Tab. 14) gegeben. Zur

Amplifikation der gewünschten Genabschnitte im Thermocycler wurde ein Standardprogramm mit jeweils 30 Zyklen herangezogen (Tab. 15). Die Amplifikate wurden nach der Reaktion mittels Gelelektrophorese auf einem 1,5% Agarosegel (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldenburg, DE) analysiert. Als Kontrollen dienten bei -20 °C konservierte Biopsie-Lysate von C3H Wildtyp-Mäusen (negativ) und Lysate von bereits als positiv identifizierten RT2- bzw. Tag2-TCR Mäusen.

Tab. 14: PCR-Reaktionsmix für die Genotypisierung transgener Mauslinien. Die Sequenzen der Primer sind unter Abschnitt 3.4 aufgeführt.

Reagenz	Konzentration	RIP1-Tag2	Tag2-TCR
Primer 5'	100 µM	0,5 µl	0,5 µl
Primer 3'	100 µM	0,5 µl	0,5 µl
Key Buffer	10x	5,0 µl	5,0 µl
MgCl ₂	10 mM	1,0 µl	1,0 µl
dNTPs	100 µM	1,0 µl	1,0 µl
Taq-Polymerase	5 U/ml	0,25 µl	0,5 µl
H ₂ O (PCR Grade)		39,25 µl	39,25 µl

Tab. 15: Temperaturprogramm für die Genotypisierung transgener Mauslinien. Die Schmelztemperatur (T_m) der Primer wurde mit jeder neuen Charge Taq-Polymerase individuell evaluiert und betrug für die RT2-PCR ca. 63°C und für die Tag2-TCR PCR ca. 57°C.

Dauer	Temperatur	
3 min	94 °C	DNA-Denaturierung
anschließend 30 Zyklen:		
30 s	94 °C	DNA-Denaturierung
30 s	T _m Primer	Primer-Anlagerung (Annealing)
40 s	72 °C	Verlängerung des DNA-Strangs (Elongation)
3 min	72 °C	Finale Elongation
∞	8 °C	Lagerung

3.7 Zellkultur

Alle für die Zellkultur nötigen Zentrifugations- und Waschschrte wurden für 5 min bei 4 °C und 1.200 rpm in einer Multifuge durchgeführt.

3.7.1 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen jeweils 1:10 mit Trypanblau (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE) verdünnt und mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer gezählt. Dabei wurden blau gefärbte Zellen als tot erachtet und nicht mitgezählt. Die Berechnung der Zellzahl erfolgte unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufe laut Angaben des Herstellers.

3.7.2 Isolation muriner CD4⁺ Zellen und APCs aus Organen des lymphatischen Systems

Die Isolation von CD4⁺ Zellen aus Tag2-TCR Spendermäusen (3.6.2.4) erfolgte mittels positiver magnetischer Separation unter sterilen Bedingungen.

Das Prinzip des so genannten „*Magnetic activated cell sortings*“ (MACS, Milteny Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, DE) beruht darauf, Zellen mit spezifischen Antikörpern, an welche superparamagnetische Mikrokügelchen (MACS[®] MicroBeads) gekoppelt sind, zu markieren. Die markierten Zellen binden an eine spezielle LS-Säule, welche in einen MACS-Separator, ein starkes Magnetfeld, eingespannt ist. Entfernt man die LS-Säule aus dem Magnetfeld, so lassen sich die markierten Zellen wieder sehr leicht ablösen. Dabei werden lediglich minimale Antikörpermengen eingesetzt, was eine Aktivierung der zu isolierenden Zellpopulation vermeiden soll. So können spezifische Zellpopulationen schonend selektiert werden.

Für die *in vitro* Aktivierung und Vermehrung muriner CD4⁺ T-Zellen wurden CD4⁺ Zellen zunächst frisch aus Organen des lymphatischen Systems (inguinale, axilläre und zervikale Lymphknoten und aus der Milz) (Abb. 12) von Spendermäusen isoliert. Zur spezifischen Vermehrung von CD4⁺ T-Zellen wurden daraus im Anschluss T-Zellkulturen angelegt. Die Spendermäuse wurden mittels CO₂ und cervikaler Dislokation getötet. Anschließend wurden die Lymphknoten und Milzen entfernt und separat in mit MACS-Puffer befeuchtete Zellsiebe mit einer Porengröße von 70 µm gegeben. Mit Hilfe des Stempels eines 1 ml-Spritzenkolbens wurden die Organe dann durch vorsichtiges Reiben homogenisiert. Die Zellsiebe wurden zwei Mal mit jeweils 5 ml MACS-Puffer gespült und das jeweilige Homogenisat als Zellsuspension

in je einem 50 ml Falcon aufgefangen. Pro Zellsieb wurden max. drei Milzen bzw. die Lymphknoten aus drei Spendermäusen gesammelt und verarbeitet.

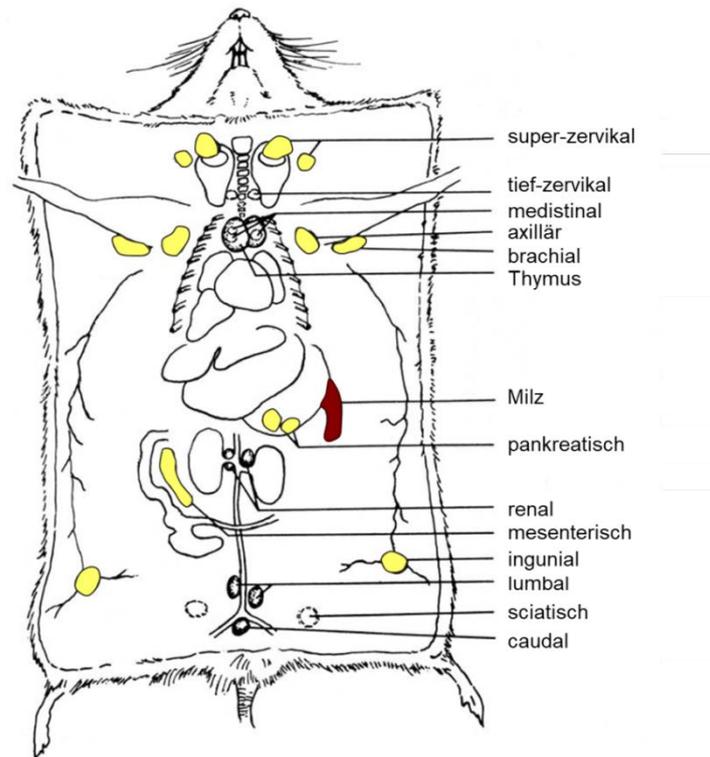


Abb. 12: Organe des lymphatischen Systems der Maus. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Mäusen vorwiegend Organe des lymphatischen Systems entnommen. Alle lymphatischen Organe von Interesse sind hier farblich gekennzeichnet (modifiziert nach Dunn, 1954)¹⁶⁵.

Das folgende Protokoll ist auf die Isolierung von Zellen aus einer einzelnen Spendermaus berechnet.

Die Zellsuspensionen aus Milz und Lymphknoten wurden zunächst in der Zentrifuge pelletiert; Überstände wurden verworfen. Um störende Erythrozyten aus dem Pellet der Milz zu verdauen, wurde es in 1,5 ml ACK-Lysepuffer resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Das Pellet der Lymphknotensuspension wurde unmittelbar in 10 ml MACS-Puffer aufgenommen. Nach Ablauf der Inkubationszeit und Zugabe von 10 ml MACS-Puffer zur Milzsuspension wurden Lymph- und Milzsuspensionen vereint. Es erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt, der Überstand wurde anschließend verworfen. Die Zellen wurden dann mit CD4 MicroBeads (Klon: L3T4; Milteny Biotech GmbH) markiert. Dafür wurde das Zellpellet in 15 µl MicroBeads und 135 µl MACS-Puffer resuspendiert und für 20 min bei RT

inkubiert. Ein darauffolgender Waschschrift in 10 ml MACS-Puffer reinigte die markierten Zellen von überschüssigen MicroBeads. Das Zellpellet wurde in 3 ml MACS-Puffer resuspendiert und auf eine zuvor mit 5 ml MACS-Puffer kalibrierte LS-Säule gegeben. Der Durchfluss, welcher APCs, CD8⁺ Zellen und evtl. auch restliche CD4⁺ Zellen enthielt, wurde in einem 50 ml Falcon aufgefangen. Anschließend wurde die Säule zwei Mal mit jeweils 5 ml MACS-Puffer gewaschen, der Durchfluss wurde weiterhin im selben Falcon gesammelt. Um die CD4⁺ Zellen nach den Waschschriften von der Säule zu lösen, wurden 6 ml MACS-Puffer auf die Säule gegeben. Die Säule wurde dann unmittelbar aus der Magnethalterung genommen. Durch zügiges Pressen wurden die Zellen von der LS-Säule gespült und in einem frischen 50 ml Falcon aufgefangen. Ein weiterer Zentrifugationsschritt diente dazu, die Zellen (APCs im Säulendurchfluss und CD4⁺ Zellen) jeweils vom MACS-Puffer zu separieren. Die Überstände wurden verworfen.

Die pelletierten CD4⁺ Zellen wurden in etwas T-Zellmedium (3.5.1) aufgenommen und bis zum weiteren Gebrauch bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Die APCs (Säulendurchfluss) wurden folgendermaßen weiterverarbeitet:

Zunächst sollten eventuelle Reste an CD4⁺ und CD8⁺ Zellen von den APCs entfernt werden. Dazu wurde das Zellpellet im Anschluss an den letzten Zentrifugationsschritt (s.o.) mit jeweils (pro isolierter Milz) 0,5 ml anti-CD4 mAb, anti-CD8 mAb, Maus-anti-Ratte (MAR)-Antikörper (Tab. 6) und 1,5 ml der Komplement Lösung (Tab. 13) versetzt. Nach einem Inkubationsschritt von 45 min bei 37°C und 7,5% CO₂ (Brutschrank) wurde die Reaktion durch Zugabe von mind. 10 ml T-Zellmedium gestoppt. Die Suspension wurde erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen und die pelletierten Zellen anschließend in 3 ml T-Zellmedium resuspendiert.

Um die Proliferation von APCs zu unterbinden, die Fähigkeit zur Antigenpräsentation aber dennoch zu erhalten, wurden die APCs anschließend in einer Röntgenröhre mit einer Dosis von 30 Gy bestrahlt. Die Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4°C in etwas T-Zellmedium gelagert.

3.7.3 Spezifische Aktivierung und Polarisierung von CD4⁺ T-Zellen

Frisch isolierte CD4⁺ Zellen (3.7.2) wurden durch Zugabe des Tag2-Peptids, Antikörper gegen Interleukin-4 (anti-IL-4 mAb), dem T-Zell Wachstumsfaktor IL-2,

CPG1668-Oligonukleotid (Tab. 16) in Co-Kultur mit den zuvor bestrahlten (30 Gy) APCs zu Tag2-spezifischen IFN- γ produzierenden T-Helferzellen vom Typ 1 (T_H1-Zellen) polarisiert. Dafür wurden die CD4⁺ Zellen und bestrahlten APCs (3.7.2) zunächst gezählt und mit T-Zellmedium auf folgende Konzentrationen eingestellt:

CD4⁺ Zellen: 2×10^6 Zellen/ml

APCs: 5×10^6 Zellen/ml

Die Zellsuspensionen wurden nun 1:1 gemischt und anschließend mit den in Tab. 16 aufgeführten Zusätzen versetzt. Der Zellmix wurde dann zu je 200 μ l auf einer 96-Well Flachbodenplatte ausplattiert und im Brutschrank bei 37 °C und 7,5% CO₂ kultiviert.

Tab. 16: Zusätze zur Kultivierung von Tag2-Th1-Zellen. Die Zusätze sind jeweils auf einen Milliliter T-Zellkultur berechnet.

Zusatz	pro ml	Stock	Endkonzentration	Herkunft
Tag2-Peptid	20 μ l	4 μ M	80 nM	EMC Microcollections GmbH (Tübingen, DE)
anti-IL-4 mAb (Klon 11B11)	10 μ l	1 mg/ml	10 μ g/ml	Dr. Jürgen Brück (Universitäts-Hautklinik Tübingen)
CPG1668-Oligonukleotid	10 μ l	20 μ M	0,2 μ M	Eurofins Genomics GmbH (Ebersberg, DE)
IL-2 (Proleukin)	2,5 μ l	2000 U/ml	5 U/ml	Novartis (Basel, CH)

Nach vier Tagen wurden die Zellen zur weiteren Expansion auf eine 24-Well Flachbodenplatte umgesetzt. Dafür wurden Zellen aus jeweils vier Wells der 96-Well Flachbodenplatte in ein Well einer 24-Well Flachbodenplatte zusammengeführt und mit jeweils 1 ml T-Zellmedium und IL-2 (50 U/ml) supplementiert. Die Zellen wurden erneut im Brutschrank kultiviert.

Nach weiteren drei Tagen wurden die Zellen von der 24-Well Flachbodenplatte in eine 100 ml Zellkultur Flasche überführt. Zuvor wurde ein Mediumwechsel vorgenommen. Dafür wurden die Zellen zunächst gezählt (3.7.1), in ein 50 ml Falcon gegeben und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in T-Zellmedium resuspendiert. Die Zellen wurden schließlich unter Verwendung von T-Zellmedium und Zusatz von IL-2 (50 U/ml) zu 1×10^6 Zellen/ml in die Zellkulturflasche gegeben und bis zum Gebrauch weiterhin im Brutschrank kultiviert.

3.8 Kombinierte Immuntherapie im RT2-Mausmodell mit fortgeschrittenen Inselzellkarzinomen

Die experimentelle kombinierte Immuntherapie (Kombinationstherapie) im murinen RT2-Inselzellkarzinommodell setzte sich aus wiederholten intraperitonealen (*i.p.*) Injektionen von 10^7 IFN- γ produzierenden Tag2-Th1-Zellen (T_H1 -Zellen) (3.7.3) und wiederholten *i.p.*-Injektionen eines therapeutischen, IC-blockierenden Antikörpercocktails (Immuncheckpoint-Blockade, ICB), bestehend aus anti-PD-L1 und anti-LAG-3 mAbs (PD-L1/LAG-3) (Tab. 5), zusammen. Im Vorfeld, 24 h vor dem ersten T_H1 -Zelltransfer, erfolgte eine Immunzelldepletion, initiiert durch eine Niedrigdosis-Ganzkörperbestrahlung der Mäuse (3.8.1) (Abb. 13).

Die hierfür verwendeten weiblichen RT2-Mäuse (3.6.2) waren zum Zeitpunkt des Therapiestarts zwischen zehn und elf Wochen alt; die Tumore befanden sich dementsprechend in einem fortgeschrittenen Stadium mit bereits reduzierten Blutglukosespiegeln von ca. 80 bis 100 mg/dL. Die Therapie wurde durch regelmäßige Messungen der Blutglukose und Gewichtskontrollen (2x pro Woche) überwacht (3.10). Bei zweimaligem Unterschreiten der Blutglukose von 30 mg/dL, einem massiven Gewichtsverlust oder einer auffälligen Verschlechterung der körperlichen Fitness (3.10.3) wurden die Tiere vorzeitig aus dem Versuch genommen und euthanasiert.

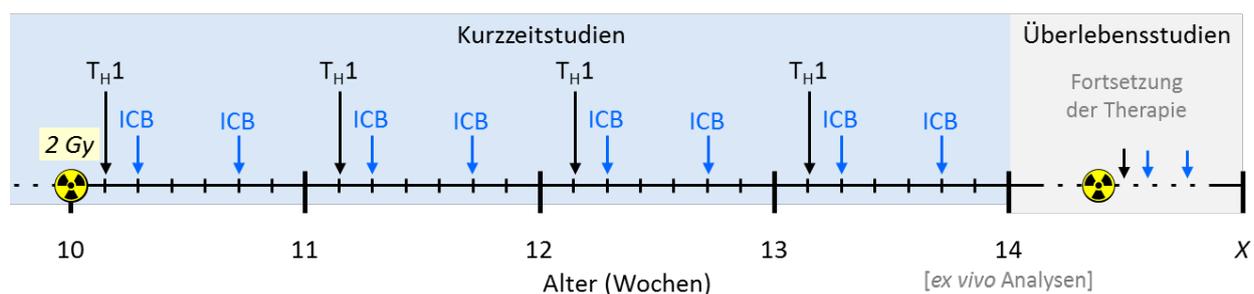


Abb. 13: Behandlungsschema von RT2-Mäusen innerhalb der Kombinationstherapie. Beginnend mit einer 2 Gy-vermittelten Immunzelldepletion im Alter von ca. zehn Wochen wurden weiblichen RT2-Mäusen wiederholt wöchentlich einmal T_H1 -Zellen und zweimal ein Mix aus anti-PD-L1 und anti-LAG-3 mAbs (ICB) *i.p.* injiziert. Im Alter von ca. 14 Wochen, nach drei bis vier Behandlungswochen, wurden die Mäuse entweder für *ex vivo* Analysen geopfert, oder bis zum Erreichen der Abbruchkriterien weiter behandelt. Dabei wurde sechs Wochen nach der initialen Immunzelldepletion eine weitere Bestrahlung vorgenommen.

3.8.1 Immunzelldepletion mittels Niedrigdosis-Ganzkörperbestrahlung

Um Platz für die therapeutischen T_H1-Zellen zu schaffen, wurden die Mäuse zu Therapiestart, 24 h vor der ersten T_H1-Zell-Injektion, einer Ganzkörperbestrahlung mit einer geringen Strahlendosis ausgesetzt. Dafür wurden sie wach und in Dreiergruppen in einen extra hierfür konzipierten Bestrahlungszyylinder (20 x 5 cm) gegeben. Dieser wurde anschließend auf eine fahrbare Bühne in eine Gammazelle, welche eine standardisierte γ -Strahlenquelle (¹³⁷Cs) enthält, gestellt. Nach dem Starten des Geräts wurde die Bühne automatisch für 20 s vor der γ -Strahlenquelle platziert. Die Mäuse wurden somit einer Gesamtdosis von 2 Gy (6 Gy/min) ausgesetzt. Kontrolltiere wurden einer Scheinbestrahlung (Ø2 Gy) unterzogen, indem sie sich lediglich für 20 s im Bestrahlungszyylinder befanden. Die Bestrahlung wurde innerhalb von Überlebensstudien nach 6 Wochen wiederholt, auch hier 24 h vor der nächsten Injektion der therapeutischen T_H1-Zellen.

3.8.2 Intraperitoneale Injektion therapeutischer Tag2-Th1-Zellen

Einmal wöchentlich wurden die Mäuse jeweils mit 10⁷ T_H1-Zellen behandelt, wobei die erste Injektion stets 24 h nach der initialen Niedrigdosis-Ganzkörperbestrahlung (3.8.1) der Mäuse stattfand. Für die *i.p.*-Injektionen wurden die zuvor eigens isolierten (3.7.2) und polarisierten (3.7.3) T_H1-Zellen nach ca. 10 Tagen Kultur aus der Zellkulturflasche entnommen, in ein 50 ml Falcon überführt und mittels Zentrifugation pelletiert (1.200 x g, 5 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen. Es folgte ein Waschschrift in PBS. Anschließend wurden die Zellen mit PBS auf 5x10⁷ Zellen/ml eingestellt und bis zur Injektion auf Eis gelagert. Zur Injektion wurden die Zellen vorsichtig in eine 1-ml Insulinspritze (40 U) aufgezogen. Jeder Maus wurden 10⁷ T_H1-Zellen in 200 μ l PBS *i.p.* injiziert. Kontrolltiere wurden lediglich mit 200 μ l PBS *i.p.* injiziert.

3.8.3 Intraperitoneale Injektion des therapeutischen Antikörpercocktails

Die therapeutischen Antikörper (PD-L1/LAG-3) (Tab. 5) wurden jeweils als Stocklösungen mit PBS auf 5 mg/ml eingestellt und bei -20°C gelagert. Die *i.p.*-Injektionen wurden zweimal wöchentlich vorgenommen, wobei die initiale Injektion 24 h nach dem ersten T_H1-Zelltransfer stattfand und höher dosiert war als alle

Folgeinjektionen. Die zweite Injektion von PD-L1/LAG-3 wurde vier Tage nach T_H1-Zelltransfer vorgenommen. Für die initiale Injektion wurden die Stocklösungen 1:1 gemischt und jeder Maus wurden *i.p.* 200 µl PD-L1/LAG-3 (ICB) injiziert, was einer Dosis von 500 µg pro mAb und Maus entsprach. Alle Folgeinjektionen fanden zu je 100 µg pro mAb und Maus in 200 µl PBS statt. Ab der fünften Behandlungswoche wurden die Antikörper nur noch einmal wöchentlich verabreicht, stets 24 h nach dem adoptiven T_H1-Zelltransfer. Kontrolltiere wurden *i.p.* mit den gleichen Mengen an Isotyp-Kontrollantikörpern (Tab. 5) behandelt.

3.9 Checkpoint-Inhibitor-Therapie in RT2-Mäusen

Für manche *in vivo* Versuche wurden die Mäuse lediglich mit den therapeutischen Antikörpern PD-L1/LAG-3 behandelt (Checkpoint-Inhibitor-Therapie, CIT). Die Therapie wurde ebenfalls in zehn bis elf Wochen alten RT2-Mäusen begonnen, jedoch ohne eine initiale Immunzelldepletion via 2 Gy-Ganzkörperbestrahlung durchzuführen. Zudem wurde auf einen adoptiven T_H1-Zelltransfer verzichtet.

Die Injektionen des therapeutischen Antikörpercocktails (PD-L1/LAG-3) wurden zweimal wöchentlich vorgenommen, wobei die initiale Injektion höher dosiert war (500 µg/mAb, *i.p.*) als alle Folgeinjektionen (100 µg/mAb, *i.p.*). Die wöchentlichen Injektionen fanden stets im Abstand von drei bis vier Tagen statt. Kontrolltiere wurden *i.p.* mit den gleichen Mengen an Isotyp-Kontrollantikörpern (Tab. 5) behandelt.

3.10 Therapiemonitoring

3.10.1 Blutglukosemessungen

In allen RT2-Mauslinien korreliert das Tumorwachstum negativ mit dem Blutglukosespiegel der Mäuse (1.4.1). Je größer die Tumorlast, umso mehr Insulin wird produziert, was zu einer kontinuierlichen Reduktion des Blutglukosespiegels führt. Innerhalb der Studien zur Kombinationstherapie wurde der Blutglukosespiegel zweimal wöchentlich, jeweils unmittelbar vor der Injektion des therapeutischen Antikörpercocktails, gemessen. Zur Messung wurde den wachen Mäusen mit einer Spritzenkanüle (25 G) vorsichtig in die Schwanzspitze gestochen, um einen Tropfen

Blut zu entnehmen, welcher mit einer Glukose-Küvette aufgefangen wurde. Die Küvette wurde zur Bestimmung der Blutglukose in ein Blutglukosemessgerät überführt. Bei zweimaliger Unterschreitung eines Blutglukosewertes von 30 mg/dL wurden die betroffenen Mäuse aus dem Versuch genommen und getötet.

3.10.2 Gewichtskontrollen

Das Gewicht der Mäuse wurde regelmäßig parallel zu den Blutglukosemessungen kontrolliert. Dazu wurden die Mäuse aus ihren Käfigen genommen und in einen austarierten Messbecher auf eine digitale Waage gesetzt. Das Gewicht wurde notiert und die Mäuse wurden zurück in ihren Käfig gesetzt. Bei einem Gewichtsverlust von über 20 % im Vergleich zu Kontrolltieren gleichen Alters, Stammes und Geschlechts wurden die betroffenen Tiere aus dem Versuch genommen und getötet.

3.10.3 Abbruchkriterien

Neben regelmäßigen Kontrollen der Blutglukose und des Gewichts wurden die Versuchstiere auf ihre allgemeine Fitness und ihr Verhalten untersucht. Bei Auftreten von Verhaltensänderungen (z. B. Apathie, verminderte oder gestörte Nahrungsaufnahme, motorische Auffälligkeiten, unphysiologische Körperhaltung, gesträubtes Fell), Atembeschwerden oder starker Zunahme der Atemfrequenz wurden die betreffenden RT2-Mäuse aus dem Versuch genommen und euthanasiert. Ebenso führten anhaltender Durchfall von mehr als einem Tag, eine Ansammlung von Flüssigkeit im Bauchraum (Aszites), eine auffällige oder palpable Vergrößerung der Milz oder der Lymphknoten oder anale Blutungen zu einem sofortigen Abbruch.

Sollten MRT-Messungen durchgeführt worden sein, führten detektierte Durchmesser einzelner Tumore von über 1,5 cm oder der Durchmesser aller Tumore von in Summe über 3 cm zu einem Versuchsabbruch für das jeweilige Tier.

3.11 Bildgebende Verfahren

Die *in vivo* Bildgebung wurde im Hygienebereich des institutseigenen Bildgebungslabors durchgeführt. Alle PET Studien wurden an dedizierten Kleintier-PET-Scannern (Abb. 14) mit axialen und transaxialen Gesichtsfeldern von 10 bzw. 12,7 cm durchgeführt und mittels der Software „*Inveon Acquisition Workplace*“ (Siemens Preclinical Solutions, Knoxville, TN, USA) aufgenommen und gesteuert. Die Akquisition der Daten erfolgte in einem Engeriefenster von 350 - 650 keV und einem Koinzidenzfenster von 3,432 ns. Die Sensitivität der Scanner betrug etwa 10 % bei einer Auflösung von ca. 1,4 mm.

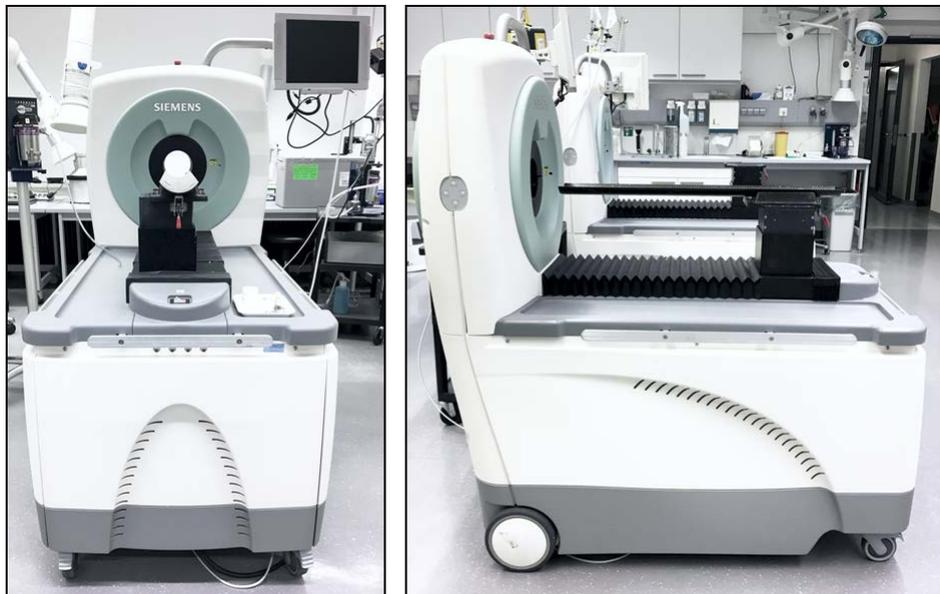


Abb. 14: Kleintier PET-Scanner. Zur Messung des Glukosemetabolismus in der Milz von RT2-Mäusen wurde ein Kleintier PET-Scanner mit einem axialen und transaxialen Gesichtsfeld von 10 bzw. 12,7 cm, einer Sensitivität von ca. 10% und einer ungefähren Auflösung von 1,4 mm herangezogen.

Als Radiotracer für die PET Messungen wurde das Glukoseanalogon ^{18}F -FDG verwendet. Das Messprotokoll ist im Folgenden beschrieben.

Im Anschluss an jede PET Messung wurde eine Messung an einem 7 T Kleintier-MRT (Abb. 15) durchgeführt, um eine anatomische Zuordnung korrespondierend zum PET-Signal zu erhalten. Das hierfür erforderliche Messprotokoll ist ebenfalls im Folgenden beschrieben.

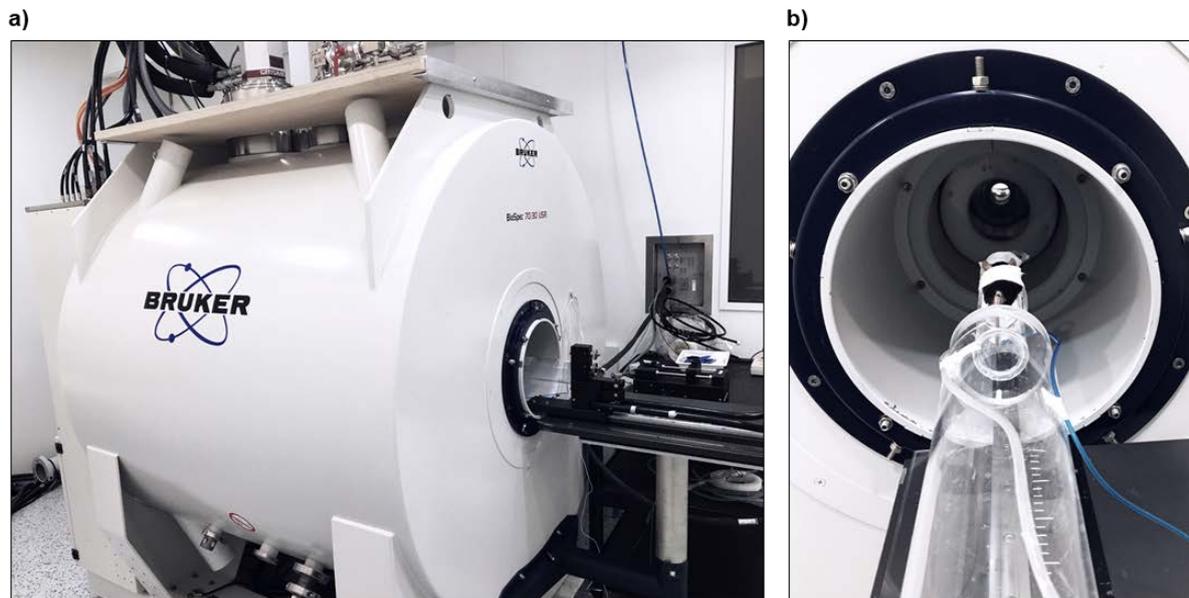


Abb. 15: 7 T Magnetresonanztomograph. (a) Anatomische Aufnahmen von Mäusen wurden mit einem 7 T Kleintier-MRT generiert. (b) Die Mäuse wurden dafür auf Tierliegen platziert und in mittig in die Bohrung des Magneten geschoben.

3.11.1 Intravenöse Injektion von ^{18}F -FDG

^{18}F -FDG wurde stets intravenös (*i.v.*) in die Schwanzvene der Tiere injiziert. Zur Platzierung des Schwanzvenenkatheters wurden die Tiere mittels Isofluran-Narkose (1,5 Vol.% gemischt mit 100% O_2) anästhesiert und auf einer Wärmematte platziert. Der Katheter setzte sich aus einer Einmalspritzenkanüle (30 G) und einem Schlauch aus Polyethylen zusammen. ^{18}F -FDG wurde generell in 0,9% Natriumchlorid (NaCl) dahingehend verdünnt, dass zur *i.v.*-Injektion die jeweilige Aktivitätsmenge in max. 50 μl Flüssigkeit vorlag. Der Schlauch wurde vor der Platzierung des Katheters mit heparinisiertem (0,8 U/ml) 0,9% NaCl gefüllt und nach der Injektion von 12,5 MBq ^{18}F -FDG mittels einer Insulinspritze (20 U) mit 25 μl heparinisiertem 0,9% NaCl nachgespült. Die Aktivität der Radiotracer wurde mittels einem Dosiskalibrator bestimmt. Für statische Messungen wurden die Tiere im Anschluss an die ^{18}F -FDG-Injektionen für 45 min zur Verteilung des Radiotracers im Körper unter Aufrechterhaltung der Narkose in eine mit Isofluran (1,5 Vol.% gemischt mit 100% O_2) gefüllte Wärmebox gelegt. Zur Durchführung dynamischer PET-Messungen wurden die Tiere nach Injektion des Radiotracers direkt auf die fahrbaren Tierliegen des PET-Scanners gelegt. Während der Narkose schützte ein Augengel

(Corneregel, Gerhard Mann GmbH, Berlin, DE) die Augen der Versuchstiere vor dem Austrocknen.

3.11.2 Vorbereitung der Versuchstiere für die Bildgebung

Für die *in vivo* Scans wurden die narkotisierten (3.11.1) Tiere auf entsprechende MRT-kompatible Tierliegen gelegt. Je nach Versuchsaufbau wurde entweder eine handelsübliche Einzeltierliege aus Polymethylmethacrylat (PMMA; Bruker Biospin, Ettlingen, DE) verwendet oder eine eigens konstruierte Doppelliege, auf welcher zwei Tiere nebeneinander platziert werden konnten (Abb. 16). Die Doppelliege bestand aus einem selbst gebauten Aufsatz, welcher auf einer Einzeltierliege angebracht wurde. Die Tiere wurden mittels Wattepad's und medizinischen Kunstseidepflastern auf den Tierliegen fixiert. Um ein Austrocknen der Augen während der Narkose zu verhindern, wurden diese erneut mit dem Augengel (3.11.1) bedeckt. Die Narkose wurde über eine Kopfmaske aufrechterhalten, welche am oberen Ende der Tierliegen, angeschlossen an eine Isofluraneinheit, angebracht war. Die Temperatur der Tiere wurde durch Infrarot-Wärmelampen, welche hinter die Bohrung des PET-Scanners gestellt wurden, aufrechterhalten. Zur Kontrolle der Atmung im MRT wurde zusätzlich ein Atempad, welches an eine digitale „Gating“-Einheit angeschlossen werden konnte, unter den Tieren platziert (Abb. 16).

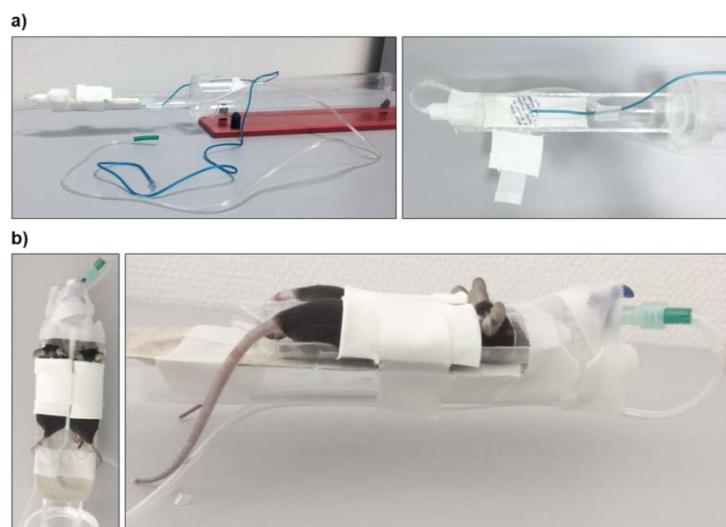


Abb. 16: Aufbau der Tierliegen. (a) PMMA-Einzeltierliege mit Polsterung, bestehend aus Zellstofftupfern, und einem Atempad. Zur Fixierung der Tiere auf der Liege wurde ein Zellstofftupfer mit einem Kunstseidepflaster angebracht. (b) Zur simultanen Messung zweier Mäuse wurde ein

eigens konstruierter Aufbau auf den Einzeltierliegen angebracht. Auf einen stabilen Karton wurden zwei Schalen fixiert. Die Schalen wurden aus 50 ml-Eppendorfgefäßen zugeschnitten, die Schnittstellen wurden abgerundet. Zur Sicherstellung der Narkose und gleichmäßigen Verteilung des Isofluran-Sauerstoff-Gemischs wurde ein Dreiwegehahn (Braun AG, Melsungen, DE), angebracht. An zwei Enden des Dreiwegehahns wurden jeweils abgeschnittene Spritzenköpfe aufgesteckt, welche den Tieren als Kopfmasken für die Zuleitung der Narkose dienten. Auch hier wurden die Schnittstellen abgerundet, um eine Verletzung der Tiere zu vermeiden. Die Tiere wurden ebenfalls mit Zellstoffputfern und Kunstseidepflastern fixiert.

3.11.3 Messung des Glukosemetabolismus mittels ^{18}F -FDG PET

Zur Messung des Glukosemetabolismus in der Milz der Versuchstiere wurden jeweils 12,5 MBq ^{18}F -FDG intravenös in die Schwanzvene der Tiere injiziert. Zuvor wurden die Tiere über Nacht gefastet. Um eine Anreicherung von ^{18}F -FDG im Muskelgewebe zu verhindern, wurde die Isofluran-Narkose über den gesamten Zeitraum vor Injektion des Radiotracers bis hin zum Abschluss der PET- und MRT-Scans aufrechterhalten (siehe auch 3.11.1).

3.11.3.1 Dynamische ^{18}F -FDG PET-Scans

Um die Aufnahme des radioaktiv markierten Glukoseanalogons ^{18}F -FDG in der Milz näher zu charakterisieren, wurden zunächst dynamische PET-Scans durchgeführt. Dazu wurden jeweils zwei Versuchstiere unmittelbar nach Platzierung des Schwanzvenenkatheters gemeinsam auf die Doppeltierliegen gelegt und in das Zentrum des Gesichtsfeldes des PET-Scanners gefahren. Gleichzeitig mit Start der Aufnahme wurde der Radiotracer injiziert. Die PET-Scans wurden über einen Zeitraum von 60 min in 19 Zeitfenstern (6 x 5 s, 3 x 10 s, 2 x 30 s, 1 x 60 s, 1 x 120 s, 2 x 300 s, 3 x 600 s, 1 x 900 s) aufgenommen. Im Anschluss an die dynamischen PET-Scans erfolgte, unter Aufrechterhaltung der Narkose, eine MRT zur anatomischen Co-Lokalisation des PET-Signals.

3.11.3.2 Statische ^{18}F -FDG PET-Scans

Zur Aufnahme von statischen PET-Scans wurden die anästhesierten Tiere 45 min nach der Injektion von ^{18}F -FDG aus der gewärmten Narkosebox zu zweit auf MRT-kompatible Doppeltierliegen gebettet und unter weiterer Aufrechterhaltung der Narkose in das Zentrum des Gesichtsfeldes des PET-Scanners gefahren. Die PET-Akquisition erfolgte über 15 min (1 x 900 s). Im Anschluss an die statischen PET-

Scans erfolgte, ebenfalls unter Aufrechterhalten der Narkose, eine MRT zur anatomischen Co-Lokalisation des PET-Signals.

3.11.4 Magnetresonanztomografie

Zur anatomischen Co-Lokalisation des PET-Signals und zur Darstellung der Inselzellkarzinome in RT2-Mäusen wurden MRT-Messungen an Kleintier-MR-Tomographen (7 T) durchgeführt.

Die einzelnen Parameter der T2-gewichteten MRT-Messprotokolle sind in **Tab. 17** aufgeführt. Um die korrekte Position der Tiere im Gesichtsfeld des MRTs zu bestimmen, wurden vor jeder Messung kurze Protokolle zur Lokalisierung, sogenannte „*Localizer*“ angewendet. Die Atemfrequenz der Versuchstiere wurde während den Messungen mittels einer „*Gating*“-Kontrolleinheit überwacht, um Artefakte durch Bewegungen des Brustraumes zu reduzieren.

Tab. 17: Parameter der T2-gewichteten „3D-turbo spin echo“ Sequenzen für MRT-Aufnahmen.

Scanner	Ø Spule	TR	TE	Voxelgröße	FOV	Matrix
Clinscan	35 mm	3000 ms	205,0 ms	0,22x0,22x0,22 mm ³	35 x 57 mm ²	256 x 160
Biospec	72 mm	500 ms	30,4 ms	0,33 x 0,33 x 0,33 mm ³	49 x 52 mm ²	150 x 160

3.11.4.1 Darstellung der Inselzellkarzinome

Zur Darstellung der Inselzellkarzinome wurden die Tiere zunächst narkotisiert. Dafür wurden sie für ca. 10 min in eine mit Isofluran (3.11.1) gefüllte Wärmebox gelegt. Anschließend wurden die Versuchstiere wie bereits unter 3.11.2 beschrieben auf Einzeltierliegen fixiert und im Gesichtsfeld des MRT (Clinscan) positioniert. Zur Messung wurde eine Maus-Ganzkörperspule mit einem Innendurchmesser von 35 mm verwendet und das entsprechende Messprotokoll (**Tab. 17**) angewendet.

3.11.4.2 Aufnahmen zur anatomischen Co-Lokalisation des PET Signals

Zur Co-Lokalisation des PET Signals wurden die Tiere auf den Doppeltierliegen direkt nach jeder PET Messung in das Gesichtsfeld des MRT gebracht. Da die Doppeltierliegen zu breit für die Maus-Ganzkörperspule waren, wurde für die

Messungen eine Ratten-Ganzkörperspule mit einem Innendurchmesser von 72 mm, unter Anwendung des entsprechenden Messprotokolls (Tab. 17), verwendet.

3.11.4.3 Bildrekonstruktion und Analyse

Die PET Messungen wurden wie bereits oben beschrieben akquiriert (3.11.3). Die Rekonstruktion der aus den LORs erzeugten Sinogramme in zerfallskorrigierte Datensätze erfolgte durch einen iterativen OSEM3D-Algorithmus mit einer Matrixgröße von 128 x 128 und einer Pixelgröße von 0,79 x 0,79 mm² (1.5.1.2) Die räumliche Auflösung betrug schließlich 1,4 mm¹⁶⁶.

Die rekonstruierten Datensätze wurden mittels der Software „*Inveon Research Workplace*“ (Siemens Preclinical Solutions, Knoxville, TN, USA) ausgewertet. Dazu wurden die rekonstruierten PET Bilder mit den anatomischen MR-Scans überlagert. Anhand des MR-Scans wurde ein Betrachtungsvolumen („*Volume of interest*“, VOI) in das jeweilige Zielorgan eingezeichnet, woraus dann die mittlere akkumulierte Aktivität (in Bq/mL) innerhalb dieser VOI ermittelt wurde. Die organspezifische Aktivität wurde prozentual in das Verhältnis zur ursprünglich injizierten und zerfallskorrigierten Gesamtaktivität im Tier gesetzt und als prozentual-injizierte Dosis pro Kubikzentimeter (%ID/cm³) angegeben.

Der zeitliche Verlauf der Radiotracer-Akkumulation in einem Zielgewebe wurde aus dynamischen PET Messungen ermittelt. Dazu wurden Zeit-Aktivitätskurven erstellt, indem die %ID/cm³ eines Organs gegen die Zeit aufgetragen wurde.

3.12 Ex vivo Analysen

Für die *ex vivo* Analysen wurden die Versuchstiere jeweils zum Ende eines Kurzzeitversuchs in einer CO₂-Kammer eingeschläfert oder, im Falle einer vorangehenden Blutentnahme, narkotisiert und mittels cervikaler Dislokation getötet; davon abweichend analysierte Zeitpunkte sind gesondert im Text vermerkt.

Im Anschluss an die fachgerechte Euthanasierung der Mäuse wurden die Organe für die darauffolgenden *ex vivo* Analysen wie folgt entnommen und entsprechend der jeweiligen Methoden und zugehörigen Protokolle aufgearbeitet.

Die folgenden Protokolle beschreiben die routinemäßige Gewinnung von Blut- und Gewebeproben. Innerhalb dieser Arbeit wurden jedoch nicht alle Organe analysiert.

3.12.1 Blutentnahmen

Zur Gewinnung von Vollblut bzw. Blutplasma wurde den Tieren zunächst unter 1,5% Isofluran-Narkose retrobulbär Blut entnommen. Dazu wurde den narkotisierten Tieren medial eine kleine Kapillare in den Augenwinkel platziert und unter Rotation leicht nach unten geneigt. Durch die Rotation wird der Venenplexus im Augenwinkel leicht verletzt und das Blut kann durch die Kapillare fließen. Das Blut wurde in 1,5 ml EDTA-Mikrovetten aufgefangen. So konnten bis zu 1 ml Blut gewonnen werden.

Zur Gewinnung von Blutplasma wurden die Proben für 5 min bei 12.000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand, das Blutplasma, wurde vorsichtig abgenommen, in ein Kryoröhrchen überführt und bei -80°C gelagert.

3.12.2 Organentnahmen

Die Organe wurden nach der Entnahme entweder kryokonserviert, entwässert und in Paraffin eingebettet oder direkt für die Durchflusszytometrie aufgearbeitet. Zur Organentnahme wurde der Bauchraum mit einer Schere geöffnet. Die Leber wurde nach rechts geklappt, so dass der peripankreatische Lymphknoten (PLK), welcher den Tumor-drainierenden Lymphknoten darstellt, gut sichtbar wurde. Dieser wurde vorsichtig mit einer kleinen Schere herausgeschnitten und entsprechend gelagert. Anschließend wurden Milz und das Pankreasgewebe, welches die Tumore enthielt, entfernt. Nach der Entfernung der mesenterialen Lymphknoten und des rechten vorderen Leberlappens wurde zuletzt der Thymus inklusive der angesiedelten Lymphknoten entnommen. Bei Bedarf wurden zusätzlich die axillären bzw. brachialen Lymphknoten (ALK) entnommen und das Knochenmark mit Hilfe einer Spritze und FACS-Puffer (Tab. 13) ausgespült.

3.12.3 Kryokonservierung von Organen

Organe zur Kryokonservierung wurden nach deren Entnahme unmittelbar in Kryoröhrchen mit 0,5 ml RPMI (ohne weitere Zusätze) überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.12.4 Konservierung von Organen in Paraffin

Die Organe zur Anfertigung von paraffinierten Gewebeschnitten wurden nach deren Entnahme unmittelbar für 24 h in Roti®-Histofix (Tab. 13) gegeben, um eine Autolyse der Proben zu verhindern. Anschließend wurden die Organe automatisiert in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Die entwässerten Organe wurden mit Hilfe einer beheizten Paraffinausgießstation in Paraffin eingegossen. Die Organe wurden bis zur weiteren Verwendung bei RT gelagert.

3.12.5 Histologie

Kryokonservierte und in Paraffin eingegossene Organe wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Schaller (Universitäts-Hautklinik Tübingen) und der Arbeitsgruppe Fend (Institut für Allgemeine und Molekulare Pathologie, Universitätsklinikum Tübingen) entsprechend etablierter Protokolle aufbereitet, gefärbt und analysiert.

3.12.5.1 Anfertigen von Paraffinschnitten

Die paraffinierten Organblöcke wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Fend in 5 µm dünne Schnitte geschnitten und für (Immun-) histochemische Färbungen verwendet.

3.12.5.2 Anfertigen von Kryoschnitten

Serienschnitte aus kryokonservierten Gewebeproben wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Schaller angefertigt. Die Proben wurden bei -20 °C in einem wasserlöslichen Einbettmedium auf Glycerinbasis eingebettet. Die gefrorenen Blöcke wurden anschließend in einem Kryostat in 5 µm bzw. 20 µm dünne Schnitte geschnitten, vorsichtig auf Objektträger transferiert und direkt weiterverarbeitet oder bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.12.5.3 Hämatoxilin und Eosin-Färbung

Hämatoxilin- und Eosin (H&E)-Färbungen wurden entsprechend etablierter Standardprotokolle in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Fend aus 5 µm dünnen

Paraffinschnitten bzw. in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Schaller aus 5 µm oder 20 µm dünnen Kryoschnitten angefertigt.

Die Paraffinschnitte wurden zunächst für 15 min in Xylol fixiert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (100 %, 96 % und 70 %) und Wasser (*Aqua dest.*) für 1 min inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte für 4 min in eine Hämatoxilin-Lösung (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) gelegt, 10 min in warmem Leitungswasser gewaschen und für 2 min in einer Eosin-Lösung (Merck KGaA) gefärbt. Bevor die Schnitte eingedeckelt wurden, erfolgte eine Fixierung durch wechselnde Bäder in einer aufsteigenden Alkoholreihe sowie in Xylol.

H&E-gefärbte Kryoschnitte wurden entsprechend etablierter Protokolle automatisiert gefärbt. Die gefärbten Schnitte wurden anhand eines DM5500B-Mikroskops (Leica Microsystems) in 10-facher Vergrößerung und einer C8484-03G Digitalkamera (Hamamatsu Photonics) aufgenommen und mittels der Software MMAF Imaging Systems (Leica Microsystems) analysiert.

3.12.5.4 Immunhistochemische Färbungen

Zur Immunhistochemischen Analyse von T-Zellen (CD3, CD4, CD8), B-Zellen (B220) und Neutrophilen (MPO) wurden die Paraffinschnitte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Fend mit entsprechend spezifischen monoklonalen Primärantikörpern inkubiert und mittels Sekundärantikörpern angefärbt.

Dazu wurden 5 µm dünne Paraffinschnitte in Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe (100 %, 95 % und 80 %) für jeweils 8 min inkubiert und anschließend in Leitungswasser gewaschen. Restliches Paraffin wurde durch eine 10-minütige Inkubation in Methanol-Peroxid (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) entfernt. Durch 20 bis 30-minütiges Erhitzen der Schnitte in einer 0,01 M Citrat-gepufferten Lösung wurden die Antigene freigelegt. Es folgte eine 20-minütige bis zweistündige Inkubation in Tris-Puffer mit 5 % FCS. Die Schnitte wurden dann für mindestens zwei Stunden mit den laut Herstellerangaben entsprechend verdünnten Primärantikörpern (**Tab. 9**) inkubiert. Anschließend wurden sie 10 x in Tris-Puffer gewaschen. Die darauf folgenden Schritte zur Inkubation der Sekundärantikörper und Farbentwicklung wurden mittels einem automatisierten „*Immunostainer*“ unter der Verwendung von

entsprechenden Detektions-Kits (Basic DAB bzw. iVIEW DAB) (Tab. 4) laut Herstellerangaben durchgeführt.

Die Detektion von Neutrophilen über eine Färbung der Acetatchloresterase-Aktivität (ASDCL Färbung) erfolgte laut einem Standardprotokoll der Arbeitsgruppe Fend.

3.12.5.5 Immunfluoreszenz und Quantifizierung der Signale

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe Schaller wurden 5 µm dünne Kryoserienschnitte (3.12.5.2) zunächst mit Perjodat-Lysin-Paraformaldehyd (Sigma-Aldrich) fixiert. Nach dem Waschen in PBS (5 min) und anschließend in Waschpuffer (5 bis 10 min) wurden freie Bindungsstellen in 1:20 verdünntem Eselserum (Sigma-Aldrich) laut Angaben des Herstellers abgeblockt.

Es folgte eine einstündige Inkubation in verdünnten Lösungen der spezifischen Primärantikörper (Tab. 10); anschließend wurden die Schnitte dreimal in Waschpuffer gewaschen. Zur Detektion wurde jeweils eine in Waschpuffer verdünnte Lösung des passenden Sekundärantikörpers (Tab. 10) angesetzt, auf die Schnitte gegeben und eine weitere Stunde bei RT inkubiert. Die Zellkerne wurden nach drei weiteren Waschschritten in Waschpuffer mit Yopro (Thermo Fisher Scientific) angefärbt. Hierfür wurden die Schnitte in PBS verdünnten (1:2000) Lösungen 5 min bei RT inkubiert und 5 min in PBS gewaschen. Abschließend wurden die Schnitte eingedeckelt und mit einem konfokalen Lasermikroskop (LSM 800; Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, DE) und der Software ZEN 2.3 (Carl Zeiss Microscopy GmbH) analysiert.

Zur *ex vivo* Quantifizierung von seneszenten (p16^{Ink4a}-Färbung) und proliferierenden (Ki67-Färbung) Tumorzellen im isolierten Tumorgewebe von RT2-Mäusen wurde das jeweils detektierte Fluoreszenzsignal der an p16^{Ink4a}- und Ki67- bindenden Sekundärantikörper digital quantifiziert. Dafür wurde zunächst jeweils das Tumorareal definiert.

Zur quantitativen Beurteilung der Proliferationsfähigkeit der einzelnen Tumore wurde von jeweils 1.500 Zellkernen die Anzahl an Ki67⁺ Zellen bestimmt und in Relation zur Gesamtzahl an Tumorzellen gesetzt. Zur quantitativen Beurteilung der Seneszenz im Tumorgewebe wurde von jeweils 1.500 Zellkernen die Fläche (µm²) des von der p16^{Ink4a}-Färbung stammenden Fluoreszenzsignals detektiert. Diese Fläche wurde in

Relation zur gesamten Zellkernfläche gesetzt. Das zytoplasmatische p16^{Ink4a}-Signal wurde vernachlässigt. Pro Tier wurden jeweils drei repräsentative Schnitte ausgewertet¹⁶⁷.

3.12.5.6 Detektion und Quantifizierung der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidaseaktivität

Zur Detektion der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase (SA- β -Gal)-Aktivität wurden 20 μ m Kryo-Serienschnitte in 2% Formaldehyd mit 0,25% Glutaraldehyd fixiert und zweimal für jeweils 5 min in PBS/MgCl₂ (1 mM) gewaschen. Die Schnitte wurden anschließend in X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid) Färbelösung bei pH-Werten von 4,0, 5,5 und 7,0 für 5 h bei 37 °C inkubiert. SA-Gal schneidet X-Gal in Galaktose und 5-Bromo-4-chloro-3-hydroxyindol, welches wiederum durch Luftsauerstoff oxidiert wird, dimerisiert und dadurch einen blauen Farbstoff bildet. Die nun blau gefärbten Schnitte wurden dreimal für 10 min in PBS/MgCl₂ gewaschen und anschließend unter einem digitalen Mikroskop bei 4-facher Vergrößerung aufgenommen.

Die digitale Quantifizierung der β -Galaktosidasefärbung wurde von der AG Schaller etabliert und analog Brenner et. al¹⁶⁷ und wie im Folgenden beschrieben durchgeführt. Zur Bestimmung der angefärbten Tumorflächen und der Aktivität von SA β -Gal wurden die aufgenommenen Schnitte mittels Adobe Photoshop® (San José, CA, USA) analysiert. Anhand des „*White balance*“ Tools wurde der Hintergrund vereinheitlicht. Mittels der „*Quick Mask Mode*“ wurde dann das Tumoreal eingegrenzt. Die Auswahl wurde inversiert und die Pixel außerhalb des Areals gelöscht, so dass die Anzahl der Pixel im Histogramm mit der Tumorfläche korrelierte. Anschließend wurden die verschiedenen Farbtöne mit dem „*Posterize*“ Tool separiert. Weiße Pixel wurden mit Hilfe des „*Magic wand*“ Tools gelöscht. Die verbleibende Anzahl an Pixeln korrelierte nun mit der Fläche der angefärbten Tumorzellen. Die Fläche der gefärbten Tumorzellen wurde in Prozent zur gesamten Tumorfläche berechnet.

Um ein Maß für die Aktivität von SA- β -Gal zu erhalten, wurde die Intensität der Färbung ermittelt. Dafür wurde erneut die Tumorfläche herangezogen; die Farbtöne wurden anhand des „*Posterize*“ Tools separiert und deren Farbwerte mittels des

„*Filter blur average*“ Tools gemittelt. Anhand des „*Eye dropper*“ Tools wurde der RGB Farbcode des gemittelten Farbtone identifiziert und anschließend in einen Grauwert übersetzt. Der Grauwert (im Bereich von 0 - 255, schwarz = 0, weiß = 255) diente als Maß für die SA- β -Gal Aktivität innerhalb eines Tumoreals¹⁶⁷.

3.13 Durchflusszytometrie (FACS)

Mittels der Durchflusszytometrie, umgangssprachlich auch „*Fluorescent activated cell sorting*“ (FACS) genannt, werden Zellpopulationen in Suspension auf die Expression bestimmter Proteine auf der Zelloberfläche, oder auch im Zellinneren, charakterisiert. So ist es möglich, bestimmte Zelllinien, einzelne Organe oder Tumore auf die Expression von Zelloberflächenrezeptoren und Antigenen, sowie auf Zytokine und Transkriptionsfaktoren zu untersuchen und unterschiedliche Zellpopulationen zu charakterisieren.

Zur Detektion werden an Fluorochrome gekoppelte monoklonale Antikörper herangezogen, welche gegen definierte Proteine einer Zelle gerichtet sind. Die zu analysierende, gefärbte Zellsuspension wird in ein Durchflusszytometer geleitet. Dort werden die Zellen durch einen Mikrokanal einzeln an verschiedenen Lasern vorbeigeleitet, wobei das Licht durch die Zellen gestreut wird und die Fluorophore angeregt werden. Die optischen Signale werden durch verschiedene Photodioden, welche hinter Filtern bestimmter Wellenlängen angeordnet sind, detektiert, in elektrische Signale umgewandelt und mittels einer Software analysiert. Größe („*forward scatter*“, FSC) und Granularität („*Sideward-Scatter*“, SSC) einer Zelle werden über die Lichtbrechung bestimmt. Die Fluoreszenzintensität innerhalb eines jeweiligen Kanals weist einer Zelle definierte Eigenschaften zu.

Per Durchflusszytometrie können heutzutage bis zu 18 fluoreszierende Farbstoffe gleichzeitig analysiert werden. Mittels FACS ist es darüber hinaus möglich, genau definierte Zellpopulationen von der restlichen Zellsuspension zu trennen, zu isolieren und weiter zu verarbeiten.

3.13.1 Vorbereitung und Färbung der Proben

Alle Zentrifugationsschritte wurden für 5 min bei 1.200 rpm und 4 °C durchgeführt.

Zunächst wurden die frisch isolierten Organe (3.12.2) in eiskaltes RPMI/2% FCS-Medium aufgenommen und zur Vereinzelnung der Zellen vorsichtig mit Hilfe eines 1-ml Spritzenkolbens durch einen 70 µm Zellsieb in ein 50 ml Falcon gerieben. Das Knochenmark wurde zuvor mit eiskaltem FACS-Puffer (Tab. 13) aus dem Knochen in ein 50 ml-Falcon gespült und anschließend in den Zellsieb überführt. Die Siebe wurden zweimal mit 5 ml FACS-Puffer gespült, die Zellsuspensionen bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert.

Milz und Tumorgewebe wurden teilweise (für die Multifarbenanalysen am LSR Fortessa) zunächst einem Kollagenase-Verdau unterzogen: Dafür wurden die Milzen bzw. Tumore unmittelbar nach ihrer Isolation einzeln in die Vertiefungen einer 24-Well-Flachbodenplatte gegeben. Jede Vertiefung wurde zuvor mit 100 µl Kollagenase-Verdaumedium (Tab. 13) befüllt. Mit einer kleinen Schere wurden die Gewebe so gut wie möglich zerkleinert und anschließend in 2 ml Kollagenase-Verdaumedium für 30 min unter ständigem Schütteln in einem Schüttelinkubator bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von jeweils 20 µl EDTA (0,5 µM) wurde der Verdau anschließend gestoppt. Die Zellen der homogenisierten Gewebe wurden dann, wie auch bereits die anderen Organe, durch jeweils einen 70 µm Zellsieb in je ein 50 ml-Falcon gepresst; die Siebe wurden anschließend zweimal mit 5 ml PBS/2% FCS gespült.

Nach einer 5-minütigen Lyse der Erythrozyten (aller Organe mit Ausnahme der LKs) mittels jeweils 1 - 3 ml ACK-Lysepuffer (Tab. 13) und einem darauf folgenden Waschschrift in jeweils 10 ml FACS-Puffer wurden die resuspendierten Zellen zunächst gezählt und anschließend durch 40 µm Zellsiebe („Bluecaps“) in Analyseröhrchen überführt. Die Zellsuspensionen wurden dann in jeweils 50 µl eines Antikörpercocktails (3.3.3) für 30 min bei 4°C im Dunkeln gefärbt. Anschließend wurden sie zweimal in FACS-Puffer gewaschen und bis zur Analyse in jeweils 200 µl FACS-Puffer bei 4°C im Dunkeln gelagert. Sollte die Analyse im Durchflusszytometer nicht am selben Tag erfolgen, wurde den Proben zur Fixierung der Fluoreszenzfärbungen im FACS-Puffer jeweils 0,5% Roti®-Histofix (Tab. 13) hinzugefügt.

Alle in dieser Arbeit verwendeten fluoreszierenden Antikörper für die Durchflusszytometrie und deren Bezugsquellen sind in **Tab. 7** und **Tab. 8** aufgelistet. Die Tabellen bieten eine Übersicht über die Zusammenstellung der Antikörpercocktails („*Panels*“) wie sie in den einzelnen *ex vivo* Experimenten eingesetzt wurden und sind jeweils an entsprechender Stelle im Ergebnisteil aufgeführt.

3.13.2 Analyse im Durchflusszytometer und Auswertung der Signale

Die Analyse der Proben wurde an Durchflusszytometern des Typs LSR-II (für max. 8 Farben) und LSR Fortessa (für max. 18 Farben) (**Tab. 3**) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels der Software FlowJo (FlowJo, LCC, Ashland, OR, USA).

Zunächst wurde die Größe der Zellen (FSC-Signal) gegen ihre Granularität (SSC-Signal) in einem Dot-Plot-Diagramm aufgetragen. Somit ließ sich die Lymphozytenpopulation bereits gut darstellen und durch ein „*Gate*“ eingrenzen. Nach dem Ausschluss von Dubletten wurden die verschiedenen Fluoreszenzsignale zur Identifikation der vorhandenen Zellpopulationen in weiteren Dot-Plot-Diagrammen gegeneinander aufgetragen. So konnten beispielsweise die transgenen CD4⁺ Tag2-spezifischen Th1-Zellen (T_H1-Zellen) durch das Auftragen des Signals des fluoreszierenden Allophycocyanin-Cyanin 7 (APC-Cy7)-CD4 mAbs gegen das Signal des fluoreszierenden Phycoerythrin (PE)-Tag2-TCR mAbs identifiziert werden.

Durch den Einsatz von Einzelfärbungen bzw. Fehlfarbenkontrollen („*Fluorescent-Minus-one*“, FMO: Färbungen, in welchen jeweils ein Antikörper fehlt) wurden die „*Gates*“ zur Quantifizierung der Fluoreszenzsignale gesetzt. Anhand der Einzelfärbungen bzw. FMOs wurden unspezifische Signale korrigiert und ausgegrenzt. Zur Quantifizierung und statistischen Auswertung wurde der prozentuale Anteil eines Fluoreszenzsignals in Bezug zur Ausgangs- bzw. zu einer Referenzpopulation berechnet.

Abb. 17 zeigt eine innerhalb dieser Arbeit verwendete „*Gating*“-Strategie einer Analyse am LSR-II zur Darstellung der transgenen T_H1-Zellen (Lymphozyten → einzelne Zellen → CD45.2⁺ Zellen → CD3⁺ Zellen → CD4⁺ Zellen → Tag2-TCR⁺ Zellen) im Tumor-drainierenden PLK unter Verwendung von „*Panel*“ A (**Tab. 7**) und

eine Strategie zur Charakterisierung von B-Zellen und Neutrophilen in der Milz unter Verwendung von „Panel“ B (Tab. 7). Im Folgenden wird die „Gating“-Strategie der Multifarbenanalyse beschrieben.

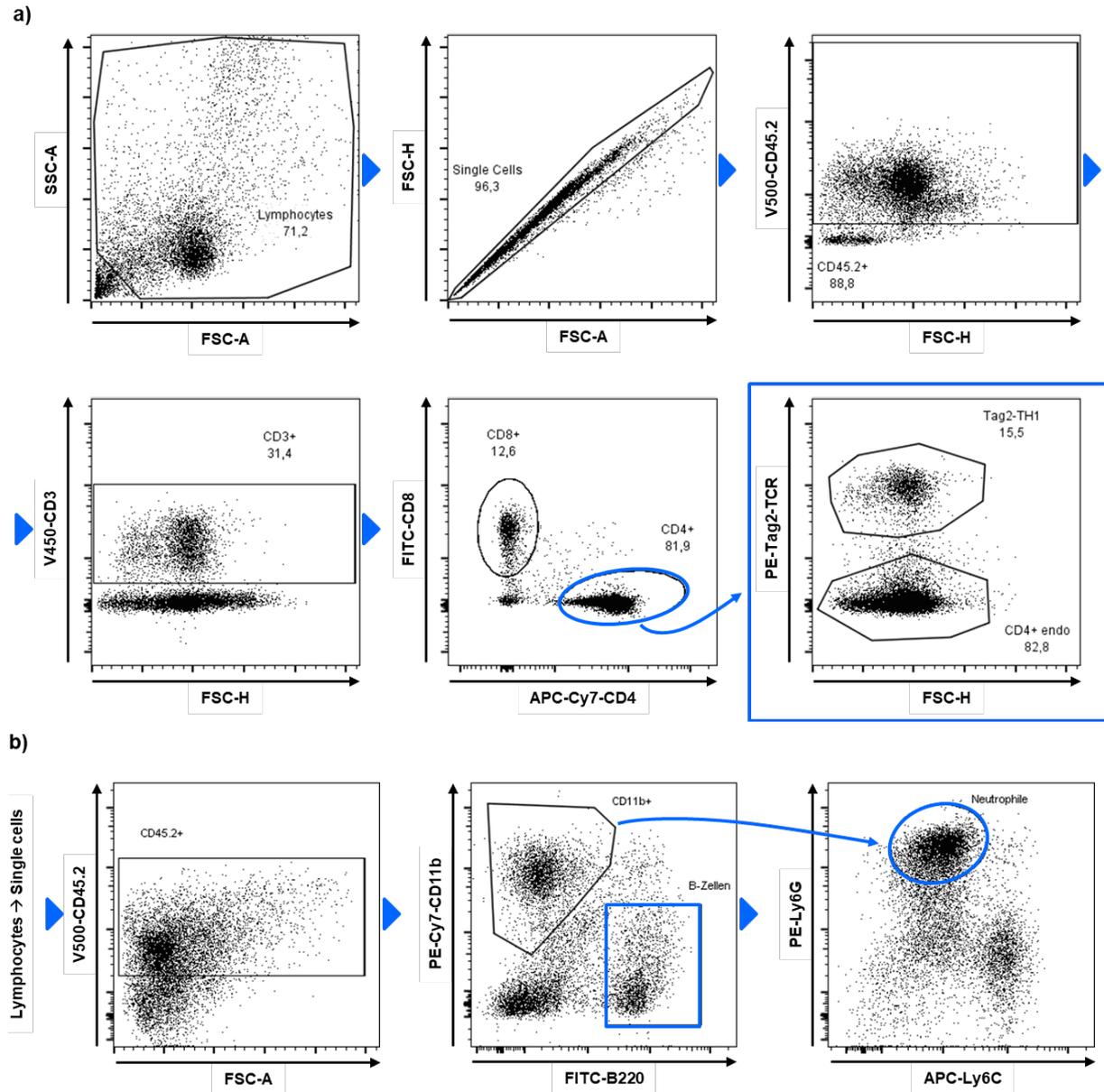


Abb. 17: „Gating“-Strategie zur Differenzierung von CD3⁺ Subpopulationen am LSR-II. Dargestellt sind repräsentative Plots einer durchflusszytometrischen Bestimmung von (a) T-Zell Subpopulationen im PLK und (b) B-Zellen und Neutrophilen in der Milz nach Kombinationstherapie (T_H1+ICB) in RT2-Mäusen. Die transgenen CD4⁺ TH1-Zellen (Tag2-T_H1) werden im PE-Kanal als Tag2-TCR-positive Zellen detektiert. TCR = „T cell receptor“.

3.13.2.1 „Gating“-Strategie innerhalb der Multifarbenanalyse

Zur Unterscheidung einzelner Immunzellpopulationen innerhalb der Multifarbenanalyse am LSR Fortessa wurden folgende Strategien gewählt:

Zunächst wurden die Einzelzellsuspensionen auf Größe und Granularität (FSC/SSC) untersucht. Nach Ausschluss von Dubletten und toten Zellen (Zombie NIRTM, **Tab. 8**), wurden die verbliebenen lebenden Zellen näher charakterisiert und in verschiedene Immunzellpopulationen unterteilt. Anhand von „Panel“ D (**Tab. 8**) wurden T-Zellen, B-Zellen, NK T-Zellen, NK-Zellen, DCs, Granulozyten, Makrophagen bzw. Monozyten und Myeloide Suppressorzellen (MMDSCs) identifiziert. **Tab. 18** bietet eine Übersicht über die Kriterien zur Identifikation der einzelnen Immunzellpopulationen.

Tab. 18: „Gating“-Strategie zur Identifikation unterschiedlicher Immunzellpopulationen.

Population	Einschlusskriterium	Ausschlusskriterium
B-Zellen	BV785-B220	BV421-CD3
CD3 ⁺ Zellen	BV421-CD3	BV785-B220
CD3 ⁺ T-Zellen	BV421-CD3	BV785-B220 / PE-NKp46
NK T-Zellen	BV421-CD3 / NKp46	BV785-B220
B220 / CD3-negative Populationen		
NK Zellen	PE-NKp46	
Dendritische Zellen (DCs)	APC-CD11c	PE-NKp46
B220 / CD3 / NKp46 / CD11c-negative Populationen		
Granulozyten	BV510-CD11b / FITC-Ly6G	
Makrophile/Monozyten (Makros/Monos)	BV510-CD11b	FITC-Ly6G / PE/Cy7-Ly6C
Myeloide Suppressorzellen (MMDSCs)	BV510-CD11b / PE/Cy7-Ly6C	

„Panel“ E (**Tab. 8**) diente zur näheren Charakterisierung und Differenzierung von T-Zellen. Dabei wurde zunächst unter Einschluss des FITC-CD3 Signals das PerCP-CD4 Signal (CD4⁺ T-Zellen) vom Signal des AF700-CD8 mAbs (CD8⁺ T-Zellen) abgegrenzt. CD4⁺ T-Zellen konnten zudem durch die Analyse des PE-Tag2-TCR Signals in endogene (CD4^E, Tag-TCR⁻) und transgene (T_H1-Zellen, Tag-TCR⁺) Zellen unterschieden werden (**Tab. 19**).

Tab. 19: „Gating“-Strategie zur Differenzierung von T-Zell-Subpopulationen.

Population	Einschlusskriterium	Ausschlusskriterium
CD3 ⁺ Zellen	FITC-CD3	
CD3⁺ Zellen		
CD4 ⁺ Zellen	PerCP-CD4	Alexa Fluor 700-CD8
CD8 ⁺ Zellen	Alexa Fluor 700-CD8	PerCP-CD4
CD4⁺ Zellen		
endogene CD4 ⁺ Zellen (CD4 ^E)	PE-Tag2-TCR	
transgene CD4 ⁺ Zellen (T _H 1)		PE-Tag2-TCR

Zuletzt wurden, ebenfalls unter Verwendung von „Panel“ E, die verschiedenen T-Zell-Subpopulationen (CD4^E, T_H1- und CD8⁺ T-Zellen) auf deren Aktivierungszustand, und Effektor- sowie Gedächtnisfunktionen untersucht. Aktivierte T-Zellen wurden anhand des BV650-CD69 Signals, unter Ausschluss des BV421-CD25 Signals, eingegrenzt. Innerhalb der CD4⁺ Population dienten die Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper CD127 und CD25 zur Identifikation von T_{regs}; diese wurden durch eine niedrige CD127-Expression (BV785-CD127^{lo}) bei gleichzeitiger Expression von CD25 (BV421-CD25⁺) charakterisiert¹⁶⁸⁻¹⁷⁰. Effektor- bzw. Gedächtnisfunktionen wurden anhand des BV510-CD44- und PE/Cy7-CD62L Signals analysiert: Dabei wurden die CD4⁺ Subpopulationen in T-Zellen mit Effektor/Gedächtnisfunktion (T_{E/EM}; CD44-positiv, CD62L-negativ), zentrale Gedächtniszellen (T_{CM}; CD44-positiv, CD62L-positiv) und naive T-Zellen (CD44-negativ, CD62L-positiv) unterteilt (Tab. 20).

CD8⁺ T-Zellen konnten durch die Signale von BV785-CD127 und PE/Cy7-CD62L in Effektor-T-Zellen (T_E; CD127-positiv, CD62L-negativ), Effektor/Gedächtnis-T-Zellen (T_{EM}; CD127-negativ, CD62L-negativ) und zentrale Gedächtnis-T-Zellen (T_{CM}; CD127-positiv, CD62L-positiv) unterteilt werden^{171,172} (Tab. 20 Tab. 21).

Weiter wurden alle T-Zell-Subpopulationen anhand ihrer PD-1 (BV711-PD-1)-Expression unterteilt: Ein geringes BV711-PD-1 Signal grenzte eine geringe PD-1-Expression (PD-1^{lo}) ein. Da der Immuncheckpoint TIM-3 hauptsächlich mit PD-1 co-exprimiert wird, wurde ein hohes PD-1 Signal nochmals dem Signal von BV605-TIM-3 gegenübergestellt: Somit wurden T-Zellen mit starker PD-1-Expression bei fehlendem TIM-3 Signal (PD-1^{hi}) und T-Zellen mit starker PD-1 und TIM-3-

Expression (PD-1^{hi}/TIM-3^{hi}) voneinander und von der PD-1^{lo} Population abgegrenzt (Tab. 20).

Tab. 20: „Gating“-Strategie zur näheren Charakterisierung der CD4- und CD8-Subpopulationen.

Population	Einschlusskriterium	Ausschlusskriterium
CD8⁺, CD4^E bzw. T_H1 Zellen		
Aktivierung	BV650-CD69	BV421-CD25
PD-1 ^{lo}		BV711-PD-1
PD-1 ^{hi}	BV711-PD-1	BV605-TIM-3
PD-1 ^{hi} /TIM-3 ^{hi}	BV711-PD-1 / BV605-TIM-3	
nur CD4^E bzw. T_H1 Zellen		
T _{regs}	BV421-CD25	BV785-CD127
T _{E/EM}	BV510-CD44	PE/Cy7-CD62L
T _{CM}	BV510-CD44 / PE/Cy7-CD62L	
nur CD8⁺ Zellen		
T _E		BV785-CD127 / PE/Cy7-CD62L
T _{EM}	BV785-CD127	PE/Cy7-CD62L
T _{CM}	BV785-CD127/PE/Cy7-CD62L	

3.14 Statistische Analysen

Die Ergebnisse der Blutglukose- und PET-Messungen, sowie die *in vitro* und *ex vivo* Analysen, wurden als Mittelwert ± Standardabweichung des Mittelwerts („*Standard error of the mean*“, SEM) abgebildet. Die Blutglukosespiegel wurden entweder im zeitlichen Verlauf anhand der jeweiligen berechneten Flächen unter den Kurven („*Area under the curve*“, AUC) oder zu einem einzigen definierten Zeitpunkt miteinander verglichen.

Für den Vergleich von unabhängigen Stichproben wurde generell der zweiseitige „*Student’s*“ t-Test verwendet; ein Vergleich abhängiger Stichproben erfolgte mittels eines zweiseitigen t-Tests für verbundene Stichproben. Der Vergleich von nicht-normalverteilten Stichproben mit einer hohen Standardabweichung wurde mittels eines nicht parametrischen Rangsummentests (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test) durchgeführt. Für den Vergleich der Überlebenskurven wurde der Log-Rank Test

herangezogen. Zur Korrektur für Mehrfachtestungen wurde jeweils eine Bonferroni Korrektur des Signifikanzniveaus angewendet. Die in den Experimenten verwendeten statistischen Tests sind unter der jeweiligen Abbildung beschrieben. Falls nicht explizit erwähnt, wurden Werte von $P < 0,05$ als statistisch signifikant erachtet.

Die durchgeführten statistischen Gruppenvergleiche wurden nach der Besprechung mit Prof. Dr. Martin Eichner (Institut für medizinische Biometrie, Universität Tübingen) angewandt. Für die statistische Auswertung wurde die Software Graphpad (Graphpad Software, Inc., San Diego, CA, USA) bzw. JMP (SAS Institute GmbH, Heidelberg, DE) verwendet.

4 Ergebnisse

Die Ergebnisse unter den Abschnitten 4.1. und 4.2. sind Teil folgender Publikation:
E. Brenner*, **B.F. Schörg***, und F. Ahemtlíč*, *et al.* (Nature Communications, 2020)¹⁶⁷

Die Ergebnisse unter Abschnitt 4.4. sind Teil folgender Publikation:
J. Schwenck* und **B. Schörg*** *et. al.* (Theranostics, 2020)¹⁷³

4.1 Wirksamkeit einer kombinierten Immuntherapie im fortgeschrittenen murinen RT2-Inselzellkarzinommodell

Eine T-Zell basierte Immuntherapie wurde bereits von der Arbeitsgruppe Röcken im RT2-Inselzellkarzinommodell etabliert und intensiv erforscht (1.4.1)^{62,64}. Hierbei wurde jedoch stets eine protektive Behandlung der RT2-Mäuse untersucht, da die Mäuse zu Beginn der Therapie lediglich fünf bis sieben Wochen alt waren und sich die Inselzellen der Tiere zu diesem Zeitpunkt im Stadium der Hyperplasie befanden. Folglich waren zu Therapiebeginn auch noch keine Symptome wie reduzierte Blutglukosespiegel messbar.

Um ein experimentelles Tiermodell zu verwenden, welches sich eher an der tatsächlichen klinischen Situation von Tumorpatienten orientiert, wurden im Folgenden zum Therapiestart stets ältere (zehn bis elf Wochen alte) RT2-Mäuse eingesetzt, deren Inselzellen bereits zu größeren, angiogenen Karzinomen herangewachsen waren (1.4.1). Die Karzinome sollten sich daher gut im MRT darstellen lassen¹²⁴ und die Mäuse bereits Symptome wie reduzierte Blutglukosespiegel zeigen (1.4.1). An diesem fortgeschrittenen endogenen RT2-Inselzellkarzinommodell wurde nun zunächst die Effizienz einer kombinierten, T-Zell-basierten Immuntherapie anhand der Blutglukosespiegel und der mittleren Überlebensrate der Versuchstiere untersucht. Ein weiterer Unterschied zur protektiven Behandlung bestand darin, die Therapie um eine Komponente, einem

*gleichberechtigte Erstautoren

therapeutischen Cocktail aus den IC-inhibierenden Antikörpern anti-PD-L1 und anti-LAG-3 mAbs (PD-L1/LAG-3) zu erweitern.

4.1.1 Einfluss der kombinierten Immuntherapie auf den Blutglukosespiegel von RT2-Mäusen

Zehn bis elf Wochen alte RT2-Mäuse wurden, wie unter 3.8 beschrieben, nach einer initialen Immunzelldepletion über einen Zeitraum von knapp vier Wochen mit den therapeutischen T-Zellen (T_H1) und PD-L1/LAG-3 (ICB) behandelt. Bei den Kontrollgruppen wurde nach der Immunzelldepletion jeweils eine Therapiekomponente gegen eine Scheinbehandlung ausgetauscht: PBS wurde zur Substitution der T_H1 -Zellen eingesetzt; wirkungslose IgG-Isotyp-Antikörper dienten als Ersatz für den therapeutischen Antikörpercocktail. Eine weitere Gruppe wurde im Anschluss an die Immunzelldepletion komplett scheinbehandelt (Sham). Der Blutglukosespiegel wurde zweimal wöchentlich gemessen.

Der Blutglukosespiegel betrug zu Beginn der Therapie in jeder Gruppe im Mittel zwischen 80 und 100 mg/dL (Abb. 18a). Anhand der scheinbehandelten Gruppe (Sham) ließ sich das rapide Tumorwachstum aufgrund der rasch sinkenden Blutglukose sehr gut beobachten: Der Blutglukosespiegel sank während der vierwöchigen Therapie von $95,3 \pm 6,3$ mg/dL auf $54,7 \pm 5,8$ mg/dL. Im Vergleich dazu stellte sich in der Haupt-Therapiegruppe (T_H1 +ICB) bereits sehr früh ein deutlicher Behandlungserfolg ein: Nach nur einer Behandlungswoche stieg die Konzentration der Blutglukose von $83,5 \pm 5,2$ mg/dL zu Beginn der Therapie auf $98,7 \pm 5,3$ mg/dL und konnte im zeitlichen Verlauf im Vergleich zu allen Kontrollgruppen weiter stabilisiert werden ($96,1 \pm 3,8$ mg/dL nach vierwöchiger Behandlung). Die alleinige Behandlung mit T_H1 -Zellen führte kurzzeitig zu einer Stabilisierung des Blutglukosespiegels, was vermutlich auf eine verlangsamte Tumorprogression zurückzuführen ist (Startwert: $83,7 \pm 3,6$ mg/dL; nach einwöchiger Behandlung: $84,6 \pm 8,2$ mg/dL). Im zeitlichen Verlauf führte die T_H1 -Zell-Monotherapie jedoch zu einem Abfall der Blutglukose ($50,8 \pm 4,6$ mg/dL nach vierwöchiger Behandlung). Auch der IC-inhibierende Antikörpercocktail (ICB) zeigte als alleinige Therapiekomponente keinen Behandlungseffekt ($37,0 \pm 3,1$ mg/dL nach vierwöchiger Behandlung) (Abb. 18a). Ein signifikanter Unterschied der Blutglukosespiegel über einen

Behandlungszeitraum von 3 Wochen (3.14) konnte im Vergleich zur scheinbehandelten Gruppe (Sham) ausschließlich durch die Kombinationstherapie (T_H1+ICB) erreicht werden (222,2±9,1 a.u. vs. 272,0±10,6 a.u.; *P* = 0,005) (Abb. 18b).

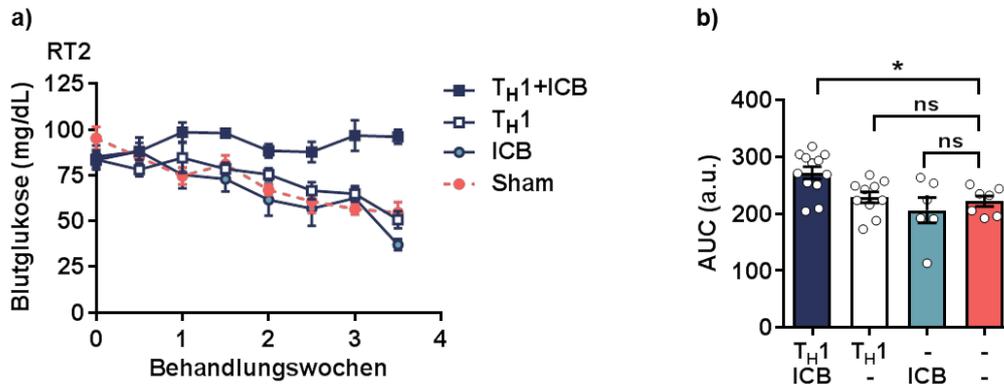


Abb. 18: Blutglukosespiegel von RT2-Mäusen unter Kombinationstherapie. (a) Zeitlicher Verlauf der Blutglukose von zehn bis elf Wochen alten RT2-Mäusen, welche nach initialer Bestrahlung (2 Gy) 1x wöchentlich mit T_H1-Zellen und 2x mit dem Antikörpercocktail PD-L1/LAG-3 (T_H1+ICB, n = 12) behandelt wurden. In den Kontrollgruppen wurden die T_H1-Zellen mit PBS (ICB, n = 6) oder der therapeutische Antikörpercocktail mit Isotyp-mAbs (T_H1, n = 10) substituiert. Sham-behandelte Tiere (n = 7) erhielten PBS und Isotyp-mAbs. **(b)** Zur statistischen Auswertung wurden die Flächen unter den Blutglukosekurven („Area under the Curve“, AUC) über 3 Behandlungswochen berechnet und mittels eines zweiseitigen Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests mit Bonferroni-Korrektur für Mehrfachtestungen (k = 3) verglichen. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte ± SEM als „arbitrary units“ (a.u., willkürliche Einheiten). Jeder Punkt repräsentiert die AUC einer entsprechend behandelten Maus (T_H1+ICB, n = 12; T_H1, n = 10; ICB, n = 6; Sham (-/-), n = 7); **P* < 0,017; ns = nicht signifikant (modifiziert nach Brenner *et al.*, 2020)¹⁶⁷

4.1.2 Einfluss der kombinierten Immuntherapie auf die Überlebensrate von RT2-Mäusen

Nachdem die Effizienz der Kombinationstherapie indirekt über den Einfluss auf den Blutglukosespiegel im Kurzzeitversuch getestet wurde und dadurch ein signifikanter Therapieeffekt gegenüber scheinbehandelten Mäusen beobachtet werden konnte (4.1.1), wurde anschließend der Einfluss auf die mittlere prozentuale Überlebensrate der Versuchstiere im Langzeitversuch überprüft.

Zehn bis elf Wochen alte RT2-Mäuse wurden wie bereits im vorigen Absatz beschrieben behandelt. Die Behandlung wurde nun jedoch nicht zu einem definierten Zeitpunkt abgebrochen. Jedes Versuchstier wurde so lange behandelt, bis zweimal in Folge ein Blutglukosewert von weniger als 30 mg/dL gemessen wurde, oder das

Versuchstier andere, vor Versuchsbeginn festgelegte Abbruchkriterien (3.10.3), erfüllte.

Das Überleben von unbehandelten RT2-Mäusen beträgt bekanntermaßen ca. 14 Wochen (1.4.1). Im hier durchgeführten Überlebensversuch betrug die mittlere Überlebensrate scheinbehandelter Mäuse (Sham) 3,6 Behandlungswochen, was bei einem Versuchsbeginn bei ca. zehn Wochen einem Alter von knapp 14 Wochen entspricht. Eine alleinige Behandlung mit dem therapeutischen Antikörpercocktail (ICB) hatte im Gegensatz zur T_H1 -Zell-Monotherapie keinen sichtbaren Einfluss auf das Überleben der Mäuse (mittlere Überlebensrate: 3,7 Behandlungswochen). Durch die T_H1 -Zell-Monotherapie jedoch konnte gegenüber der Scheinbehandlung ein signifikanter Effekt auf die mittlere Überlebensrate der Mäuse erreicht werden (3,6 vs. 7,6 Behandlungswochen; $P=0,0006$). Nach der zusätzlichen Verabreichung des ICB-Antikörpercocktails (T_H1 +ICB) konnte der Therapieeffekt und somit das mittlere Überleben der Mäuse in der Haupt-Therapiegruppe nochmals signifikant gesteigert werden (8,9 vs. 7,6 Behandlungswochen, $P=0,016$) (Abb. 19).

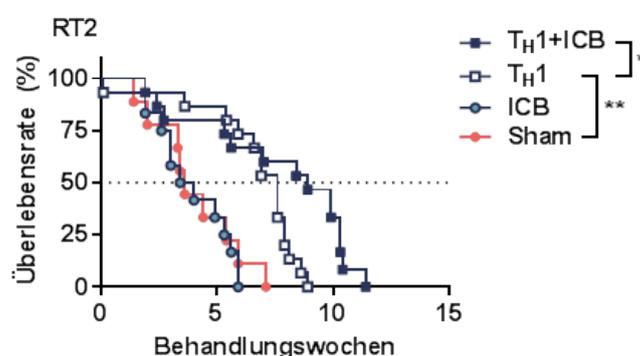


Abb. 19: Überlebensrate von RT2-Mäusen unter Kombinationstherapie. Zeitlicher Verlauf des prozentualen Überlebens von zehn bis elf Wochen alten RT2-Mäusen, welche nach initialer Bestrahlung (2 Gy) wöchentlich mit T_H1 -Zellen und dem Antikörpercocktail PD-L1/LAG-3 (T_H1 +ICB, $n=15$) behandelt wurden. In den Kontrollgruppen wurden die T_H1 -Zellen mit PBS (ICB, $n=12$) bzw. der therapeutische Antikörpercocktail mit Isotyp-mAbs (T_H1 , $n=15$) substituiert. Sham-behandelte Tiere ($n=9$) erhielten PBS + Isotyp-mAbs. Die gestrichelte Linie zeigt die mittlere prozentuale Überlebensrate an. Zur statistischen Auswertung wurde ein Log-rank Test mit Bonferroni-Korrektur für Mehrfachtestungen ($k=2$) verwendet (* $P<0,025$; ** $P<0,005$) (modifiziert nach Brenner *et al.*, 2020)¹⁶⁷.

4.1.3 Effekte der initialen Niedrigdosis-Ganzkörperbestrahlung innerhalb der kombinierten Immuntherapie

Es wurde bereits gezeigt, dass die Kombinationstherapie im fortgeschrittenen murinen RT2-Inselzellkarzinommodell sehr gut wirksam ist. Nun sollte kurz auf den Effekt der initialen Niedrigdosis-Ganzkörperbestrahlung (2 Gy) eingegangen werden. Eine solche Bestrahlung bewirkt eine Depletion der endogenen Immunzellen und schafft so möglicherweise Platz für die therapeutischen, TA-spezifischen T_H1-Zellen. Bedingt durch die unterschiedlichen zellulären Expressionsmuster der ICs PD-L1 und LAG-3 bindet der anti-PD-L1 mAb sowohl an Immunzellen als auch an Tumorzellen, während der anti-LAG-3 mAb ausschließlich an Immunzellen bindet (1.3.2). Im Folgenden wurde also zunächst anhand des Blutglukosespiegels und Körpergewichts der Mäuse untersucht, inwieweit der Therapieeffekt der Kombinationstherapie durch die anfängliche Immunzelldepletion, vermittelt durch 2 Gy, beeinflusst wird.

Ca. zehn Wochen alte RT2-Mäuse wurden im Kurzzeitversuch wie unter 3.8 beschrieben behandelt. Den bereits oben beschriebenen Behandlungsgruppen wurde eine weitere Gruppe, welche ebenfalls mit T_H1-Zellen und PD-L1/LAG-3 behandelt wurde, jedoch im Voraus nur einer Scheinbestrahlung (Ø2 Gy) unterzogen wurde (T_H1+ICB Ø2 Gy), gegenübergestellt.

Der Blutglukosespiegel betrug zu Beginn der Therapie in jeder Gruppe im Mittel 88 mg/dL. Auch in dieser Versuchsreihe ließ sich das rapide Tumorwachstum der scheinbehandelten Mäuse aufgrund der rasch sinkenden Blutglukose mit einem finalen Mittelwert von 39,6±4,2 mg/dL sehr gut nachvollziehen. Im Vergleich dazu konnte in der Haupt-Therapiegruppe (T_H1+ICB), erneut nach bereits einer Behandlungswoche, ein deutlicher Anstieg des Blutglukosespiegels beobachtet (96,8±3,0 mg/dL) und im weiteren Verlauf der knapp vierwöchigen Therapie weiter stabilisiert werden (81,4±6,5 mg/dL in der finalen Behandlungswoche). Auch innerhalb der scheinbestrahlten Gruppe (T_H1+ICBØ2 Gy) konnte nach der ersten Behandlungswoche ein Anstieg der mittleren Blutglukose beobachtet werden (90,4±5,7 mg/dL). Dabei handelte es sich jedoch lediglich um einen kurzzeitigen

Effekt, da der Blutglukosespiegel im Anschluss stetig auf einen finalen Wert von $63,4 \pm 6,6$ mg/dL sank (Abb. 20a).

Zwischen der scheinbehandelten (Sham) und der scheinbestrahlten Versuchsgruppe ($T_H1+ICB \emptyset 2Gy$) konnte über den gesamten Behandlungszeitraum von 3,7 Wochen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($444,4 \pm 31,0$ a.u. vs. $555,5 \pm 28,9$ a.u.; $P = 0,056$) wohingegen durch die kombinierte Behandlung nach 2 Gy Ganzkörperbestrahlung (T_H1+ICB) über die Dauer der Therapie erneut ein signifikant höherer Blutglukosespiegel der Mäuse im Vergleich zur Scheinbehandlung (Sham) erzielt werden konnte ($650,1 \pm 19,2$ a.u. vs. $444,4 \pm 31,0$ a.u.; $P = 0,008$) (Abb. 20b).

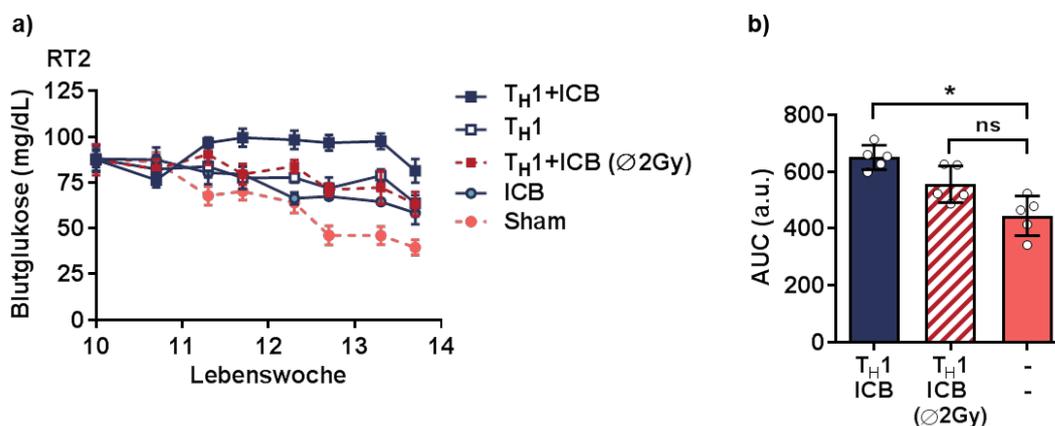


Abb. 20: Einfluss der Niedrigdosis-Ganzkörperbestrahlung auf den Blutglukosespiegel von RT2-Mäusen unter Kombinationstherapie. (a) Zeitlicher Verlauf der Blutglukose von ca. zehn Wochen alten RT2-Mäusen, welche nach initialer Bestrahlung (2 Gy) wöchentlich mit T_H1 -Zellen und dem Antikörpercocktail PD-L1/LAG-3 (T_H1+ICB , $n = 5$) behandelt wurden. Eine zweite Gruppe wurde vor Behandlungsbeginn lediglich einer Scheinbestrahlung unterzogen ($T_H1+ICB \emptyset 2Gy$, $n = 5$). In den Kontrollgruppen wurden die T_H1 -Zellen mit PBS (ICB, $n = 5$) oder der therapeutische Antikörpercocktail mit Isotyp-mAbs (T_H1 , $n = 5$) substituiert. Sham-behandelte Tiere ($n = 5$) erhielten PBS+ Isotyp-mAbs. **(b)** Zur statistischen Auswertung wurden die Flächen unter den Blutglukosekurven (AUC) berechnet und mittels eines zweiseitigen Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests mit Bonferroni-Korrektur für Mehrfachtestungen ($k = 2$) verglichen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (a.u.). Jeder Punkt repräsentiert die AUC einer entsprechend behandelten Maus aus a). * $P < 0,017$; ns = nicht signifikant (modifiziert nach Schwenck et al., 2020)¹⁷³.

Im Gegensatz zum Verlauf der Blutglukose zeigte die 2 Gy-Ganzkörperbestrahlung, wie auch die Behandlung mit den IC-Inhibitoren PD-L1/LAG-3, keinen Einfluss auf das Körpergewicht der Mäuse (Abb. 21). Jedoch trat eine Woche nach Versuchsbeginn, zwischen der elften und zwölften Lebenswoche der RT2-Mäuse, im

Vergleich zu scheinbehandelten Tieren (Sham, $0,5 \pm 0,2$ g) in Folge der jeweils ersten T_H1 -Zell-Injektionen eine deutliche, kurzzeitige Gewichtsabnahme der Versuchstiere auf (T_H1 : $-2,9 \pm 0,4$ g; T_H1+ICB : $-2,8 \pm 0,2$ g; $T_H1+ICB \emptyset 2$ Gy: $-2,6 \pm 0,5$ g) (Abb. 21b). Das Körpergewicht glied sich im weiteren Therapieverlauf wieder dem der scheinbehandelten RT2-Mäuse an (Abb. 21a).

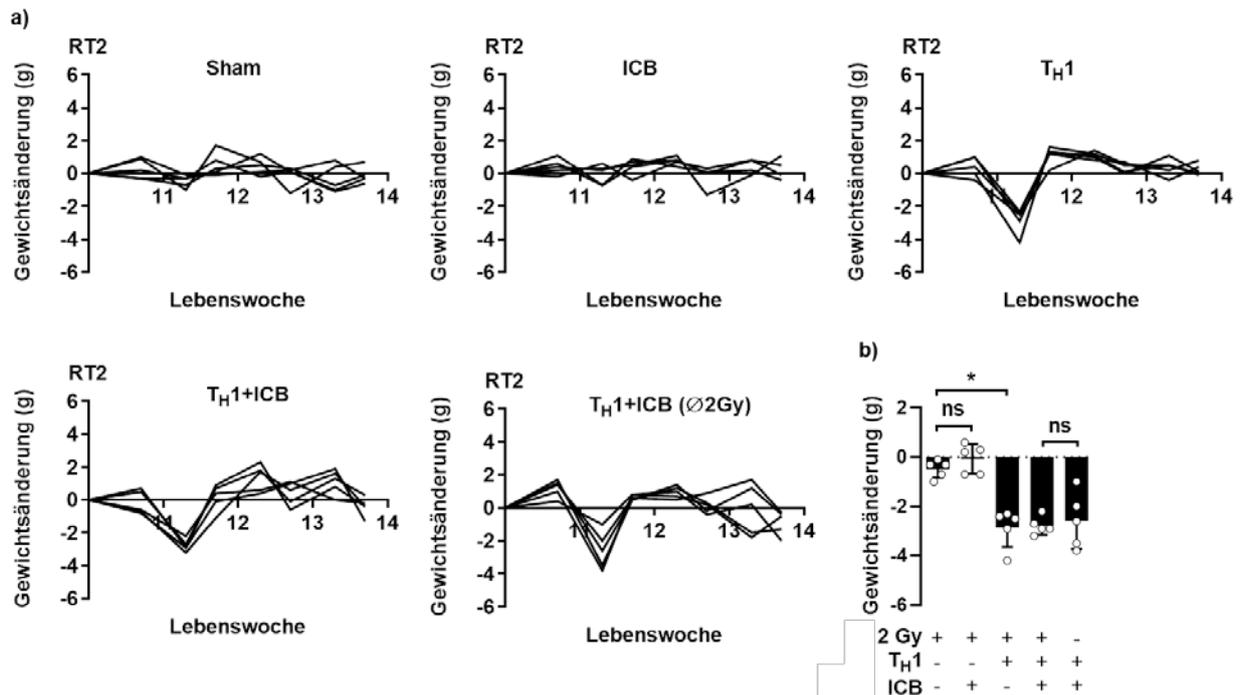


Abb. 21: Änderung des Körpergewichts während des Behandlungsverlaufs. (a) Änderung des Körpergewichts der RT Mäuse während des gesamten Behandlungsverlaufs. Die Mäuse wurden wie in Abb. 20 beschrieben behandelt. Jede Linie repräsentiert die Änderung des Körpergewichts einer entsprechend behandelten RT2-Maus (pro Gruppe: $n = 5$) **(b)** Darstellung der Gewichtsänderung zwischen der elften und zwölften Lebenswoche. Zur statistischen Auswertung wurde ein zweiseitiger Wilcoxon-Mann-Whitney-Test mit Bonferroni-Korrektur für Mehrfachtestungen ($k = 3$) verwendet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Jeder Punkt repräsentiert die Änderung des Körpergewichts einer entsprechend behandelten Maus in Gramm (pro Gruppe: $n = 5$). * $P < 0,017$; ns = nicht signifikant.

Im Anschluss an das *in vivo* Experiment wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht, wie sich die Ganzkörperbestrahlung auf die Verteilung der transferierten T_H1 -Zellen und der endogenen T-Zellen in Blut, Milz und dem Tumor-drainierenden PLK der Versuchstiere nach vierwöchiger Kombinationstherapie auswirkt. Hierzu wurden die entsprechend behandelten Mäuse getötet, die Organe isoliert, für die *ex vivo* Analysen vorbereitet (3.12) und mittels Durchflusszytometrie (3.13) unter Verwendung von „Panel“ A (Tab. 7) untersucht.

Die initiale 2 Gy-Ganzkörperbestrahlung zeigte nach vierwöchiger Kombinationstherapie (T_H1+ICB) in allen untersuchten lymphatischen Organen und dem Blut hauptsächlich Effekte auf die Verteilung der endogenen $CD8^+$ T-Zellen und der applizierten, therapeutischen T_H1 -Zellen (**Abb. 22**).

Die Bestrahlung hatte keine signifikanten Effekte auf den Anteil der $CD4^+$ T-Zellen an der Gesamt-Leukozytenpopulation ($CD45.2^+$ Zellen). Der Anteil der endogenen $CD8^+$ T-Zellen an der Leukozytenpopulation hingegen wurde durch die initiale Bestrahlung sowohl im Blut, als auch in den lymphatischen Organen signifikant reduziert. Während ohne Bestrahlung in der Milz $6,0 \pm 0,4\%$ $CD8^+$ T-Zellen detektiert wurden, verringerte sich ihr Anteil auf $2,7 \pm 0,6\%$ (T_H1+ICB , $P = 0,008$). Auch im PLK und dem Blut reduzierte die Bestrahlung den Anteil der $CD8^+$ T-Zellen nach Kombinationstherapie auf ca. die Hälfte (PLK: $6,4 \pm 0,6\%$ vs. $15,3 \pm 0,6\%$, $P = 0,008$; Blut: $1,4 \pm 0,2\%$ vs. $3,0 \pm 0,6\%$, $P = 0,016$) (**Abb. 22b**). Des Weiteren lag die endogene $CD8^+$ T-Zellpopulation in scheinbehandelten, aber bestrahlten Kontrollmäusen (Sham) im Blut und in allen untersuchten lymphatischen Organen jeweils auf etwa dem gleichen Niveau wie in T_H1+ICB -behandelten, aber lediglich scheinbestrahlten Mäusen (T_H1+ICB $\emptyset 2$ Gy) vor (**Abb. 22b**). Die Verringerung des Anteils der endogenen $CD8^+$ T-Zellen an der Gesamt-Leukozytenpopulation scheint also ausschließlich als additiver Effekt in Folge von Bestrahlung (2 Gy) und kombinierter Behandlung (T_H1+ICB) aufzutreten.

Schlussendlich wurden die therapeutischen T_H1 -Zellen anteilig zur $CD4^+$ Gesamtpopulation betrachtet. Das Verhältnis der endogenen $CD4^+$ T-Zellen zu den therapeutischen ($CD4^+$) T_H1 -Zellen verschob sich in T_H1+ICB -behandelten Tieren nach initialer Bestrahlung sowohl im Blut als auch in den untersuchten lymphatischen Organen zugunsten der T_H1 -Zellen: In der Milz erhöhte sich der relative Anteil der T_H1 -Zellen an der $CD4^+$ Gesamtpopulation durch die Bestrahlung signifikant von $14,4 \pm 1,1\%$ auf $23,8 \pm 3,2\%$ ($P = 0,016$). In der Blutzirkulation wurden sogar doppelt so viele therapeutische T_H1 -Zellen in T_H1+ICB behandelten und bestrahlten Mäusen detektiert ($11,8 \pm 2,0\%$) als in behandelten, aber scheinbestrahlten Tieren ($4,7 \pm 0,6\%$, $P = 0,008$). Lediglich im drainierenden Lymphknoten wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen detektiert, tendenziell reduzierte sich aber auch hier der Anteil therapeutischer T_H1 -Zellen an der $CD4^+$

Gesamtpopulation durch die fehlende Bestrahlung um ca. ein Drittel ($37,9 \pm 5,6\%$ vs. $28,6 \pm 2,6\%$, $P = 0,31$) (Abb. 22c).

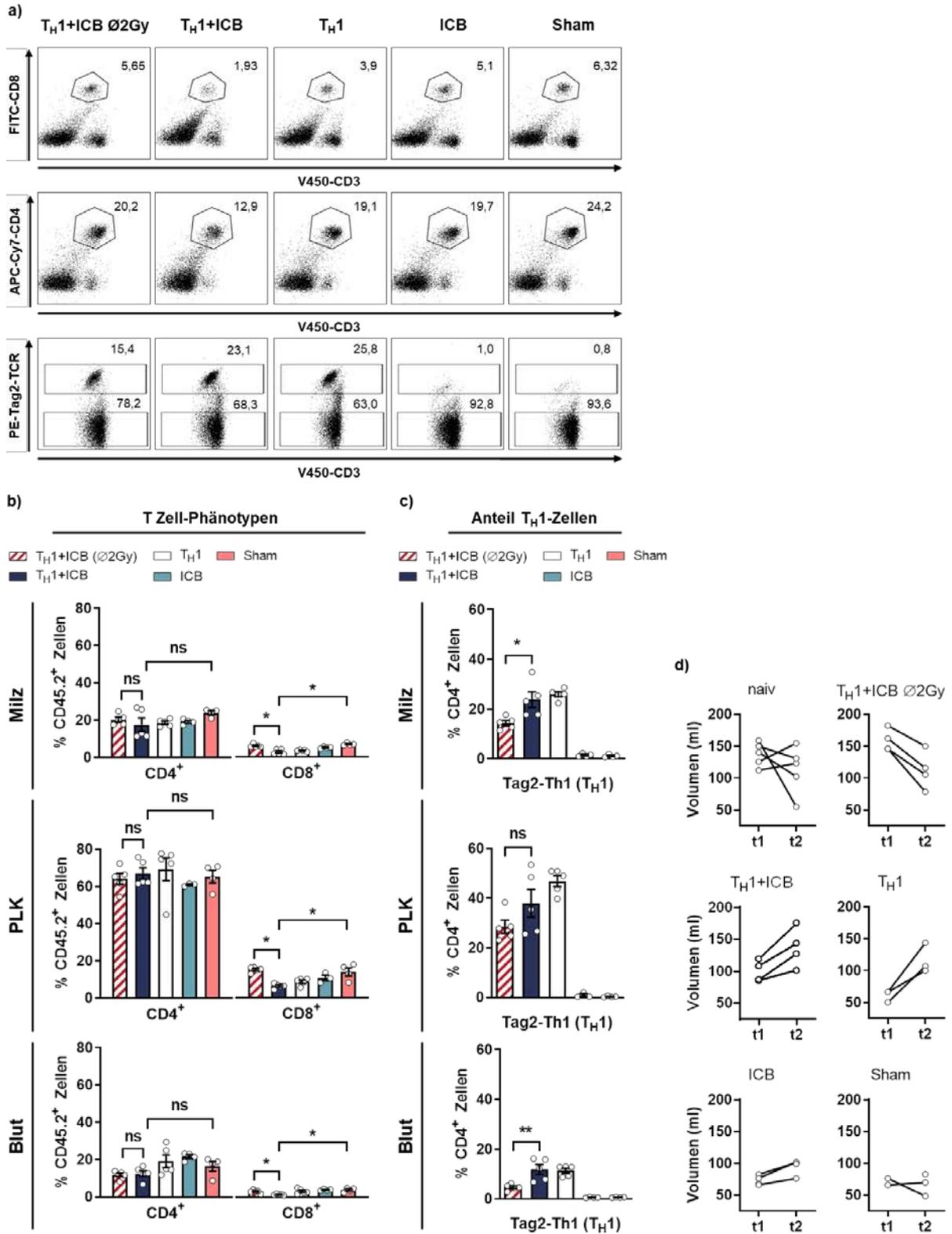


Abb. 22: Verteilung der T-Zellpopulationen in Blut und den sekundär lymphatischen Organen von RT2-Mäusen nach Kombinationstherapie mit oder ohne vorangehender Immunzelledepletion. Repräsentative Schaubilder der durchflusszytometrischen Analyse der Milz nach knapp vierwöchiger Behandlung. Die jeweiligen „Gates“ erfassen die prozentualen Anteile der verschiedenen T-Zellpopulationen (CD4⁺, CD8⁺ und therapeutische T_H1-Zellen) an der gesamten Leukozytenpopulation (CD45.2; oben und mittig) bzw. an der gesamten CD4⁺ T-Zell Population (unten). PE-Tag-TCR detektiert therapeutische T_H1-Zellen. **(b)** Vergleichende Darstellung aller T-Zellen anteilig an der Gesamt-Leukozytenpopulation (CD45.2) und **(c)** der therapeutischen T_H1-Zellen anteilig an der CD4⁺ T-Zellpopulation in Milz, PLK und Blut nach vierwöchiger Immuntherapie. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM. Jeder Punkt repräsentiert eine mittels Durchflusszytometrie untersuchte Zellsuspension einer entsprechend behandelten RT2-Maus (T_H1+ICB Ø2Gy: n = 5; T_H1+ICB, n = 5; T_H1, n = 5; ICB, n = 4 (außer PLK, hier n = 3); Sham n = 4). Zur statistischen Auswertung wurde ein zweiseitiger Wilcoxon-Mann-Whitney-Test mit Bonferroni-Korrektur für Mehrfachtestungen (Teilabbildung (b), k = 2; *P < 0,025) bzw. ohne Mehrfachtestung (Teilabbildung (c), *P < 0,05. **P < 0,01) verwendet. **(d)** Milzvolumen zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten innerhalb von drei Behandlungswochen (t1: Volumen nach initialer Bestrahlung und einem Therapiezyklus; t2: Volumen nach drei weiteren Behandlungszyklen). Zum Vergleich ist das Milzvolumen von naiven RT2-Mäusen (nicht bestrahlt und behandelt) zu zwei vergleichbaren Zeitpunkten abgebildet. Jeder Punkt repräsentiert jeweils eine mittels MRT untersuchte Milz einer RT2-Maus.

Neben der *ex vivo* Untersuchung der Zusammensetzung der T Zellpopulationen wurde das Milzvolumen von RT2-Mäusen zu Beginn (t1: nach initialer Bestrahlung und einem Therapiezyklus) und Ende einer Kurzzeittherapie (t2: nach drei weiteren Therapiezyklen) *in vivo* mittels MRT ermittelt. Während sich das Milzvolumen naiver RT2-Mäuse nur geringfügig änderte (t1 = 137,3 ± 8,4 ml; t2 = 113,1 ± 16,7 ml), vergrößerten sich die Milzen in Folge der Niedrigdosis-Ganzkörperbestrahlung und jeglicher therapeutischen Behandlung (T_H1+ICB: 99,9 ± 8,3 ml vs. 136,8 ± 15,5 ml; T_H1: 60 ± 5,4 ml vs. 116,7 ± 13,6 ml; ICB: 73,4 ± 3,7 vs. 94,6 ± 6,2 ml) im Laufe der Zeit. Die Kombinationstherapie hatte jedoch keine langfristige Vergrößerung des Milzvolumens zur Folge, wenn die initiale Bestrahlung ausblieb (T_H1+ICB Ø2 Gy: 159,0 ± 8,6 ml vs. 112,4 ± 17,8 ml) (**Abb. 22d**).

4.1.4 Einfluss der kombinierten Immuntherapie auf das Tumorwachstum

Neben den Blutglukosemessungen, welche indirekt das Wachstum der Inselzellkarzinome widerspiegeln, wurde das Tumorwachstum der Versuchstiere *in vivo* mittels MRT direkt während der Immuntherapie verfolgt. Dazu wurden die Mäuse wie unter 3.11.4.1 beschrieben vor dem Therapiestart und vor dem Versuchsabbruch nach knapp vier Behandlungswochen mittels MRT untersucht.

Während sich bei der scheinbehandelten Gruppe (Sham) ein stetiges Tumorwachstum beobachten ließ und nach 4 Behandlungswochen deutlich große Tumore im MRT erkennbar waren, konnte das Tumorwachstum durch die T_H1 -Zell-Monotherapie nur marginal verlangsamt werden. Erst durch die Kombination mit dem Antikörpercocktail PD-L1/LAG-3 (T_H1 +ICB) wurde eine Regression der Tumore deutlich sichtbar (Abb. 23a).

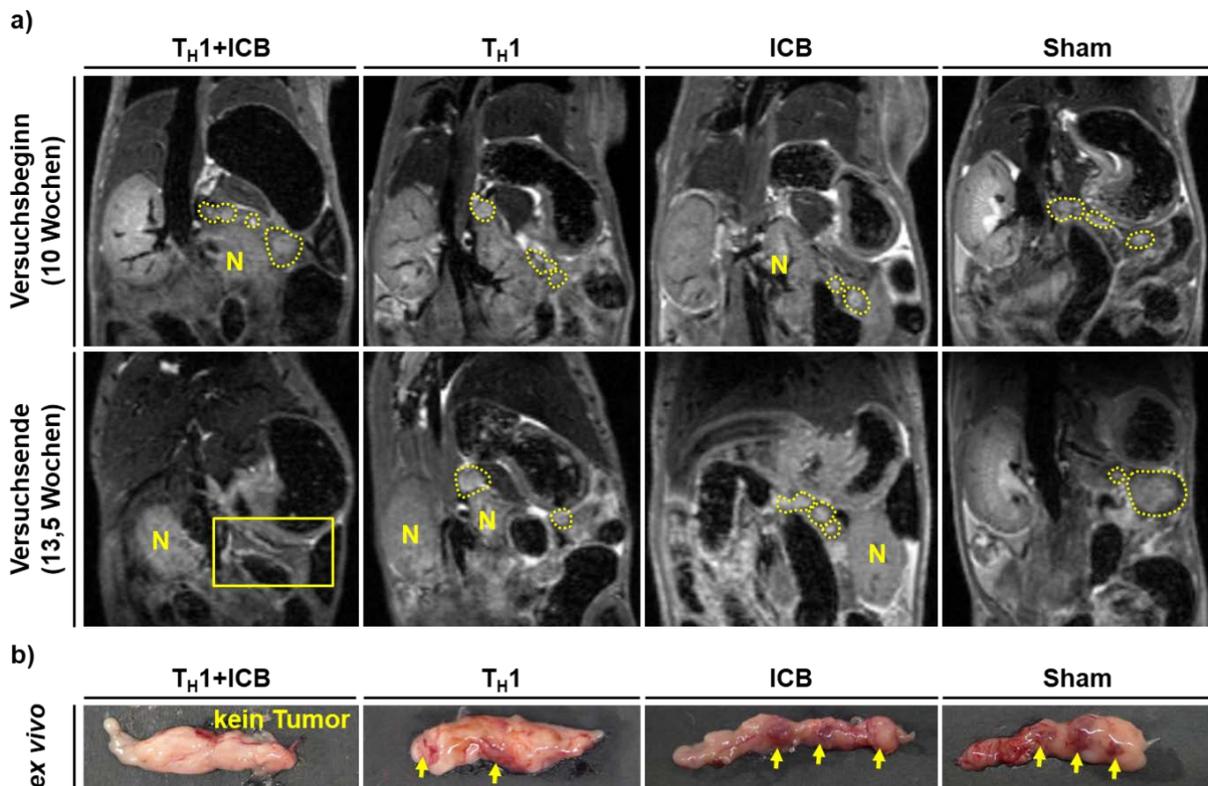


Abb. 23: In vivo Darstellung des Tumorwachstums mittels Magnetresonanztomografie (MRT). (a) Verlauf des Tumorwachstums von RT2-Mäusen unter Kombinationstherapie (T_H1 +ICB) und entsprechenden Kontrollbehandlungen. Die MRT fand kurz vor Versuchsbeginn an ca. zehn Wochen alten Versuchstieren und nach knapp vier Behandlungswochen an ca. 14 Wochen alten Mäusen statt. Die in den dargestellten Schnittebenen (coronal) sichtbaren Inselzellkarzinome sind gelb umrandet. Gelber Kasten: Pankreas ohne sichtbares Tumor-Gewebe. N=Niere. (b) Ex vivo Pankreas- und Tumorgewebe nach Organentnahme im Anschluss an die zweite MRT. Die gelben Pfeile weisen auf makroskopisch sichtbare Tumore hin.

Im Anschluss an die finale MRT-Untersuchung wurde das Pankreas isoliert und vor der Verarbeitung für die darauffolgenden histologischen Färbungen fotografiert. Abb. 23b zeigt ein jeweils für die einzelnen Versuchsgruppen repräsentatives Pankreas. Während in scheinbehandelten Mäusen die größten Tumore sichtbar

waren, waren die Tumore von ICB-behandelten Mäusen deutlich kleiner und variierten in deren Anzahl. Die Anzahl der Tumore in den Pankreata von lediglich mit T_H1-Zellen behandelten Mäusen war tendenziell verringert, die Tumore waren allerdings deutlich größer. Wie bereits im MRT sichtbar (**Abb. 23a**), waren in den Pankreata der Haupt-Therapiegruppe (T_H1+ICB) zumeist keine optisch sichtbaren Tumore erkennbar. Zudem war das Pankreas offensichtlich von Fettgewebe durchzogen. Diese Ansammlung von Fett wurde jedoch auch in der T_H1-Zell-behandelten Gruppe beobachtet (**Abb. 23b**).

4.2 Wirkmechanismen einer kombinierten Immuntherapie im fortgeschrittenen murinen RT2-Inselzellkarzinommodell

Nachdem die Wirksamkeit der Kombinationstherapie intensiv *in vivo* untersucht wurde, wurden (immun-)histochemische Analysen der Inselzellkarzinome und der Tumor-drainierenden PLKs vorgenommen, um die Unterschiede in den einzelnen Behandlungsgruppen auf zellulärer Ebene genauer zu erfassen und folglich Rückschlüsse auf potentielle Wirkmechanismen ziehen zu können. Mit Hilfe von RT2xStat1^{-/-}-Mäusen wurde der Einfluss des IFN- γ -Signalwegs auf die Seneszenz-Induktion in Tumorzellen untersucht.

4.2.1 Histologische Untersuchungen des Pankreasgewebes und der drainierenden Lymphknoten von RT2-Mäusen

Die Mäuse der einzelnen Versuchsgruppen (3.8) wurden nach drei- bis vierwöchiger Therapie geopfert, um Lymphknoten- und Pankreasgewebe für (immun-)histochemische Färbungen zu gewinnen (3.12). Ein Teil der Paraffinschnitte wurde zunächst morphologisch mittels H&E-Färbung untersucht (3.12.5.3). Des Weiteren wurden immunhistochemische Färbungen angefertigt (3.12.5.4), um das Immunzellinfiltrat näher zu charakterisieren. Der Fokus lag dabei auf der Detektion von T- und B-Zellen. Zusätzlich sollte auf den Tumorzellen die Expression von CD31 (*“Platelet endothelial cell adhesion molecule”*, PECAM-1), einem Angiogenesemarker, und von PD-L1 analysiert werden. PD-L1-positive Tumorzellen wurden durch eine zusätzliche CD3-Färbung von PD-L1-positiven T-Zellen abgegrenzt.

Auf allen untersuchten Pankreasschnitten konnten mittels H&E-Färbung Tumore nachgewiesen werden. Sham-behandelte Mäuse zeigten stets große und stark vaskularisierte Tumore. Die endokrinen Langerhans'schen Zellen wurden komplett durch Tumorzellen ersetzt. ICB-behandelte Tiere wiesen mehrere, aber kleine Tumoringeln auf, während die Tumore T_H1-Zell-behandelter Tiere deutlich größer, jedoch in der Anzahl verringert waren. Nach Kombinationstherapie (T_H1+ICB) wurden lediglich sehr kleine, regressive Tumore auf den Paraffinschnitten detektiert. Das exokrine Pankreasgewebe dieser Mäuse zeigte eine deutliche Atrophie und wurde teilweise durch Fettgewebe ersetzt (Abb. 24a).

Die Tumor-drainierenden PLKs aus T_H1 -Zell-behandelten Mäusen (T_H1 ; T_H1+ICB) waren deutlich größer als die Lymphknoten aus den Kontrollmäusen, welche keinerlei T_H1 -Zell-Injektionen erhielten (Abb. 24b).

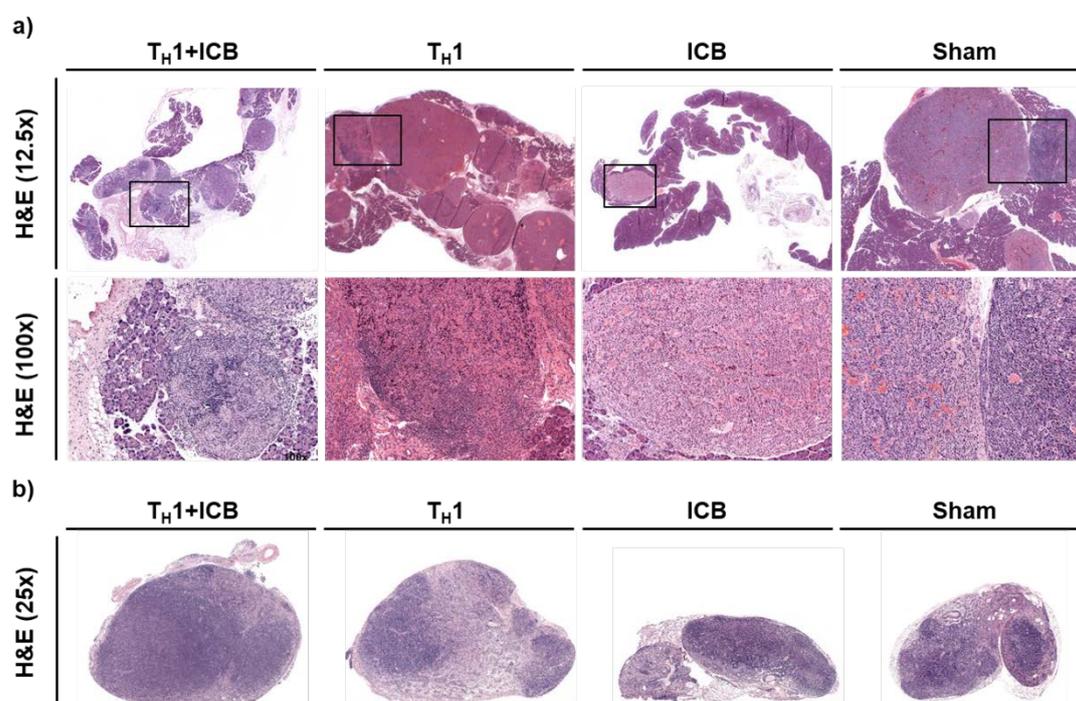


Abb. 24: Histologische Analyse von Pankreasgewebe und PLK aus RT2-Mäusen nach Kombinationstherapie. Repräsentative H&E-Färbungen von (a) Pankreasgeweben und (b) Tumor-drainierenden PLKs aus RT2-Mäusen nach drei- bis vierwöchiger Kombinationstherapie (T_H1+ICB) bzw. nach entsprechenden Kontrollbehandlungen. Die für die 100-fache Vergrößerung ausgewählten Ausschnitte der Inselzellkarzinome sind mit einem schwarzen Kasten gekennzeichnet.

Abb. 25 zeigt immunhistochemische Färbungen der Pankreata und PLKs entsprechend behandelter RT2-Mäuse. Die histopathologischen Untersuchungen der Pankreata von scheinbehandelten Mäusen wiesen eindrucksvoll auf eine fehlende Immunogenität der Inselzellkarzinome hin: Es konnten weder T- (CD3-Färbung) noch B-Zellen (B220-Färbung) detektiert werden. Die wiederholten Applikationen des IC-blockierenden Antikörpercocktails (ICB) führten zu einer moderaten Einwanderung von T-Zellen, aber nicht von B-Zellen. Die T_H1 -Zell-Monotherapie bewirkte eine Rekrutierung von T- und B-Zellen, welche sich jedoch hauptsächlich am Tumorrand ansiedelten. Erst durch die kombinierte Behandlung mit T_H1 -Zellen und PD-L1/LAG3 (T_H1+ICB) konnte eine starke T-Zellinfiltration in das Tumorgewebe erreicht werden (Abb. 25a).

Die drainierenden PLKs aller T_H1 -Zell-Empfängertiere (T_H1 ; T_H1+ICB) zeigten hyperplastische Bereiche mit einem erhöhten T-Zellinfiltrat, welches hauptsächlich aus CD4-positiven Zellen bestand, wohingegen die B-Zell Follikel hypoplastisch waren. Die Lymphknoten von Sham- und ICB-behandelten Tiere wiesen im Gegensatz dazu keine morphologischen Veränderungen auf (**Abb. 25b**).

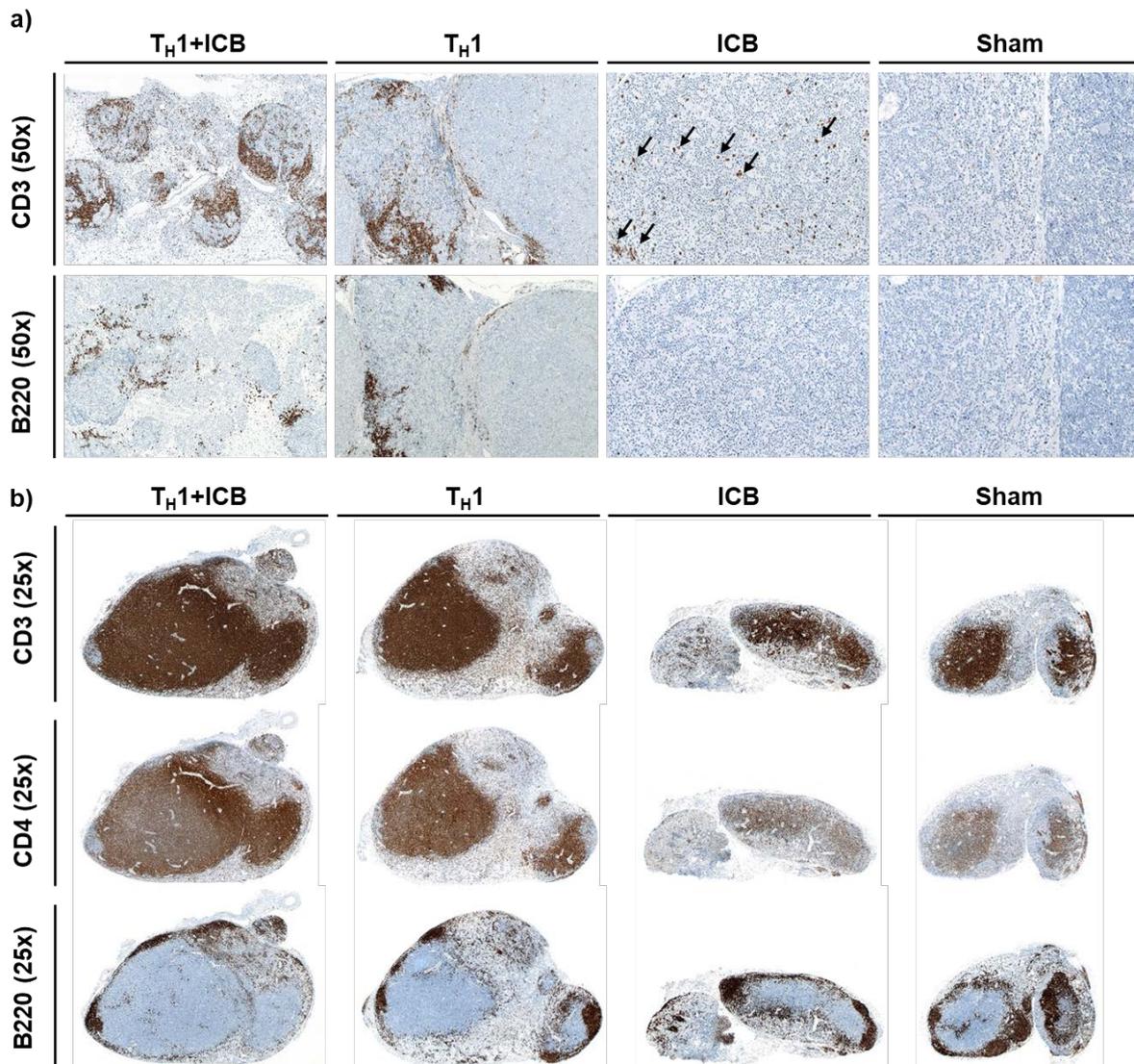


Abb. 25: Immunhistochemische Färbungen von Pankreasgewebe und PLK aus RT2-Mäusen nach Kombinationstherapie. (a) Repräsentative Darstellung der CD3-, und B220-Immunhistochemie zur Untersuchung des Immunzellinfiltrats in den Inselzellkarzinomen aus RT2-Mäusen nach drei- bis vierwöchiger Kombinationstherapie (T_H1+ICB) bzw. nach entsprechenden Kontrollbehandlungen. Die Pfeile weisen auf vereinzelte T-Zellen hin. **(b)** Repräsentative Darstellung der CD3-, CD4- und B220-Immunhistochemie der Tumor-drainierenden PLK aus RT2-Mäusen nach drei- bis vierwöchiger Kombinationstherapie (T_H1+ICB) bzw. nach entsprechenden Kontrollbehandlungen.

Die immunhistochemische Untersuchung der PD-L1-Expression der Tumore zeigte eine deutliche PD-L1-Färbung auf den Tumor-Gewebeschnitten scheinbehandelter RT2-Mäuse. Diese wurde weder durch die IFN- γ produzierenden T_H1-Zellen, noch durch die Injektion von PD-L1/LAG-3 erhöht oder verringert. Auch die Kombinationsbehandlung zeigte optisch keine Änderung in der Intensität der PD-L1-Färbung. In den von CD3⁺ Immunzellen infiltrierten Tumorarealen war keine PD-L1-Expression erkennbar (Abb. 26).

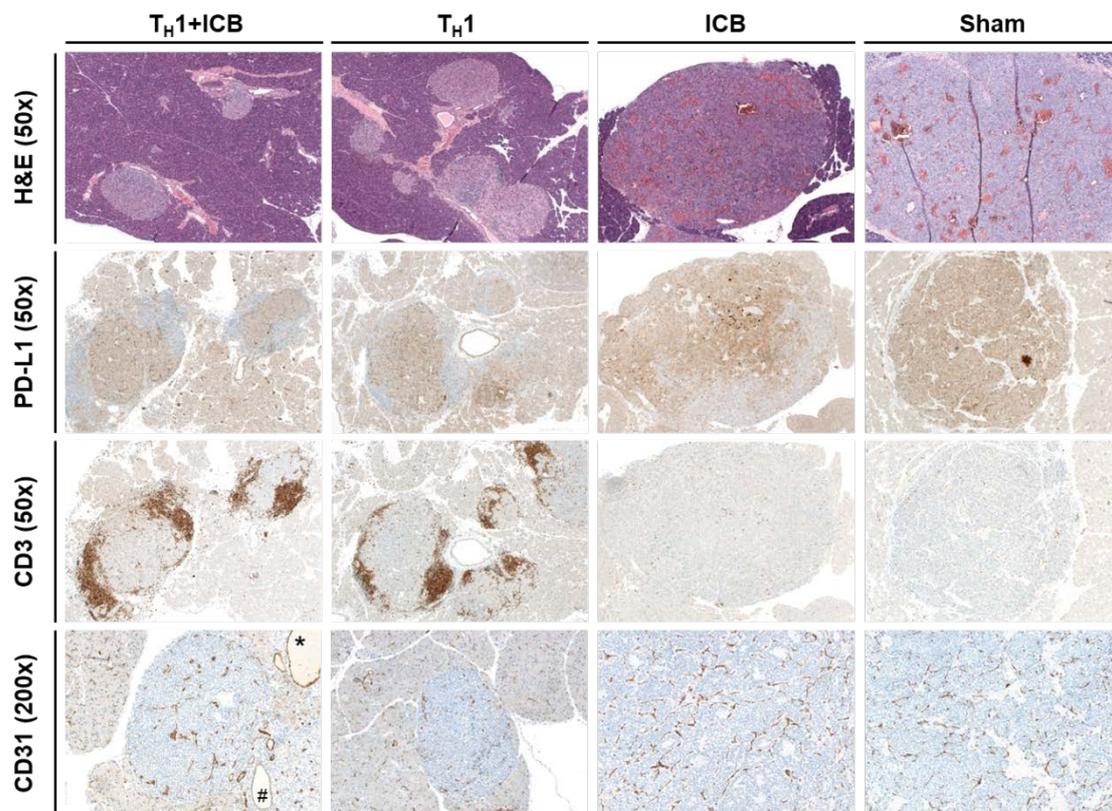


Abb. 26: CD3-, CD31- (PECAM-1) und PD-L1-Expression im murinen RT2-Inselzellkarzinom. Repräsentative H&E-Färbungen und CD3-, PD-L1- und CD31 Immunhistochemie zur Darstellung des T-Zell-Infiltrats, der PD-L1-Expression und Angiogenese in den Inselzellkarzinomen aus RT2-Mäusen nach drei- bis vierwöchiger Kombinationstherapie (T_H1+ICB) bzw. nach entsprechenden Kontrollbehandlungen. *Blutgefäß außerhalb des Tumorareals, #sekretorischer Gang.

Eine visuelle Bewertung der Tumormorphologie anhand der H&E-gefärbten Gewebeschnitte der scheinbehandelten Tiere zeigte, verglichen mit den Geweben der T_H1-Zell-behandelten Tieren, große und erweiterte Blutgefäße innerhalb der Tumore. Auch in Folge der ICB-Monotherapie wurde auf den Tumor-Gewebeschnitten ein Muster ähnlich der Inselzellkarzinome scheinbehandelter Tiere

erkennbar. Die reduzierte Angiogenese trat ausschließlich in kleineren Tumoren in Folge der wiederholten T_H1-Zell-Applikationen auf. Die immunhistochemische Färbung des Angiogenesemarkers CD31 (PECAM-1) bestätigte die morphologischen Beobachtungen: Innerhalb kleiner Tumore lag die CD31-Expression in Folge der Applikation der T_H1-Zellen reduziert vor. Die Ergebnisse beschränken sich jedoch auf eine rein visuelle Begutachtung, eine Quantifizierung der CD31-Färbungen wurde bis dato nicht durchgeführt (**Abb. 26**).

4.2.2 Immunfluoreszenz der Inselzellkarzinome zu Identifizierung der Tumorsenesenz

Im Zuge der Etablierung der T-Zell Monotherapie im RT2-Mausmodell durch die Arbeitsgruppe Röcken konnte eine T-Zell-vermittelte Seneszenz-Induktion in einem frühen Inselzellkarzinomstadium beobachtet werden (1.3.1)^{62,64}. Um zu untersuchen, ob die T_H1-Zellen auch in bereits fortgeschrittenen Tumorstadium Seneszenz induzieren, wurden RT2-Mäuse im Folgenden wie unter 3.8 beschriebenen behandelt, nach vierwöchiger Therapie getötet und die isolierten Pankreata mit den Inselzellkarzinomen bei -80°C kryokonserviert. Die daraus angefertigten Kryoschnitte wurden mit fluoreszierenden Antikörpern zur Detektion von Zellproliferation (Ki67) und Seneszenz (p16^{Ink4a}) gefärbt und anschließend qualitativ und quantitativ ausgewertet (3.12.5.5).

Wie erwartet zeigten die Kryoschnitte der Inselzellkarzinome scheinbehandelter Tiere (Sham) eine starke Färbung des Proliferationsmarkers Ki67, wohingegen auf denselben Gewebeschnitten nahezu kein Signal des Seneszenzmarkers p16^{Ink4a} detektiert wurde. In Folge der Behandlungen mit jeweils nur einer Therapiekomponente (T_H1- bzw. ICB) wurde in den Tumorzellen eine leichte Seneszenz-Induktion und folglich auch eine leicht reduzierte Zellproliferation beobachtet. Durch die Kombination von T_H1-Zellen mit dem therapeutischen Antikörpercocktail PD-L1/LAG-3 (T_H1+ICB) trat jedoch in den Tumorzellen eine deutliche Färbung an p^{16Ink4a} und nahezu keine Ki67-Färbung auf (**Abb. 27a**).

Der quantitative Vergleich bestätigte die qualitativen Beobachtungen. In Folge der Kombinationstherapie (T_H1+ICB) wurde ein signifikant stärkeres p16^{Ink4a}-Signal (15.944,8 ± 1.748,0 μm²/4.500 Nuklei) auf den Gewebeschnitten der

Inselzellkarzinome gegenüber der Schnitte jeder Kontrollgruppe detektiert (T_H1 : $4.656,9 \pm 875,0 \mu\text{m}^2$; ICB: $4.535,7 \pm 787,1 \mu\text{m}^2$; Sham: $1.120,5 \pm 216,1 \mu\text{m}^2$ / 4.500 Nuklei; detaillierte Statistik siehe Tab. 21) (Abb. 27b).

Im Gegensatz dazu wurden auf denselben Kryoschnitten nach der Kombinationstherapie signifikant weniger $Ki67^+$ Tumorzellen (T_H1+ICB : $214,9 \pm 32,5$ $Ki67^+$ Zellen/4.500 Nuklei) gegenüber jeder Kontrollgruppe gezählt (T_H1 : $1.339,3 \pm 180,5$ $Ki67^+$ Zellen; ICB: $1.259,4 \pm 257,6$ $Ki67^+$ Zellen; Sham: $1.998,4 \pm 313,0$ $Ki67^+$ Zellen/4.500 Nuklei) (Tab. 21 und Abb. 27c). Die Tag2-spezifischen, $IFN-\gamma$ -produzierenden T_H1 -Zellen können folglich auch in den fortgeschrittenen Inselzellkarzinomen einen Seneszenz-assoziierten Wachstumsarrest induzieren, welcher durch die Kombination mit einer IC-Blockade deutlich verstärkt wird.

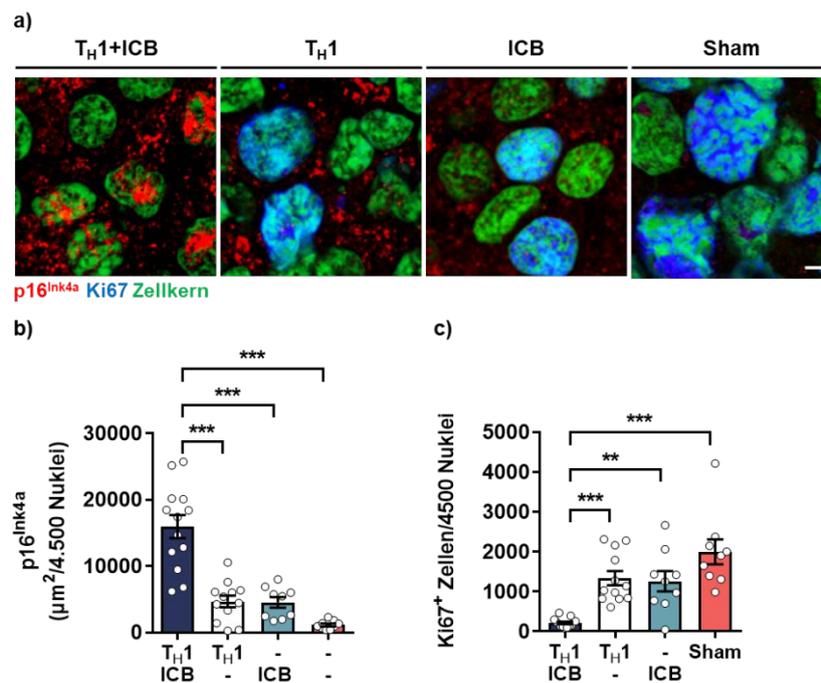


Abb. 27: Immunfluoreszenz von Inselzellkarzinomen aus RT2-Mäusen. (a) Repräsentative Immunfluoreszenz-Färbungen des Seneszenzmarkers p16^{Ink4a} (rot) und des Proliferationsmarkers Ki67 (blau) auf Kryoschnitten von Inselzellkarzinomen aus RT2-Mäusen nach knapp vierwöchiger Kombinationstherapie (T_H1+ICB) bzw. entsprechenden Kontrollbehandlungen. Zellkerne (Nuklei) sind grün dargestellt. Maßstab (weißer Balken) = 2 μm . (b) Quantifizierung des p16^{Ink4a}-Signals anhand der rot gefärbten Fläche von jeweils 4.500 Nuklei. (c) Quantifizierung des Ki67-Signals anhand der jeweiligen Anzahl blauer Zellen pro 4.500 Nuklei. Die Balken repräsentieren Mittelwerte \pm SEM; die Punkte stellen jeweils die Summe dreier verschiedener Schnittebenen dar (3 x 1.500 Zellkerne pro Gewebe). Die Anzahl der untersuchten Gewebe entspricht der Anzahl an untersuchten Mäusen (T_H1+ICB : n = 13; T_H1 : n = 12; ICB: n = 9; Sham (-/-): n = 9). Zur statistischen Auswertung wurde ein

zweiseitiger Wilcoxon-Mann-Whitney-Test mit Bonferroni-Korrektur für Mehrfachtestungen ($k = 3$) verwendet (** $P < 0,003$; *** $P < 0,0003$) (modifiziert nach Brenner *et al.*, 2020)¹⁶⁷.

Tab. 21: Detaillierte Statistik zur quantitativen Bestimmung der p16^{Ink4a} und Ki67 Signale. Getestet wurde jeweils gegen die Kombinationstherapie-Gruppe (T_H1+ICB). Aufgeführt sind die Mittelwerte der p16^{Ink4a}-gefärbten Flächen (μm^2) über jeweils 4.500 Nuklei bzw. die jeweilige Anzahl an Ki67-positiven Zellen pro 4.500 Nuklei. Zur Berechnung der *P*-Werte wurde ein zweiseitiger Wilcoxon-Mann-Whitney- verwendet.

Behandlung	Anzahl (n)	Mittelwert	SEM	P-Wert
p16^{Ink4a}				
T _H 1+ICB	13	15.944,8	1.748,0	
T _H 1	12	4.656,9	875,0	< 0,0001
ICB	9	4.535,7	787,1	< 0,0001
Sham	9	1.120,5	216,1	< 0,0001
Ki67				
T _H 1+ICB	13	214,9	32,5	
T _H 1	12	1.339,3	180,5	< 0,0001
ICB	9	1.259,4	257,6	0,0014
Sham	9	1.998,4	313,0	< 0,0001

4.2.3 Untersuchung der T_H1-Zell-vermittelten Seneszenz-Induktion im fortgeschrittenen murinen RT2-Inselzellkarzinommodell

In den bisher untersuchten RT2-Wildtyp-Mäusen mit fortgeschrittenen Inselzellkarzinomen äußerte sich die Kombinationstherapie (T_H1+ICB) neben einem positiven Einfluss auf den Blutglukosespiegel (4.1.1) und einer Verlängerung der Überlebensrate (4.1.2) in einer erhöhten Expression des Seneszenzmarkers p16^{Ink4a} und einer verminderten Proliferationsrate (Ki67) der Tumorzellen (4.2.2). Dies ließ vermuten, dass neben einer potentiell zytotoxischen Immunantwort, welche die Tumorzellen direkt angreift und im besten Fall zerstört, weitere Mechanismen greifen, um das Tumorwachstum zu verlangsamen und zu kontrollieren. Im Folgenden wurde also die Rolle der Seneszenz-Induktion im Rahmen der Kombinationstherapie am fortgeschrittenen murinen Inselzellkarzinommodell näher untersucht. Dafür wurden transgene RT2-Mäuse behandelt, welche ein STAT1-Knock-out (*Stat1*^{-/-}) und somit einen unterbrochenen IFN- γ Signalweg aufweisen (RT2x*Stat1*^{-/-}) (3.6.2.3).

4.2.3.1 Einfluss der kombinierten Immuntherapie auf den Blutglukosespiegel von RT2xStat1^{-/-}-Mäusen

Zehn bis elf Wochen alte RT2xStat1^{-/-}-Mäuse wurden, wie bereits für die RT2-Wildtyp-Mäuse beschrieben, über einen Zeitraum von drei bis vier Wochen entweder mit der Kombinationstherapie (T_H1+ICB) oder den entsprechenden Kontrollen (T_H1, ICB, Sham) behandelt (3.8). Der Blutglukosespiegel wurde zweimal wöchentlich gemessen.

Dieser betrug zu Beginn der Therapie in jeder Gruppe im Mittel zwischen 80 und 90 mg/dL. Wie auch bei den scheinbehandelten RT2-Wildtyp-Mäusen (Abb. 28a) sank der Blutglukosespiegel scheinbehandelter RT2xStat1^{-/-}-Mäuse innerhalb von drei Wochen rapide von 87,3±6,8 mg/dL auf 42,0±7,0 mg/dL. Die Beobachtung dieser Gruppe wurde zu diesem Zeitpunkt vorzeitig beendet, da nahezu alle Mäuse die Abbruchkriterien bereits erreicht hatten. ICB- oder T_H1-Zell-behandelte Mäuse verhielten sich ähnlich und auch die Kombinationstherapie (T_H1+ICB) hatte keinen positiven Effekt auf den Blutglukosespiegel: Dieser sank von anfänglich 85,1±6,6 mg/dL innerhalb von drei Wochen auf ein Niveau von 47,5±4,2 mg/dL (Abb. 28a).

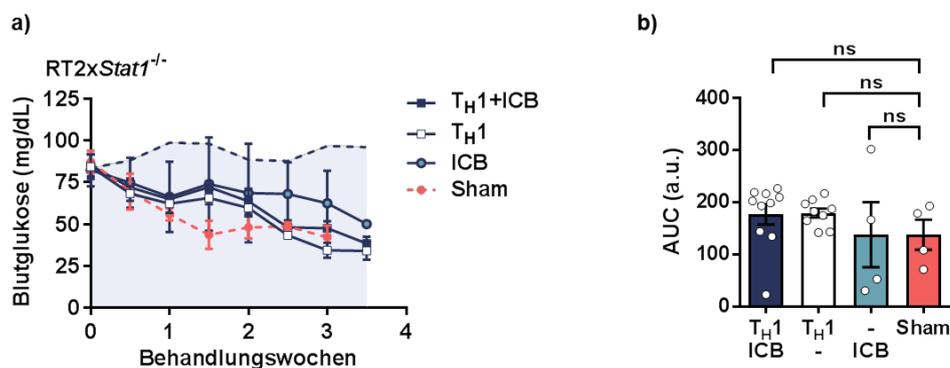


Abb. 28: Blutglukosespiegel von RT2xStat1^{-/-}-Mäusen unter Kombinationstherapie. (a) Zeitlicher Verlauf der Blutglukose von zehn bis elf Wochen alten RT2xStat1^{-/-}-Mäusen, welche nach initialer Bestrahlung (2 Gy) einmal wöchentlich mit T_H1-Zellen und zweimal wöchentlich mit PD-L1/LAG-3 (T_H1+ICB, n = 10) behandelt wurden. In den Kontrollgruppen wurden die T_H1-Zellen mit PBS (ICB, n = 4) oder der therapeutische Antikörpercocktail mit Isotyp-mAbs (T_H1, n = 9) substituiert. Sham-behandelte Tiere (n = 4) erhielten PBS und Isotyp-mAbs. Die blau unterlegte Fläche zeigt nochmals zum Vergleich das Level der Blutglukose von T_H1+ICB behandelten RT2-Wildtyp-Mäusen aus Abb. 18a. **(b)** Zur statistischen Auswertung wurden die Flächen unter den Blutglukosekurven (AUC) über 3 Behandlungswochen berechnet und mittels eines zweiseitigen Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests mit Bonferroni-Korrektur für Mehrfachtestungen (k = 3) verglichen. Dargestellt sind jeweils die

Mittelwerte \pm SEM (a.u., willkürliche Einheiten). Jeder Punkt repräsentiert die AUC einer entsprechend behandelten Maus aus a). * $P < 0,017$; ns = nicht signifikant (modifiziert nach Brenner *et al.*, 2020)¹⁶⁷.

Eine statistische Analyse der Blutglukosespiegel über diesen Behandlungszeitraum zeigte, dass im Vergleich zur Sham-Behandlung ($137,5 \pm 28,9$ a.u.) weder die Kontrollbehandlungen (T_H1 : $179,1 \pm 8,7$ a.u.; $P = 0,260$; ICB: $137,7 \pm 62,4$ a.u.; $P = 0,686$), noch die Kombinationstherapie (T_H1+ICB : $176,5 \pm 19,7$ a.u.; $P = 0,106$) einen signifikanten Einfluss auf den Blutglukosespiegel von $RT2xStat1^{-/-}$ -Mäusen mit unterbrochenem IFN- γ Signalweg hatten (3.14) (Abb. 28b).

4.2.3.2 Einfluss der kombinierten Immuntherapie auf die Überlebensrate von $RT2xStat1^{-/-}$ -Mäusen

Im Gegensatz zur Behandlung von RT2-Wildtyp-Mäusen zeigte die Kombinationstherapie keinen signifikanten Effekt auf den Blutglukosespiegel von $RT2xStat1^{-/-}$ -Mäusen (4.2.3.1). Auch die Betrachtung der Überlebensrate von $RT2xStat1^{-/-}$ -Mäusen ließ keinen signifikanten Effekt erkennen. Mit T_H1+ICB behandelte $RT2xStat1^{-/-}$ -Mäuse lebten nicht wesentlich länger als die Versuchstiere der scheinbehandelten Kontrollgruppe (mittlere Überlebensrate 3,7 vs. 2,3 Behandlungswochen; $P = 0,056$) (Abb. 29).

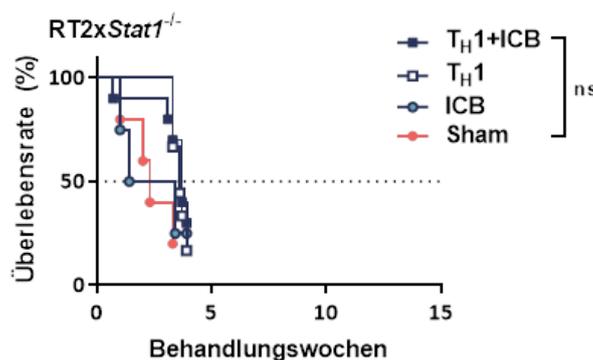


Abb. 29: Überlebensrate von $RT2xStat1^{-/-}$ -Mäusen unter Kombinationstherapie. Zeitlicher Verlauf des prozentualen Überlebens von zehn bis elf Wochen alten $RT2xStat1^{-/-}$ -Mäusen, welche nach initialer Bestrahlung (2 Gy) einmal wöchentlich mit T_H1 -Zellen und zweimal wöchentlich mit PD-L1/LAG-3 (T_H1+ICB , $n = 10$) behandelt wurden. In den Kontrollgruppen wurden die T_H1 -Zellen mit PBS (ICB, $n = 4$) oder der therapeutische Antikörpercocktail mit Isotyp-mAbs (T_H1 , $n = 9$) substituiert. Sham-behandelte Tiere ($n = 4$) erhielten PBS+Isotyp-mAbs. Die gestrichelte Linie zeigt die mittlere prozentuale Überlebensrate an. Zur statistischen Auswertung wurde der Fisher's Exakt Test verwendet (* $P < 0,05$; ns = nicht signifikant) (modifiziert nach Brenner *et al.*, 2020)¹⁶⁷.

4.2.3.3 Histologische Untersuchungen der Inselzellkarzinome von RT2xStat1^{-/-}-Mäusen

Um die Tumor-Morphologie sowie das T-Zellinfiltrat von Inselzellkarzinomen aus therapierten RT2xStat1^{-/-}-Mäusen zu untersuchen, wurden im Anschluss an die Kombinationstherapie, bzw. an die entsprechenden Kontrollbehandlungen, Paraffin- und Kryoschnitte der isolierten Pankreata angefertigt. Die Kryoschnitte wurden morphologisch jeweils mittels H&E-Färbung untersucht (3.12.5.3); die Paraffinschnitte mittels Immunhistochemie, um das CD3⁺ T-Zellinfiltrat zu analysieren (3.12.5.4). Zum Vergleich wurden Kryo- und Paraffinschnitte von Pankreata aus entsprechend behandelten RT2-Wildtyp-Mäusen analysiert.

Abb. 30 zeigt repräsentative H&E-Färbungen von Pankreasgewebe aus RT2-Wildtyp- bzw. RT2xStat1^{-/-}-Mäusen. In allen untersuchten Geweben konnten Inselzellkarzinome detektiert werden. In RT2-Wildtyp-Mäusen wurden nach Kombinationstherapie (T_H1+ICB) im Vergleich zur Scheinbehandlung lediglich kleine Tumore detektiert; die Monotherapien (T_H1 bzw. ICB) hingegen ließen, rein optisch betrachtet, keinen Einfluss auf die Tumormorphologie erkennen (**Abb. 30**, oben). Die Tumore der RT2xStat1^{-/-}-Mäuse wurden durch die Kombinationstherapie wiederum nicht beeinflusst. Auch die Kontrollbehandlungen hatten keinen Einfluss auf die Tumor-Morphologie von RT2xStat1^{-/-}-Mäusen (**Abb. 30**, unten). Zudem waren die Tumore der RT2xStat1^{-/-}-Mäuse in allen Versuchsgruppen tendenziell etwas größer als die Tumore der entsprechenden Wildtyp-Mausgruppen.

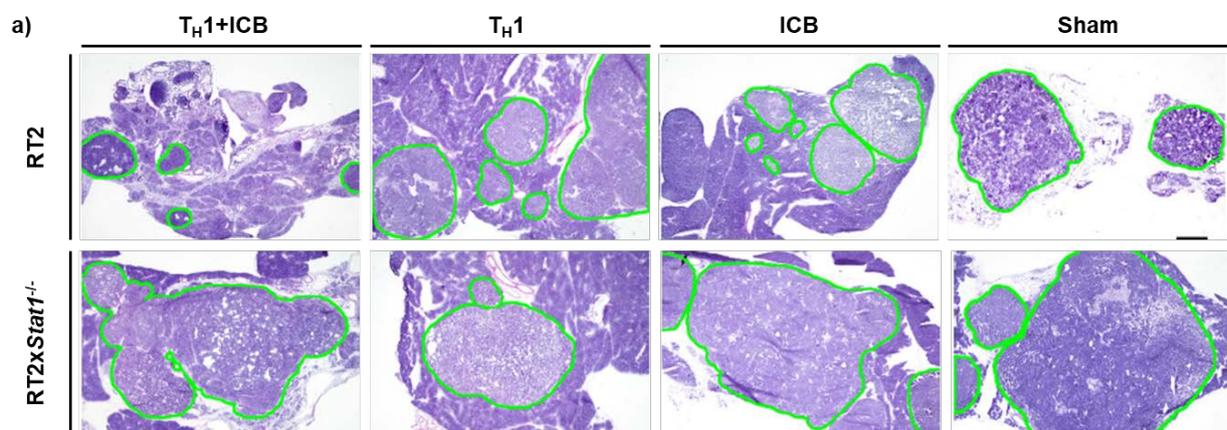


Abb. 30: Histologische Färbungen von Pankreasgewebe aus RT2- und RT2xStat1^{-/-}-Mäusen. Repräsentative Abbildung H&E-gefärbter Kryoschnitte von Pankreasgewebe (welches die Tumore

beinhaltet) nach drei- bis vierwöchiger Kombinationstherapie (T_H1+ICB) bzw. entsprechender Kontrollbehandlungen in RT2-Wildtyp- (oben) und RT2xStat1^{-/-}-Mäusen (unten). Die detektierten Inselzellkarzinome sind jeweils grün umrandet. Maßstab (schwarzer Balken) = 200 µm (modifiziert nach Brenner *et al.*, 2020)¹⁶⁷.

Anschließend wurde das T-Zellinfiltrat nach T_H1-Zell-Mono- und Kombinationstherapie (T_H1+ICB) im Tumorgewebe analysiert. Qualitativ konnten in den Tumoren aller Versuchsgruppen CD3⁺ T-Zellen nachgewiesen werden. Selbst in RT2xStat1^{-/-}-Mäusen konnte, unabhängig von einer ICB-Behandlung und trotz ausbleibendem Therapieeffekt (4.2.3.1, 4.2.3.2), in Folge der T_H1-Zell-Applikationen ein T-Zellinfiltrat in deren Inselzellkarzinomen detektiert werden (Abb. 31).

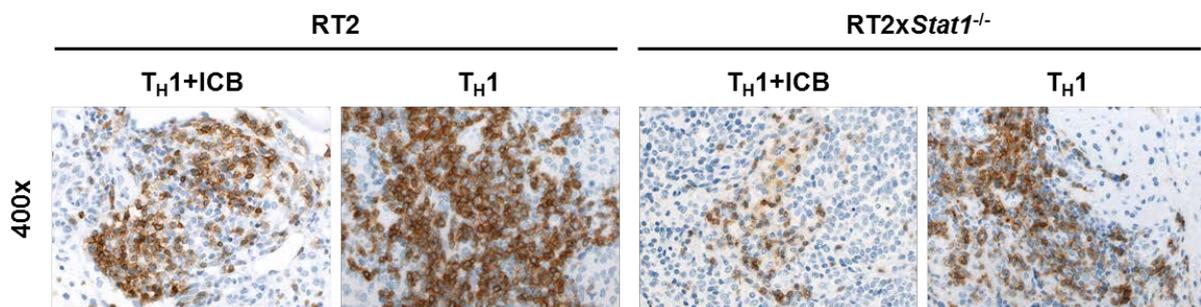


Abb. 31: CD3-Immunhistochemie von Inselzellkarzinomen aus RT2- und RT2xStat1^{-/-}-Mäusen. Repräsentative CD3-Immunhistochemie zur Darstellung des T-Zell-Infiltrats in den Inselzellkarzinomen aus RT2- bzw. RT2xStat1^{-/-}-Mäusen nach drei- bis vierwöchiger T_H1-Zell-Mono oder Kombinationstherapie (modifiziert nach Brenner *et al.*, 2020)¹⁶⁷.

4.2.3.4 Immunfluoreszenz und SA-β-Gal-Aktivität der Inselzellkarzinome aus RT2xStat1^{-/-}-Mäusen zur Analyse der Seneszenz-Induktion

Nachdem an fortgeschrittenen Inselzellkarzinomen von RT2-Wildtyp-Mäusen im Rahmen dieser Arbeit bereits eine T_H1-Zell-vermittelte Seneszenz-Induktion nachgewiesen wurde (4.2.2), sollte anhand weiterer Untersuchungen von Tumorgewebe aus RT2xStat1^{-/-}-Mäusen nach vierwöchiger Behandlung analysiert werden, ob die Unterbrechung des IFN-γ Signalwegs durch die fehlende STAT1-Expression die Seneszenz-Induktion in malignen Inselzellen blockiert. Dazu wurden Kryo-Serienschnitte der Inselzellkarzinome aus RT2xStat1^{-/-}-Mäusen angefertigt und mittels Immunfluoreszenz-Färbungen von p16^{Ink4a} und Ki67 analysiert (3.12.5.5). Ein Teil der Serienschnitte wurde zudem mittels histochemischen Färbungen zur Detektion der SA-β-Gal-Aktivität in den Tumorzellen untersucht (3.12.5.6). Zum

Vergleich wurde die SA- β -Gal-Aktivität zusätzlich in Tumoren aus entsprechend behandelten RT2-Widltyp-Mäusen analysiert.

Unabhängig von der Behandlung zeigten die Tumore aller RT2xStat1^{-/-}-Mäuse eine starke Färbung des Proliferationsmarkers Ki67 und nahezu kein Signal des Seneszenz-Markers p16^{Ink4a} (Abb. 32a). Eine quantitative Analyse der Signale ergab keinen Einfluss der Kombinationstherapie auf die Tumore aus RT2xStat1^{-/-}-Mäusen, weder in der Intensität des p16^{Ink4a}-Signals ($380,7 \pm 159,8 \mu\text{m}^2$ vs. $266,8 \pm 81,1 \mu\text{m}^2$ /4.500 Nuklei; $P=0,9$), noch in der Anzahl Ki67-positiver Zellen ($2777,8 \pm 307,5$ Ki67⁺ Zellen vs. $2673,0 \pm 668,0$ Ki67⁺ Zellen/4.500 Nuklei; $P > 0,9$) (Abb. 32b,c).

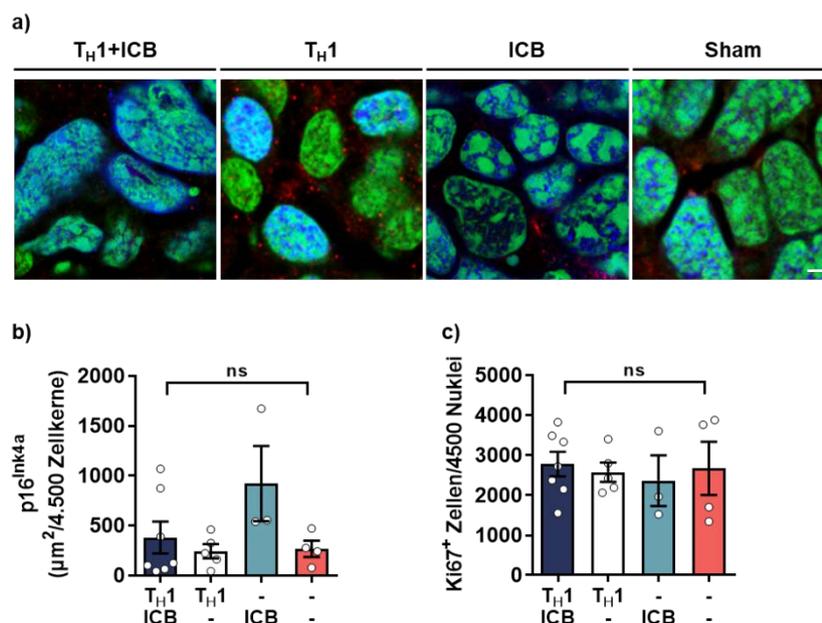


Abb. 32: Immunfluoreszenz von Inselzellkarzinomen aus RT2xStat1^{-/-}-Mäusen. (a) Repräsentative Immunfluoreszenz-Färbungen des Seneszenzmarkers p16^{Ink4a} (rot) und des Proliferationsmarkers Ki67 (blau) auf Kryoschnitten von Inselzellkarzinomen aus RT2xStat1^{-/-}-Mäusen nach knapp vierwöchiger Kombinationstherapie (TH1+ICB) und entsprechend behandelten Kontrolltieren. Zellkerne (Nuklei) sind grün dargestellt. Maßstab (weißer Balken) = 2 μm . (b) Quantifizierung des p16^{Ink4a}-Signals anhand der rot gefärbten Fläche von jeweils 4.500 Nuklei. (c) Quantifizierung des Ki67-Signals anhand der jeweiligen Anzahl blauer Zellen pro 4.500 Nuklei. Die Balken repräsentieren Mittelwerte \pm SEM; die Punkte stellen jeweils die Summe dreier verschiedener Schnittebenen dar (3 x 1.500 Zellkerne pro Gewebe). Die Anzahl der untersuchten Gewebe entspricht der Anzahl an untersuchten Mäusen (TH1+ICB: n = 7; TH1: n = 5; ICB: n = 3; Sham (-/-): n = 4). Zur statistischen Auswertung wurde ein zweiseitiger Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verwendet (* $P=0,05$; ns = nicht signifikant) (modifiziert nach Brenner *et al.*, 2020)¹⁶⁷.

In den Inselzellkarzinomen der RT2-Wildtyp-Mäuse konnte nach knapp vierwöchiger Kombinationstherapie (T_H1+ICB) eine SA-β-Gal Aktivität von 87,2% detektiert werden, welche in RT2xStat1^{-/-}-Mäusen nach gleicher Behandlung lediglich 19,5% betrug. Auch die RT2xStat1^{-/-}-Kontrollgruppen wiesen kaum SA-β-Gal Aktivität auf (TH1: 8,7%; ICB: 17,4%; Sham: 10,2% β-Gal Aktivität im Tumor) (Abb. 33).

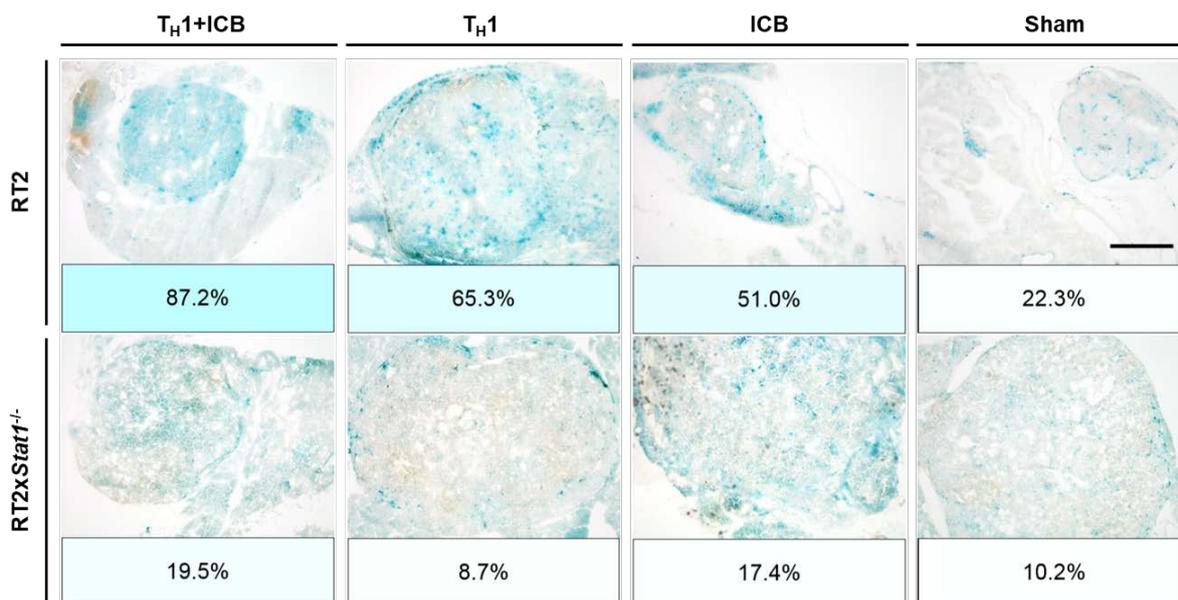


Abb. 33: Aktivität von SA-β-Gal in Inselzellkarzinomen nach Kombinationstherapie in RT2- und RT2xStat1^{-/-}-Mäusen. Repräsentative Abbildung zur Detektion des Umsatzes von X-Gal durch SA-β-Gal (bei pH = 5,5) von Inselzellkarzinomen, welche aus RT2- (oben) und RT2xStat1^{-/-}-Mäusen (unten) nach drei- bis vierwöchiger Kombinationstherapie (T_H1+ICB) bzw. entsprechender Kontrollbehandlungen isoliert wurden. Der Umsatz von X-Gal über SA-β-Gal und somit deren prozentuale Aktivität innerhalb der repräsentativen Tumorareale ist jeweils unter den jeweiligen Bildabschnitten angegeben. Maßstab (schwarzer Balken) = 1.000 μm (modifiziert nach Brenner *et al.*, 2020)¹⁶⁷.

4.2.4 Untersuchung der Immunzellpopulationen in der Milz von RT2-Wildtyp- und RT2xStat1^{-/-}-Mäusen nach Kombinationstherapie

Ein defekter IFN-γ Signalweg kann die Migration von T_H1-Zellen beeinflussen¹⁷⁴. Um zu untersuchen, ob ein defekter IFN-γ Signalweg nun auch die Migration von T_H1-Zellen in RT2xStat1^{-/-}-Mäusen beeinflusst oder gar verhindert, wurden die Milzen aus diesen Mäusen nach knapp vierwöchiger Kombinationstherapie (T_H1+ICB) bzw. T_H1-Zell-Monotherapie auf die phänotypische Zusammensetzung ihrer T-Zellpopulation untersucht. Dafür wurden die Milzen aus den Mäusen isoliert, pro Behandlungsgruppe gepoolt, entsprechend aufgearbeitet und mittels Durchfluss-

zytometrie unter Verwendung von „Panel“ A semi-quantitativ analysiert (Tab. 7). Zum Vergleich wurden Milzen aus entsprechend behandelten RT2-Wildtyp-Mäusen analysiert.

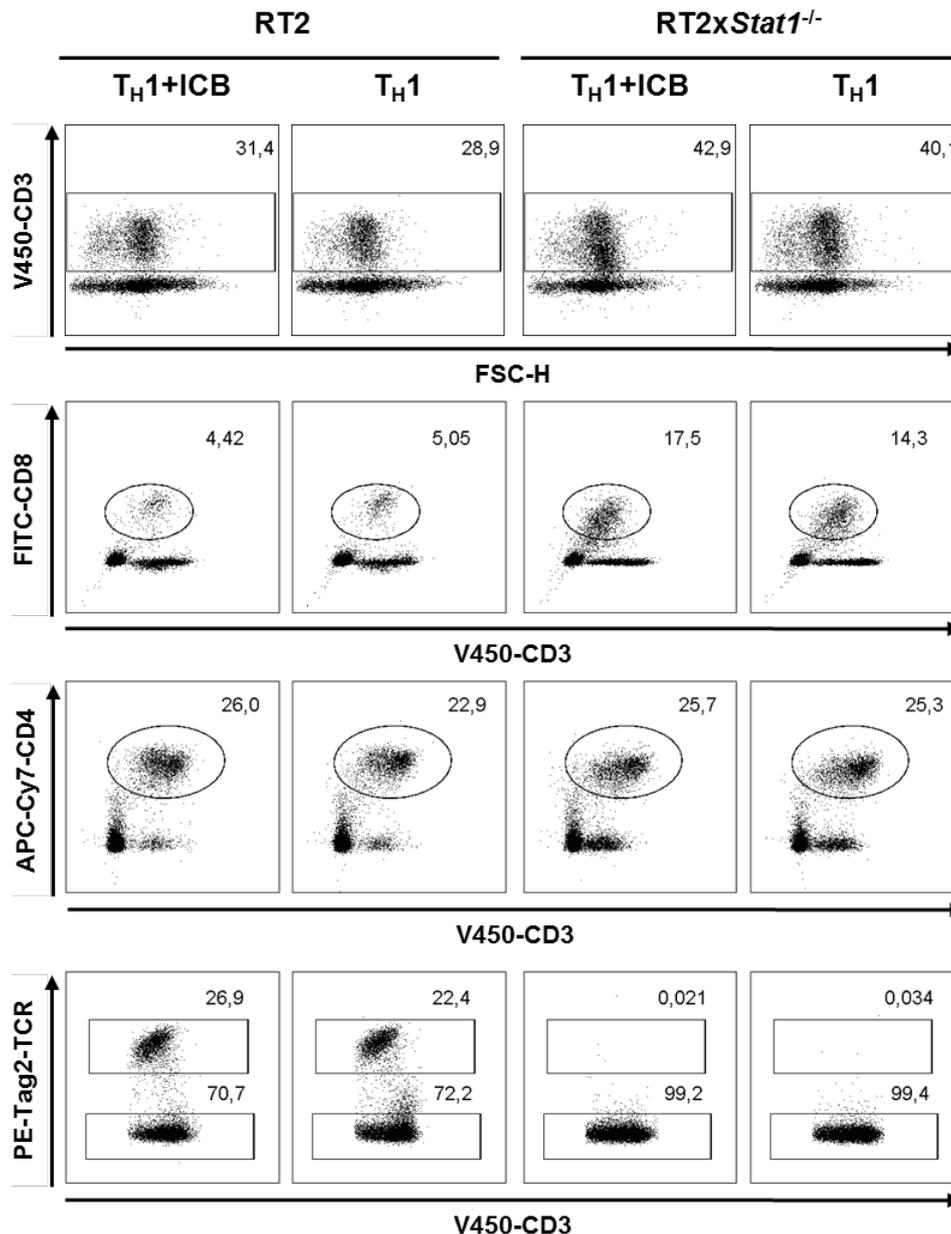


Abb. 34: T-Zellpopulationen in der Milz von RT2- und RT2xStat1^{-/-}-Mäusen nach Kombinationstherapie. Schaubilder der durchflusszytometrischen Analyse nach knapp vierwöchiger Immuntherapie (T_H1+ICB bzw. T_H1). Die jeweiligen „Gates“ zeigen die prozentualen Anteile der gesamten CD3⁺ T-Zellpopulation (oben) und der CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellsubpopulationen (mittig) an der Leukozytenpopulation (CD45.2⁺) an. Die untere Reihe zeigt den Anteil der therapeutischen T_H1-Zellen an der CD4⁺ T-Zellsubpopulation an. Für diesen Versuch wurden die Milzen aus den Mäusen jeweils gepoolt analysiert (RT2/T_H1+ICB: n = 3; RT2/T_H1 n = 3; RT2xStat1^{-/-}/T_H1+ICB: n = 2; RT2xStat1^{-/-}/T_H1: n = 1).

Gegenüber den Milzen behandelter RT2-Wildtyp-Mäuse (T_H1 ; T_H1+ICB) wurde in den Milzen entsprechend behandelter RT2xStat1^{-/-}-Mäuse zunächst eine um ca. 10% erhöhte CD3⁺ T-Zellpopulation an der Gesamt-Leukozytenpopulation festgestellt (42,9% bzw. 40,1% CD45⁺ Zellen vs. 31,4% bzw. 28,9% CD45⁺ Zellen; **Abb. 34**, oben). Ausschlaggebend dafür war vermutlich eine Reduktion der CD8⁺ Subpopulation in den Milzen behandelter RT2-Wildtyp-Mäuse, denn es konnten lediglich ca. 4 - 5% CD8⁺ T-Zellen detektiert werden. Dahingegen nahmen CD8⁺ T-Zellen in der Milz von RT2xStat1^{-/-}-Mäusen 14 - 17% der Gesamt-Leukozytenpopulation ein (**Abb. 34**, mittig).

CD4⁺ T-Zellen waren in allen untersuchten Milzsuspensionen anteilig an der gesamten Leukozytenpopulation gleichermaßen vertreten (22,9 - 26,0 %) (**Abb. 34**, mittig). Bei genauerer Betrachtung wurde jedoch, trotz der geringen Unterschiede, festgestellt, dass in den Milzen der RT2xStat1^{-/-}-Mäuse keinerlei therapeutische T_H1 -Zellen nachweisbar waren. In den Milzen behandelter RT2-Wildtyp-Mäuse hingegen stellten die therapeutischen T_H1 -Zellen ca. 22 - 27% der CD4⁺ T-Zellpopulation dar (**Abb. 34**, unten).

4.2.5 Untersuchung der Tumorantigen-Expression im fortgeschrittenen Inselzellkarzinom nach Kombinationstherapie

Der Verlust der Tumorantigen-(TA) Expression ist einer von vielen Mechanismen, welcher Tumore sich bedienen, um einer Immunantwort zu entgehen. Um einen potentiell negativen Einfluss einer verringerten TA-Expression auf die Kombinationstherapie zu untersuchen, wurden Inselzellkarzinome aus RT2-Wildtyp- und RT2xStat1^{-/-}-Mäusen nach knapp vierwöchiger Kombinationstherapie (T_H1+ICB) oder einer Scheinbehandlung immunhistochemisch auf die Expression des TAs Tag2 untersucht (3.12.5.4). **Abb. 35** zeigt eine repräsentative Auswahl der qualitativ untersuchten Pankreasgewebeschnitte. In allen betrachteten Tumorarealen konnte, unabhängig von der Behandlung, eine starke Expression des Tag2-Peptids nachgewiesen werden. Die Therapie hatte also keinen Einfluss auf die Expression des Tumorantigens Tag2 - weder in RT2-Wildtyp-Mäusen, noch in Mäusen der RT2xStat1^{-/-} Linie. Aufgrund der offensichtlich starken Expression des Tag2-Peptids wurde an dieser Stelle auf eine Quantifizierung der Tag2-Färbung verzichtet.

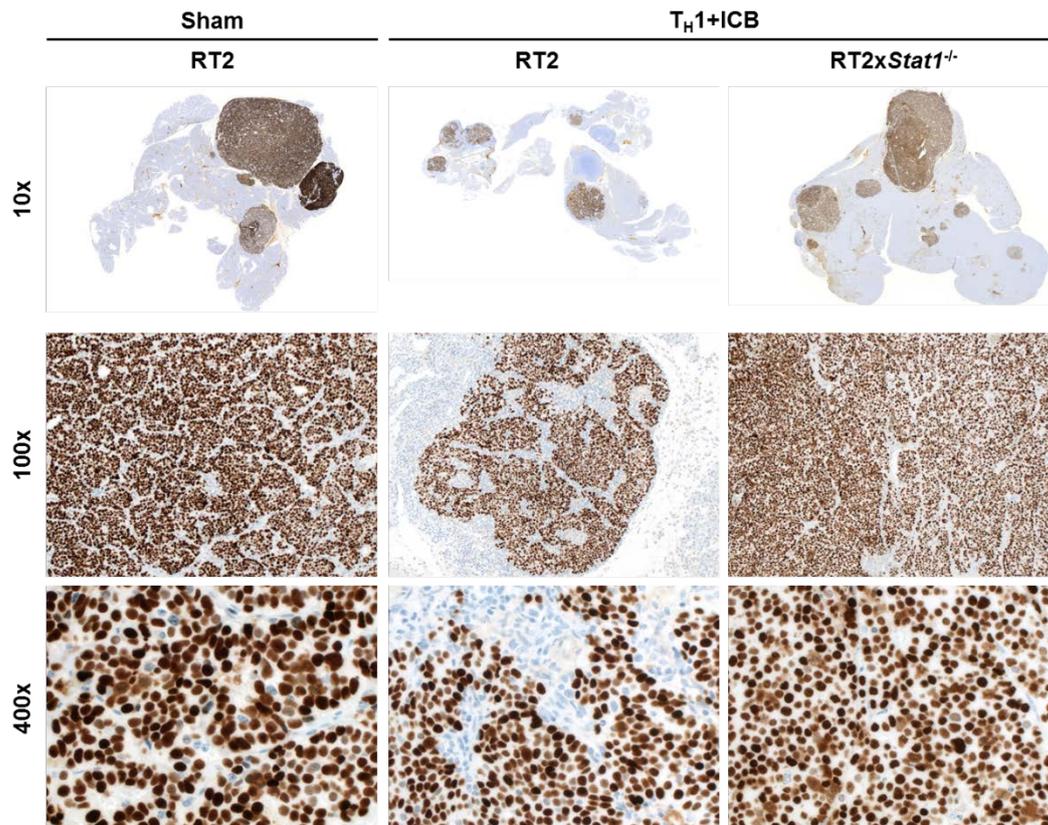


Abb. 35: CD3-Immunhistochemie der Tag2-Expression auf Inselzellkarzinomen aus RT2- und RT2xStat1^{-/-}-Mäusen. Repräsentative Tag2-Immunhistochemie zur Darstellung der Tumorantigen-Expression auf Paraffinschnitten von Inselzellkarzinomen aus RT2- bzw. RT2xStat1^{-/-}-Mäusen nach drei- bis vierwöchiger Kombinationstherapie (T_H1+ICB) oder Scheinbehandlung (Sham) (modifiziert nach Brenner *et al.*, 2020)¹⁶⁷.

4.3 Zelluläre Charakterisierung des Tumor-Mikromilieus und der lymphatischen Organe

Um die Wirkmechanismen der Kombinationstherapie auf zellulärer Ebene weiter zu beurteilen, wurde das lokale Immunzellinfiltrat innerhalb des Mikromilieus der Inselzellkarzinome (TME), mit besonderem Fokus auf die T-Zellantwort, betrachtet. Dazu wurde Tumorgewebe nach drei Therapiezyklen, vier Tage nach der letzten Injektion von PD-L1/LAG-3, aus RT2-Wildtyp-Mäusen entnommen und das Immunzellinfiltrat mittels Durchflusszytometrie detailliert untersucht (3.13) (Abb. 36). Zur Analyse wurde ein Mix aus fluoreszierenden Antikörpern herangezogen, welcher es nicht nur erlaubte, die therapeutischen T_H1 -Zellen von der endogenen $CD4^+$ T-Zellpopulation zu unterscheiden, sondern gleichzeitig den Phänotyp und Aktivierungszustand der T-Zellen unter Berücksichtigung der Expression von ICs zu charakterisieren („Panel“ E, Tab. 8). Ein weiterer Antikörpermix („Panel“ D, Tab. 8) diente der Identifikation weiterer Immunzellpopulationen wie DCs, B-Zellen, Granulozyten und Makrophagen.

Die Untersuchungen wurden schließlich auf die lymphatischen Organe ausgedehnt, um die systemischen Effekte der Kombinationstherapie, im Besonderen die systemischen Effekte auf die T-Zellantwort in Lymphknoten und Milz, zu untersuchen. Auch hierfür wurden „Panel“ D und E verwendet (Tab. 8).

Abb. 36 zeigt das Behandlungsschema der RT2-Mäuse und den Zeitpunkt, zu welchem die im Folgenden analysierten Organe den Versuchstieren entnommen wurden. Der Übersichtlichkeit halber wird der Zeitpunkt der Organentnahme in den folgenden Abschnitten dieses Kapitels nicht mehr erwähnt.

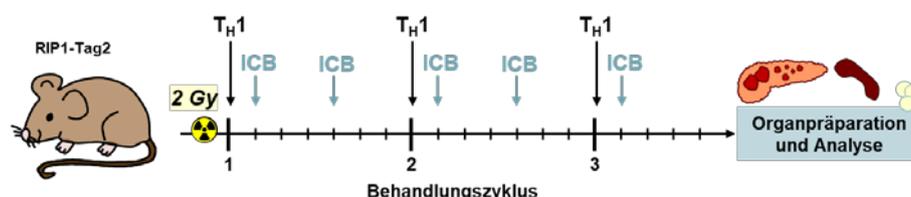


Abb. 36: Behandlungsschema und Versuchsablauf zur Durchflusszytometrie. RT2-Wildtyp-Mäuse im fortgeschrittenen Tumorstadium wurden nach drei Behandlungszyklen der Kombinationstherapie (T_H1 +ICB) euthanasiert, um die Inselzellkarzinome, Milz, Knochenmark und Lymphknoten zu isolieren. Die Organe wurden anschließend mittels fluoreszierender Antikörper (Tab. 8) auf ihre Immunzelllandschaft im Durchflusszytometer analysiert. Für die Mono- und

Scheinbehandlungen wurden jeweils TH1-Zell-Injektionen mit PBS und/oder ICB-Injektionen mit einem Cocktail aus wirkungslosen Isotyp-Antikörpern ersetzt.

4.3.1 Globale Analyse der Immunzellpopulationen im TME und den lymphatischen Organen

Zunächst wurde mit einer vergleichenden Analyse definierter Immunzellpopulationen im TME, im Tumor-drainierenden PLK, in den axillären Lymphknoten (ALK), der Milz und schließlich auch im Knochenmark begonnen.

Abb. 37a stellt u.a. den Anteil aller im TME detektierten Immunzellen an der gesamten lebenden Zellpopulation im Tumor dar. Dieser Anteil betrug nach Kombinationstherapie (T_H1+ICB) bzw. T_H1-Zell-Monotherapie ca. 25%, ein Effekt, welcher durch eine alleinige ICB-Therapie schwächer ausfiel und in scheinbehandelten Tieren lediglich 10% ausmachte. Nach genauerer Betrachtung dieses Infiltrats wurden neben B-Zellen, Granulozyten, Makrophagen bzw. Monozyten und den myeloiden Suppressorzellen (MMDSCs) hauptsächlich T-Zellen, DCs und NK-Zellen detektiert, welche die drei größten Populationen innerhalb des TMEs darstellten. Die CD3⁺ T-Zellpopulation wurde durch die Kombinationstherapie (T_H1+ICB) im Vergleich zur Sham-Behandlung signifikant erhöht (17,4±2,0% vs. 2,1±2,1% lebender Zellen, *P*=0,016, **Abb. 37b**).

Anschließend wurde die Zusammensetzung der Immunzellpopulationen im Tumor-drainierenden PLK, als Teil der lokalen Immunantwort, betrachtet (**Abb. 37a**). Unabhängig von der Behandlung stellten CD3⁺ T-Zellen im Mittel, mit einem Anteil von ca. 60 - 75%, die größte lebende Zellpopulation im PLK dar, welche nach alleiniger T_H1-Zell-Behandlung tendenziell am größten war. Die zweit-größte Population machten die B-Zellen aus; die Unterschiede zwischen der kombinierten Behandlung und den einzelnen Kontrollgruppen waren jedoch für beide Populationen nicht signifikant (**Abb. 37c**). Des Weiteren wurde in Folge der Kombinationstherapie im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit T_H1-Zellen eine signifikant erhöhte Population an DCs im PLK, nicht aber im ALK, detektiert (1,5±0,1% vs. 1,0±0,1% lebender Zellen, *P*=0,016, **Abb. 37c**).

Im ALK, welcher den Tumor nicht drainiert, wurde eine ähnliche Zusammensetzung an T- und B-Zellen beobachtet (**Abb. 37a**). Der Anteil an DCs lag jedoch, wie bereits

Zellen, B-Zellen, DCs, Granulozyten, Makrophagen/Monozyten (Makros/Monos), NK-Zellen und Myeloide Suppressorzellen (MMDSCs)) an lebenden Zellen aus entsprechenden Einzelzellsuspensionen. *n.d.* = nicht weiter definierte Zellpopulationen (n=3-5 pro Organ und Behandlungsgruppe). **(b - f)** Vergleichende Darstellung der Anteile ausgewählter Immunzellpopulationen an lebenden Zellen im TME **(b)**, im PLK **(c)**, im ALK **(d)**, in der Milz **(e)** und im Knochenmark **(f)**. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Jeder Punkt repräsentiert eine mittels Durchflusszytometrie untersuchte Zellsuspension einer entsprechend behandelten RT2-Maus (T_H1+ICB , n=5; T_H1 , n=4; ICB, n=3; Sham (-/-), n=3 (nur PLK) bzw. n=4). Zur statistischen Auswertung wurde ein zweiseitiger Wilcoxon-Mann-Whitney-Test mit Bonferroni-Korrektur für Mehrfachtestungen (k = 3) verwendet (* $P < 0,017$; ns = nicht signifikant).

Abseits der lokalen Immunantwort innerhalb des Tumors und des PLKs wurden im Weiteren Milz und Knochenmark analysiert (**Abb. 37**). Im Gegensatz zu den Lymphknoten stellten in der Milz die B-Zellen mit Anteilen zwischen ca. 18 bis 28%, gefolgt von $CD3^+$ T-Zellen mit Anteilen von ca. 11 bis 15%, die größte lebende Immunzellpopulation dar (**Abb. 37a**). In geringem Maße wurden DCs (ca. 2%), Makrophagen bzw. Monozyten (ca. 1%) und NK Zellen (ca. 2 - 3,5%) detektiert (**Abb. 37e**). Die unterschiedlichen Behandlungen hatten jedoch keine signifikanten Einflüsse auf die Zusammensetzung dieser Immunzellpopulationen.

Im Knochenmark wurden hauptsächlich B-Zellen und Granulozyten detektiert (**Abb. 37a**). Der Anteil beider Populationen war nach Kombinationstherapie (T_H1+ICB) im Vergleich zu scheinbehandelten Tieren (Sham) signifikant verringert (B-Zellen: $12,0 \pm 2,2\%$ vs. $27,0 \pm 3,2\%$ lebender Zellen, $P = 0,016$; Granulozyten: $13,1 \pm 1,2\%$ vs. $34,6 \pm 5,1\%$ lebender Zellen, $P = 0,016$, **Abb. 37f**). Der Anteil an DCs, NK- und T-Zellen lag anteilig an der lebenden Gesamtpopulation jeweils unter einem Prozent. Monozyten, die Vorläuferzellen von Makrophagen, stellten mit 2 bis 3% die drittgrößte detektierte Immunzellpopulation im Knochenmark dar (**Abb. 37a**).

4.3.2 Untersuchung der lokalen T-Zell-Antwort im TME

Da $CD3^+$ T-Zellen im Tumor, wie auch in allen untersuchten sekundären lymphatischen Organen, eine der größten Zellpopulationen darstellen (4.3.1) und der Fokus dieser Arbeit zudem auf der Evaluierung einer T-Zell-basierten Immuntherapie liegt, wurde im Folgenden die lokale wie auch systemische T-Zellantwort unter Verwendung von „Panel“ E (**Tab. 8**) im Durchflusszytometer detailliert untersucht.

4.3.2.1 T-Zellphänotypen

Zunächst wurde das CD3⁺ T-Zellinfiltrat, welches aus den Inselzellkarzinomen der RT2-Mäuse isoliert wurde, in drei Phänotypen unterteilt: Dazu wurde die CD4⁺ T-Zellpopulation zunächst von den CD8⁺ T-Zellen abgegrenzt und weiter in endogene CD4⁺ T-Zellen (CD4^E) und adaptiv transferierte T_H1-Zellen (T_H1) unterteilt.

Abb. 38a zeigt den mittleren prozentualen Anteil der drei T-Zell Phänotypen an lebenden Zellen im TME. Wie bereits unter Abschnitt 4.3.1 beschrieben, war der Anteil an CD3⁺ T-Zellen nach der Kombinationstherapie im Vergleich zu scheinbehandelten Tieren im TME signifikant erhöht. Die detaillierte Betrachtung der drei unterschiedlichen T-Zell Phänotypen ließ erkennen, dass vor allem eine Behandlung mit T_H1-Zellen eine massive Infiltration von CD4^E T-Zellen ins TME zur Folge hatte. Ein statistischer Vergleich zeigte eine signifikant erhöhte Population an CD4^E Zellen nach Kombinationstherapie im Vergleich zur Scheinbehandlung ($11,4 \pm 5,1\%$ vs. $0,9 \pm 0,6\%$ lebende Zellen, $P = 0,016$) (**Abb. 38b**, links).

Die therapeutischen T_H1-Zellen siedelten sich, wenn auch überraschender Weise nur in geringem Maße, unabhängig einer ICB-Behandlung gleichermaßen im TME an. Es traten keine signifikanten Unterschiede zwischen den T_H1-Zellpopulationen im TME beider T-Zell-Empfängergruppen auf (T_H1+ICB: $1,6 \pm 0,3\%$ lebender Zellen; T_H1: $1,8 \pm 0,6\%$ lebender Zellen; $P = 1,0$) (**Abb. 38b**, mittig).

Zuletzt wurden die Effekte der Kombinationstherapie auf die Infiltration von CD8⁺ T-Zellen ins TME untersucht: Durch die Kombination von T_H1-Zellen mit dem PD-L1/LAG-3-Antikörpercocktail konnte im Vergleich zur Scheinbehandlung (Sham) ein signifikant höheres Signal an CD8⁺ T-Zellen detektiert werden ($5,8 \pm 0,7\%$ vs. $0,4 \pm 0,2\%$ lebender Zellen; $P = 0,016$). Auch ein Vergleich zur T_H1-Zell-Monotherapie ergab ein signifikant höheres Signal an CD8⁺ T-Zellen nach Kombinationstherapie ($5,8 \pm 0,7\%$ vs. $2,2 \pm 0,6\%$ lebender Zellen, $P = 0,016$) (**Abb. 38b**, rechts). Dies legte die Vermutung nahe, dass CD8⁺ T-Zellen vor allem durch die Kombination aus T_H1-Zellen und einer IC-Blockade ins TME einwandern konnten.

Cocktails nach T_H1 -Zelltransfer nicht signifikant erhöht (T_H1 : $54,2 \pm 3,2\%$, T_H1+ICB : $48,7 \pm 4,9\%$ der $CD8^+$ T-Zellen; $P = 0,413$) (**Abb. 39a**).

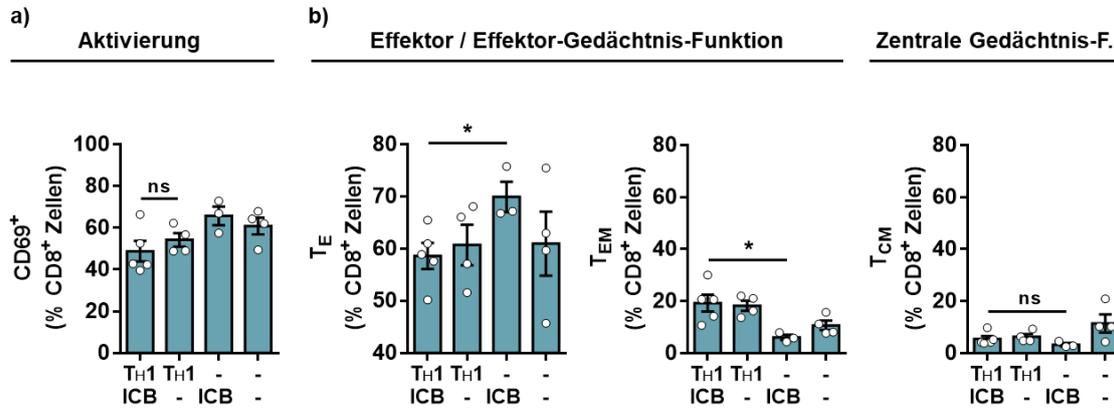


Abb. 39: Differenzierte Analyse der $CD8^+$ T-Zellen im TME mit Fokus auf die Aktivierung und Effektor-/Gedächtnis-Funktion. (a) Darstellung aktivierter $CD8^+$ T-Zellen ($CD69^+$) im Verhältnis zur gesamten $CD8^+$ T-Zell-Fraktion im Tumor. **(b)** Analyse der Effektor- und Gedächtnis-Funktionen von $CD8^+$ T-Zellen anhand der Oberflächenexpression von $CD127$ und $CD62L$. T_E = T-Effektorzellen ($CD127^+/CD62L^-$); T_{EM} = Effektor-Gedächtnis-T-Zellen ($CD127^+/CD62L^+$); T_{CM} = zentrale Gedächtnis-T-Zellen ($CD127^+/CD62L^+$). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM als prozentualer Anteil an der $CD8^+$ T-Zellpopulation. Jeder Punkt repräsentiert eine untersuchte Tumor-Zellsuspension aus einer RT2-Maus nach entsprechender Behandlung (T_H1+ICB , $n = 5$; T_H1 , $n = 4$; ICB, $n = 3$; Sham (-/-), $n = 4$). Zur statistischen Auswertung wurde ein zweiseitiger Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verwendet (* $P < 0,05$; ns = nicht signifikant).

Des Weiteren wurden $CD8^+$ T-Zellen durch die Expression von $CD127$ und $CD62L$ in (1) T-Effektorzellen (T_E), negativ für beide Oberflächenmoleküle, in (2) Effektor-Gedächtnis-T-Zellen („*effector memory T cells*“, T_{EM}), lediglich positiv für $CD127$, und (3) zentrale Gedächtnis-T-Zellen („*central memory T cells*“, T_{CM}), positiv für beide Marker, eingeteilt (3.13.2.1).

Nach einer semi-quantitativen Analyse wurden in jeder Behandlungsgruppe hauptsächlich T_E -Zellen detektiert. Nach ICB-Monotherapie war deren Anteil mit $69,9 \pm 2,9\%$ an der $CD8^+$ T-Zellpopulation am höchsten und unterschied sich signifikant vom Anteil nach Kombinationstherapie ($58,6 \pm 2,5\%$, $P = 0,036$). Dieser Effekt konnte durch eine erhöhte T_{EM} -Zellpopulation in Folge der T_H1 -Zell-Injektionen erklärt werden: Deren Anteil an der $CD8^+$ T-Zellpopulation betrug nach dreimaligem adoptiven Zelltransfer $18,3 \pm 2,0\%$ (T_H1) bzw. $19,2 \pm 3,3\%$ (T_H1+ICB). Wurde auf die wiederholten T_H1 -Zell-Injektionen verzichtet, betrug der Anteil lediglich $6,0 \pm 1,0\%$ (ICB). Ein statistischer Vergleich zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen der

Kombinationstherapie und der ICB-Monotherapie, bezogen auf den Anteil der T_{EM}-Zellpopulation an der gesamten CD8⁺ T-Zellpopulation ($P=0,036$). Der adoptive T_H1-Zelltransfer erhöhte also den Anteil der T_{EM}-Zellen an der CD8⁺ T-Zellpopulation unabhängig von einer zusätzlichen IC-Blockade. Ein Effekt auf den Anteil der zentralen Gedächtniszellen wurde nicht detektiert. Diese waren mit einem mittleren Anteil von drei bis sechs Prozent in allen Behandlungsgruppen vertreten (**Abb. 39b**).

Eine weitere Unterteilung der CD8⁺ T-Zell Population ließ sich durch die Beurteilung der Oberflächenexpression der zwei ICs PD-1 und TIM-3 festlegen. Diese Rezeptoren stellen ein Maß für die T-Zell-Aktivierung, aber auch für den Verlust von Effektor-Funktionen, dar (1.3.2). Zunächst wurden die Zellen in (1) CD8⁺ T-Zellen mit geringer PD-1-Expression (PD-1^{lo}), (2) CD8⁺ T-Zellen mit hoher PD-1-Expression bei einer gleichzeitig geringen TIM-3-Expression (PD-1^{hi}) und (3) CD8⁺ T-Zellen mit hoher Expression beider ICs (PD-1^{hi}/TIM-3^{hi}) unterteilt und im Verhältnis zur CD8⁺ T-Zellpopulation dargestellt (**Abb. 40a-c**).

Nach der Behandlung mit dem PD-L1/LAG-3-Antikörpercocktail wurde eine prominente Subpopulation an Zellen mit hoher PD-1-Expression detektiert (ICB: $32,0 \pm 0,5\%$ CD8⁺ T-Zellen), ein Effekt, der auch in Kombination mit T_H1-Zellen zu beobachten war (T_H1+ICB; $20,3 \pm 3,2\%$ CD8⁺ T-Zellen). Ohne die Verabreichung des Antikörpercocktails wurden nach T_H1-Zelltransfer signifikant weniger CD8⁺ PD-1^{hi} T-Zellen detektiert ($10,1 \pm 2,2\%$ CD8⁺ T-Zellen, $P=0,032$). Zudem wurde nach Verabreichung des ICB-Antikörpercocktails, neben einer hohen PD-1-Expression, eine CD8⁺ Subpopulation mit gleichzeitig hoher TIM-3-Expression beobachtet (ICB: $43,8 \pm 2,5\%$ CD8⁺ T-Zellen), auch nach zusätzlichem T_H1-Zelltransfer (T_H1+ICB: $24,8 \pm 4,1\%$ CD8⁺ T-Zellen). Ohne die Verabreichung des Antikörpercocktails wurden auch hier nach T_H1-Zelltransfer tendenziell weniger CD8⁺ PD-1^{hi}/TIM-3^{hi} T-Zellen detektiert ($8,8 \pm 3,3\%$ CD8⁺ T-Zellen), die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant (**Abb. 40c**).

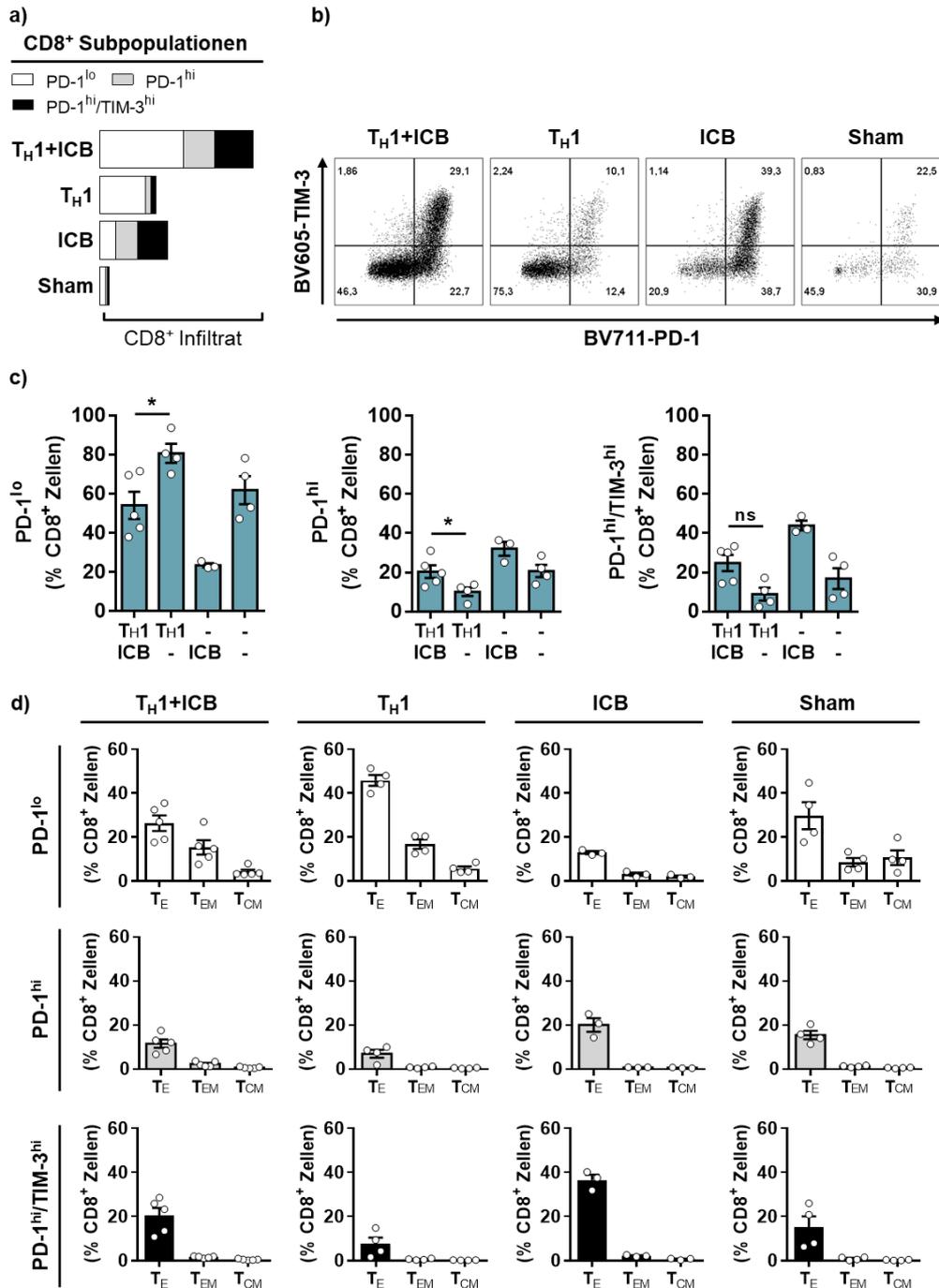


Abb. 40: Differenzierte Analyse der CD8⁺ T-Zellen im TME mit Fokus auf die PD-1 und TIM-3-Expression. Darstellung der Expression von PD-1 und TIM-3 auf CD8⁺ T-Zellen, isoliert aus den Inselzellkarzinomen von RT2-Mäusen. Die Balken repräsentieren das mittlere CD8⁺ Tumor-Infiltrat im Verhältnis zueinander nach entsprechender Behandlung. Dargestellt sind die Mittelwerte der Populationen mit schwacher PD-1-Expression (PD-1^{lo}), starker PD-1-Expression bei fehlender TIM-3-Expression (PD-1^{hi}) und starker PD-1-Expression bei Co-Expression mit TIM-3 (PD-1^{hi}/TIM-3^{hi}). **(b)** Repräsentative Plots der durchflusszytometrischen Analyse der PD-1 und TIM-3-Expression des CD8⁺ T-Zell-Infiltrats nach entsprechender Behandlung. Die Zahlen entsprechen dem prozentualen Anteil an der CD8⁺ T-Zellpopulation. **(c)** Vergleichende Analyse von PD-1^{lo}, PD-1^{hi} und PD-1^{hi}/TIM-3^{hi} CD8⁺ T-Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM als prozentuale Anteile an der

CD8⁺ T-Zellpopulation in der Tumorzellsuspension. Zur statistischen Auswertung wurde ein zweiseitiger Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verwendet (*P < 0,05; ns = nicht signifikant). **(d)** Differenzierte Analyse der Effektor- und Gedächtnis-Funktion der CD8⁺ T-Zellen, abhängig von der PD-1 und TIM-3-Expression anhand der Oberflächenexpression von CD127 und CD62L. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM anteilig an der gesamten CD8⁺ Population im Tumor. Jeder Punkt repräsentiert eine untersuchte Tumor-Zellsuspension einer entsprechend behandelten RT2-Maus (T_H1+ICB, n = 5; T_H1, n = 4; ICB, n = 3; Sham (-/-), n = 4).

Da nun einerseits der therapeutische Antikörpercocktail die Expression von TIM-3 und PD-1 zu beeinflussen schien und andererseits die Injektion der T_H1-Zellen eine Polarisierung von T_{EM}-Zellen bewirkte, wurden die CD8⁺ T-Zellpopulationen erneut auf Effektor- und Gedächtnis-Funktionen, jedoch unter Berücksichtigung der PD-1 und TIM-3-Expression, untersucht (**Abb. 40d**). Dabei konnte generell und gruppenübergreifend beobachtet werden, dass die Zelloberflächenexpression der ICs PD-1 und TIM-3 mit der Ausbildung von Gedächtnisfunktionen nicht mehr messbar war. Die hohe Expression der ICs PD-1 und TIM-3 wurde also innerhalb der CD8⁺ T-Zellenpopulation exklusiv auf Zellen mit reiner Effektor-Funktion (T_E) nachgewiesen. Die Ausbildung von Gedächtnis-Funktionen wurde erneut bevorzugt nach T_H1-Zelltransfer beobachtet: Der Anteil von PD-1^{lo} T_{EM}-Zellen an der CD8⁺ T-Zellpopulation betrug innerhalb der T_H1-Zell-Empfängergruppen 15,2 ± 3,3% (T_H1+ICB) bzw. 16,8 ± 2,1% (T_H1) und für ICB-behandelte Tiere 3,1 ± 0,7%. Der Anteil an PD-1^{lo} T_{CM}-Zellen an der CD8⁺ T-Zellpopulation im Tumor lag in allen Behandlungsgruppen zwischen zwei und sechs Prozent (**Abb. 40d**).

4.3.2.3 CD4⁺ Subpopulationen

Innerhalb der CD4⁺ T-Zellen wurde generell zwischen den therapeutischen, *in vitro* aktivierten und anschließend adoptiv transferierten T_H1-Zellen und den endogenen (CD4^E) T-Zellen unterschieden. Prozentual stellten CD4^E T-Zellen, mit einem mittleren Anteil von 11% nach Kombinationstherapie, die größte Immunzellpopulation im TME dar. Therapeutische T_H1-Zellen waren in beiden Empfängergruppen mit ca. 2% vertreten (vgl. **Abb. 38**). Auch hier wurden die Daten scheinbehandelter Tiere lediglich der Vollständigkeit halber abgebildet, jedoch aufgrund der geringen Zellzahl nicht weiter betrachtet (vgl. **Abb. 38b**).

Zunächst wurde die endogene CD4⁺ T-Zellpopulation auf die Expression von CD44, einem Zelloberflächenmolekül, das unmittelbar nach Antigenkontakt exprimiert wird, untersucht. Dabei wurden keine deutlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen festgestellt; Eine zusätzliche Injektion von T_H1-Zellen hatte im Vergleich zur ICB-Monotherapie weder Einfluss auf die Expression von CD44 ($69,5 \pm 3,3$ vs. $66,3 \pm 4,9$; $P = 0,679$) (**Abb. 41a**, links) noch auf die Ausbildung von Gedächtnisfunktionen (**Abb. 41b**, links), welche durch die zusätzliche Betrachtung der CD62L-Expression abgegrenzt wurden.

Die therapeutischen T_H1-Zellen zeigten eine sehr hohe CD44-Expression, sowohl als Monotherapie als auch in Kombination mit den therapeutischen Antikörpern (T_H1: $83,0 \pm 3,0$; T_H1+ICB: $81,2 \pm 2,8\%$ der T_H1-Zellen; $P = 0,714$) (**Abb. 41a**, rechts). Die detailliertere Analyse zur Differenzierung von endogenen bzw. transgenen zentralen T-Gedächtniszellen (T_{CM}) ergab einen gleichbleibenden mittleren prozentualen Anteil von sieben bis neun Prozent an der CD4^E- bzw. T_H1-Zellpopulation (**Abb. 41b**).

Im Hinblick auf die T-Zell-Aktivierung konnte ein Einfluss der therapeutischen T_H1-Zellen auf die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 (unter Ausschluss des CD25-Signals) auf die endogenen CD4⁺ T-Zellen beobachtet werden: Während durch eine ICB-Behandlung $37,5 \pm 0,7\%$ der CD4^E T-Zellen mit einer hohen CD69-Expression vorlagen, reduzierte sich der Anteil dieser Subpopulation durch die zusätzliche Verabreichung von T_H1-Zellen signifikant auf $22,7 \pm 3,0\%$ ($P = 0,036$) (**Abb. 41c**, links). Die transgenen T_H1-Zellen jedoch exprimierten CD69 gleichermaßen mit einem Anteil von ca. 66 % (**Abb. 41**, rechts).

Als nächstes wurde untersucht, welchen Einfluss die Verabreichung des ICB-Cocktails auf die PD-1-Expression beider CD4⁺ T-Zell Populationen, unabhängig von der TIM-3-Expression, hatte. In Folge der T_H1-Zell-Monotherapie zeigten $37,4 \pm 1,7\%$ der CD4^E-Zellen eine hohe PD-1-Expression (PD-1^{hi}). Nach zusätzlicher Verabreichung des ICB-Cocktails stieg der Anteil von PD-1^{hi} CD4^E T-Zellen signifikant auf $52,9 \pm 4,1\%$ ($P = 0,016$) (**Abb. 42**, links). Auf die therapeutischen T_H1-Zellen hatte die Kombinationstherapie im Vergleich zur T_H1-Zell-Monotherapie keinen Einfluss. Im Mittel zeigten ca. 80% der T_H1-Zellen im TME der

Inselzellkarzinome beider Behandlungsgruppen eine hohe PD-1-Expression (T_H1 : $80,5 \pm 5,3\%$, T_H1+ICB : $78,7 \pm 3,1\%$ % der T_H1 -Zellen) (**Abb. 42**, rechts).

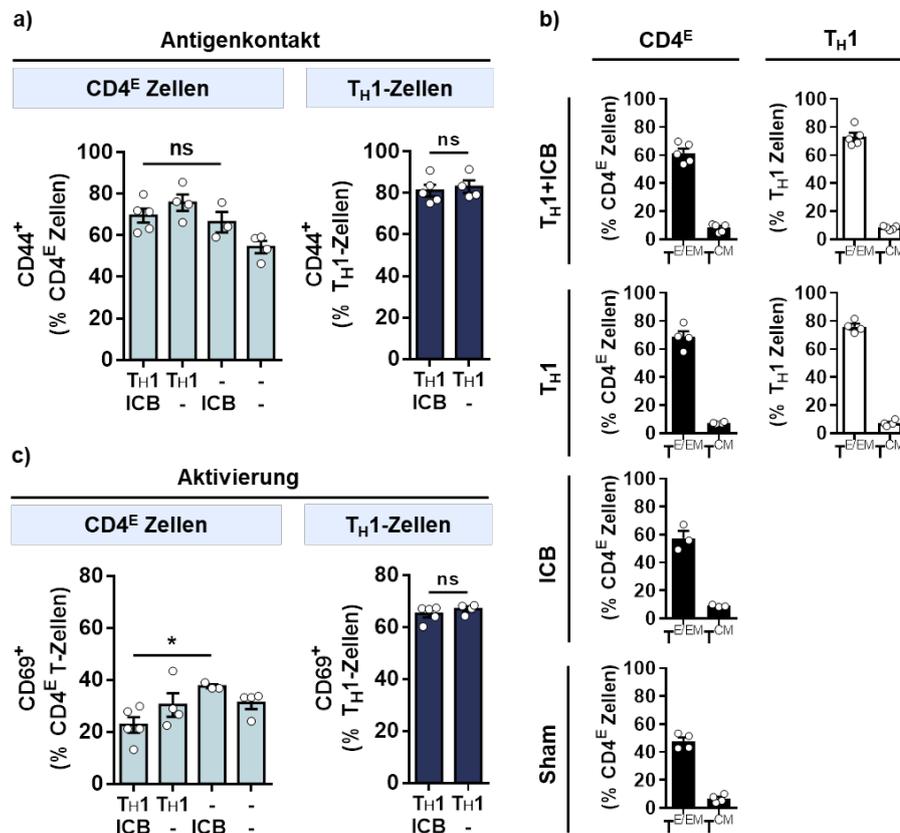


Abb. 41: Differenzierte Analyse der CD4⁺ T-Zellen im TME mit Fokus auf die CD69-Expression und Effektor-/Gedächtnis-Subpopulationen. (a) Analyse der Antigen-erfahrenen endogenen (CD4^E) und therapeutischen (T_{H1}) CD4⁺ T-Zellen anhand der Zelloberflächenexpression von CD44. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der prozentualen Anteile an der CD4^E bzw. T_{H1}-Zellpopulation im TME. **(b)** Differenzierte Analyse der Effektor- und Gedächtnis-Funktion anhand der Oberflächenexpression von CD44 und CD62L auf CD4^E und T_{H1}-Zellen. T_{E/EM} = T-Effektorzellen (CD44⁺/CD62L⁻); T_{CM} = zentrale Gedächtniszellen (CD44⁺/CD62L⁺). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM anteilig an der CD4^E bzw. T_{H1}-Zellpopulation im Tumor. **(c)** Darstellung aktivierter CD4^E und T_{H1}-Zellen (CD69⁺/CD25⁻) anteilig an der CD4^E- bzw. T_{H1}-Zellpopulation im Tumor. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Jeder Punkt repräsentiert eine untersuchte Tumor-Zellsuspension aus einer RT2-Maus nach entsprechender Behandlung (T_{H1}+ICB, n = 5; T_{H1}, n = 4; ICB, n = 3; Sham (-/-), n = 4). Zur statistischen Auswertung wurde ein zweiseitiger Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verwendet (*P < 0,05; ns = nicht signifikant).

Um eine Aussage über den Grad der T-Zellermüdung („Exhaustion“) treffen zu können, wurden die CD4^E- bzw. T_{H1}-Zellen auch hier in PD-1^{hi} (unter Ausschluss von TIM-3⁺ Zellen) und PD-1^{hi}/TIM-3^{hi} Zellen unterteilt und in Relation zur jeweiligen CD4⁺ T-Zellpopulation dargestellt. Im Gegensatz zu den CD8⁺ T-Zellen traten

innerhalb der endogenen und der therapeutischen CD4⁺ T-Zellpopulationen deutlich weniger PD-1^{hi}/TIM-3^{hi} Zellen auf. Ihre mittleren Anteile lagen, je nach Behandlung, zwischen 8 und 16% der jeweiligen CD4⁺ T-Zellpopulation (Abb. 43a,b). Die PD-1-Expression auf den endogenen CD4⁺ T-Zellen wurde, im Gegensatz zur Expression von TIM-3, durch die Behandlung mit dem PD-L1/LAG3-Antikörpercocktail stärker beeinflusst (Abb. 43).

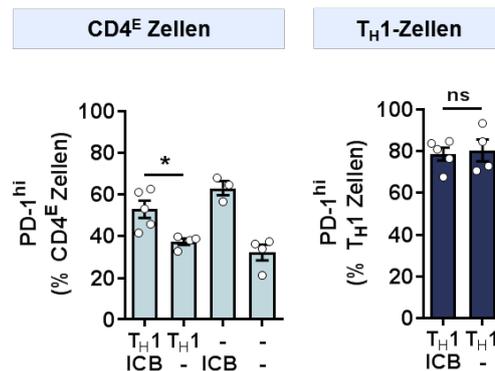


Abb. 42: Differenzierte Analyse der CD4⁺ T-Zellen im TME mit Fokus auf die PD-1-Expression. (a) Durchflusszytometrische Analyse der PD-1 Zelloberflächenexpression (BV711-PD-1) auf endogenen (CD4^E) und therapeutischen (T_H1) CD4⁺ T-Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte ±SEM als prozentuale Anteile an CD4^E bzw. T_H1-Zellen. Jeder Punkt repräsentiert eine untersuchte Tumorzellsuspension aus einer RT2-Maus nach entsprechender Behandlung (T_H1+ICB, n=5; T_H1, n=4; ICB, n=3; Sham (-/-), n=4). Zur statistischen Auswertung wurde ein zweiseitiger Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verwendet (*P < 0,05; ns = nicht signifikant).

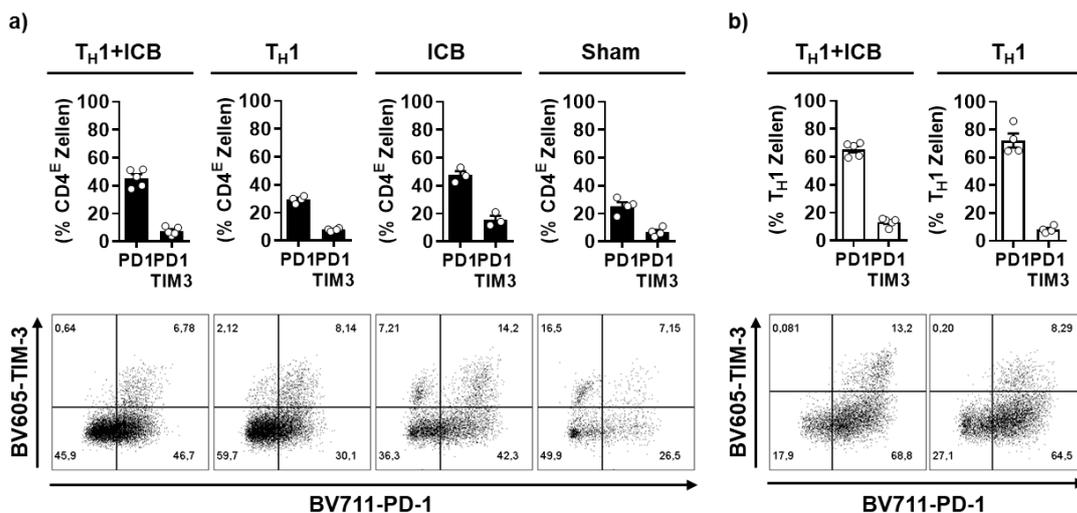


Abb. 43: Differenzierte Analyse der CD4⁺ T-Zellen im TME mit Fokus auf die Co-Expression von PD-1 und TIM-3. Abbildung der (a) endogenen (CD4^E) und (b) therapeutischen (T_H1) CD4⁺ T-Zellpopulationen mit hoher PD-1-Expression bei fehlender TIM-3-Expression (PD1) und hoher PD-1-Expression bei gleichzeitiger TIM-3-Expression (PD1/TIM3). Dargestellt sind Mittelwerte ±SEM

als prozentualer Anteil an den entsprechenden CD4⁺ T-Zellpopulationen im Tumor. Jeder Punkt repräsentiert eine untersuchte Tumor-Zellsuspension einer entsprechend behandelten RT2-Maus (T_H1+ICB, n=5; T_H1, n=4; ICB, n=3; Sham (-/-), n=4). Unter den Graphen sind jeweils repräsentative Plots der durchflusszytometrischen Analyse der PD-1 und TIM-3-Expression des CD4⁺ T-Zell-Infiltrats nach entsprechender Behandlung abgebildet. Die Zahlen entsprechen dem prozentualen Anteil an der endogenen bzw. therapeutischen CD4⁺ T-Zellpopulation.

Zuletzt wurde das TME via Durchflusszytometrie auf die Anwesenheit von regulatorischen CD4⁺ T-Zellen (T_{regs}) untersucht. T_{regs} lassen sich üblicherweise durch die intrazelluläre Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 von anderen Zellen abgrenzen. Mittlerweile werden T_{regs} jedoch auch durch eine starke Zelloberflächen-Expression von CD25 (CD25⁺) bei gleichzeitig geringer Expression von CD127 (CD127^{lo}) von T-Effektorzellen abgegrenzt¹⁶⁸⁻¹⁷⁰. Die nun als CD25⁺/CD127^{lo} detektierten CD4⁺ T_{reg} Populationen wurden anteilig an der entsprechenden T-Zellpopulation (CD4^E bzw. T_H1) abgebildet.

Die Untersuchungen zeigten, dass die Behandlung mit therapeutischen T_H1-Zellen, unabhängig von der IC-Blockade, eine Infiltration endogener T_{regs} ins TME zur Folge hatte. Nach ICB-Monotherapie waren lediglich 4,8±0,8% der CD4^E T-Zellen T_{regs}; Nach der zusätzlichen Verabreichung von T_H1-Zellen wurden signifikant mehr T_{regs} identifiziert (15,4±2,3; *P*=0,036). Auch durch die bloße Verabreichung von T_H1-Zellen konnten der Anteil der endogenen T_{regs} verdreifacht werden (16,2±1,5%) (Abb. 44a). Im Gegensatz dazu reduzierten die wiederholten Injektionen des ICB-Cocktails in Kombination mit T_H1-Zellen den Anteil von T_{regs} an der therapeutischen T_H1-Zellpopulation signifikant von 11,5±0,8% (T_H1) auf 7,1±0,8% (T_H1+ICB, *P*=0,016) (Abb. 44b).

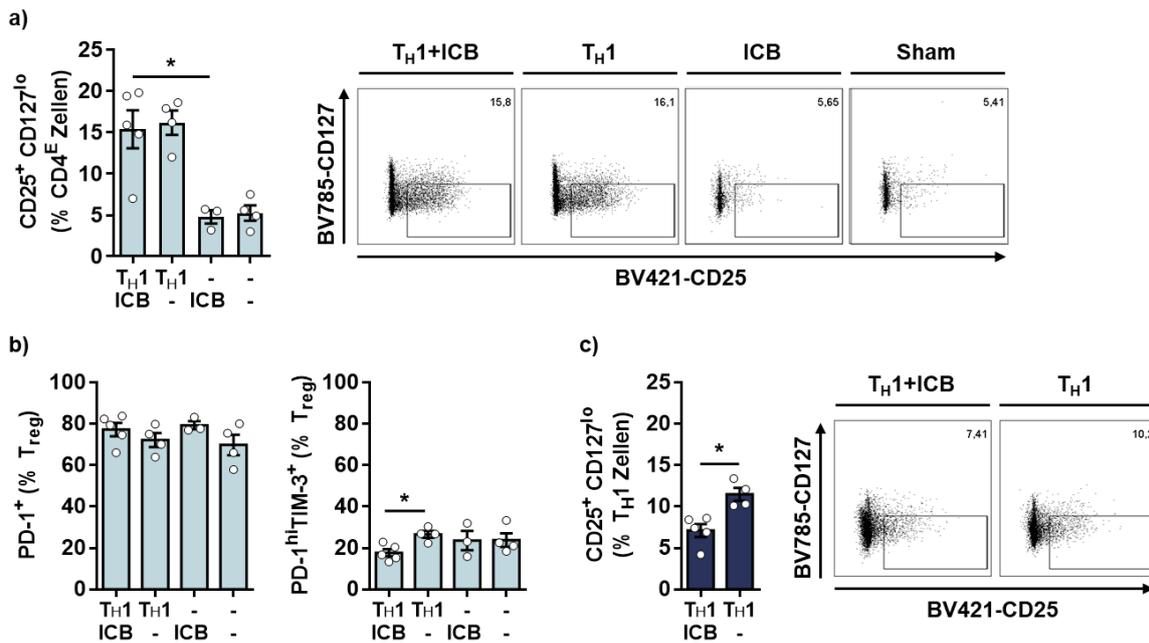


Abb. 44: Differenzierte Analyse der CD4⁺ T-Zellen im TME mit Fokus auf T_{regs}. Detektion von Tregs als CD25⁺/CD127^{lo} T-Zellen. **(a)** T_{regs} als prozentualer Anteil an der CD4^E T-Zellpopulation. **(b)** Prozentualer Anteil der CD4^E T_{regs} mit hoher PD-1-Expression bei gleichzeitig fehlender TIM-3-Expression (links) bzw. gleichzeitiger Expression von PD-1 und TIM-3 (rechts). **(c)** Anteil der transgenen T_{regs} anteilig an der TH1-Zellpopulation. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM als prozentuale Anteile an den entsprechenden CD4⁺ T-Zellpopulationen im TME. Jeder Punkt repräsentiert eine untersuchte Tumor-Zellsuspension einer entsprechend behandelten RT2-Maus (TH1+ICB, n = 5; TH1, n = 4; ICB, n = 3; Sham (-/-), n = 4). Zur statistischen Auswertung wurde ein zweiseitiger Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verwendet (*P < 0,05). Rechts neben den Balkendiagrammen in a) und b) sind jeweils repräsentative Plots der durchflusszytometrischen Analyse der CD127- und CD25-Expression abgebildet. Die Zahlen entsprechen dem prozentualen Anteil an der entsprechenden Subpopulation.

4.3.3 Untersuchung der lokalen Immunantwort im PLK

4.3.3.1 T-Zellphänotypen

Im Anschluss wurden die verschiedenen T-Zellphänotypen im Tumor-drainierenden PLK der RT2-Mäuse analysiert und den T-Zellphänotypen im axillären Kontroll-Lymphknoten (ALK) gegenübergestellt. Wie bereits für das TME beschrieben, wurde die gesamte CD3⁺ T-Zellpopulation auch hier jeweils in die drei unterschiedlichen Subpopulationen unterteilt: endogene CD4⁺ (CD4^E) und CD8⁺ T-Zellen und die therapeutischen TH1-Zellen.

Abb. 45a zeigt für die jeweiligen Lymphknoten den mittleren prozentualen Anteil der drei T-Zell-Subpopulationen an der lebenden Zellfraktion. Wie bereits unter Abschnitt

4.3.1 beschrieben, war die gesamte $CD3^+$ T-Zellpopulation nach Kombinations-therapie im Vergleich zur jeweiligen Monotherapie bzw. Scheinbehandlung, unabhängig von der Art des Lymphknotens, nicht signifikant erhöht. Eine detaillierte Betrachtung der $CD3^+$ T-Zell-Subpopulationen zeigte jedoch, dass sich die therapeutischen T_H1 -Zellen hauptsächlich im PLK (im Mittel zwischen 33,7% bzw. 38,3% der $CD3^+$ Zellen), nicht aber im ALK (im Mittel zwischen 1,4% und 1,0% der $CD3^+$ Zellen) ansiedelten (Abb. 45a). Dadurch verringerten sich die prozentualen Anteile der $CD4^E$ -Zellen an der $CD3^+$ T-Zellpopulation im PLK, nicht jedoch im ALK, signifikant zugunsten der T_H1 -Zellpopulation (ICB: $78,3 \pm 1,0\%$ der $CD3^+$ Zellen; T_H1+ICB : $49,6 \pm 2,2\%$ der $CD3^+$ Zellen; $P=0,036$). Im ALK wurden keine signifikanten Behandlungseffekte auf die Verteilung der T-Zell-Subpopulationen detektiert. Es wurden im Mittel ca. 80% $CD4^E$ - und bis zu 20% $CD8^+$ T-Zellen detektiert. Wie bereits oben beschrieben, siedelten sich nur wenige T_H1 -Zellen im ALK an (Abb. 45b).

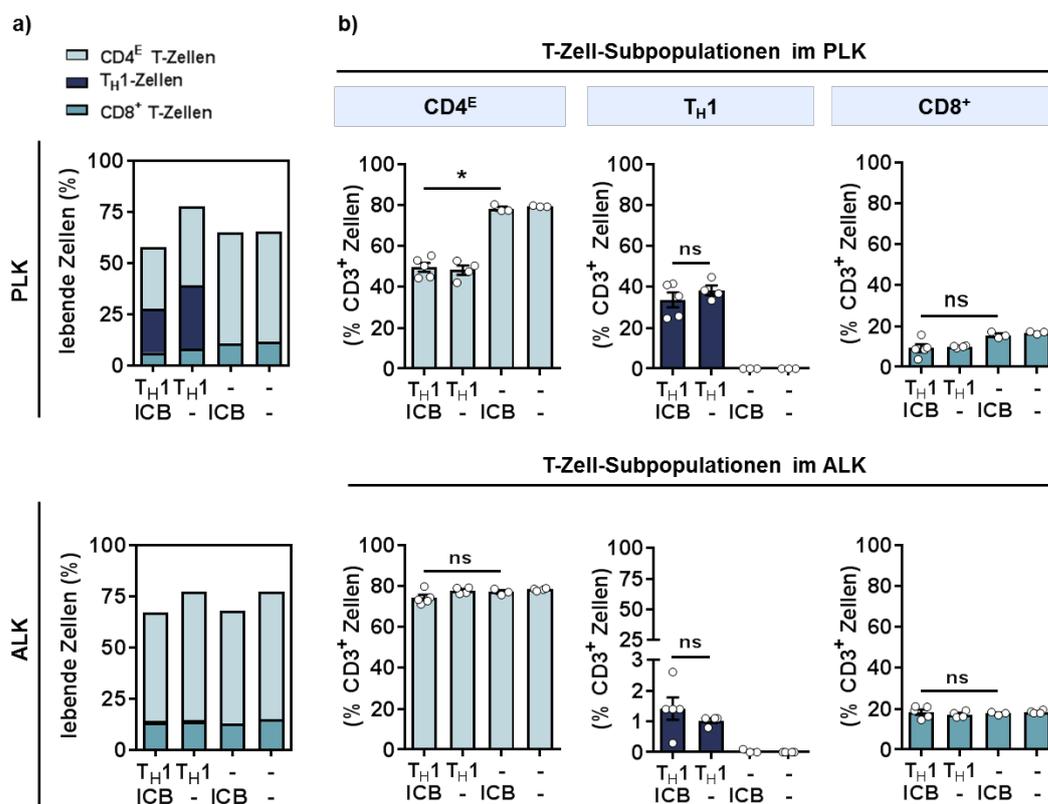


Abb. 45: T-Zell Phänotypen in den Lymphknoten. (a) Mittlere prozentuale Anteile und Zusammensetzung der $CD3^+$ T-Zell-Gesamtpopulation an lebenden Zellen im Tumor-drainierenden (PLK, oben) bzw. Kontroll-Lymphknoten (ALK, unten). (b) Semi-quantitative Analyse der endogenen ($CD4^E$) bzw. therapeutischen (T_H1) $CD4^+$ T-Zellen und endogenen $CD8^+$ T-Zellen im PLK (oben) und ALK (unten). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM anteilig an der $CD3^+$ T-Zellpopulation. Jeder Punkt

repräsentiert eine untersuchte Einzelzellsuspension aus einer RT2-Maus nach entsprechender Behandlung (T_H1+ICB , $n=5$; T_H1 , $n=4$; ICB , $n=3$; Sham (-/-), $n=3-4$). Zur statistischen Auswertung wurde ein zweiseitiger Wilcoxon-Mann-Whitney-Test mit Bonferroni-Korrektur für Mehrfachtestungen ($k=3$) verwendet (* $P < 0,017$; ns = nicht signifikant).

4.3.3.2 CD8⁺ Subpopulationen

Weder in der Expression von CD69 (T-Zell-Aktivierungsmarker), noch in der Ausbildung von T-Zell-Effektor- und Gedächtnis-Funktionen ($T_E/T_{EM}/T_{CM}$) traten innerhalb der CD8⁺ T-Zell-Subpopulation des PLKs Unterschiede als Auswirkung der Kombinationstherapie und den entsprechenden Mono- bzw. Scheinbehandlungen auf. Tendenziell lagen die CD8⁺ T-Zellen im PLK jeweils nach ICB-Behandlung mit einer etwas höheren CD69-Expression vor (ca. 9% der CD8⁺ T-Zellen zeigten eine erhöhte CD69-Expression) als nach T_H1 -Zell-Mono- (ca. 7%) oder gar Scheinbehandlung (ca. 4%). Signifikante Unterschiede wurden jedoch nicht detektiert (Abb. 46a).

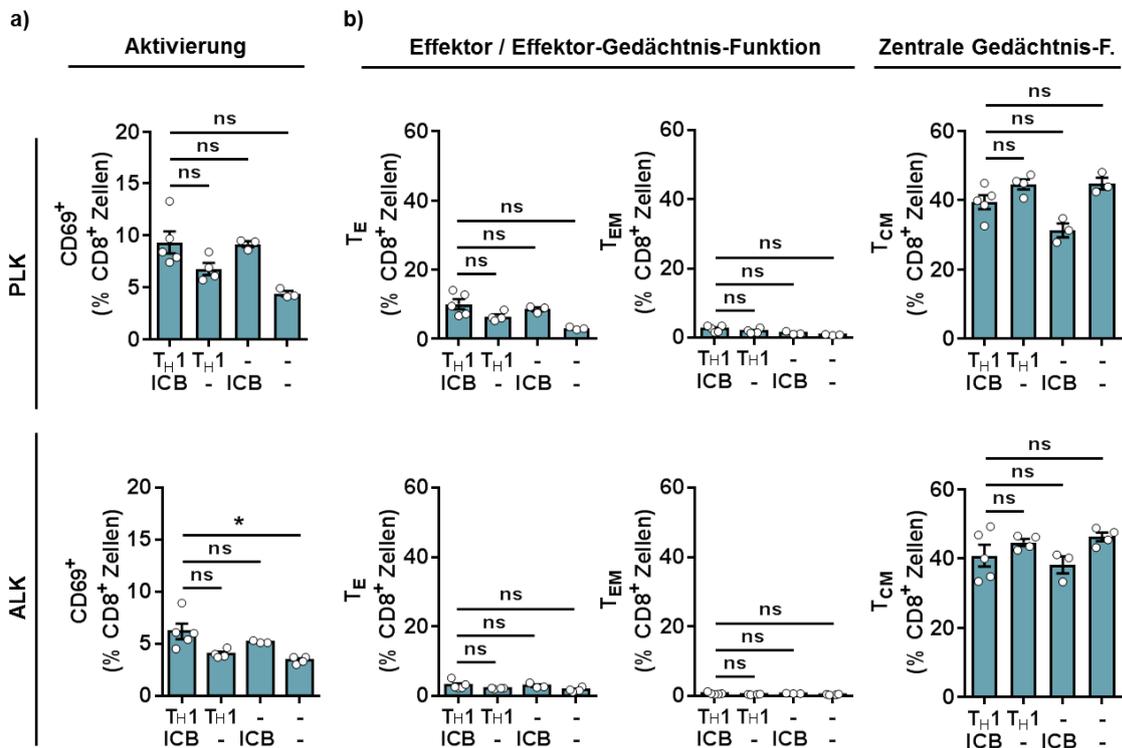


Abb. 46: Differenzierte Analyse der CD8⁺ T-Zellen in den Lymphknoten mit Fokus auf die CD69-Expression und Effektor-/Gedächtnis-Subpopulationen. (a) Darstellung aktivierter CD8⁺ T-Zellen (CD69⁺) anteilig an der CD8⁺ T-Zellpopulation im PLK bzw. ALK. **(b)** Analyse der Effektor- und Gedächtnis-Funktion von CD8⁺ T-Zellen anhand der Oberflächenexpression von CD127 und CD62L. T_E = T-Effektorzellen (CD127⁺/CD62L⁻); T_{EM} = Effektor/Gedächtniszellen (CD127⁺/CD62L⁺); T_{CM} =

zentrale Gedächtniszellen (CD127⁺/CD61L⁺). Dargestellt sind Mittelwerte±SEM als prozentualer Anteil an der CD8⁺ T-Zellfraktion. Jeder Punkt repräsentiert eine untersuchte Lymphknoten-Zellsuspension aus einer RT2-Maus nach entsprechender Behandlung (T_H1+ICB, n=5; T_H1, n=4; ICB, n=3; Sham (-/-), n=3-4). Zur statistischen Auswertung wurde ein zweiseitiger Wilcoxon-Mann-Whitney-Test mit Bonferroni-Korrektur für Mehrfachtestungen (k=3) verwendet (**P*<0,017; ns = nicht signifikant).

Bei genauerer Betrachtung der CD8⁺ T-Zell Effektor- und Gedächtnis-Funktionen im PLK konnten kaum gruppenspezifische Unterschiede in der Ausbildung von Effektor-(T_E) und Gedächtnisfunktionen (T_{EM}/T_{CM}) gezeigt werden. Jedoch konnten nach jeglicher Behandlung im PLK generell mehr CD8⁺ T_E-Zellen anteilig an der CD8⁺ T-Zellpopulation detektiert werden als im ALK (T_H1+ICB: 10,1±1,5% vs. 3,1±0,5%; T_H1: 6,5±0,7% vs. 2,1±0,1%; ICB: 8,6±0,6% vs. 2,9±0,4%; Sham: 3,1±0,2% vs. 1,8±0,4%), wobei der Anteil der CD8⁺ T_E-Zellen im PLK nach Kombinationstherapie tendenziell am höchsten war (**Abb. 46b**). Darüber hinaus wies der größte Anteil der CD8⁺ T-Zellen gruppenübergreifend und in beiden Lymphknoten eine zentrale Gedächtnis-Funktion auf (T_{CM}, ca. 30 - 45% der CD8⁺ T-Zellen) (**Abb. 46b**).

Als nächstes wurde die Oberflächenexpression von PD-1 und TIM-3 auf den CD8⁺ T-Zellen in den Lymphknoten untersucht.

Im PLK zeigte sich nach jeweiliger ICB-Behandlung eine erhöhte PD-1-Expression (T_H1+ICB: 10,3±1,7% der CD8⁺ T-Zellen; ICB 8,8±0,9% der CD8⁺ T-Zellen; *P*=0,39). Es traten jedoch, vermutlich aufgrund der starken Streuung, keine signifikanten Unterschiede zwischen der kombinierten Therapie und den Gruppen mit deutlich geringerer PD-1-Expression auf (T_H1: 3,4±0,6% der CD8⁺ T-Zellen, *P*=0,03; Sham: 2,1±0,2% der CD8⁺ T-Zellen, *P*=0,04) (**Abb. 47a,b**). Im ALK war der Anteil der PD-1 exprimierenden CD8⁺ T-Zellen zwar gruppenübergreifend geringer (im Mittel 4,6±0,5% nach T_H1+ICB-Therapie), die Unterschiede zur Kombinationstherapie waren jedoch in Abhängigkeit von der ICB-Behandlung signifikant (T_H1: 1,4±0,1%, *P*=0,016; Sham: 1,0±0,2%, *P*=0,016) (**Abb. 47a,b**).

Die TIM-3-Expression auf CD8⁺ T-Zellen war in den Lymphknoten im Gegensatz zur Expression auf CD8⁺ T-Zellen im TME marginal und wurde daher vernachlässigt (vgl. **Abb. 47b**).

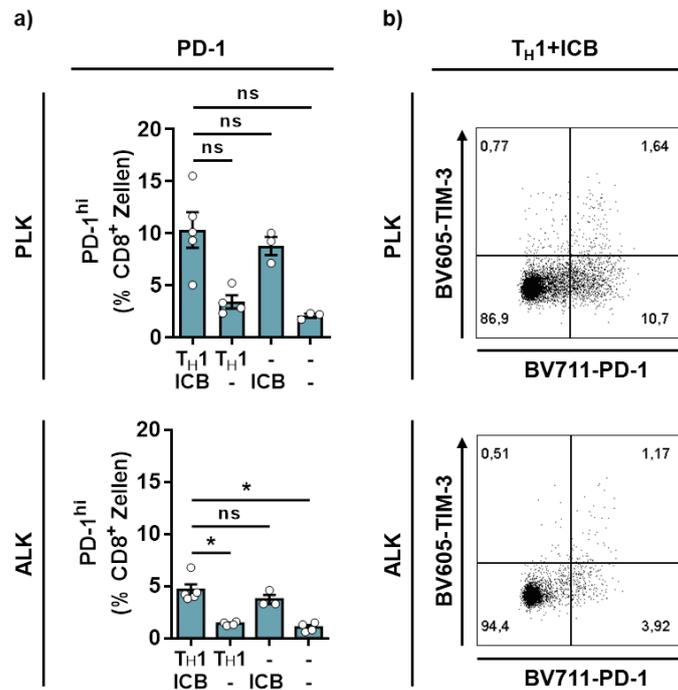


Abb. 47: Differenzierte Analyse der CD8⁺ T-Zellen in den Lymphknoten mit Fokus auf die PD-1 und TIM-3-Expression. Vergleichende Analyse von (a) PD-1^{hi} CD8⁺ T-Zellen im PLK (oben) und ALK (unten) von RT2-Mäusen dargestellt sind Mittelwerte ± SEM als prozentuale Anteile an der CD8⁺ T-Zellpopulation. Jeder Punkt repräsentiert eine untersuchte Einzelzellsuspension aus den Lymphknoten einer entsprechend behandelten RT2-Maus (T_H1+ICB, n = 5; T_H1, n = 4; ICB, n = 3; Sham (-/-), n = 3-4). Zur statistischen Auswertung wurde ein zweiseitiger Wilcoxon-Mann-Whitney-Test mit Bonferroni-Korrektur für Mehrfachtestungen (k = 3) verwendet (*P < 0,017; ns = nicht signifikant). (b) Repräsentative Plots der durchflusszytometrischen Analyse der PD-1- und TIM-3-Expression auf CD8⁺ T-Zellen in den LK nach Kombinationstherapie. Die Zahlen entsprechen dem prozentualen Anteil an der CD8⁺ T-Zellpopulation.

4.3.3.3 CD4⁺ Subpopulationen

Die CD4⁺ T-Zellpopulation wurde auch in den PLK und den ALK in therapeutische, *in vitro* aktivierte und anschließend applizierte T_H1-Zellen und in endogene (CD4^E) T-Zellen unterteilt. Prozentual stellten endogene CD4⁺ T-Zellen den größten Anteil der gesamten CD3⁺ T-Zellpopulation in den LKs dar. Therapeutische T_H1-Zellen wurden hauptsächlich im PLK detektiert (bis zu 38% der CD3⁺ T-Zellen) und daher im ALK vernachlässigt (vgl. Abb. 45).

Zunächst wurde die Antigenerfahrung der CD4⁺ Population anhand der Expression von CD44 untersucht. Dabei schien die Expression von CD44 auf CD4^E T-Zellen im PLK als Folge jeglicher Behandlung (T_H1+ICB, T_H1, ICB) tendenziell etwas höher zu sein als nach Scheinbehandlung, signifikante Unterschiede zur Kombinationstherapie

traten jedoch nicht auf ($T_{H1}+ICB$: $31,0 \pm 2,6\%$ der $CD4^E$ T-Zellen; Sham: $13,1 \pm 0,8\%$ der $CD4^E$ T-Zellen; $P = 0,04$) (**Abb. 48a**, mittig). Im ALK wurde auf den $CD4^E$ T-Zellen in allen Gruppen generell eine geringere CD44 Expression (zwischen ca. 6% und 11%) als im PLK detektiert, welche nur marginal durch die Behandlungen beeinflusst wurde; auch hier traten keine signifikanten Unterschiede auf (**Abb. 48a**, links).

Auf den therapeutischen T_{H1} -Zellen in den PLK wurde, wie bereits im TME, eine sehr hohe CD44-Expression detektiert. Diese wurde nicht weiter durch eine zusätzliche IC-Blockade beeinflusst ($T_{H1}+ICB$: $75,3 \pm 2,1\%$ der T_{H1} -Zellen; T_{H1} : $77,2 \pm 0,3\%$ der T_{H1} -Zellen; $P = 0,3$) (**Abb. 48a**, rechts).

Nach zusätzlicher Analyse der CD62L-Expression wurden die Antigen-erfahrenen $CD4^+$ T-Zellpopulation in T-Effektor/Gedächtniszellen ($T_{E/EM}$, $CD44^+/CD62L^-$) und zentrale Gedächtniszellen (T_{CM} , $CD44^+/CD62L^+$) unterteilt und anteilig an der jeweiligen $CD4^+$ T-Zellpopulation analysiert.

Innerhalb der endogenen $CD4^+$ T-Zell Population im PLK wurden in Folge aller therapeutischer Behandlungen im Mittel zwischen 17 und 24% $T_{E/EM}$ detektiert, am meisten nach Kombinationstherapie ($24,1 \pm 2,1\%$ der $CD4^E$ T-Zellen). Lediglich nach Scheinbehandlung war der $CD4^E$ T-Zellen Anteil mit $7,5 \pm 0,3\%$ vergleichsweise gering. Der Anteil der zentralen Gedächtniszellen (T_{CM}) an $CD4^E$ T-Zellen im PLK lag in jeder Gruppe gleichermaßen im Mittel zwischen sechs und sieben Prozent (**Abb. 48b**). Im ALK lagen $T_{E/EM}$ und T_{CM} nahezu in jeder Gruppe in gleichen Verhältnissen vor und rangierten im Mittel zwischen drei und sieben Prozent anteilig an der $CD4^E$ Population (**Abb. 48b**).

Therapeutische T_{H1} -Zellen besaßen im PLK, unabhängig von der Injektion des ICB-Cocktails, hauptsächlich $T_{E/EM}$ -Funktionen mit einem Anteil von 82 bis 86% an der gesamten T_{H1} -Zellpopulation. T_{CM} nahmen lediglich einen Anteil von 8 bis 9% ein (**Abb. 48b**).

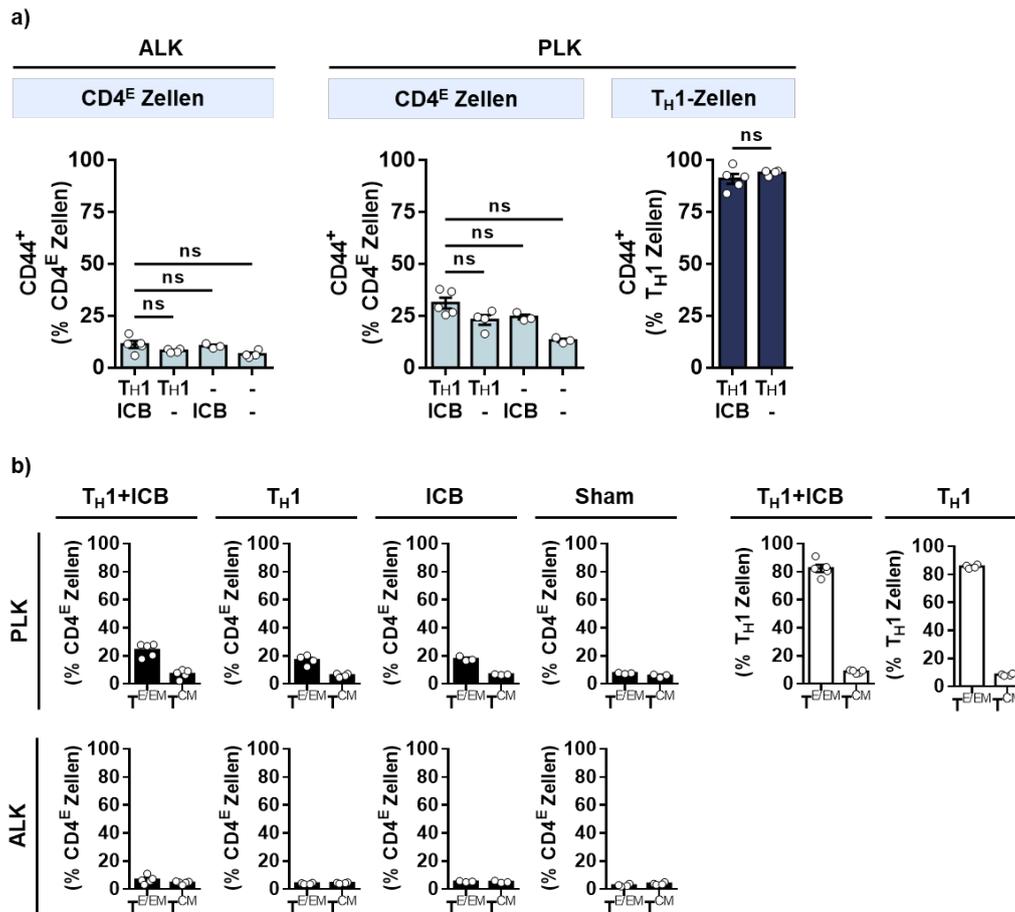


Abb. 48: Differenzierte Analyse der CD4⁺ T-Zellen in den Lymphknoten mit Fokus auf die Effektor-/Gedächtnis-Funktion. (a) Analyse der Antigen-erfahrenen endogenen (CD4^E) und therapeutischen (T_H1) CD4⁺ T-Zellen anhand der Zelloberflächenexpression von CD44. Dargestellt sind die Mittelwerte±SEM der prozentualen Anteile an der CD4^E bzw. T_H1-Zellpopulation in ALK (links) und PLK (rechts). Zur statistischen Auswertung wurde ein zweiseitiger Wilcoxon-Mann-Whitney-Test mit Bonferroni-Korrektur für Mehrfachtestungen (k = 3) verwendet (*P < 0,017; ns = nicht signifikant). **(b)** Differenzierte Analyse von Effektor- und Gedächtnis-Funktion anhand der Oberflächenexpression von CD44 und CD62L auf CD4^E und T_H1-Zellen. T_{E/EM} = T-Effektorzellen (CD44⁺/CD62L⁻); T_{CM} = zentrale Gedächtniszellen (CD44⁺/CD62L⁺). Dargestellt sind Mittelwerte±SEM anteilig an der CD4^E bzw. T_H1 Population im PLK (oben) und ALK (unten). Jeder Punkt repräsentiert eine untersuchte Zellsuspension aus einer RT2-Maus nach entsprechender Behandlung (T_H1+ICB, n = 5; T_H1, n = 4; ICB, n = 3; Sham (-/-), n = 3-4).

Die Untersuchungen mit Fokus auf die Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen anhand der CD69-Zelloberflächenexpression (nach Ausschluss CD25-positiver Zellen) zeigten im PLK eine höhere Expression von CD69 auf endogenen CD4⁺ T-Zellen (CD4^E) als im ALK, wie auch bereits für die CD8⁺ T-Zellpopulation gezeigt. Nach ICB-Mono- bzw. Kombinationstherapie lag die CD69-Expression von CD4^E T-Zellen im PLK bei 13,6±0,3% bzw. 13,5±1,4%. Die CD69-Expression von CD4^E T-Zellen war in der

scheinbehandelten Gruppe nur etwas geringer ($9,0 \pm 0,3\%$ der $CD4^E$ T-Zellen). Im ALK lag die CD69-Expression der $CD4^E$ T-Zellen in allen Gruppen generell bei ca. 6 bis 7% (Abb. 49a, links). Die applizierten T_H1 -Zellen im PLK zeigten in beiden Empfängergruppen eine gleichermaßen sehr starke CD69-Expression (T_H1+ICB : $62,5 \pm 3,6\%$ der T_H1 -Zellen; T_H1 : $62,6 \pm 2,2\%$ der T_H1 -Zellen) (Abb. 49a, rechts).

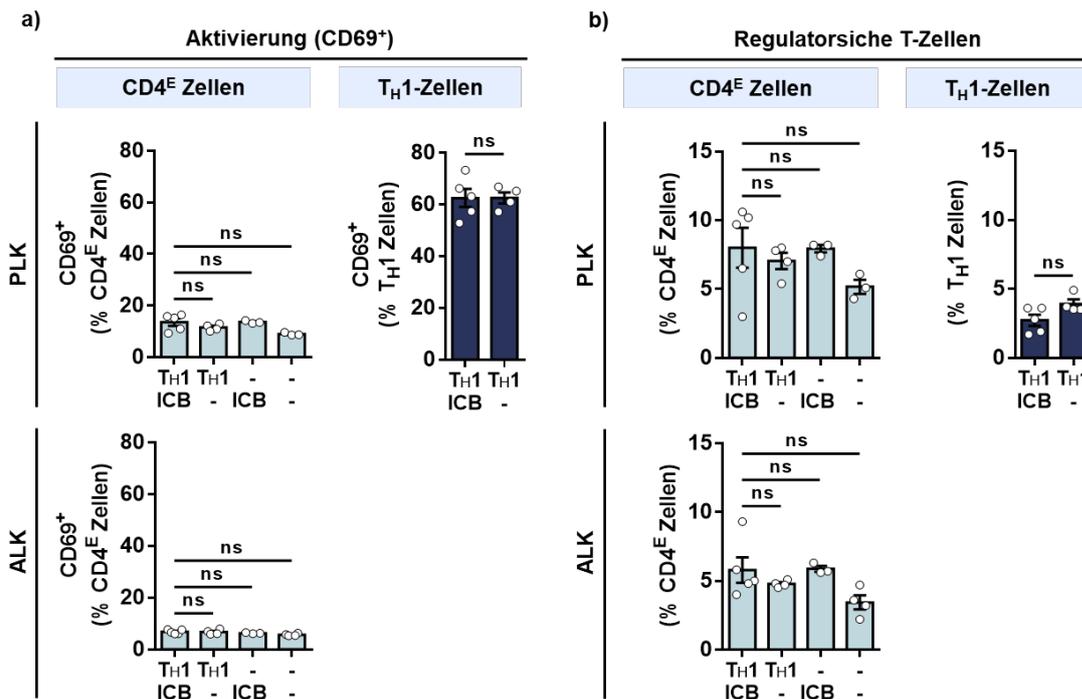


Abb. 49: Differenzierte Analyse der $CD4^+$ T-Zellen in den Lymphknoten mit Fokus auf die CD69-Expression und auf T_{reg} s. (a) Analyse aktivierter $CD4^E$ und T_H1 -Zellen anhand der CD69-Expression. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der prozentualen Anteile an CD69-positiven Zellen anteilig an der $CD4^E$ bzw. T_H1 -Zellpopulation im PLK und ALK. (b) Analyse von $CD4^E$ und T_H1 -Zellen in PLK und ALK hinsichtlich der Eigenschaften als T_{reg} . Diese wurden als Zellpopulationen mit einer geringen Expression an CD127 und hoher CD25-Expression ($CD25^+/CD127^{lo}$) klassifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM als prozentualer Anteil an den entsprechenden $CD4^+$ T-Zellpopulationen in den LK. Jeder Punkt repräsentiert eine untersuchte Einzelzellsuspension einer entsprechend behandelten RT2-Maus (T_H1+ICB , $n=5$; T_H1 , $n=4$; ICB, $n=3$; Sham (-/-), $n=3-4$). Zur statistischen Auswertung wurde ein zweiseitiger Wilcoxon-Mann-Whitney-Test mit Bonferroni-Korrektur für Mehrfachtestungen ($k=3$) verwendet (* $P < 0,017$; ns = nicht signifikant).

Die Lymphknoten wurden nun weiter auf die Anwesenheit von regulatorischen $CD4^+$ T-Zellen (T_{reg}) untersucht. Dazu wurde, wie bereits für $CD4^+$ T-Zellen im TME beschrieben (vgl. 4.3.2), die CD25- und CD127-Expression analysiert und in Relation zur entsprechenden $CD4^+$ T-Zell-Subpopulation gesetzt. $CD4^E$ T_{reg} -Zellen nahmen im PLK und ALK im Mittel zwischen 3 und 8% der endogenen $CD4^+$ T-Zellpopulation

ein, wobei im PLK tendenziell mehr T_{regs} vorhanden waren; signifikante Unterschiede wurden weder im PLK noch im ALK detektiert (**Abb. 49b**).

Auch unter den adoptiv transferierten T_{H1} -Zellen waren T_{regs} nur in geringem Maße im PLK nachweisbar ($T_{\text{H1}}+\text{ICB}$: $2,7 \pm 0,4\%$ der T_{H1} -Zellen; T_{H1} : $3,9 \pm 0,3\%$ der T_{H1} -Zellen). Deren Expression wurde durch zusätzlichen Gabe des ICB-Cocktails lediglich geringfügig beeinflusst (**Abb. 49b**). Auf eine Auswertung der T_{H1} -Zellen im ALK wurde aufgrund der geringen Zellzahl verzichtet (vgl. **Abb. 45**).

Schließlich wurde die Oberflächenexpression von PD-1 und TIM-3 der $CD4^+$ T-Zellen in den Lymphknoten untersucht. Als Folge einer Behandlung mit dem therapeutischen Antikörpercocktail (ICB) zeigten $CD4^E$ T-Zellen eine erhöhte PD-1-Expression in beiden Lymphknoten; die Expression war dabei im PLK stärker ausgeprägt (PLK: im Mittel zwischen 14% und 18% der $CD4^E$ T-Zellen; ALK: ca. 5%) (**Abb. 50a**). Auch die PD-1-Expression auf den therapeutischen T_{H1} -Zellen im PLK wurde durch die zusätzliche ICB-Behandlung tendenziell erhöht ($T_{\text{H1}}+\text{ICB}$: $3,5 \pm 1,0\%$ der T_{H1} -Zellen; T_{H1} : $1,3 \pm 0,4\%$ der T_{H1} -Zellen) (**Abb. 50a**).

Die TIM-3-Expression auf $CD4^E$ T-Zellen als auch auf T_{H1} -Zellen war marginal und wurde daher vernachlässigt (**Abb. 50b**). Auf eine Auswertung der T_{H1} -Zellen im ALK wurde aufgrund der bereits oben erwähnten geringen Anzahl gänzlich verzichtet (vgl. **Abb. 45**).

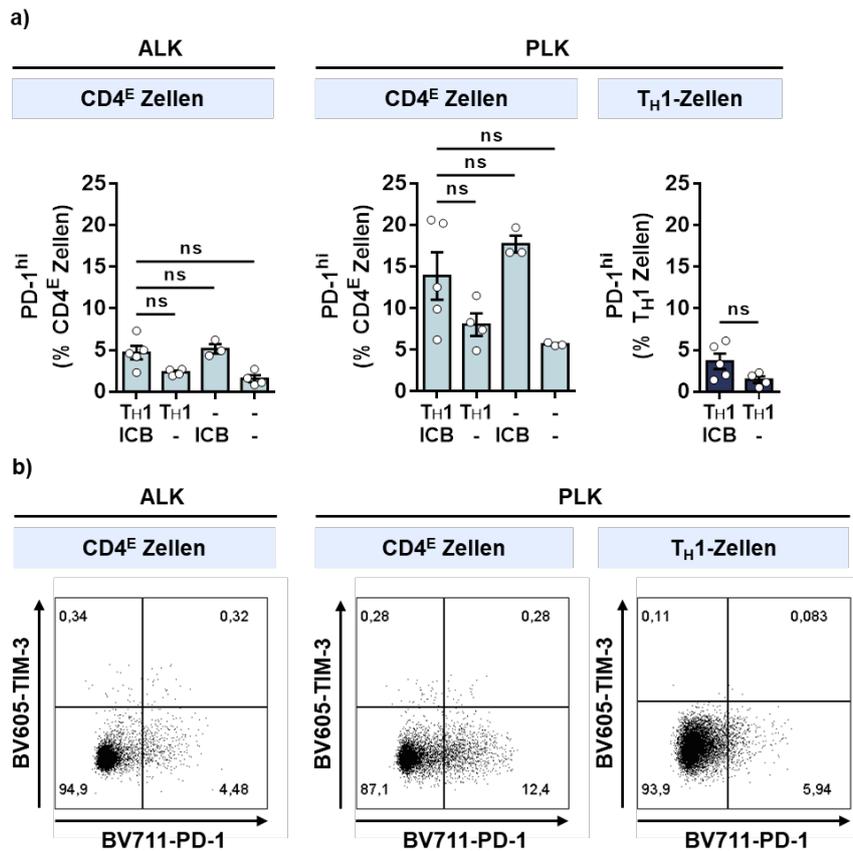


Abb. 50: Differenzierte Analyse der CD4⁺ T-Zellen in den Lymphknoten mit Fokus auf die PD-1 und TIM-3-Expression. (a) Abbildung der endogenen (CD4^E) und therapeutischen (T_H1) T-Zellpopulationen mit starker PD-1-Expression bei fehlender TIM-3-Expression. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM als prozentualer Anteil an den entsprechenden CD4⁺ T-Zellpopulationen (CD4^E T-Zellen und T_H1-Zellen) im ALK (links) bzw. PLK (rechts). Jeder Punkt repräsentiert eine untersuchte Einzelzellsuspension einer entsprechend behandelten RT2-Maus (T_H1+ICB, n = 5; T_H1, n = 4; ICB, n = 3; Sham (-/-), n = 3-4). Zur statistischen Auswertung wurde ein zweiseitiger Wilcoxon-Mann-Whitney-Test mit Bonferroni-Korrektur für Mehrfachtestungen (k = 3) verwendet (* $P < 0,017$; ns = nicht signifikant). (b) Repräsentative Plots der durchflusszytometrischen Analyse der PD-1- und TIM-3-Expression auf CD4^E und auf T_H1-Zellen im ALK bzw. PLK nach Kombinationstherapie. Die Zahlen entsprechen dem prozentualen Anteil an der jeweiligen CD4⁺ T-Zellpopulation.

4.3.4 Untersuchung der systemischen Immunantwort in der Milz

4.3.4.1 T-Zellphänotypen

Um neben der Untersuchung des axillären Lymphknotens einen weiteren Eindruck der systemischen T-Zellantwort nach Kombinationstherapie zu bekommen, wurden schließlich die Milzen der RT2-Mäuse mittels Durchflusszytometrie analysiert. Auch hier wurde die gesamte CD3⁺ T-Zellpopulation zunächst in die drei unterschiedlichen Subpopulationen (CD4^E T-Zellen, T_H1-Zellen und CD8⁺ T-Zellen) unterteilt.

Anschließend wurden diese auf deren Antigenerfahrung, Gedächtnisfunktionen und Expression der ICs PD-1 und TIM-3 untersucht.

Abb. 51a zeigt den mittleren prozentualen Anteil der drei T-Zell Phänotypen an lebenden Zellen in der Milz. Wie bereits unter 4.3.1 beschrieben, war die gesamte CD3⁺ T-Zellpopulation der Milz anteilig an allen lebenden Zellen nach Kombinationstherapie im Vergleich zur Mono- bzw. Scheinbehandlung nicht signifikant erhöht. CD3⁺ T-Zellen nahmen im Mittel 11,0±0,4% (ICB) bis 15,9±1,0% (T_H1+ICB) der lebenden Zellfraktion der Milz ein (vgl. **Abb. 37**).

So wie im PLK verschoben sich auch in der Milz die Anteile der endogenen CD4^E T-Zellen an der CD3⁺ T-Zellpopulation zugunsten der therapeutischen T_H1-Zellen. Nach deren Injektion stellten die T_H1-Zellen 9,9±1,1% (T_H1+ICB) bzw. 11,6±0,3% (T_H1) der CD3⁺ T-Zellpopulation dar (**Abb. 51a,b**). Der Anteil der CD4^E T-Zellen an der CD3⁺ T-Zellpopulation reduzierte sich von 72,4±0,4% nach ICB-Behandlung durch zusätzliche Injektion von T_H1-Zellen signifikant auf 63,3±2,0% (*P* = 0,036) (**Abb. 51b**, links). Der Anteil der CD8⁺ T-Zellen an der CD3⁺ T-Zellpopulation blieb unverändert und lag im Mittel in den Milzen aller analysierten Gruppen bei ca. 12 - 15% (**Abb. 51b**, rechts).

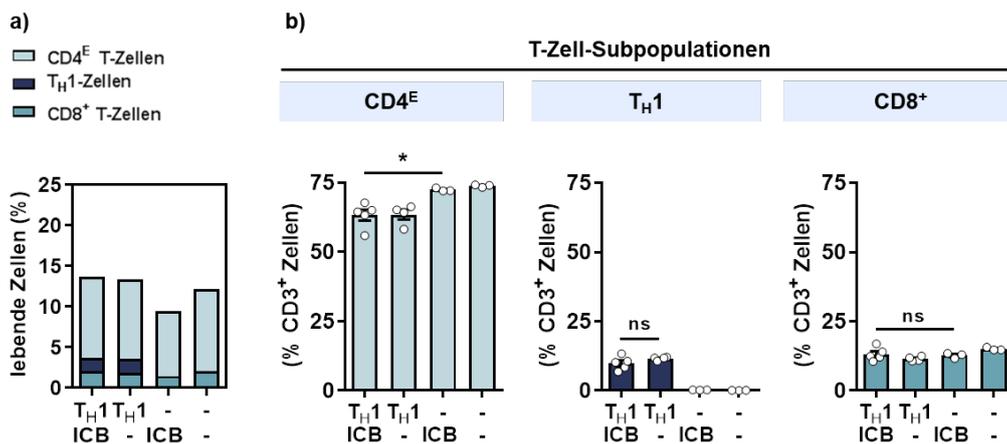


Abb. 51: T-Zellphänotypen in der Milz. **(a)** Darstellung der Verteilung der CD3⁺ T-Zell-Subpopulationen (CD8⁺ T-Zellen, endogene (CD4^E) und therapeutische (T_H1) CD4^E T-Zellen) in der Milz von RT2-Mäusen. Dargestellt sind die Mittelwerte als Prozent der lebenden Zellen. **(b)** Detaillierte Analyse der CD3⁺ T-Zell-Subpopulationen aus a). Dargestellt sind Mittelwerte±SEM. Jeder Punkt repräsentiert eine untersuchte Milz-Zellsuspension einer entsprechend behandelten RT2-Maus (T_H1+ICB, n=5; T_H1, n=4; ICB, n=3; Sham (-/-), n=3). Zur statistischen Auswertung wurde ein zweiseitiger Wilcoxon-Mann-Whitney-Test mit Bonferroni-Korrektur für Mehrfachtestungen (k=3) verwendet (**P* < 0,017, ns = nicht signifikant).

4.3.4.2 CD8⁺ Subpopulationen

Zunächst wurde die CD8⁺ T-Zell-Subpopulation auch in der Milz auf die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 und auf die Ausbildung von Effektor- oder Gedächtnisfunktionen (CD62L und CD127) untersucht.

Wie auch bereits im PLK beobachtet, wurde innerhalb der CD8⁺ T-Zellpopulation in der Milz durch die wiederholte Verabreichung des ICB-Cocktails eine erhöhte CD69-Expression detektiert (T_H1+ICB: 7,1±1,5% der CD8⁺ T-Zellen; ICB: 7,3±0,7% der CD8⁺ T-Zellen). Während eine alleinige Behandlung mit T_H1-Zellen im Vergleich zur Scheinbehandlung keine höhere CD69-Expression zur Folge hatte (3,8±0,2% vs. 3,5±0,2% der CD8⁺ T-Zellen, $P=0,2$), konnte diese durch die zusätzliche Verabreichung des ICB-Cocktails signifikant gesteigert werden (T_H1+ICB, $P=0,016$) (Abb. 52a).

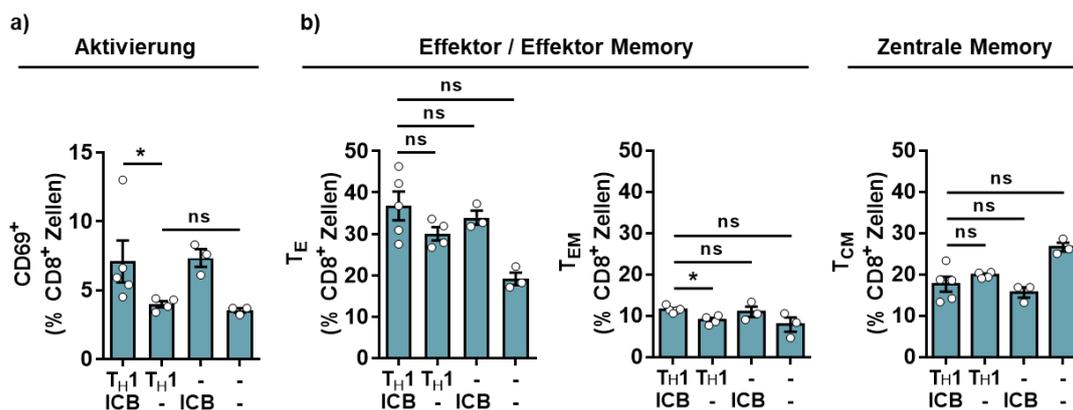


Abb. 52: Differenzierte Analyse der CD8⁺ T-Zellen in der Milz mit Fokus auf die CD69-Expression und Effektor-/Gedächtnis-Subpopulationen. (a) Darstellung aktivierter CD8⁺ T-Zellen (CD69⁺) anteilig an der CD8⁺ Fraktion in der Milz. Zur statistischen Auswertung wurde ein zweiseitiger Wilcoxon-Mann-Whitney-Test mit Bonferroni-Korrektur für Mehrfachtestungen ($k=2$) verwendet ($*P<0,025$; ns = nicht signifikant). **(b)** Analyse der Effektor- und Gedächtnis-Funktion von CD8⁺ T-Zellen anhand der Oberflächenexpression von CD127 und CD62L. T_E = T-Effektorzellen (CD127⁺/CD62L⁻); T_{EM} = Effektor/Gedächtniszellen (CD127⁺/CD62L⁺); T_{CM} = zentrale Gedächtniszellen (CD127⁺/CD61L⁺). Zur statistischen Auswertung wurde ein zweiseitiger Wilcoxon-Mann-Whitney-Test mit Bonferroni-Korrektur für Mehrfachtestungen ($k=3$) verwendet ($*P<0,017$; ns = nicht signifikant). Dargestellt sind Mittelwerte±SEM als prozentualer Anteil an der CD8⁺ T-Zellfraktion. Jeder Punkt repräsentiert eine untersuchte Zellsuspension der Milz einer RT2-Maus nach entsprechender Behandlung (T_H1+ICB, $n=5$; T_H1, $n=4$; ICB, $n=3$; Sham (-/-), $n=3$).

Hinsichtlich der T-Effektor- und T-Gedächtnis-Funktionen waren in der Milz als Folge jeglicher Behandlung prinzipiell mehr CD8⁺ T-Effektorzellen (T_E, ca. 30 - 37% der

CD8⁺ T-Zellen) und weniger T-Gedächtniszellen (T_{EM} und T_{CM}, ca. 27 - 29% der CD8⁺ T-Zellen) anzutreffen als nach Scheinbehandlung (T_E: ca. 19%; T_{EM} und T_{CM}: ca. 35% der CD8⁺ T-Zellen). Die Kombination von T_H1-Zellen mit dem ICB-Cocktail steigerte in der Milz den Anteil von T_{EM}-Zellen an CD8⁺ T-Zellen signifikant (11,5±0,4%) im Vergleich zur T_H1-Zell-Monotherapie (9,0±0,5%, *P* = 0,016) (Abb. 52b).

Anschließend wurde die Oberflächenexpression von PD-1 und TIM-3 auf CD8⁺ T-Zellen analysiert. Dabei konnte erneut, wie auch bereits im TME und den Lymphknoten, beobachtet werden, dass die therapeutische Applikation des ICB-Cocktails eine gesteigerte PD-1-Expression auf den CD8⁺ T-Zellen zur Folge hat. Der Anteil an PD-1^{hi} CD8⁺ T-Zellen an der CD8⁺ T-Zellpopulation konnte im Rahmen der Kombinationstherapie von 5,8±0,6% (T_H1) auf 18,1±2,6% (T_H1+ICB, *P* = 0,016) gesteigert werden (Abb. 53, links).

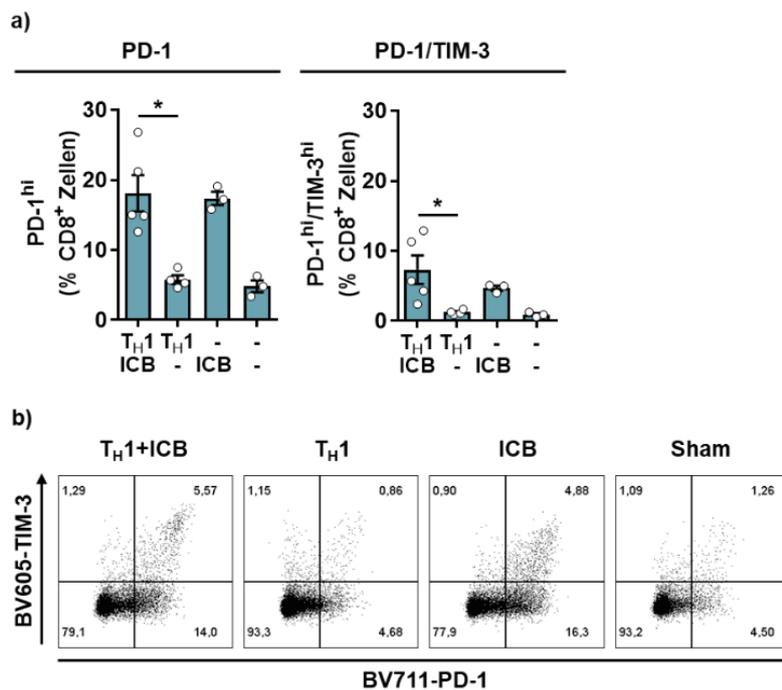


Abb. 53: Differenzierte Analyse der CD8⁺ T-Zellen in der Milz mit Fokus auf die PD-1- und TIM-3-Expression. (a) Vergleichende Analyse von PD-1^{hi} und PD-1^{hi}/TIM-3^{hi} CD8⁺ T-Zellen in der Milz von RT2-Mäusen. Dargestellt sind die Mittelwerte±SEM als prozentualer Anteile an der CD8⁺ T-Zellpopulation. Jeder Punkt repräsentiert eine untersuchte Milz-Zellsuspension einer entsprechend behandelten RT2-Maus (T_H1+ICB, n = 5; T_H1, n = 4; ICB, n = 3; Sham (-/-), n = 3). Zur statistischen Auswertung wurde ein zweiseitiger Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verwendet (**P* < 0,05; ns = nicht signifikant). (b) Repräsentative Plots der durchflusszytometrischen Analyse der PD-1- und

TIM-3-Expression auf CD8⁺ T-Zellen in der Milz. Die Zahlen entsprechen dem prozentualen Anteil an der CD8⁺ T-Zellpopulation.

Auch die TIM-3 Co-Expression nahm als Folge wiederholter Injektionen des ICB-Cocktails zu. Nach Kombinationstherapie wurde bei $7,3 \pm 2,0\%$ der CD8⁺ T-Zellen eine hohe PD-1/TIM-3 Co-Expression detektiert. Im Vergleich dazu konnten nach alleiniger T_H1-Zell-Therapie lediglich $2,3 \pm 0,2\%$ der CD8⁺ T-Zellen, also signifikant weniger ($P=0,16$), mit einem PD-1^{hi}/TIM-3^{hi} Phänotyp detektiert werden (**Abb. 53**, rechts).

4.3.4.3 CD4⁺ Subpopulationen

Auch in der Milz wurde generell zwischen den therapeutischen, *in vitro* aktivierten und anschließend applizierten T_H1-Zellen und den endogenen CD4⁺ (CD4^E) T-Zellen unterschieden. Prozentual stellten endogene CD4⁺ T-Zellen, mit ca. 63% (T_H1; T_H1+ICB) bis 73% (ICB; Sham) den größten Anteil der gesamten CD3⁺ T-Zellpopulation in der Milz dar. Therapeutische T_H1-Zellen nahmen ca. 10-12% der CD3⁺ T-Zellpopulation ein (siehe **Abb. 51**).

Eine Betrachtung des Zell-Adhäsions-Markers CD44 auf endogenen CD4⁺ T-Zellen zeigte in Folge der ICB-Monotherapie dessen leicht erhöhte Expression im Vergleich zur Scheinbehandlung ($46,0 \pm 4,0\%$ vs. $33,3 \pm 0,5\%$ der CD4^E T-Zellen). Durch die T_H1-Zell-Monotherapie blieb die CD44-Expression jedoch unverändert und konnte erst wieder in Kombination mit einer IC-Blockade gesteigert werden (T_H1+ICB, $45,0 \pm 2,2\%$ der CD4^E T-Zellen, $P=0,064$). Die therapeutischen T_H1-Zell-Injektionen führten folglich in der Milz zu keiner gesteigerten Antigenerfahrung der endogenen CD4⁺ T-Zellen (**Abb. 54a**, links). Die CD44-Expression der therapeutischen T_H1-Zellen lag in der Milz bei 76% - 79% (**Abb. 54a**, rechts).

Die zusätzliche Betrachtung des Zelloberflächenmarkers CD62L zeigte, dass es sich bei den CD4^E T-Zellen sowie den T_H1-Zellen hauptsächlich um T-Effektor/Gedächtniszellen (T_{E/EM}) handelte und weniger um zentrale Gedächtniszellen (T_{CM}). Lediglich 4 bis 5% der jeweiligen CD4⁺ T-Zell-Sopulationen lagen in allen Versuchsgruppen als zentrale Gedächtniszellen vor (**Abb. 54b,c**).

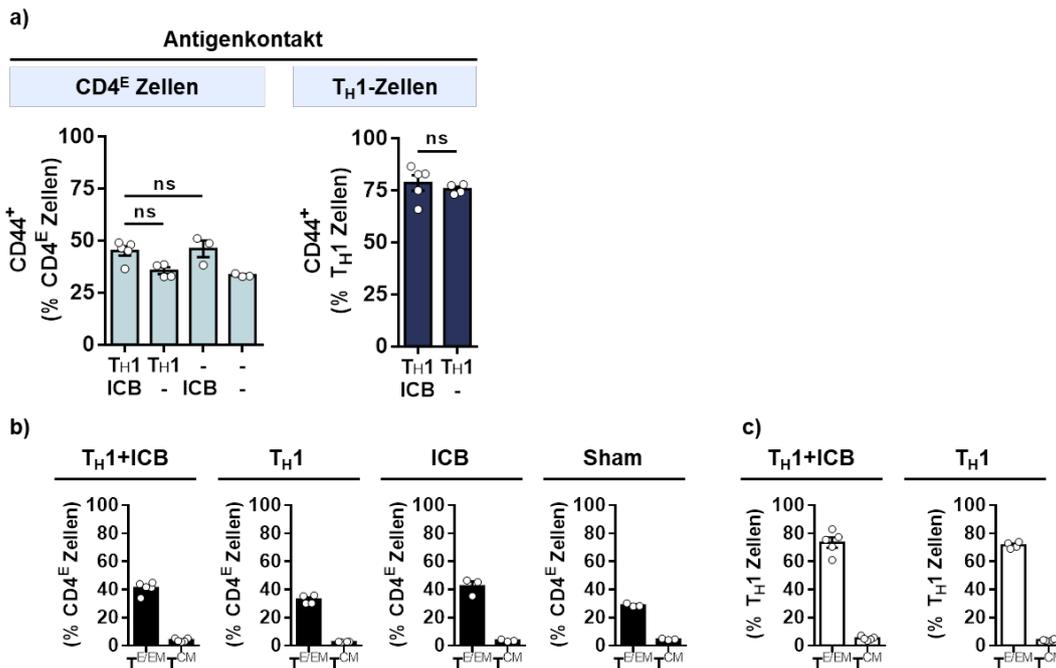


Abb. 54: Differenzierte Analyse der CD4⁺ T-Zellen in der Milz mit Fokus auf die Effektor-/Gedächtnis-Funktion. (a) Analyse der Antigen-erfahrenen endogenen (CD4^E) und therapeutischen (T_H1) CD4⁺ T-Zellen anhand der Zelloberflächenexpression von CD44. Dargestellt sind die Mittelwerte±SEM der prozentualen Anteile an der CD4^E bzw. T_H1-Zellpopulation. Zur statistischen Auswertung wurde ein zweiseitiger Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verwendet (*P < 0,05; ns = nicht signifikant). **(b,c)** Differenzierte Analyse von Effektor- und Gedächtnis-Funktion anhand der Oberflächenexpression von CD44 und CD62L auf CD4^E **(b)** und T_H1-Zellen **(c)**. T_{E/EM} = T-Effektorzellen (CD44⁺/CD62L⁻); T_{CM} = zentrale Gedächtniszellen (CD44⁺/CD62L⁺). Dargestellt sind Mittelwerte±SEM anteilig an der CD4^E bzw. T_H1 Population in der Milz. Jeder Punkt repräsentiert eine untersuchte Milz-Zellsuspension aus einer RT2-Maus nach entsprechender Behandlung (T_H1+ICB, n = 5; T_H1, n = 4; ICB, n = 3; Sham (-/-), n = 3).

Im Anschluss wurde auch für die CD4⁺ T-Zellen der Milz die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 (unter Ausschluss des CD25-Signals) auf der Zelloberfläche untersucht. Verglichen mit der T_H1-Zell-Monotherapie wurde auf den CD4^E T-Zellen in Folge der Kombinationstherapie eine höhere CD69-Expression detektiert (9,1±0,4% CD4^E T-Zellen vs. 11,9±0,5% CD4^E T-Zellen; P=0,016), jedoch reichte auch die alleinige Behandlung mit den IC-blockierenden Antikörpern bereits aus um eine ähnlich hohe CD69-Expression auf den CD4^E T-Zellen zu induzieren (13,4±0,5% der CD4^E T-Zellen) (**Abb. 55a**).

Die therapeutischen T_H1-Zellen lagen in beiden Empfängergruppen mit einer nahezu identischen CD69-Expression vor (T_H1+ICB: 16,3±3,5%; T_H1: 16,2±1,6%) (**Abb. 55a**). Die CD69-Expression von endogenen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen scheint

also in sekundär lymphatischen Organen, als systemischer Effekt, exklusiv durch die ICB-Behandlung deutlich gesteigert zu werden.

Die weitere Analyse der CD25- und CD127-Expression innerhalb der CD4⁺ T-Zellpopulationen zeigte, dass nur 0,5% der therapeutischen T_H1-Zellen dem regulatorischen Phänotyp (T_{reg}, CD127^{lo}/CD25⁺) zugeordnet werden konnten (Abb. 55b, rechts). Auch innerhalb der CD4^E Subpopulation konnten gruppenübergreifend im Mittel lediglich 3 - 5% T_{regs} in der Milz detektiert werden. Es traten keine signifikanten Unterschiede auf (Abb. 55b).

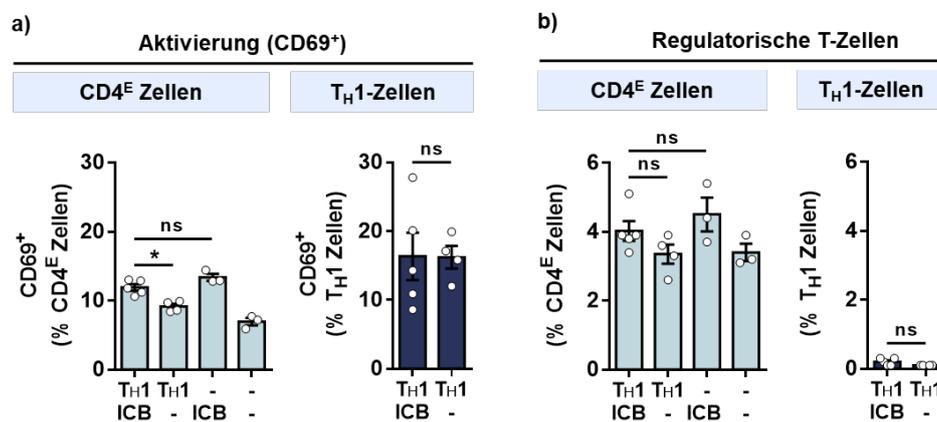


Abb. 55: Differenzierte Analyse der CD4⁺ T-Zellen in der Milz mit Fokus auf die CD69-Expression und T_{regs}. (a) Analyse der CD69-Expression aktivierter CD4^E und T_H1-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der prozentualen Anteile CD69-positiver Zellen anteilig an der CD4^E bzw. T_H1-Zellpopulation. (b) Analyse von CD4^E und T_H1-Zellen hinsichtlich der Expression von CD127 und CD25 als Marker für T_{regs}. T_{regs} wurden als Zellpopulationen mit einer geringen CD127-Expression und hohen CD25-Expression (CD127^{lo}/CD25⁺) klassifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM als prozentualer Anteil an den entsprechenden CD4⁺ T-Zellpopulationen in der Milz. Jeder Punkt repräsentiert eine untersuchte Milz-Einzelzellsuspension einer entsprechend behandelten RT2-Maus (T_H1+ICB, n=5; T_H1, n=4; ICB, n=3; Sham (-/-), n=3). Zur statistischen Auswertung wurde ein zweiseitiger Wilcoxon-Mann-Whitney-Test mit Bonferroni-Korrektur für Mehrfachtestungen (k=2) verwendet (*P < 0,025; ns = nicht signifikant).

Abschließend wurde die Oberflächenexpression von PD-1 und TIM-3 auf den CD4⁺ T-Zellen der Milz untersucht. Hauptsächlich CD4^E Zellen exprimierten PD-1. Im Vergleich zur Kombinationstherapie (32,7 \pm 3,1% der CD4^E T-Zellen) wurden nach alleiniger T_H1-Zell-Behandlung anteilig an der CD4^E T-Zellpopulation signifikant weniger PD-1⁺ Zellen detektiert (18,2 \pm 0,8%, P=0,01). Auch nach alleiniger ICB-Behandlung wurde eine erhöhte PD-1-Expression von CD4^E T-Zellen beobachtet (40,5 \pm 2,2% der CD4^E T-Zellen), tendenziell sogar höher als in Folge der

Kombinationstherapie (Abb. 56a, links). Auf den therapeutischen T_H1 -Zellen wurde PD-1 im Rahmen der Kombinationstherapie nur schwach exprimiert ($4,1 \pm 0,9\%$ der T_H1 -Zellen) und war nach alleiniger T_H1 -Zell-Behandlung kaum detektierbar ($1,5 \pm 0,2\%$ der T_H1 -Zellen) (Abb. 56a, rechts).

TIM-3 wurde auf $CD4^E$ T-Zellen wie auch auf T_H1 -Zellen in der Milz nur marginal exprimiert. (Abb. 56b).

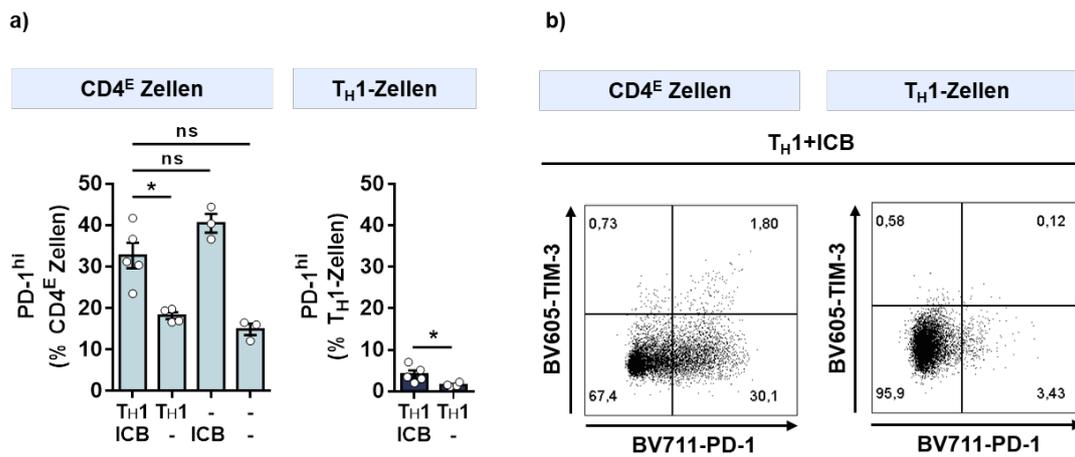


Abb. 56: Differenzierte Analyse der $CD4^+$ T-Zellen in der Milz mit Fokus auf die PD-1- und TIM-3-Expression. (a) Abbildung der endogenen ($CD4^E$) und therapeutischen (T_H1) T-Zellpopulationen mit starker PD-1-Expression bei fehlender TIM-3-Expression. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM als prozentualer Anteil an den entsprechenden $CD4^E$ T-Zellpopulationen ($CD4^E$ T-Zellen und T_H1 -Zellen). Jeder Punkt repräsentiert eine untersuchte Einzelzellsuspension einer entsprechend behandelten RT2-Maus (T_H1+ICB , $n=5$; T_H1 , $n=4$; ICB, $n=3$; Sham (-/-), $n=3$). Zur statistischen Auswertung wurde ein zweiseitiger Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verwendet (T_H1 : $*P < 0,05$; $CD4^E$: Bonferroni-Korrektur für Mehrfachtestungen, $k=3$; $*P < 0,017$; ns = nicht signifikant). (b) Repräsentative Plots der durchflusszytometrischen Analyse der PD-1- und TIM-3-Expression auf $CD4^E$ und auf T_H1 -Zellen in der Milz nach Kombinationstherapie. Die Zahlen entsprechen dem prozentualen Anteil an der jeweiligen $CD4^+$ T-Zellpopulation.

4.4 Untersuchung des Glukosemetabolismus in der Milz zur Beurteilung des Ansprechens auf IC-basierte Immuntherapien

Wie bereits oben erwähnt, sind die Ergebnisse unter Abschnitt 4.4. Teil folgender Publikation: J. Schwenck und B. Schörg* et al. (Theranostics, 2020)¹⁷³*

Die Identifizierung von Patienten, welche auf die neuartigen Checkpoint-Inhibitor-basierten Immuntherapien ansprechen, stellt derzeit noch eine große Herausforderung in der klinischen Praxis dar. Laufend werden neue Strategien entwickelt und Methoden untersucht, die eine bessere Patientenstratifikation und eine Prognose zum Therapieerfolg vor und während der Behandlung ermöglichen sollen (1.6).

Da aktivierte Immunzellen, wie auch Tumorzellen, dem Warburg-Effekt unterliegen und somit eine erhöhte Glykolyserate haben¹⁷⁵⁻¹⁷⁷, wurden RT2-Mäuse unter Immuntherapie im Folgenden hinsichtlich ihres Glukosemetabolismus in der Milz untersucht. Zunächst wurde dafür die bereits unter Abschnitt 4.1 und 4.2 untersuchte und etablierte T_H1-Zell-basierte Kombinationstherapie angewandt. Um zusätzlich einen klinisch etablierten Therapieansatz am Patienten wieder zu spiegeln, wurden RT2-Mäuse einer exklusiven Checkpoint-Inhibitor-Therapie (CIT) unterzogen, welche ohne eine initiale Immunzelldepletion und ohne einen adoptiven T_H1-Zell-Transfer auskam (3.9). Zur Untersuchung des Glukosemetabolismus in der Milz wurde die Anreicherung des radioaktiv markierten Glukoseanalogon ¹⁸F-FDG vor, während, oder nach vierwöchiger Behandlung der Versuchstiere mittels PET und MRT detektiert (3.11).

4.4.1 Untersuchung der Dynamik der ¹⁸F-FDG-Anreicherung in der Milz naiver RT2-Mäuse

Zunächst wurde die Dynamik der ¹⁸F-FDG-Aufnahme in die Milz von naiven RT2-Mäusen im Alter von zehn bis elf Wochen untersucht. Die Tiere wurden hierzu bereits

*gleichberechtigte Erstautoren

vor der intravenösen Injektion von jeweils $12,5 \pm 0,1$ MBq ^{18}F -FDG auf dem PET-Scanner platziert. Die Verteilung des Radiotracers wurde nach dessen Applikation über einen Zeitraum von 60 min *in vivo* verfolgt (3.11.3.1).

Abb. 57 stellt die Zeit-Aktivitätskurve von ^{18}F -FDG in der Milz naiver RT2-Mäuse und somit die zeitliche Dynamik der Akkumulation des Radiotracers dar. Innerhalb der ersten Minuten nach ^{18}F -FDG-Injektion konnte ein rascher Anstieg der Aktivität auf max. $8,4$ %ID/cm³ beobachtet werden (extrazelluläres ^{18}F -FDG in der Blutzirkulation), welcher dann wieder abfiel und sich nach ca. zwanzig Minuten im Mittel auf ein stabiles Niveau von $4,3 \pm 0,2$ %ID/cm³ einpendelte. Somit wurde das letzte Intervall nach 45 min mit einer Länge von 15 min zur weiteren Beurteilung der spezifischen ^{18}F -FDG Anreicherung in die Milz ausgewählt. Alle weiteren ^{18}F -FDG PET Akquisitionen wurden also 45 min nach der jeweiligen ^{18}F -FDG-Injektion in die Versuchstiere gestartet und für eine Dauer von 15 min durchgeführt.

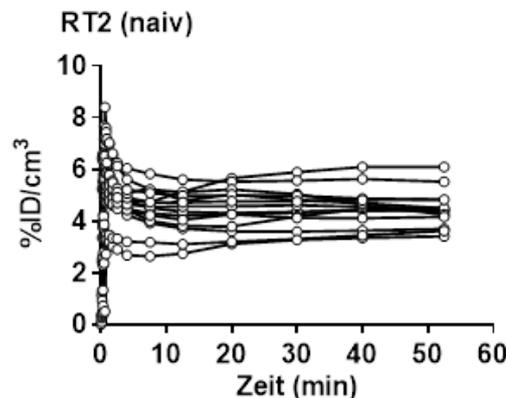


Abb. 57: ^{18}F -FDG Anreicherung in der Milz naiver RT2-Mäuse. Zeit-Aktivitätskurve der Akkumulation von ^{18}F -FDG in die Milz von RT2-Mäusen im Alter von zehn bis elf Wochen ($n = 14$), welche zuvor weder bestrahlt noch behandelt wurden. Der Messzeitraum von 60 min wurde in 19 Zeitfenster unterteilt. Jede Linie repräsentiert die Messung eines Tieres; jeder Punkt den Mittelwert der Akkumulation des Radiotracers (%ID/cm³) zum mittleren Zeitpunkt des jeweiligen Fensters.

4.4.2 Anreicherung von ^{18}F -FDG in der Milz von RT2-Mäusen nach Kombinationstherapie

Nachdem eine Anreicherung von ^{18}F -FDG in der Milz von unbehandelten RT2-Mäusen beobachtet werden konnte (4.4.1), sollte nun untersucht werden, ob die Aufnahme des Radiotracers in die Milz durch die vierwöchige Kombinationstherapie ($T_{\text{H}1} + \text{ICB}$) beeinflusst wird. Dazu wurden RT2-Mäuse, wie unter Abschnitt 3.8

beschrieben, im Kurzzeitversuch mit T_H1 -Zellen und dem Immun-Checkpoint-blockierenden Antikörpercocktail PD-L1/LAG-3 behandelt. Die Versuchstiere wurden vier Tage nach der letzten Injektion der therapeutischen Antikörper via ^{18}F -FDG PET und MRT untersucht (Abb. 58).

^{18}F -FDG-PET/MRT nach kombinierter Immuntherapie

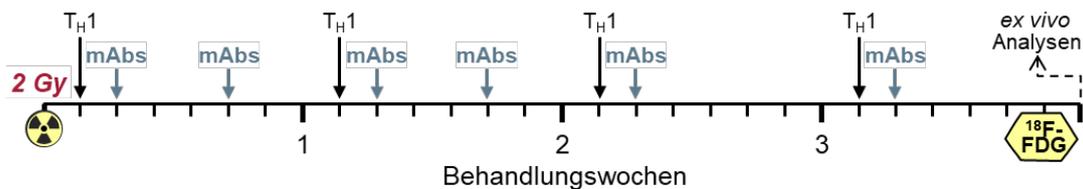


Abb. 58: Versuchsaufbau zur Untersuchung des Glukosemetabolismus in der Milz nach Kombinationstherapie. Die Zeitachse gibt die Tage der jeweiligen Behandlungs- und Scanzzeitpunkte der Versuchstiere wieder. Die Kombinationstherapie wurde in zehn bis elf Wochen alten RT2-Mäusen im fortgeschrittenen Tumorstadium gestartet. Die ^{18}F -FDG-PET und MRT Akquisitionen wurden vier Tage nach der finalen Antikörperinjektion angesetzt (gelbe Wabe). Die Tötung und Organentnahme für die darauffolgenden *ex vivo* Analysen fand am darauffolgenden Tag statt. T_H1 = wiederholte Injektion von 10^7 Tag2-Th1-Zellen (*i.p.*); mAbs = wiederholte Injektion der IC-inhibierenden Antikörper (ICB) bzw. der Isotyp-Kontrollantikörper; 2 Gy = Niedrigdosis Ganzkörperbestrahlung (modifiziert nach Schwenck et al., 2020)¹⁷³.

Tatsächlich konnte in der Milz von RT2-Mäusen nach Kombinationstherapie (T_H1 +ICB) im Vergleich zur Milz Sham-behandelter Kontrolltiere eine deutlich erhöhte ^{18}F -FDG Aufnahme beobachtet werden (Abb. 57a). Ein quantitativer Vergleich aller Gruppen zeigte exklusiv nach T_H1 +ICB-Behandlung eine signifikant gesteigerte ^{18}F -FDG Aufnahme ($6,1 \pm 0,6 \% \text{ID}/\text{cm}^3$) verglichen zu Sham-behandelten Kontrolltieren ($3,1 \pm 0,4 \% \text{ID}/\text{cm}^3$, $P=0,008$) (Abb. 59b). Zudem zeigten die Milzen T_H1 -Zell-behandelter Mäuse, im Gegensatz zu den Milzen der lediglich mit ICB-behandelten Mäuse, einen leichten, aber nicht signifikanten Volumenanstieg verglichen mit den Milzen der Sham-behandelten Versuchstiere (Abb. 59c).

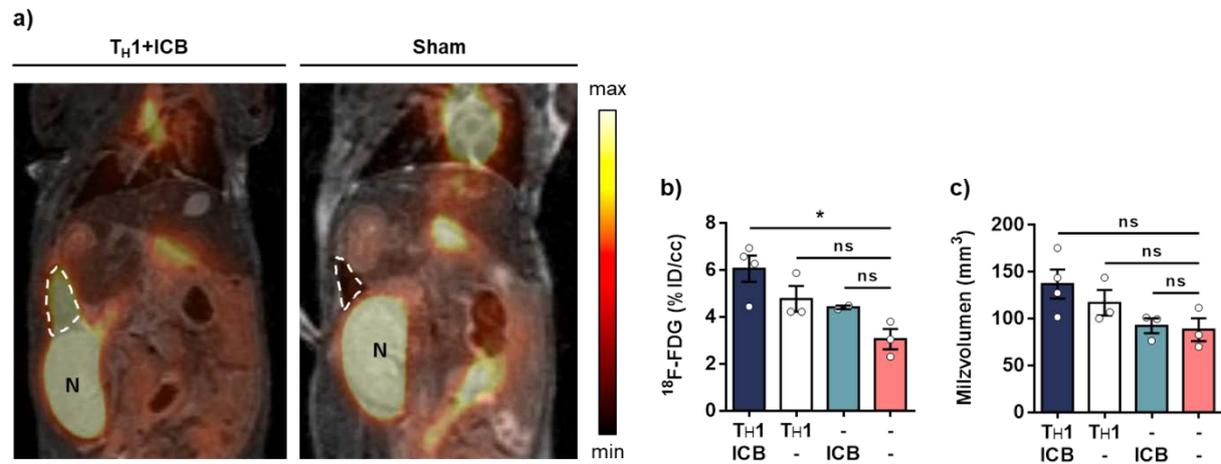


Abb. 59: Nichtinvasive PET/MRT-Bildgebung der ¹⁸F-FDG Aufnahme der Milzen von RT2-Mäusen nach vierwöchiger Behandlung. (a) Repräsentative PET/MR-Scans von Mäusen nach Kombinationstherapie (T_H1+ICB) und den entsprechenden Kontrollbehandlungen. Die Milz in der dargestellten Schnittebene (coronal) ist weiß umrandet. N = Niere. **(b)** Quantitative Auswertung der ¹⁸F-FDG-Akkumulation in der Milz. **(c)** Korrespondierendes Milzvolumen der in b) untersuchten Mäuse. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM. Jeder Punkt repräsentiert eine untersuchte Maus (T_H1+ICB: n=4, T_H1: n=3, ICB: n=2, Sham: n=3). Zur statistischen Auswertung wurde ein zweiseitiger t-Test mit Bonferroni-Korrektur für Mehrfachtestungen (k=3) verwendet (*P < 0,017; ns = nicht signifikant) (modifiziert nach Schwenck et al., 2020)¹⁷³.

4.4.3 Ex vivo Analysen der Milz

Zur Untersuchung der Auswirkung der kombinierten therapeutischen Behandlung auf die Morphologie der Milz und die Verteilung der dort lokalisierten Immunzellpopulationen, welche potentiell für den erhöhten Glukosemetabolismus verantwortlich sein könnten, wurden diese nach vierwöchiger Therapie im Anschluss an die *in vivo* ¹⁸F-FDG-PET und MRT-Scans (Immun-)histochemisch und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Hierzu wurden die Milzen aus den zu Versuchsende euthanasierten Mäusen entnommen, für die unterschiedlichen *ex vivo* Analysen geteilt, aufgearbeitet und entsprechend analysiert.

4.4.3.1 Durchflusszytometrische Analyse der Milz

Zur Analyse via Durchflusszytometrie wurden zunächst Einzelzellsuspensionen aus den Milzstückchen hergestellt, entsprechend aufbereitet (3.13.1) und anschließend unter Verwendung von „Panel“ A und B (Tab. 7) entsprechend gefärbt und analysiert (3.13.2).

Abb. 60a stellt die prozentuale Zusammensetzung der gesamten Leukozytenpopulation in der Milz innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen nach vierwöchiger Immuntherapie dar. Hierbei wurden CD3⁺ Zellen, B-Zellen, Neutrophile und monozytäre Zellen genauer definiert. Da CD3⁺ Zellen ein Drittel bis ein Viertel der gesamten Leukozytenpopulation der Milz einnahmen (**Abb. 60a**), wurden diese näher analysiert. RT2-Mäuse, welche die Kombinationstherapie erhielten (T_H1+ICB), zeigten eine signifikante Reduktion der CD3⁺ Zellpopulation (21,0±3,9% CD45.2⁺ Zellen) im Vergleich zu scheinbehandelten Tieren (Sham, 32,5±0,7% CD45.2⁺ Zellen, $P=0,04$). Da die Tiere zuvor mit *in vitro* aktivierten T_H1-Zellen behandelt wurden (3.7.3) und diese ein Viertel der CD4⁺ T-Zellpopulation einnehmen (vgl. **Abb. 22c**), wurde die gesamte T-Zellpopulation (CD3⁺ Zellen), zu welcher neben den endogenen CD4⁺ T-Zellen auch die therapeutischen T_H1-Zellen zählen, auf die Zelloberflächenexpression des Aktivierungsmarkers CD69 untersucht. Es konnten hierbei jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kombinationstherapie (T_H1+ICB, 2,1±0,1% CD45.2⁺ Zellen) und der Scheinbehandlung (Sham, 1,9±0,3% CD45⁺ Zellen; $P=0,4$) detektiert werden (**Abb. 60b**).

Der semiquantitative Vergleich weiterer Immunzellpopulationen zeigte nach vierwöchiger Therapie eine signifikante Verringerung der B-Zellpopulation in der Milz nach Kombinationstherapie (T_H1+ICB, 22,7±2,5% CD45.2⁺ Zellen) im Vergleich zur Scheinbehandlung (Sham, 39,6±4,1% CD45.2⁺ Zellen, $P=0,03$) (**Abb. 60c**). Lediglich der Anteil der Neutrophilen an der gesamten Leukozytenpopulation hatte sich im Mittel, vor allem im Vergleich zur Scheinbehandlung (Sham), nach vierwöchiger Kombinationstherapie (T_H1+ICB) verdreifacht (3,5±1,3 vs. 11,6±4,0% CD45.2⁺ Zellen). Ein statistischer Vergleich zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede ($P=0,1$) (**Abb. 60c**). Auch monozytäre Zellen waren etwas stärker repräsentiert, die Unterschiede waren aber auch hier nicht signifikant (**Abb. 60c**).

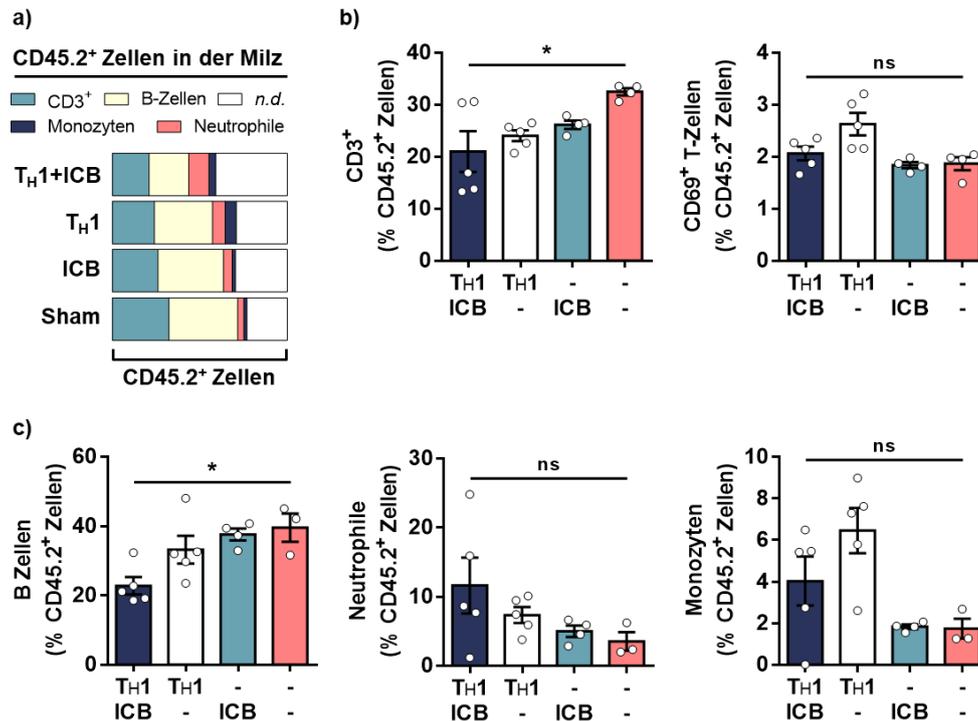


Abb. 60: Immunzellpopulationen in der Milz von RT2-Mäusen nach vierwöchiger Immuntherapie. (a) Mittlere prozentuale Anteile der CD3⁺ Zellen, der B-Zellen, Monozyten und Neutrophilen an der gesamten Leukozytenpopulation. *n.d.* (nicht definiert): restliche, nicht näher charakterisierte CD45.2⁺ Subpopulationen. (b) Prozentuale Anteile der CD3⁺ Zellpopulation und deren CD69-Expression und (c) Anteile der B-Zellen (B220), der Neutrophilen und der Monozyten an der gesamten Leukozytenpopulation der Milz. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM. Jeder Punkt repräsentiert eine untersuchte Zellsuspension aus der Milz einer behandelten Maus (T_H1+ICB, n = 5; T_H1, n = 5; ICB, n = 4; Sham, n = 3-4). Zur statistischen Auswertung wurde ein zweiseitiger t-Test verwendet (**P* < 0,05; ns = nicht signifikant) (modifiziert nach Schwenck et al., 2020)¹⁷³.

4.4.3.2 Histologische Untersuchungen der Milz

Für die (immun-)histochemischen Färbungen wurden aus einem Teil der Milz zunächst Paraffinschnitte angefertigt (3.12.5.1). Ein Teil der Paraffinschnitte wurde zunächst mittels H&E-Färbung morphologisch untersucht (3.12.5.3). Des Weiteren wurden immunhistochemische Färbungen mit Fokus auf das Immunzellinfiltrat an T-Zellen (CD3), B-Zellen (B220) und Neutrophilen (MPO) (3.12.5.4) analysiert.

Eine morphologische Betrachtung H&E-gefärbter Gewebeschnitte der Milz von T_H1+ICB behandelten Tieren zeigte im Vergleich zu den Gewebeschnitten Sham-behandelter Tiere eine deutlich atrophe weiße Pulpa, was sich durch eine Reduktion der Germinal-Zentren, sowohl in der Zahl als auch in deren Größe, widerspiegelte. Die rote Pulpa hingegen war deutlich vergrößert (Abb. 61a). Die komplett veränderte

Struktur der weißen Pulpa lässt sich durch einen starken Verlust der B- und T-Zell-Zonen innerhalb der Germinal-Zentren erklären, deutlich erkennbar an der B220 und CD3-Färbung. (Abb. 61a). Innerhalb der roten Pulpa wurde anhand der ASDCL- und MPO-Färbung ein starkes Infiltrat an Neutrophilen beobachtet, welche sich hauptsächlich um die kleinen Blutgefäße (Sinusoide) herum ansammelten (Abb. 61b).

Im Einklang mit den Ergebnissen der durchflusszytometrischen Analyse (vgl. Abb. 60), konnten nach einer Quantifizierung der immunhistochemischen CD3-Färbung der Milzen nach Kombinationstherapie (T_H1+ICB) im Vergleich zu den Milzen Sham-behandelter Mäuse tendenziell weniger $CD3^+$ T-Zellen detektiert werden, der Unterschied war jedoch nicht signifikant (T_H1+ICB : $1624,0 \pm 211,8$ Zellen; Sham: $3071,0 \pm 625,3$ Zellen in drei Sichtfeldern; $P=0,1$). Dahingegen vervierfachte sich die Neutrophilenpopulation in der Milz nach Kombinationstherapie (T_H1+ICB : $2197,0 \pm 248,0$ Zellen in drei Sichtfeldern) gegenüber der Sham-Behandlung ($703,0 \pm 87,0$ Zellen in drei Sichtfeldern, $P=0,0024$) (Abb. 61c). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass durch die Kombinationstherapie eine starke humorale Immunantwort induziert wurde.

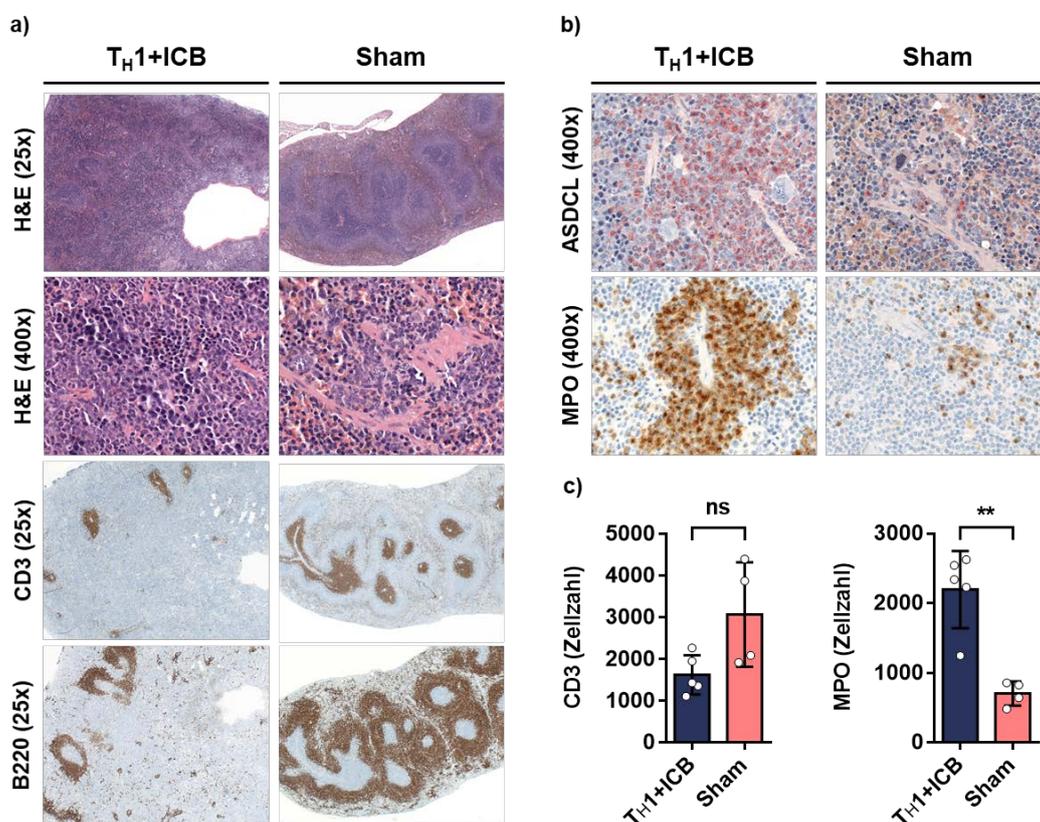


Abb. 61: Immunhistochemie von Milzen aus RT2-Mäusen nach Kombinationstherapie. Repräsentative H&E-Färbungen und Immunhistochemie von CD3, B220, ASDCL und MPO zur Darstellung von **(a)** T- und B-Zellen und **(b)** Neutrophilen in den Milzen aus RT2-Mäusen nach vierwöchiger Kombinationstherapie (T_H1+ICB, n=5) oder Scheinbehandlung (Sham, n=4). **(c)** Quantitative Analyse CD3- und MPO-positiver Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte±SEM. Jeder Punkt repräsentiert die Summe der gefärbten Zellen je Sichtfeld dreier Paraffinschnitte pro Maus. Zur statistischen Auswertung wurde ein zweiseitiger t-Test verwendet (** $P < 0,01$; ns = nicht signifikant) (modifiziert nach Schwenck et al., 2020)¹⁷³.

4.4.4 Anreicherung von ¹⁸F-FDG in der Milz von RT2-Mäusen nach exklusiver Checkpoint-Inhibitor-Therapie

In Abschnitt 4.4.2 wurde gezeigt, dass es nach initialer Immunzelldepletion und anschließender Kombinationstherapie nach vier Wochen zu einer vermehrten ¹⁸F-FDG-Anreicherung in der Milz von RT2-Mäusen kommt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass auch nach der ICB-Monotherapie ein geringer Effekt auf die ¹⁸F-FDG Akkumulation in der Milz auftritt (vgl. Abb. 59).

Für Tumorpatienten sind IC-Inhibitor-basierte Immuntherapien bisher ausschließlich ohne die Applikation therapeutischer T-Zellen zugelassen. Um den Einfluss dieser neuartigen Therapieformen auf den Glukosemetabolismus der Milz näher zu untersuchen und somit die präklinischen Studien näher an der klinischen Praxis zu orientieren, wurde der Fokus im Folgenden auf Studien an RT2-Mäusen gelegt, welche weder einer initialen Ganzkörperbestrahlung zur Immunzelldepletion ausgesetzt wurden, noch T_H1-Zellen Injektionen erhielten (CIT).

Zur Bewertung des Glukosemetabolismus in der Milz wurden zehn bis elf Wochen alte RT2-Mäuse wie unter 3.9 beschrieben behandelt. Vor Behandlungsstart fand ein initialer statischer ¹⁸F-FDG-PET-Scan (Basisscan) mit anschließender MRT zur anatomischen Co-Lokalisation des PET-Signals statt (3.11). Der Folgescan fand nach vier Behandlungen, genauer vier Tage nach der vierten Antikörperinjektion, statt. Zur Bewertung des Therapieerfolgs wurde zweimal pro Woche der Blutglukosespiegel der Mäuse gemessen (3.10.1).

Im Gegensatz zur T-Zell-basierten Kombinationstherapie, zeigte die exklusive CIT nach zwei Behandlungswochen (vier Antikörperinjektionen) lediglich einen geringen Effekt auf den Blutglukosespiegel der Mäuse ($65,0 \pm 3,2$ mg/dL, vgl. Abb. 18), welcher

im Vergleich zu scheinbehandelten Tieren (Sham: $51,5 \pm 2,6$ mg/dL) jedoch hochsignifikant ausfiel ($P = 0,006$) (Abb. 62).

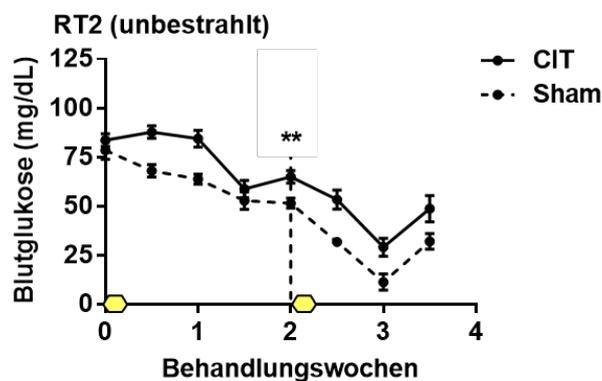


Abb. 62: Verlauf des Blutglukosespiegels von RT2-Mäusen unter exklusiver CIT. Zeitlicher Verlauf der Blutglukose von ca. zehn bis elf Wochen alten RT2-Mäusen über 3,5 Behandlungswochen, welche zweimal wöchentlich mit dem Antikörpercocktail PD-L1/LAG-3 (CIT, $n = 8$) bzw. mit Isotyp-mAbs (Sham, $n = 8$) injiziert wurden. Die gelben Symbole (Hexagone) weisen auf den Zeitpunkt der Basis- und der Folge- ^{18}F -FDG PET-Scans hin. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Zur statistischen Auswertung wurden die Gruppen nach zwei Behandlungswochen, zum Zeitpunkt des Folgescans, mittels eines zweiseitigen t-Tests miteinander verglichen. (** $P < 0,01$) (modifiziert nach Schwenck et al., 2020)¹⁷³.

Die visuelle sowie quantitative Beurteilung des ^{18}F -FDG PET-Signals in der Milz von RT2-Mäusen im fortgeschrittenen Tumorstadium zeigte nach der CIT (PD-L1/LAG-3) ein deutlich erhöhtes Signal im Vergleich zum Basisscan ($+1,1 \pm 0,4\% \text{ID}/\text{cm}^3$; $P = 0,028$). In den Milzen von RT2-Mäusen, welche lediglich eine Scheinbehandlung erhielten, wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den zwei Zeitpunkten detektiert, das Signal verlor jedoch tendenziell an Intensität ($-0,6 \pm 0,4\% \text{ID}/\text{cm}^3$; $P = 0,15$) (Abb. 63a,b).

Gleichzeitig wurde das Milzvolumen betrachtet. Obwohl das Volumen nach viermaliger Injektion der Antikörper (CIT) in den meisten RT2-Mäusen etwas anstieg (um ca. 14%), konnten keine signifikanten Änderungen detektiert werden ($+20,0 \pm 10,7 \text{mm}^3$; $P = 0,1$). Das Milzvolumen Sham-behandelter Tiere verringerte sich jedoch innerhalb von zwei Wochen, kurz vor Eintritt der Versuchs-Abbruchkriterien, signifikant um $26,6 \pm 4,9\%$ ($-40,4 \pm 7,2 \text{mm}^3$; $P = 0,0008$) (Abb. 63c).

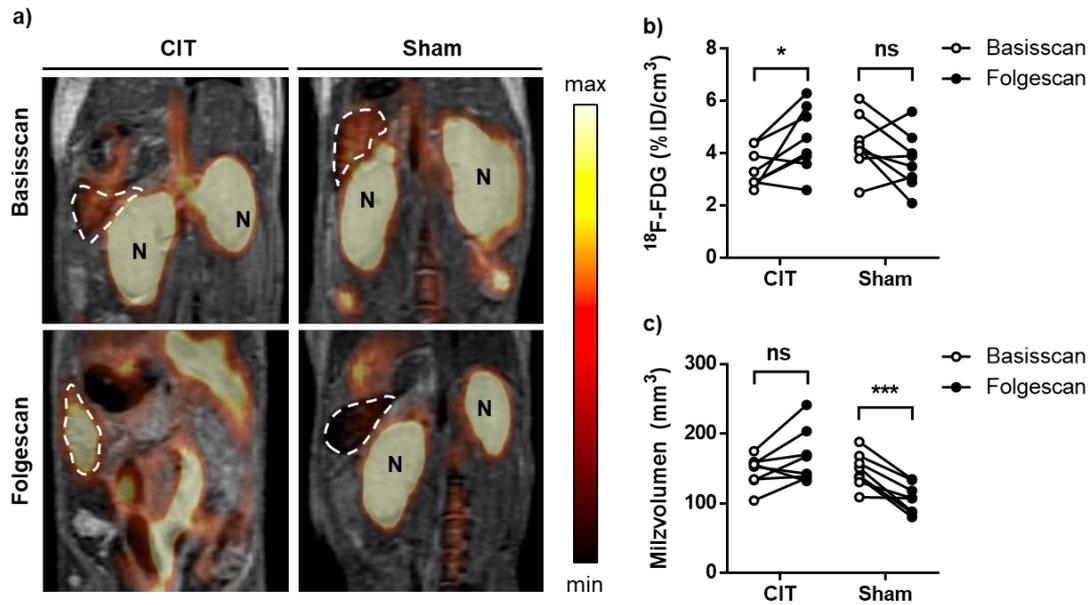


Abb. 63: Nichtinvasive PET/MRT-Bildgebung der ^{18}F -FDG-Akkumulation in der Milz von RT2-Mäusen unter CIT. (a) Repräsentative ^{18}F -FDG PET/MR-Scans von Mäusen vor (Basisscan) und nach (Folgescan) CIT bzw. Sham-Kontrollbehandlung (vier Injektionen der Antikörper- bzw. des Istoyp-Cocktails) mit Fokus auf die Milz. Dargestellt ist jeweils die coronale Schnittebene, die Milz ist weiß umrandet. N=Niere. (b) Änderung der ^{18}F -FDG-Aufnahme (%ID/cm³) der Milz von Basis- zu Folgescan der in a) beschriebenen Behandlungsgruppen. (c) Änderung des Milzvolumens (mm³) von Basis- bis zu Folgescan. Jedes Punktepaar stellt die Quantifizierung der ^{18}F -FDG-Aufnahme bzw. des Milzvolumens innerhalb eines Tieres zu den zwei unterschiedlichen Zeitpunkten dar (Basis- und Folgescan). CIT: n = 8, Sham: n = 8. Zur statistischen Auswertung wurde ein zweiseitiger t-Test für verbundene Stichproben verwendet (* $P < 0,05$; *** $P < 0,001$; ns = nicht signifikant) (modifiziert nach Schwenck et al., 2020)¹⁷³.

4.4.5 Ex vivo Analysen der Milz und des drainierenden Lymphknotens

Unmittelbar nach den *in vivo* ^{18}F -FDG PET-Folgescans wurde die Auswirkung der exklusiven CIT auf die Verteilung und Aktivierung der T-Zellpopulationen in der Milz untersucht. Dazu wurden die Milzen einer Teilgruppe von RT2-Mäusen unter CIT oder Scheinbehandlung mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung von „Panel“ A (Tab. 7) untersucht und entsprechend analysiert (3.13.2). Der PLK wurde zudem in gleicher Weise analysiert.

Selbst ohne eine initiale Bestrahlung und ohne die Verabreichung von T_H1-Zellen wurden in den Milzen von RT2-Mäusen nach viermaliger PD-L1/LAG-3-Injektion (CIT) im Vergleich zur Sham-Behandlung verhältnismäßig weniger CD3⁺ T-Zellen detektiert (16,5 ± 1,1% vs. 25,9 ± 1,4% der CD45.2⁺ Zellen, $P = 0,0017$), welche zudem weniger stark aktiviert (CD69⁺) vorlagen (4,8 ± 0,2 vs. 5,9 ± 0,2% der CD45.2⁺

Zellen, $P=0,0088$). Nach genauerer Betrachtung der relativen Verteilung der $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellpopulationen konnte gezeigt werden, dass für die Reduktion der $CD3^+$ T-Zellen beide Subpopulationen ($CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen) verantwortlich waren. Die $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen waren anteilig an der gesamten Leukozytenpopulation im Vergleich zu den entsprechenden Zellpopulationen Sham-behandelter Kontrolltiere signifikant um ca. 30 bzw. 50% reduziert (detaillierte Statistik siehe Tab. 22) (Abb. 64a).

Die Analyse des Tumor-drainierenden PLKs zeigte eine ähnliche Situation. Die Gesamtpopulation der $CD3^+$ T-Zellen lag nach der CIT im Vergleich zu Sham-behandelten Tieren auch hier signifikant reduziert vor. Diese zeigten jedoch eine ca. 33% stärkere Expression des Aktivierungsmarkers $CD69$. Eine detailliertere Betrachtung der T-Zell-Subpopulationen im PLK therapierter Tiere zeigte anteilig an den gesamten Leukozyten eine signifikant geringere $CD8^+$ T-Zellpopulation im Vergleich zur Sham-Behandlung. Die $CD4^+$ T-Zellpopulation unterschied sich zwischen den zwei Behandlungsgruppen nicht signifikant (Tab. 22, Abb. 64a)

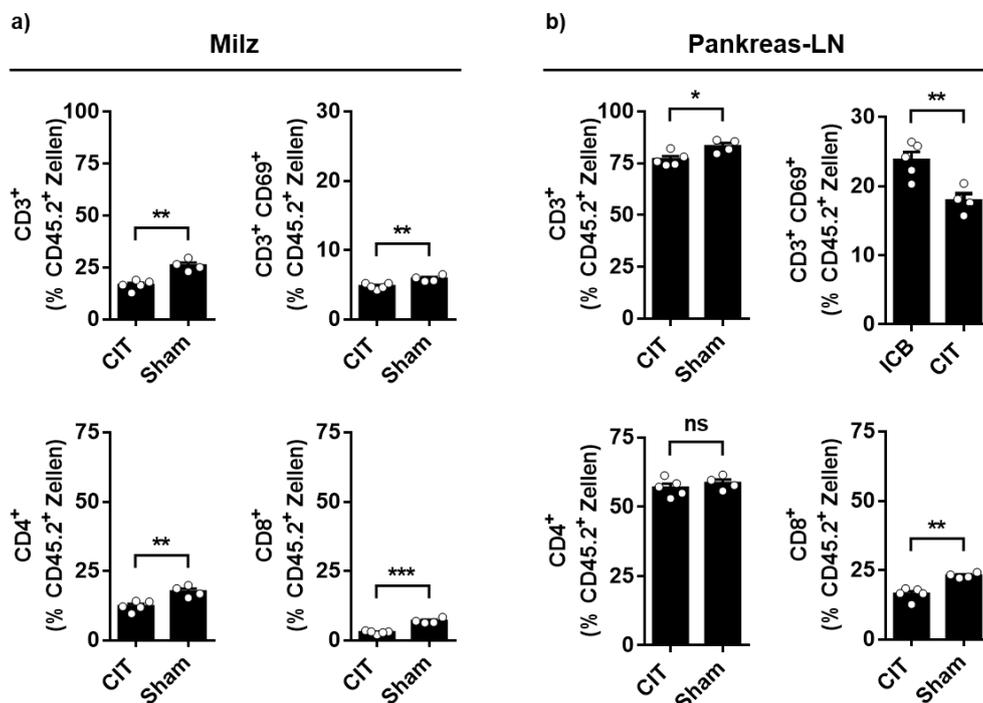


Abb. 64: T-Zellpopulationen im PLK von RT2-Mäusen nach CIT. Prozentuale Anteile der gesamten T-Zellpopulation ($CD3^+$) und deren $CD69$ -Expression und der $CD4^+$ - und $CD8^+$ T-Zell Subpopulationen an der gesamten Leukozytenpopulation ($CD45.2^+$) in (a) Milz und (b) PLK. Die Lymphknoten wurden

jeweils nach viermaliger PD-L1/LAG-3-Injektion (CIT, n=5) bzw. viermaliger Sham-Kontrollbehandlung (n=4) *ex vivo* per Durchflusszytometrie analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte±SEM. Die Punkte repräsentieren jeweils eine untersuchte Einzelzellsuspension des jeweiligen Organs. Zur statistischen Auswertung wurde ein zweiseitiger t-Test verwendet (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; ns = nicht signifikant).

Tab. 22: Detaillierte Statistik zur durchflusszytometrischen Analyse von Milz und PLK aus RT2-Mäusen nach CIT. Getestet wurden jeweils die gesamte T-Zellpopulation (CD3⁺), deren CD69-Expression und die entsprechenden T-Zell-Subpopulationen (CD3⁺CD4⁺ bzw. CD3⁺CD8⁺ T-Zellen) der RT2-Mäuse unter CIT gegen die jeweils korrespondierende Zellpopulation Sham-behandelter Tiere aus Milz und PLK. Abgebildet sind die Mittelwerte als % der CD45.2⁺ Gesamtpopulation. Zur Ermittlung der *P*-Werte wurde ein zweiseitiger t-Test verwendet.

Population	Behandlung	Anzahl (n)	Mittelwert (%)	SEM	<i>P</i> -Wert
Milz					
CD3 ⁺	ICB	5	16,5	1,1	0,0017 **
	Sham	4	26,0	1,4	
CD3 ⁺ CD69 ⁺	ICB	5	4,8	0,2	0,0088 **
	Sham	4	5,9	0,2	
CD3 ⁺ CD4 ⁺	ICB	5	12,3	0,8	0,0058 **
	Sham	4	17,6	1,0	
CD3 ⁺ CD8 ⁺	ICB	5	2,9	0,3	0,0008 ***
	Sham	4	7,0	0,5	
PLK					
CD3 ⁺	ICB	5	76,8	1,5	0,0227 *
	Sham	4	83,2	1,6	
CD3 ⁺ CD69 ⁺	ICB	5	23,8	1,1	0,0056 **
	Sham	4	18,0	1,0	
CD3 ⁺ CD4 ⁺	ICB	5	57,0	1,4	0,4091 ns
	Sham	4	58,6	1,2	
CD3 ⁺ CD8 ⁺	ICB	5	16,4	1,0	0,0013 **
	Sham	4	23,0	0,5	

5 Diskussion

5.1 Wirksamkeit einer kombinierten Immuntherapie im fortgeschrittenen murinen RT2-Inselzellkarzinommodell

Noch heute stellen maligne Tumore weltweit eine der Haupt-Todesursachen dar. Die Gründe hierfür liegen unter anderem in der enormen Heterogenität solider maligner Tumore, gekennzeichnet durch ein hochspezialisiertes Mikromilieu (TME), der Fähigkeit, das Immunsystem und umliegende Zellen zum eigenen Nutzen zu manipulieren und sich selbst durch genetische Modifikationen ständig zu verändern und Metastasen zu bilden².

T-Zellen haben durch ihre Fähigkeit, maligne Zellen gezielt zu erkennen und zu eliminieren, als zentrales Element vieler neuartiger Therapieformen enorm an Bedeutung gewonnen. Während im Mai 2018 weltweit 375 zellbasierte klinische Studien registriert wurden, hauptsächlich unter Verwendung eines adoptiven T-Zelltransfers, konnten nur ein Jahr später bereits 494 aktive Studien gezählt werden^{178,179}. Dennoch stehen Forschung und Entwicklung weiterhin vor großen Herausforderungen. Neben einer aufwändigen und kostenintensiven Produktion der hochspezialisierten therapeutischen Zellen und der Identifizierung von Antigenen, welche auf das maligne Gewebe beschränkt sind, zählen die Zugänglichkeit zu soliden Tumor-Geweben und die Ausbildung von Resistenzmechanismen zu den größten Herausforderungen moderner T-Zell-Therapien^{36,179}.

Aus diesen Gründen beschränkten sich die klinischen Zulassungen durch die FDA und EMA bisher hauptsächlich auf T-Zell-Therapien zur Behandlung von hematopoetischen Tumoren wie beispielweise dem B-Zell-Lymphom¹⁷⁹. Zur Verbesserung der therapeutischen Wirkung T-Zell-basierter Therapien gegen solide Tumore sind daher Studien und Forschungsarbeiten notwendig, welche die zugrundeliegenden biologischen Prozesse von Therapieerfolg und Resistenzen weiter aufdecken oder die Palette biotechnologischer Möglichkeiten zur genetischen Zellmanipulation erweitern. Darüber hinaus bieten Kombinationen mit anderen Therapieformen wie der Blockade von ICs ein enormes therapeutisches Potential¹⁷⁸.

Da CD8⁺ CTLs in der Lage sind, Tumore über MHC-I präsentierte Antigene direkt zu erkennen und zu eliminieren, konzentrieren sich die meisten Studien auf diesen T-Zellphänotyp. Perez Diez *et al.* haben allerdings in murinen Tumormodellen erstmals im direkten Vergleich zeigen können, dass auch CD4⁺ T-Zellen, obwohl sie Peptid-MHC-I-Komplexe (pMHC-I) grundsätzlich nicht erkennen, ähnliche oder gar bessere anti-tumorale Eigenschaften als CD8⁺ T-Zellen besitzen⁶¹. Auch in der Klinik wurden bereits erste Erfolge durch den Einsatz von CD4⁺ T-Zellen erzielt. Der adoptive Transfer von "New York Esophageal Squamous Cell Carcinoma-1" (NY-ESO-1-)spezifischen CD4⁺ T-Zellen in einen Patienten mit metastasiertem Melanom führte innerhalb eines Beobachtungszeitraums von 2 Jahren zu einer dauerhaften Regression des Tumors ohne Anzeichen eines Rückfalls⁶⁷. Tran *et al.* konnten in einem weiteren klinischen Fallbeispiel die Remission eines metastasierten Cholangiokarzinoms in Folge wiederholter adoptiver Transfers von ERB2IP-spezifischen Th1-Zellen demonstrieren⁶⁸.

Eine im murinen RT2-Inselzellkarzinommodell wirksame CD4-basierte T-Zell-Therapie wurde bereits von Müller-Hermelink *et al.* entwickelt⁶². Jedoch beschränkt sich diese Therapie auf einen adoptiven Zelltransfer (ACT) von Tag2-Th1-Zellen (T_{H1}-Zellen) im frühen Tumorstadium. Die Mäuse erhielten nach einer vorangehenden Immunzelldepletion ab einem Alter von sieben Wochen wiederholt 10⁷ T_{H1}-Zellen. Das mittlere Überleben der Mäuse ließ sich mit einem Therapiestart in diesem frühen Stadium, in dem eine Neubildung von Blutgefäßen (Angiogenese) im Bereich der hyperplastischen Inseln zwar bereits eingesetzt hatte, aber noch keine Tumore vorlagen (1.4.1)¹²², nahezu verdoppeln. Eine Verdopplung der gesamten Lebenserwartung von 14 auf über 30 Wochen konnte durch einen noch früheren Therapiebeginn, in fünf Wochen alten Mäusen, erreicht werden⁶². Dieser protektive Therapieansatz verdeutlicht das enorme Potential CD4⁺ T-Zell-basierter ACTs, jedoch stellt der experimentelle Aufbau keine klinisch relevante Situation dar.

Die präklinische Untersuchung einer Therapieform im Mausmodell kann maßgeblich zur Aufklärung der Wirksamkeit als auch der Wirkmechanismen und zur Definition neuer Therapiekomponenten beitragen und als Grundlage für das Design klinischer Studien dienen. Heutzutage werden immer noch hauptsächlich primäre Tumormodelle zur Evaluierung experimenteller Therapien herangezogen¹⁸⁰. Dabei

werden Phänomene, wie eine mehrstufige Tumorentwicklung, Metastasierung und das Auftreten von Rezidiven, welche eine wesentliche Rolle bei der Ausbildung von Therapieresistenzen spielen, meist außer Acht gelassen. Das für die Studien innerhalb dieser Arbeit herangezogene RT2-Mausmodell eignet sich durch die Imitierung einer natürlichen Tumorentstehung, von der Ausbildung hyperplastischer Inseln über die Initiierung der Angiogenese bis hin zur Transformation der Inselzellen in solide, invasive Karzinome¹²², daher besonders gut zur Etablierung neuartiger Immuntherapien.

Über die Wirksamkeit eines adoptiven Transfers von T_H1-Zellen im fortgeschrittenen RT2-Inselzellkarzinommodell liegen bisweilen noch keine Ergebnisse vor. Um dies zu untersuchen, wurden RT2-Mäuse, welche in einem Alter von zehn bis elf Wochen bereits solide Tumore ausbilden^{122,124}, analog vorangegangener Studien⁶² nach einer Bestrahlungs-induzierten Immunzelldepletion wiederholt einem ACT von T_H1-Zellen unterzogen. Anhand von Blutglukosemessungen wurde die Tumorprogression indirekt erfasst. Während die T_H1-Zell-Therapie zunächst keinen Einfluss auf den Blutglukosespiegel der Mäuse hatte (4.1.1), konnte die mittlere Überlebensrate durch den adoptiven T_H1-Zell-Transfer deutlich erhöht werden, was sich letztendlich in einer Verdoppelung der Behandlungsdauer äußerte (4.1.2).

Eine ähnliche Studie in einem weiteren klinisch relevanten Mausmodell wurde von Goding *et al.* durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde sehr eindrücklich gezeigt, dass ein ACT von CD4⁺ T-Zellen zur Behandlung rezidivierter muriner Melanome nur in Folge einer Depletion von Tumor-infiltrierenden T_{regs} und einer Antikörper-vermittelten Blockade des ICs PD-L1 wirksam ist. Weiter konnte auf eine Depletion der T_{regs} verzichtet werden, sobald die Injektionen der PD-L1-blockierenden Antikörper mit einer LAG-3-Blockade kombiniert wurde¹¹⁹. Diese Arbeit bot ausreichend Grund zur Annahme, dass die kombinierte Blockade von PD-L1 und LAG-3 (ICB) die Wirksamkeit der T_H1-Zell-Monotherapie im fortgeschrittenen RT2-Inselzellkarzinommodell nochmals steigern könne.

Um dies zu untersuchen, wurden die Mäuse wie bereits im oberen Abschnitt beschrieben behandelt und bekamen zusätzlich PD-L1- und LAG-3-blockierende mAbs injiziert. Dadurch konnte nun eine therapeutische Erhöhung des Blutglukosespiegels über einen Behandlungszeitraum von nahezu vier Wochen

erreicht werden (4.1.1). Dies wirkte sich obendrein auf das Überleben der Mäuse aus, welches durch die zusätzliche Therapiekomponente (ICB) nochmals deutlich gesteigert werden konnte (4.1.2). Im Gegensatz zur T_H1-Zell-Monotherapie war eine IC-Blockade in diesem fortgeschrittenen Pankreaskarzinommodell als Monotherapie nicht wirksam, vermittelte jedoch in Kombination mit den T_H1-Zellen einen additiven Therapieeffekt (4.1.1, 4.1.2). Die T_H1-Zellen spielen also vermutlich eine zentrale Rolle für die Ausbildung der anti-tumoralen Immunantwort in RT2-Mäusen mit fortgeschrittenen Inselzellkarzinomen. Die zellulären und molekularen Mechanismen, welche die Wirkung der T_H1-Zellen beeinflussen und der additive Beitrag, den die zeitgleiche Blockade von PD-L1 und LAG-3 zum Therapieerfolg leistet, sollen in den folgenden Abschnitten behandelt werden.

5.1.1 Einfluss der Niedrigdosisganzkörperbestrahlung

Der Behandlungserfolg bei soliden Tumoren mittels Zell-basierter Therapieformen kann nach derzeitigem Kenntnisstand durch eine vorangehende Immunzelldepletion, vermittelt durch eine Chemotherapie oder niedrig-dosierte Strahlenbehandlung, verstärkt werden^{36,37}. Die dem gesteigerten Therapieerfolg zugrunde liegenden Mechanismen sind noch immer nicht hinreichend bekannt, jedoch werden derzeit drei grundlegende Phänomene diskutiert, welche die Behandlung positiv beeinflussen können:

Zu aller erst können T_{reg} Populationen depletiert werden, welche ansonsten die körpereigene Immunantwort zugunsten des Tumorwachstums supprimieren¹⁸¹. Des Weiteren wird der Zytokin-Haushalt zugunsten einer anti-tumoralen Immunantwort reguliert⁴⁸. Der vielleicht kritischste Punkt ist die Bildung einer Nische, in der sich die transferierten Zellen ansiedeln, proliferieren und mit den endogenen Immunzellen interagieren können. Dudley *et al.* konnten erstmalig nach einer Immunzelldepletion, auch noch Monate nach dem ACT, eine Persistenz transferierter TILs in Melanom-Patienten nachweisen und dies mit einer Verbesserung der Ansprechquote korrelieren⁴³.

Auch im frühen RT2-Inselzellkarzinommodell wirkt sich eine Kombination aus einem ACT von T_H1-Zellen und einer vorangehenden niedrig-dosierten Ganzkörperbestrahlung von 2Gy zur Immunzelldepletion positiv auf den Therapieerfolg aus,

während eine alleinige Bestrahlung keinen Effekt auf das Tumorwachstum zeigt⁶². Über den Erfolg einer T_H1-Zell-basierten Immuntherapie ohne vorangehende Immunzelldepletion liegen im RT2-Inselzellkarzinommodell jedoch bisher keine Erkenntnisse vor. Dies wurde nun in Kombination mit einer IC-Blockade in RT2-Mäusen mit fortgeschrittenen Tumoren untersucht.

Der Therapieerfolg wurde indirekt über den Verlauf des Blutglukosespiegels bewertet. Erneut konnte nur durch die Kombinationstherapie in Folge einer initialen Bestrahlung eine über mehrere Wochen andauernde Erhöhung der Blutglukose erreicht werden. Ohne vorangehende Immunzelldepletion wurde zwar ein kurzzeitiger Anstieg der Blutglukose erzielt, dieser ließ sich jedoch nicht stabilisieren. Ein deutlicher Unterschied zur Scheinbehandlung wurde nicht festgestellt (4.1.3).

Eine *ex vivo* Analyse am Ende des Beobachtungszeitraums von knapp vier Wochen zeigte kaum bestrahlungs- oder behandlungsbedingte Effekte auf den relativen Anteil der CD4⁺ T-Zellen an der Leukozytenpopulation in Milz, Blut und dem Tumor-drainierenden PLK. Jedoch konnte eine deutliche Erhöhung des Anteils der transferierten T_H1-Zellen an der CD4⁺ T-Zellpopulation durch die Bestrahlungs-induzierte Immunzelldepletion festgestellt werden. Im Blut hatte sich der Anteil der T_H1-Zellen an der CD4⁺ T-Zellpopulation im Vergleich zu dem im Blut nicht bestrahlter Tiere sogar verdoppelt. Der relative Anteil der CD8⁺ T-Zellen an der gesamten Leukozytenpopulation reduzierte sich hingegen stark, hauptsächlich durch die Kombination von initialer Bestrahlung, einem T_H1-Zelltransfer und der Blockade der ICs LAG-3 und PD-L1, nicht aber durch die alleinige Bestrahlung oder kombinierte Behandlung ohne vorangehende Immunzelldepletion (4.1.3).

Die Bildung einer Nische zur Sicherung des Langzeitüberlebens der transferierten Zellen wird benötigt, um eine erfolgreiche anti-tumorale Immunantwort zu erzielen^{43,182}. Die in dieser Arbeit untersuchten Zellpopulationen wurden weder auf ihre absolute Anzahl, noch auf ihre Proliferationseigenschaften untersucht. Jedoch vermitteln die prozentual erhöhten Anteile der T_H1-Zellen an der CD4⁺ T-Zellpopulation den Eindruck, dass nach initialer Bestrahlung tatsächlich Raum zum Langzeitüberleben der therapeutischen T-Zellen geschaffen wurde. Indirekt konnte dieser Umstand durch die Bewertung der Morphologie von PLK und Milz untersucht werden. Eine histologische Betrachtung des PLKs aus bestrahlten RT2-Mäusen

zeigte eine deutliche Hyperplasie nach wiederholten T_H1 -Zell-Applikationen. Vor allem die $CD3^+$ T-Zell-Areale waren deutlich vergrößert, was zu einer verhältnismäßigen Verkleinerung der B-Zell Follikel führte (4.2.1).

Das durch die Bestrahlung zunächst reduzierte Milzvolumen stieg im Behandlungsverlauf an und erreichte vergleichsweise ein Volumen im Bereich naiver RT2-Mäuse selben Alters, insbesondere in den Therapiegruppen mit wiederholten T_H1 -Zelltransfers. Ein T_H1 -Zelltransfer im Zuge der Kombinationsbehandlung resultierte im Kontrast dazu ohne vorangehende Immunzelldepletion in einer Reduktion des Milzvolumens (4.1.3), was bei unveränderten Anteilen der Zellpopulationen in der Milz (4.1.3) wiederum die Theorie bekräftigt, dass den transferierten T_H1 -Zellen bei fehlender Immunzelldepletion die Nische zur Ausbildung einer Persistenz fehlt.

Eine vorangegangene Arbeit im Labor für präklinische Bildgebung von Dr. med D. Sonanini hat sich mit dem Einfluss einer 2 Gy-vermittelten Immunzelldepletion auf die Verteilung verschiedener Immunzellpopulationen in den sekundär lymphatischen Organen von C3H Mäusen, unter anderem der Milz, befasst^{183,184}. Die Bestrahlung, welche die nach fünf Tagen ermittelte Gesamt-Leukozytenzahl im Blut um etwa 68 % und in der Milz um etwa 74 % verringerte, wirkte sich vor allem auf die $CD8^+$ T-Zell-Population aus, deren Anteile in den ersten Tagen stark zurückgingen (unter ca. 10 % des Ausgangswerts). Innerhalb von zwei Wochen konnte sich die gesamte Leukozytenpopulation der Milz auf die Hälfte des Ausgangswertes normalisieren. Die B-Zellpopulation regenerierte sich dabei etwas schneller als die T-Zellpopulation, vor allem die $CD8^+$ T-Zellen regenerierten sehr langsam. Im Kontrast zur $CD8^+$ T-Zellpopulation verringerte sich die $CD4^+$ T-Zellpopulation in der Milz nur etwa auf ein Viertel des Ausgangswertes. Interessanterweise war der Effekt auf die relativen Anteile der verschiedenen Lymphozytenpopulationen zueinander weniger stark ausgeprägt als in der absoluten Anzahl^{183,184}. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits von Bogdandi *et al.* in C57BL/6 Mäusen angestellt¹⁸⁵. Es scheint also ein Gleichgewicht zwischen den einzelnen Immunzellpopulationen zueinander zu geben, das durch die Bestrahlung wenig beeinflusst wird. Dies steht im Einklang mit den in dieser Arbeit dargelegten Ergebnissen, was sich vor allem dadurch bekräftigen lässt, dass sich die transferierten T_H1 -Zellen nicht auf den relativen Anteil der $CD4^+$ und

CD8⁺ T-Zellpopulation an der gesamten Leukozytenpopulation auswirkte. Der Rückgang der CD8⁺ T-Zellpopulation in den hier untersuchten sekundär lymphatischen Organen (PLK und Milz) nach Immunzelldepletion und Kombinationstherapie scheint eher durch die Induktion und Aufrechterhaltung einer starken Immunantwort zustande zu kommen. Der Effekt der einzelnen Therapiekomponenten auf die unterschiedlichen T-Zellpopulationen wird weiter unter Abschnitt 5.3 diskutiert.

Ob und in welchem Ausmaß die transferierten T_H1-Zellen tatsächlich persistieren, welche endogenen CD4⁺ T-Zell-Phänotypen durch diese in ihrem Anteil beeinflusst werden und inwiefern die T_H1-Zellen auf den Anteil weiterer Effektorzellen wirken, sollte weiter untersucht werden. Eine Detektion der transferierten T_H1-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten in Folge eines einmaligen ACTs nach initialer Immunzelldepletion könnte Aufschluss über die Migration und das Langzeitüberleben der transferierten Zellen, und somit deren Persistenz, geben.

Es stellt sich außerdem die Frage, ob sich die Wirkung der therapeutischen T_H1-Zellen für eine dauerhafte Tumorkontrolle, beispielsweise durch die Zugabe von Zytokinen, *in vivo* aufrechterhalten lässt. Die Ergebnisse könnten Aufschluss darüber geben, ob im Setting einer Kombination aus einem T_H1-Zelltransfer und einer IC-Blockade wiederholte ACTs gar notwendig sind.

In einer aktuellen Studie von Parisi *et al.* wurde die Persistenz transferierter T-Zellen nach einer Immunzelldepletion durch die wiederholte Administration eines PEGylierten IL-2 Agonisten erhöht und zudem die Tumorkontrolle gesteigert. Die T-Zellen zeigten nach deren einmaligen Transfer in Mäuse mit subkutanen Tumoren eine verstärkte Ausbreitung im Tumorgewebe und in der Milz, eine Verbesserung der anti-Tumor Reaktivität und ließen sich zudem über zwei Wochen nachweisen¹⁸⁶. Eine ebenfalls aktuelle Studie von Johnson *et al.* konnte zeigen, dass vereinzelte Kombinationen einer niedrig dosierten Ganzkörperbestrahlung und verschiedener Chemotherapeutika zur Immunzelldepletion zwar die Persistenz von adoptiv transferierten T-Zellen verstärken, jedoch keine verbesserte Wirkung auf den Therapieeffekt haben, wie auch eine weitere Kombination mit IL-7. Die Kombination einer Immunzelldepletion mit IL-15 oder IL-2 verstärkte jedoch die anti-tumoralen Eigenschaften und steigerte das Langzeitüberleben der Mäuse¹⁸⁷.

Auch im fortgeschrittenen Pankreaskarzinommodell könnte eine Verbesserung der Kombinationstherapie durch eine zusätzliche Kombination mit Zytokinen angestrebt werden, um auch hier gegebenenfalls die Aufrechterhaltung von Effektor-Funktionen und die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses zu erleichtern.

5.1.2 Bewertung des Tumorwachstums

Die Darstellung der Tumormasse von RT2-Mäusen wurde bereits in vorangehenden Studien an unbehandelten Tieren im Labor für Präklinische Bildgebung etabliert¹²⁴. Zur abschließenden Bewertung des Therapieansprechens der Kombinationstherapie wurde nun das Tumorwachstum behandelter RT2-Mäuse über einen Zeitraum von nahezu vier Wochen *in vivo* mittels MRT beobachtet.

Zu Beginn der Therapie mit zehn Wochen wurden lediglich kleine Tumore detektiert, welche unter der Scheinbehandlung zu großen, angiogenen Karzinomen heranwuchsen. Durch die kombinierte Behandlung mit T_H1-Zellen und PD-L1/LAG-3 kam es im RT2-Inselzellkarzinommodell im fortgeschrittenen Tumorstadium neben einer Erhöhung der Blutglukose und einer Verlängerung des Überlebens zu einer deutlichen Reduktion der Tumormasse (4.1.4). Diese Regression der Inselzellkarzinome konnte durch die *ex vivo* Betrachtung der Tumore visuell bestätigt werden (4.1.4).

Aus technischen Gründen konnten die anatomischen Aufnahmen der Tumore mittels MRT nicht ausreichend quantifiziert werden. Dies mag zum einen daran gelegen haben, dass sich das Tumorgewebe im Verlauf der Therapie durch die Ausbildung von Blutgefäßen und der Einwanderung von Immunzellen ändern kann und dadurch diffuse Strukturen entstehen, was die Detektion von vor allem kleinen Tumoren erschwert; zum anderen kann die Ausbildung tertiärer lymphoider Strukturen, welche fälschlicherweise als Tumormasse detektiert werden können, zu analytischen Fehlern führen^{188,189}.

Eine Verbesserte Detektion der Tumormasse kann durch die Verwendung eines Mangan-haltigen Kontrastmittels, welches nach einer Glukosestimulation durch aktivierte Calciumkanäle vermehrt in die Inselzellen des Pankreas eintritt, erreicht werden^{190,191}. Eine weitere Alternative zur *in vivo* Detektion und Quantifizierung der

malignen Inselzellen bietet die Verwendung neuartiger PET-Tracer. ^{64}Cu -NODAGA- ^{40}Lys -Exendin-4 beispielsweise bindet an den „*Glucagon-like Peptide 1*“ Rezeptor auf funktionellen Inselzellen des Pankreas und erleichtert somit die Abgrenzung der Tumormasse vom umliegenden Gewebe¹⁹¹. Für die *in vivo* Bewertung des Therapieverlaufs mittels MRT sollte eine rein exemplarische Betrachtung der Tumormasse innerhalb dieser Arbeit jedoch ausreichen.

Ex vivo wurde festgestellt, dass sich durch die Behandlung mit T_H1 -Zellen auffallend viel Fettgewebe um das Pankreas herum gebildet hatte (4.1.4). Eine Transformation von Pankreasgewebe in Fettzellen bzw. eine das Pankreas umgebende Fettschicht wurde für das RT2-Modell bisher noch nicht beschrieben. Da dieses Phänomen vermehrt in Folge eines T_H1 -Zelltransfers beobachtet wurde, konnten folgende Schlüsse gezogen werden:

Die Fettschicht kann durch pathologische Prozesse in Folge von Stoffwechseleinflüssen auf das Pankreas zustanden kommen. Nach einem anfänglichen rapiden Gewichtsverlust der Mäuse in Folge der T_H1 -Zell-Injektionen kommt es wieder zu einem schnellen Anstieg des Körpergewichts (4.1.3). Dieser schnelle Anstieg ist höchstwahrscheinlich mit einer vermehrten Futteraufnahme und einer damit verbundenen übermäßigen Kalorienaufnahme assoziiert. Übermäßige Kalorien werden in Form von Fett in spezialisierten Zellen, den Adipozyten, gespeichert. Nicht-adipöse Zellen wie z. B. die Leber sind in der Lage, einer Speicherung von Fett entgegen zu wirken, indem sie ihre Fettsäureoxidation steigern oder übermäßiges Fett, beispielsweise in Form kleiner Lipoproteine, wieder freisetzen. Anderen Gewebszelltypen wie den Inselzellen des Pankreas fehlt solch ein Kompensationsmechanismus. Daher kann sich übermäßiges Fett im Pankreas anreichern und zu einer Lipotoxie führen¹⁹². Eine Lipotoxie kann Ursache für die Ausbildung einer Insulinresistenz und in Folge dessen einer Diabetes sein¹⁹². Tatsächlich wurden in wenigen behandelten Mäusen sehr hohe Blutglukoselevel (> 150 mg/dL) in Folge wiederholter T_H1 -Zell-Applikationen beobachtet (*siehe Anhang, Abb. 65*). Da die Mäuse T_H1 -Zell-behandelter Gruppen jedoch kein Übergewicht entwickelten, ist eine vermehrte Ansammlung von Fett in nicht-adipöses Gewebe eher unwahrscheinlich.

Des Weiteren könnte sich die Fettschicht auch als eine direkte Folge der

wiederholten T_H1-Zell-Applikationen entwickeln. Adipöse Gewebe sind, verglichen mit dem Blut, vor allem ein Sammelbecken für IFN- γ produzierende T-Zellen. Adaptive Immunantworten können direkt durch Adipozyten moduliert werden^{193,194}. Ioan-Facsinay *et al.* haben zum ersten Mal gezeigt, dass Fettsäuren durch eine Imitierung von T-Zell-APC-Interaktionen die Proliferation von CD4⁺ T-Zellen stimulieren können¹⁹³. Andererseits können hohe Konzentrationen von Fettsäuren auf T-Zellen toxisch wirken¹⁹⁴. Auch wenn die Wirkungsweise der T_H1-Zellen auf den Therapieerfolg an dieser Stelle noch nicht annähernd bewertet wurde, wurde bereits verdeutlicht, dass selbst eine T_H1-Zell-Monotherapie zu einer Verlängerung des Überlebens führt (4.1.2). Die Fettschicht könnte also indirekt mit dem Therapieerfolg verknüpft sein, die T-Zellantwort positiv oder gar negativ modulieren und sollte daher weiter untersucht werden.

5.2 Wirkmechanismen einer kombinierten Immuntherapie im fortgeschrittenen murinen RT2-Inselzellkarzinommodell

Nachdem der Therapieeffekt über die Bewertung des Blutglukosespiegels, des Langzeitüberlebens und den Rückgang der Tumormasse bewertet wurde, sollen nun die zugrundeliegenden zellulären und molekularen Wirkmechanismen näher betrachtet werden.

5.2.1 Einfluss auf die Rückbildung von Blutgefäßen

Im frühen RT2-Inselzellkarzinommodell von Müller-Hermelink *et al.* resultierte die T_H1-Zell-Monotherapie in einer Reduktion oder gar Unterdrückung der Tumovaskularisation, einem Wachstumsarrest der malignen Zellen und einer Infiltration von CD3⁺ T-Zellen in die Tumoreareale⁶². Die von CD8⁺ T-Effektorzellen unabhängige, reduzierte Vaskularisierung und die Inhibition der Tumorentwicklung wird unter Bildung der anti-angiogenen Chemokine CXCL9 (MIG) und CXCL10 (IP-10) in Abhängigkeit von IFN- γ und des TNF-Signalwegs vorangetrieben^{62,195}. Ob sich die Wirkung der T_H1-Zellen auch über anti-angiogene Prozesse vermitteln lässt, nachdem der angiogene Switch bereits stattgefunden hat, wurde nun im fortgeschrittenen RT2-Modell morphologisch und anhand der endothelialen PECAM-1-Expression (CD31) im Tumorgewebe ermittelt.

Die rein qualitativen Untersuchungen zeigten eine Reduktion der Tumovaskularisierung in Folge der wiederholten T_H1-Zell-Applikationen (4.2.1). Ob nun die zusätzliche Injektion von PD-L1/LAG-3 eine Auswirkung auf die Inhibition der Angiogenese hat, kann durch die vorliegenden Ergebnisse nicht beantwortet werden. Ein additiver oder gar synergistischer Effekt ist jedoch nicht auszuschließen.

Die Blockade von ICs kann die Ausschüttung anti-angiogener Zytokine im TME fördern. Präklinische Studien konnten zeigen, dass eine therapeutisch wirksame Kombination aus einem ACT von CD8⁺ T-Zellen und einer Blockade der PD-1/PD-L1 Achse, nicht aber ein ACT alleine, eine erhöhte IFN- γ -Expression und ebenfalls eine Erhöhung von CXCL10 im TME zur Folge hatte¹⁹⁶. Des Weiteren kommt es durch die Ausbildung von Blutgefäßen während der Tumorgenese zu einer Suppression von Immunantworten, welche sich durch die Blockade von ICs umkehren lässt. Der

vaskuläre endotheliale Wachstums- („*growth*“) Faktor (VEGF), welcher die Neubildung von Blutgefäßen anregt, ist bekannt für seinen stimulierenden Einfluss auf MDSCs und T_{regs}, hemmt aber gleichzeitig die Entwicklung von DCs und reduziert damit die Ausbildung von T-Zell-Effektorfunktionen^{197,198}. Zudem kann VEGF auch einen direkten Einfluss auf die Inhibition von T-Zellen im TME haben. Voron *et al.* konnten eine durch VEGF-A gesteigerte Expression inhibierender ICs wie PD-1 auf CD8⁺ TILs in subkutanen CT26 Tumoren nachweisen, welche das Tumorstadium begünstigte. Durch eine kombinierte Behandlung mit einem VEGF-A neutralisierenden mAb und einer PD-1 Blockade wurde das Wachstum wiederum deutlich reduziert⁹².

Auch in RT2-Mäusen mit fortgeschrittenen Tumoren wirkte sich eine therapeutische Kombination, bestehend aus einer Inhibition des VEGF-Rezeptors und einer PD-L1 Blockade, positiv auf die Tumormasse aus und verlängerte das Überleben der Versuchstiere deutlich⁹³. Maßgeblich hierfür war die Unterbrechung eines negativen Feedbackmechanismus, welcher durch eine behandlungsbedingte starke Infiltration von IFN- γ sezernierenden T-Effektorzellen ins TME zustande kam und sich in einer erhöhten zellulären PD-L1-Expression, vorwiegend im Tumorgewebe, aber auch auf Endothelzellen und Leukozyten (CD45⁺ Zellen), äußerte. Interessanterweise führte die kombinierte Behandlung auch zu einer Normalisierung der Struktur verbleibender Blutgefäße und induzierte die Ausbildung von HEVs, was es den Immunzellen wiederum erleichterte, die malignen Zellen zu erreichen⁹³.

Ferner haben Hodi *et al.* durch eine erfolgreiche klinische Studie an Melanompatienten anhand einer Kombination von Ipilimumab (anti-CTLA-4 mAb) und Bevacicimab (anti-VEGF mAb) die Grundlage geschaffen, weitere Studien zur Synergie zwischen anti-angiogenen Wirkstoffen und dem Einfluss auf die Immunregulation anzustellen und gleichzeitig neue Kombinationstherapien zu untersuchen¹⁹⁹. Weitere präklinische Arbeiten, welche die Effekte der kombinierten Wirkung an T_H1-Zellen und einer Blockade von ICs auf die Physiologie der Blutgefäße, deren immunsupprimierenden Eigenschaften und die Ausbildung von HEVs im TME von Mäusen mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom näher untersuchen, könnten die klinische Translation T-Zellbasierter Immuntherapien unterstützen.

5.2.2 T_H1-Zell-vermittelte Seneszenz-Induktion

Obwohl CD4⁺ T-Zellen im Gegensatz zu CTLs und NK-Zellen Tumorzellen nicht direkt über MHC-I präsentierte Antigene erkennen können, sind sie dennoch in der Lage, sehr starke anti-tumorale Immunreaktionen zu vermitteln und tragen sogar unabhängig von CTLs oder NK-Zellen zur Kontrolle von Tumorerkrankungen bei^{59,61,62,64,119}. Die Voraussetzungen für eine erfolgreiche CD4-basierte T-Zelltherapie sind jedoch, wie auch die einem Therapieerfolg zugrundeliegenden Mechanismen, noch weitgehend ungeklärt²⁰⁰.

Die Arbeitsgruppe um Prof. Röcken konnte präklinisch bereits am frühen RT2-Inselzellkarzinommodell zeigen, dass die anti-tumorale Wirkung, neben der Inhibition einer Angiogenese (5.2.1), durch einen Wachstumsarrest der Tumorzellen vermittelt wird. Dieser ist ebenfalls abhängig von IFN- γ und TNF, zwei Zytokine, über welche vor allem TA-spezifische Th1-Zellen ihre Wirkung entfalten^{62,64,201}. Braumüller *et al.* haben Inselzellkarzinome aus RT2-Mäusen untersucht, welche mehrere Wochen mit T_H1-Zellen behandelt wurden. Diese Zellen zeigten trotz vorhandener Tag2-Expression in Abwesenheit von MCH-II einen dauerhaften Wachstumsarrest, begleitet von der Expression Seneszenz-assoziiierter epigenetischer Marker wie phosphoryliertem Heterochromatin Protein 1 γ (pHP1 γ) und trimethyliertem H3 Histon (H3K9me3) und einer Seneszenz-assoziierten β -Gal Aktivität (SA- β -Gal)¹³². Ebenso wurde in den seneszenten Tumorzellen eine vermehrte Expression des Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitors 2A (p16^{Ink4a}) detektiert, welcher über die Hemmung der Cyclin-Kinase das Retinoblastomprotein (Rb) aktiviert. Dieser Wachstumsarrest ließ sich *ex vivo* über mehrere Passagen in der Zellkultur aufrecht erhalten und wurde auch nach einer Reimplantation der Tumorzellen in syngene C3H Wildtyp-Mäuse weiter beobachtet⁶⁴.

Nun galt es zu untersuchen, ob sich dieser Wachstumsarrest auch in fortgeschrittenen Inselzellkarzinomen induzieren ließe und sich auch die therapeutische Wirkung der T_H1-Zellen, vor allem in Kombination mit den IC-Inhibitoren anti-PD-L1 und anti-LAG-3 mAbs, von einer zytotoxischen Immunantwort abgrenzen lässt. Dazu wurden Inselzellkarzinome aus RT2-Mäusen, welche über mehrere Wochen mit T_H1-Zellen und PD-L1/LAG-3 behandelt wurden, *ex vivo* auf

ihre Proliferationseigenschaften analysiert. Tatsächlich konnte in den verbleibenden Tumorzellen eine erhöhte zelluläre Expression von p16^{Ink4a} bei gleichzeitig starker Reduktion des Proliferationsmarkers Ki67 (4.2.2) und einer erhöhten SA- β -Gal Aktivität (4.2.3.4) detektiert werden. Weder die Expression von PD-L1, noch die des Tumorantigens Tag2 wurden auf den Tumorzellen durch den therapeutischen Eingriff beeinflusst (4.2.1, 4.2.5). Daher spielen hier klassische Mechanismen, wie die Verringerung der TA-Expression oder die direkte T-Zell-Inhibierung, zur Ausbildung einer Therapieresistenz kaum eine Rolle¹⁶⁷. Die verbleibenden Tumorzellen sind also auch hier das Ergebnis eines zellulären Wachstumsarrests.

Eine T_H1-Zell-vermittelte Immunantwort kann unabhängig von CD8⁺ T-Zellen unter der Induktion eines Wachstumsarrests zur Regression von Inselzellkarzinomen im frühen Tumorstadium führen⁶². Auch eine alleinige Blockade von ICs kann, unabhängig von CTLs, einen Wachstumsarrest auslösen. So konnten Brenner *et al.* zeigen, dass die Apoptose-sensiblen malignen RT2-Inselzellen nach deren Transplantation in syngene, CD8⁺ T-Zell-depletierte Mäuse durch eine Blockade von PD-L1 und LAG-3 einen seneszenten Phänotypen entwickeln¹⁶⁷. Da PD-L1 lediglich verdächtigt wird, durch intrinsische Mechanismen anti-apoptotische Signale in Tumorzellen zu induzieren, kann eine direkte Seneszenz-Induktion durch die bloße Bindung des antagonistischen anti-PD-L1 mAbs ausgeschlossen werden^{95,96}. Die untersuchten Inselzellkarzinome zeigten zudem nach erfolgreicher ICB-Therapie ein MHC-II- und F4/80-positives Immunzellinfiltrat, frei von CD8⁺ T-Zellen oder NK-Zellen¹⁶⁷. Brenner *et al.* vermuteten somit, dass die Tumorzellen durch Makrophagen und DCs beseitigt und die verbliebenen malignen Zellen durch eine T_H1-Zell-vermittelte Zytokinantwort in ihrem Wachstum gehemmt werden¹⁶⁷. CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen stellen folglich nicht die einzige zytotoxische Immunzellpopulation dar. Diese Ergebnisse werden durch Arbeiten in einem murinen Modell Onkogen-induzierter Seneszenz bekräftigt, in welchen die Beseitigung pre-maligner, seneszenten Hepatozyten durch eine CD4⁺ T-Zell-vermittelte Immunantwort in Abhängigkeit von Makrophagen erfolgte²⁰². Auch im fortgeschrittenen RT2-Inselzellkarzinommodell wurden nach Kombinationstherapie immunhistochemisch neben CD3⁺ Immunzellen auch MHC-II- und F4/80-positive Zellen detektiert¹⁶⁷. Daher ist es ebenso wahrscheinlich, dass die Kombinationstherapie durch eine

T_H1 -Zell-vermittelte Induktion von Makrophagen und DCs und unabhängig von CTLs wirken kann.

Aufgrund der unveränderten Expression des Tumorantigens Tag2 (4.2.5) kann eine zytotoxische Immunantwort in Folge einer potentiellen Aktivierung zytotoxischer Immunzellen durch Antigenerkennung jedoch nicht ausgeschlossen werden. Ob die Seneszenz-Induktion in den Tumorzellen nun für einen therapeutischen Effekt in RT2-Mäusen mit fortgeschrittenen Tumoren ausreicht, oder zusätzlich die Induktion einer zytotoxischen, $CD8^+$ T-Zell-basierten Immunantwort erforderlich ist, konnte bisher nicht ermittelt werden. Dass endogene $CD8^+$ T-Zellen dennoch signifikant zum Therapieerfolg beitragen können, sollte nicht vernachlässigt werden. Die Analyse des Immunzellinfiltrats von RT2-Tumoren nach Kombinationstherapie zeigte eine deutliche Rekrutierung endogener $CD8^+$ T-Zellen ins TME, ein Effekt, welcher unter anderem durch die IC-blockierenden Antikörper vermittelt wurde (4.3.2.1). Bevor jedoch der Zusammenhang zwischen einer $CD8^+$ T-Zell und $CD4^+$ T-Zell-vermittelter Immunantwort näher betrachtet wird, werden zunächst die molekularen Mechanismen der IFN- γ vermittelten Seneszenz-Induktion im fortgeschrittenen RT2-Inselzellkarzinommodell diskutiert.

Wie bereits erläutert, zeigten RT2-Mäuse unter Kombinationstherapie stark reduzierte Expressionslevel des Proliferationsmarkers Ki67 bei gleichzeitiger Induktion eines seneszenten Phänotyps, welcher durch eine erhöhte Expression von $p16^{Ink4a}$ und einer erhöhten SA- β -Gal Aktivität gekennzeichnet ist. Um nun die Rolle von $p16^{Ink4a}$ in Abhängigkeit von IFN- γ zu untersuchen, wurden RT2-Mäuse mit defektem IFN- γ Signalweg (RT2xStat1^{-/-}-Mäuse), in welchen die IFN- γ Signaltransduktion zur Induktion von $p16^{Ink4a}$ unterbrochen war (1.4.2), analog zu den RT2-Wildtyp-Mäusen behandelt.

Zunächst wurde das Therapieansprechen über die Blutglukoselevel der Mäuse und deren Gesamt-Überleben bewertet. Weder die Kombinationstherapie, noch die beiden Monotherapien (T_H1 bzw. ICB) hatten Einfluss auf das Überleben der RT2xStat1^{-/-}-Mäuse (4.2.3.2). Auch die Blutglukosespiegel konnten in Folge jeglicher therapeutischer Behandlung nicht stabilisiert werden (4.2.3.1). Die Tumore wuchsen ebenso rasch wie die der scheinbehandelten Kontrollgruppen (4.2.3.3).

Übereinstimmend mit dem fortschreitenden Tumorwachstum konnten unabhängig von der Behandlung keine erhöhten p16^{Ink4a}-Expressionslevel in Tumoren der RT2xStat1^{-/-}-Mäuse festgestellt werden. Im Gegensatz dazu wurden in jeder Behandlungsgruppe gleichermaßen hohe Level des Proliferationsmarkers Ki67 detektiert (4.2.3.4). Betrachtete man die Aktivität von SA-β-Gal, wurde auch diese lediglich in Tumoren aller therapeutisch behandelten RT2-Wildtyp-Mäuse, nicht aber in Tumoren von RT2xStat1^{-/-}-Mäusen, vermehrt detektiert (4.2.3.4). Die Tumore von RT2xStat1^{-/-}-Mäusen zeigten also, wie die Tumore der scheinbehandelten RT2-Wildtyp-Mäuse, einen stark proliferativen Phänotyp (Ki67⁺, P16^{Ink4a}) bei geringer SA-β-Gal Aktivität. Auch der Cyklin-abhängige Kinase-Inhibitor 1 („*CDK-interacting protein 1*“, p21^{Cip1}) und die epigenetischen Seneszenz-assoziierten Marker pHP1y und H3K9me3 wurden lediglich in Tumor-Gewebeproben therapierter RT2-Wildtyp-Mäuse, nicht aber in Proben aus therapierten RT2xStat1^{-/-}-Mäusen nachgewiesen¹⁶⁷. Die stärkste Expression wurde durch die Kombination von T_H1-Zellen und der Blockade von PD-L1 und LAG-3 festgestellt¹⁶⁷.

In RT2xStat1^{-/-}-Mäusen ist durch die Abwesenheit der STAT1-Proteine der Signalweg von IFN-γ, und dadurch die Induktion von p16^{Ink4a} und p21^{Cip1}, unterbrochen¹²⁷. Um nun zu klären, in wie weit dies tatsächlich die Seneszenz-Induktion in Tumorzellen beeinflusst, sollten weitere Faktoren ausgeschlossen werden, welche Ursache für eine mangelnde Immunantwort sein könnten und mit einer reduzierten Zytokinexpression einhergehen.

Voraussetzung für die Einleitung der anti-tumoralen Immunantwort in RT2-Mäusen ist die Expression des Tumorantigens Tag2. Die Expression von Tag2 wurde bereits in Tumoren von behandelten RT2-Wildtyp-Mäusen nachgewiesen und konnte nun auch in den Tumoren von RT2xStat1^{-/-}-Mäusen nach Kombinationstherapie bestätigt werden (4.2.5). Zudem wurde, trotz ausbleibendem Therapieerfolg, nach der kombinierten Behandlung (T_H1+ICB) oder der T_H1-Zell-Monotherapie in den Tumoren von RT2xStat1^{-/-}-Mäusen ein CD3⁺ Immuzellinfiltrat detektiert. Dieses war vergleichbar mit dem CD3⁺ Immuzellinfiltrat in den Tumoren von erfolgreich behandelten RT2-Wildtyp-Mäusen (4.2.3.3). Eine detaillierte immunhistochemische Betrachtung von Tumor-Gewebeschnitten behandelter RT2-Wildtyp- und RT2xStat1^{-/-}-Mäusen verifizierte die Anwesenheit von CD3⁺ T-Zellen und zeigte zudem eine

Einwanderung von MHC-II-positiven und F4/80 positiven Immunzellen¹⁶⁷. Eine mangelnde Induktion der anti-tumoralen Immunantwort kann also als Ursache einer defekten Seneszenz-Induktion in RT2xStat1^{-/-}-Mäusen ausgeschlossen werden.

Weiter sollte der Einfluss des unterbrochenen IFN- γ Signalweges auf die T-Zellmigration in RT2xStat1^{-/-}-Mäusen betrachtet werden. Die Migration von transferierten TA-spezifischen Th1-Zellen wird in Abhängigkeit von STAT1 reguliert und kann durch dessen Abwesenheit stark beeinträchtigt werden, wie bereits in einem murinen Lungenentzündungsmodell durch Studien von Mikhak *et al.* gezeigt wurde¹⁷⁴. Das Immunzellinfiltrat in isolierten Tumoren behandelter RT2xStat1^{-/-}-Mäuse wurde lediglich auf die Anwesenheit von CD3⁺ T-Zellen untersucht (4.2.3.3). Ob es sich dabei ganz oder teilweise um transgene T_H1-Zellen handelt, kann daher nicht beurteilt werden. Lediglich die Milzen wurden hinsichtlich der Migration von T_H1-Zellen untersucht. Interessanterweise wurden die T_H1-Zellen in keiner der aus RT2xStat1^{-/-}-Mäusen isolierten Milzen wiedergefunden. Im Gegensatz dazu konnten rund ein Viertel der CD4⁺ T-Zellen in den Milzen der korrespondierenden RT2-Wildtyp-Mäuse als transgene T_H1-Zellen identifiziert werden (4.2.4). Mikhak *et al.* konnten wiederum in Abwesenheit von STAT1 eine Migration transferierter TA-spezifischer Th1-Zellen in die Milz nachweisen¹⁷⁴. Ob sich die T_H1-Zellen also überhaupt im Organismus von RT2xStat1^{-/-}-Mäusen etablieren, sollte durch eine erweiterte Analyse der sekundär lymphatischen Organe und des TMEs untersucht werden.

Unabhängig davon zeigten die T_H1-Zellen dennoch einen Effekt auf die Induktion einer Immunantwort in RT2xStat1^{-/-}-Mäusen, erkennbar an der Rekrutierung von CD3⁺ T-Zellen ins TME in Folge wiederholter T_H1-Zell-Applikationen (4.2.3.3). Analog dazu konnten Brenner *et al.* nach zwei T_H1-Zell-Applikationen in RT2xStat1^{-/-}-Mäuse eine Rekrutierung von CD4⁺ T-Zellen und von DCs ins TME nachweisen¹⁶⁷. Folglich kann durch die T_H1-Zellen eine Immunantwort induziert werden, auch wenn die T_H1-Zellen sich nicht im Organismus etablieren. Umfassendere Analysen zur Migration transferierter T_H1-Zellen im RT2xStat1^{-/-}-Mausmodell könnten wichtige, weiterführende Erkenntnisse über die Wirkungsweise der IFN- γ -abhängigen Immunantwort geben.

Dass solide murine Tumore auch unabhängig von einer zytotoxischen Immunantwort über die STAT1-vermittelte Induktion von p16^{Ink4a} und dem daraus resultierenden Wachstumsarrest kontrolliert werden können, wurde durch Studien im syngenem RT2-Inselzellkarzinommodell bekräftigt. Innerhalb dieser Studien konnten Brenner *et al.* zeigen, dass in C3H-Mäuse transplantierte RT2xStat1^{-/-} Tumore, im Gegensatz zu den ebenso transplantierten RT2xWildtyp-Tumoren, nach einer alleinigen Behandlung mit den IC-Inhibitoren PD-L1/LAG-3 kein p16^{Ink4a} induziert werden konnte; die Zellen exprimierten auch keine sonstigen Seneszenz-Marker wie H3K9me3, pHP1 γ und zeigten keine erhöhte SA- β -Gal Aktivität¹⁶⁷.

Die Induktion eines dauerhaften Wachstumsarrests über Zellzyklus-kontrollierende Proteine wie p16^{Ink4a} stellt also neben der Induktion einer zytotoxischen Immunantwort einen wichtigen effektiven Mechanismus zur Kontrolle maligner Tumore mittels Immuntherapien dar.

Analysen von Melanombiopsien aus Patienten, welche nicht auf eine IC-Inhibitor-Therapie ansprachen, zeigten deutlich mehr „*loss-of function*“ Mutationen Seneszenz-induzierender Zellzyklusgene bzw. „*Gain-of-function*“ Mutationen hinsichtlich von Genen, welche die Zellproliferation maßgeblich fördern¹⁶⁷. Tatsächlich waren alle humanen Tumorbiopsien *in vitro* anfällig für zytotoxische Immunantworten. Eine Seneszenz-Induktion war experimentell jedoch nur in den Tumorbiopsien aus Patienten mit wirksamer IC-Inhibitor-Therapie zu beobachten¹⁶⁷. Die Zytokin-vermittelte Induktion eines stabilen Wachstumsarrests stellt also einen kritischen Einfluss auf den Erfolg von CD4⁺ T-Zell bzw. IC-Inhibitor-basierenden Immuntherapien dar.

5.3 Modulation des TMEs und der peripheren Immunzelllandschaft

Eine detaillierte Charakterisierung der zellulären und molekularen Bestandteile des TMEs und der sekundär lymphatischen Organe im Kontext einer Behandlung kann maßgeblich zum Verständnis von Therapie-induzierten Immunantworten und deren Wirkmechanismen beitragen. Dies ist besonders wichtig, um immuntherapeutische Ansätze zu optimieren oder gar zu kombinieren und zudem neue Therapiekomponenten zu identifizieren. Die meisten präklinischen und klinischen Studien beschränken sich dennoch auf lokale Analysen des TMEs. Dabei ist bis heute nicht ausreichend bekannt, wo zu welchem Zeitpunkt eine effektive anti-tumorale Immunantwort initiiert und aufrechterhalten wird. Des Weiteren ist nicht bekannt, welche fein regulierten, zellulären und molekularen Mechanismen einer effizienten Immuntherapie zugrunde liegen oder wiederum das Tumorstadium unbeabsichtigt oder gar unbemerkt fördern können¹⁶⁴

Die bloße Anwesenheit von T-Zellen im TME zeigt, dass lokal agierende Immunzellpopulationen einen wichtigen Bestandteil einer anti-tumoralen Immunantwort darstellen und zum Behandlungserfolg zellulärer Immuntherapien beitragen können. Daher liegt nahe, dass die therapeutische Wirkung von IC-Blockern wie PD-L1/LAG-3 hauptsächlich über die Reaktivierung inhibierter TILs vermittelt wird. Eine vermehrte Expression von PD-L1 im Tumorgewebe ist jedoch kein zuverlässiger Marker für eine erfolgreiche Therapie, was deutlich macht, dass nicht nur lokale Bedingungen eine Behandlung maßgeblich beeinflussen können⁸⁹. Aktuelle Studien widmen sich daher immer häufiger auch den systemischen Effekten von Immuntherapien^{164,203,204}.

Spranger *et al.* konnten in einem murinen Melanommodell zeigen, dass eine Blockade der T-Zellmigration aus den sekundär lymphatischen Organen nahezu keinen Effekt auf eine IC-Inhibitor-Therapie hatte. Dies wurde jedoch nur beobachtet, wenn die immunogenen Tumore bereits vor Therapiebeginn ein T-Zellinfiltrat aufwiesen. Eine Blockade der T-Zellmigration aus den sekundär lymphatischen Organen vor Inokulation der Tumorzellen verhinderte einen therapeutischen Effekt²⁰³. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit der Induktion einer Immunantwort in den sekundär lymphatischen Organen. Andere Arbeitsgruppen konnten wiederum

darlegen, dass sich eine im TME etablierte anti-tumorale Antwort über lymphatische Organe koordinieren und erhalten lässt und zudem nicht wirksam ist, wenn die Auswanderung von Immunzellen aus dem lymphatischem Gewebe blockiert wird^{164,205}. So haben Fransen *et al.* gezeigt, dass der Tumor-drainierende Lymphknoten ein zentrales Element einer erfolgreichen Immunantwort hinsichtlich der T-Zell-Aktivierung und deren Migration darstellt²⁰⁵. Spitzer *et al.* haben anhand einer sehr aufwendigen Analyse sekundärer lymphatischer Organe eine Population peripherer CD4⁺ T-Zellen mit Effektor/Gedächtnisfunktion ermittelt, welche mit einem Therapieerfolg im untersuchten Mausmodell korrelierte. Zudem konnte die Arbeitsgruppe in Melanompatienten eine analoge CD4⁺ T-Zellpopulation nachweisen, welche ebenfalls mit einer erfolgreichen Therapie korrelierte¹⁶⁴. Die kontroversen Beobachtungen in den oben beschriebenen Tumormodellen verdeutlichen, dass das zu untersuchende Tumormodell für zukünftige Studien sorgfältig ausgewählt und evaluiert werden sollte. Zudem sollte der Beitrag der sekundär lymphatischen Organe zur Ausbildung einer erfolgreichen anti-tumoralen Antwort in Zukunft eingehender untersucht und berücksichtigt werden.

Zur Charakterisierung der zellulären Wirkmechanismen der Kombinationstherapie im fortgeschrittenen RT2-Inselzellkarzinommodell sollte daher eine umfassende Analyse der einzelnen zellulären Komponenten des TMEs, aber auch der lymphatischen Organe (wie des Tumor-drainierenden PLKs, des ALKs, der Milz und des Knochenmarks) nicht außer Acht gelassen werden. Dafür wurden Durchflusszytometrische Analysen mit Fokus auf verschiedene T-Zellpopulationen angestellt.

5.3.1 Globale Bewertung der Leukozytenpopulationen

Die dominierenden Immunzellpopulationen im TME sind T-Zellen, Makrophagen sowie DCs⁶⁹, jedoch unterscheiden sich diese Populationen je nach Tumorentität stark in ihrer Funktionalität. T-Zellen lassen sich oberflächlich in T-Effektor- und Gedächtniszellen, welche Teil einer effektiven anti-tumoralen Antwort sind, und in T_{regs}, welche eine Immunantwort regulieren oder gar unterdrücken, einteilen⁷⁶. Des Weiteren können Immunzellen wie Makrophagen genauso immun-stimulierende als auch supprimierende Eigenschaften haben²⁰⁶.

Eine erste Betrachtung des Immunzellinfiltrats der Inselzellkarzinome aus RT2-Mäusen zeigte in Folge wiederholter ACTs im Vergleich zu allen anderen Behandlungen eine sehr starke Leukozyteninfiltration ins TME. CD3⁺ T-Zellen stellten dabei die dominierende Leukozytenpopulation dar und wurden vermehrt vor allem durch die Injektion von T_H1-Zellen im TME beobachtet. In Kombination mit einer IC-Blockade konnte deren Anteil nochmals gesteigert werden (4.3.1). Im Einklang mit den immunhistochemischen Daten, welche die starke Tumor-Infiltration von CD3⁺ T-Zellen in Folge wiederholter ACTs bestätigten (4.2.1), wurden bereits auch im frühen RT2-Inselzellkarzinommodell T-Zellen detektiert, welche die Inselzellkarzinome in Folge wiederholter T_H1-Zell-Behandlungen massiv infiltrierten⁶². In den Organen des lymphatischen Systems wiederum wurden keine signifikanten Unterschiede in den relativen Anteilen der CD3⁺ T-Zellen an der lebenden Zellpopulation detektiert (4.3.1).

Zudem wurden im TME größere Populationen an DCs und NK-Zellen detektiert. Diese Zellpopulationen unterschieden sich in Folge der jeweiligen Behandlungen jedoch nicht maßgeblich voneinander (4.3.1). Während also die relative Populationsgröße an DCs im TME nicht wesentlich durch die Therapie beeinflusst wurde, konnte im Tumor-drainierenden Lymphknoten eine Erhöhung der DC-Population als Konsequenz der ICB-basierten Behandlung beobachtet werden (4.3.1). Da die Initiierung adaptiver Immunantworten vor allem in den sekundären lymphatischen Organen stattfindet und DCs maßgeblich daran beteiligt sind, könnte es sich hierbei um die Ausbildung einer endogenen anti-tumoralen Immunantwort in Folge der IC-Blockade handeln²⁰⁷.

Aktuelle Studien zeigen, dass vor allem die Anwesenheit einer bestimmten, CD103⁺ CD8⁺ DC-Subpopulation im TME die Voraussetzung für eine effektive Infiltration von CTLs in das Tumoreal darstellt^{208,209}. Im Gegensatz zu CD11b⁺ DCs, welche vor allem mit CD4⁺ T-Zellen interagieren, sind CD103⁺ CD8⁺ DCs in der Lage, CTLs durch „cross-priming“ zu aktivieren. Salmon *et al.* konnten im Kontext einer anti-PD-L1-basierten Immuntherapie zeigen, dass diese DC-Subpopulation Tumorantigene aus dem TME in den Tumor-drainierenden Lymphknoten transportiert, die Antigene dort präsentiert und so die Aktivierung von CTLs einleitet, welche anschließend in den Tumor migrieren, um dort ihre Effektorfunktionen

auszuüben²⁰⁹. Diese effektive Immunantwort wiederum war, wie auch im hier untersuchten RT2-Mausmodell nicht allein über eine PD-L1 Blockade zu erreichen, sondern wurde durch eine zusätzliche therapeutische Stimulation der DCs verstärkt²⁰⁹.

Die Anwesenheit von CD103⁺ CD8⁺ DCs im TME ist auch für den Erfolg adoptiver T-Zelltherapien ausschlaggebend, was Spranger *et al.* eindrücklich in einem experimentellen Melanommodell gezeigt haben. Zudem konnten Spranger *et al.* zeigen, dass CXCR3⁺ CTLs aus dem Lymphknoten durch die vor allem von CD103⁺ DCs sekretierten Chemokine MIG und IP-10 (5.2.1) in den Tumor gelockt wurden²⁰⁸. Der Einfluss von DCs könnte also maßgebliche Effekte auf die Kombinationstherapie im RIP1- Tag2 Mausmodell haben und sollte deshalb näher untersucht werden. Eine detaillierte phänotypische Analyse der DC-Population auf Zelloberflächenmarker wie CD11b, CD103 und CD8 und der Einsatz von KO-Mauslinien, welche die DC-Reifung verhindern (z. B. Batf3^{-/-} Linien)^{208,209}, würden solche Untersuchungen im Kontext der Kombinationstherapie ermöglichen.

Dass der Tumor-drainierende LK eine entscheidende Rolle in der Aktivierung einer anti-tumoralen Immunantwort unter IC-Blockade spielt, konnten Chamoto *et al.* in einem murinen Tumormodell durch dessen Entfernung eindrücklich zeigen. Der Effekt einer PD-1 Blockade wirkte nicht nur lokal auf das TME bzw. die sich darin befindlichen re-aktivierbaren Immunzellen, sondern spielte auch eine wesentliche Rolle in der Induktion und Aufrechterhaltung einer systemischen zytotoxischen T-Zellantwort im Tumor-drainierenden LK²¹⁰. Auch Fransen *et al.* haben den Effekt einer Blockade der PD-1/PD-L1 Achse in zwei Mausmodellen untersucht und konnten bestätigen, dass der Tumor-drainierende LK eine zentrale Rolle in der Vermittlung des Therapieeffekts spielt. Beides, die Restriktion von Lymphozyten im Tumor-drainierenden LK und die Resektion des Selbigen verhinderte eine erfolgreiche therapeutische Wirkung der IC-Blockade²⁰⁵. In beiden Studien war der Therapieeffekt jedoch, wie auch in den Studien von Spranger *et al.* und Salmon *et al.*, von einer CD8⁺ T-Zellantwort abhängig. Die Rolle des Tumor-drainierenden LKs innerhalb einer CD4⁺ T-Zell-abhängigen Immuntherapie ist bisher wenig erforscht und wird in den Abschnitten 5.3.3, 5.3.4 und 5.3.6 näher betrachtet.

Abseits der lokalen Immunantwort innerhalb des Tumors und der Lymphknoten wurden auch die systemischen Effekte auf die Immunzellpopulationen betrachtet. So waren in der Milz die B-Zellen die dominante Immunzellpopulation. Bis auf die Granulozytenpopulation, welche durch eine T_H1-Zell-basierte Therapie leicht anstieg, wurden keine weiteren Therapieeffekte auf die prozentuellen Anteile der Immunzellen in der Milz detektiert (4.3.1).

Im Knochenmark reduzierte sich der Anteil an B-Zellen und Granulozyten in Folge der Kombinationstherapie deutlich, vor allem jeweils im Vergleich zu scheinbehandelten Tieren. Die Rekrutierung von B-Zellen aus dem Knochenmark in die Peripherie wurde insbesondere im Kontext der T_H1-Zell-Therapie, unabhängig von einer IC-Blockade, beobachtet; Granulozyten hingegen wurden gleichermaßen nach adoptiven T_H1-Zell-Transfers oder IC-Blockade aus dem Knochenmark freigesetzt (4.3.1). Aktivierte T-Zellen sezernieren den Wachstumsfaktor GM-CSF, welcher hämatopoetische Vorläuferzellen im Knochenmark zur Reifung und Migration aus dem Knochenmark stimuliert^{184,211}. Neuere Studien weisen zudem darauf hin, dass eine Aktivierung von Granulozyten auch mit einer erhöhten Expression von PD-L1 verbunden ist^{212,213}.

Die globale Betrachtung der Zellpopulationen im TME und den lymphatischen Organen nach der immuntherapeutischen Behandlung von RT2-Mäusen mit fortgeschrittenen Inselzellkarzinomen ermöglicht einen ersten Eindruck der potentiellen zellulären Wirkmechanismen.

Das Verhältnis der CD3⁺ T-Zellpopulationen zu anderen Leukozytenpopulationen war in der Milz und den Lymphknoten von RT2-Mäusen nicht wesentlich verändert. Lediglich im Tumor stieg das Verhältnis von CD3⁺ T-Zellen zu den restlichen Zellpopulationen an. Im Kontrast dazu siedelten sich DCs, welche für die Antigenpräsentation und Aktivierung von T-Zellen eine tragende Rolle spielen, vermehrt im Tumor-drainierenden PLK an. Auf diese zwei wesentlichen Veränderungen wird im Folgenden näher eingegangen.

5.3.2 T-Zellen im TME

T-Zellen sind existentielle Effektorzellen zur Ausbildung einer erfolgreichen anti-tumoralen Immunantwort. Zahlreiche Studien in murinen Tumormodellen und

Untersuchungen humaner Tumorbiopsien konnten bereits unterschiedliche CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellpopulationen mit starken anti-tumoralen Effekten identifizieren^{23,59,61-64,119, 164,210,214}. Wo und zu welchem Zeitpunkt diese T-Zellpopulationen untereinander bzw. mit anderen Immunzellen interagieren, um eine effektive therapeutische Wirkung zu erzielen und diese aufrecht zu erhalten, ist jedoch noch weitgehend unbekannt^{164,210}. Im RT2-Mausmodell nehmen CD4⁺ T-Zellen eine zentrale Rolle in der Vermittlung des therapeutischen Effekts der Kombinations-therapie ein (5.1)^{64,167}: Die adoptiv transferierten T_H1-Zellen vermitteln durch die Sezernierung von IFN-γ die Reduktion der Tumovaskularisierung und die Ausbildung der Seneszenz in Tumorzellen (5.2.1, 5.2.2)^{62,64,167}.

CD4⁺ T-Zellen repräsentieren den größten Anteil der CD3⁺ T-Zellepopulation im TME der Inselzellkarzinome und wurden vor allem in Folge der T_H1-Zell-Applikationen vermehrt detektiert (4.3.4.1). Dies lässt vermuten, dass sich die CD4⁺ T-Zellpopulation hauptsächlich aus den transgenen T_H1-Zellen zusammensetzt. Auch Brenner *et al.* haben nach einer T_H1-Zell-Monotherapie im RT2-Inselzellkarzinommodell vermehrt CD4⁺ T-Zellen im TME detektiert und konnten zudem nach Kombinationstherapie (T_H1+ICB) anhand von Immunfluoreszenz-Färbungen keine CD8⁺ T-Zellen nachweisen¹⁶⁷. Ein Versuch, die transgenen T_H1-Zellen von anderen CD4⁺ Phänotypen abzugrenzen, wurde bisher nicht angestellt. Entgegen der Annahme, es handle sich bei dem CD4⁺ T-Zellinfiltrat im TME vor allem um die transferierten T_H1-Zellen¹⁶⁷, wurde mittels eines fluoreszierenden Antikörpers gegen den Tag2-spezifischen TCR²¹⁵ jedoch gezeigt, dass sich diese Population größtenteils aus endogenen T-Zellen zusammensetzt (4.3.3.1).

Dass jedoch auch die transferierten T_H1-Zellen einen Teil des Immunzellinfiltrats im Tumor repräsentieren soll nicht außer Acht gelassen werden. Im Einklang damit zeigten *in vivo* und *ex vivo* Studien von Müller-Hermelink *et al.* und Griessinger *et al.* eine deutliche Infiltration von eindeutig Tag2-spezifischen Th1-Zellen in die Tumore von RT2-Mäusen. Leider wurden die transferierten Zellen auch hier keinem potentiellen endogenen Immunzellinfiltrat gegenübergestellt^{62,142,216}, so dass die Rekrutierung endogener CD4⁺ T-Zellen in die RT2-Inselzellkarzinome erstmalig innerhalb dieser hier vorliegenden Arbeit im Kontext der T_H1-Zell-basierten Immuntherapie nachgewiesen wurde.

5.3.3 Therapeutische T_H1-Zellen

Um letztendlich die Rolle der transferierten T_H1-Zellen im Tumor und im lymphatischen System genauer zu charakterisieren, wurde zunächst deren globale Verteilung betrachtet. Die transferierten T_H1-Zellen wurden durch die kombinierte Blockade von PD-L1 und LAG-3 anteilmäßig weder im TME noch in den sekundär lymphatischen Organen beeinflusst. T_H1-Zellen manifestierten sich hauptsächlich im Tumor-drainierenden PLK, wo sie nahezu die Hälfte (ca. 40%) der gesamten CD3⁺ T-Zellpopulation einnahmen (CD4^E: ca. 50%, CD8: ca 10%) (4.3.3.1). In der Milz und im Tumor wiederum lag deren Anteil im Schnitt bei lediglich 10% (4.3.4.1, 4.3.2.1)

In den Lymphknoten werden den T-Zellen Antigene durch professionelle APCs, vorrangig DCs, präsentiert. Die Zirkulation von T-Zellen durch Blutbahn, Lymphe und lymphatisches Gewebe endet, sobald sie auf ihr spezifisches Antigen treffen. Molekulare *in vivo* Bildgebungsstudien mittels radiomarkierter Antikörper gegen definierte TCRs zur Zellmigration konnten eindrucksvoll eine spezifische Ansiedlung adoptiv transferierter T-Zellen unter anderem im Tumor-drainierenden Lymphknoten demonstrieren^{142,216}. Auch der hier angestellte semi-quantitative *ex vivo*-Vergleich der T_H1-Zellpopulation im Tumor-drainierenden PLK gegen die korrespondierende Population im Kontroll-LK (ALK) verdeutlichte, wie gezielt sich die Tag2-spezifischen T-Zellen nach deren Transfer ansiedelten. Im Gegensatz zum PLK konnten im ALK kaum messbare Populationen ermittelt werden (4.3.3.1). Der Tumor drainierende PLK könnte also tatsächlich eine wesentliche Rolle innerhalb der anti-tumoralen T-Zellantwort in RT2-Mäusen einnehmen (5.3.1)^{205,208-210}.

Während die *in vitro* aktivierten T_H1-Zellen in allen untersuchten Organen eine starke Antigenerfahrung durch eine hohe Expression von CD44²¹⁷ zeigten und vorwiegend einen Effektor-Gedächtnis-Phänotyp (T_{E/EM}) widerspiegeln, unterschied sich die Zelloberflächenexpression von ICs zwischen den T_H1-Zellen im TME und den T_H1-Zellen in den sekundär lymphatischen Organen dramatisch. Unabhängig der IC-Blockade wurde PD-1 auf den T_H1-Zellen im TME gleichermaßen stark exprimiert. In den sekundär lymphatischen Organen hingegen ging die PD-1-Expression der T_H1-Zellen nahezu verloren und lag nach der kombinierten Blockade von PD-L1 und

LAG-3 bei ungefähr 5%. Eine deutliche Co-Expression von TIM-3 wurde lediglich im Tumor beobachtet und wurde durch die zusätzliche ICB-Behandlung leicht verstärkt. Dennoch war der Anteil PD-1/TIM-3 Co-exprimierender Zellen sehr gering (8 bzw. 13 % der T_H1-Zellen) (4.3.2.3, 4.3.3.3, 4.3.4.3).

Während die Dynamik der Expression von PD-1 auf CD8⁺ T-Zellen und die daraus resultierenden Effekte bereits gut untersucht sind, ist über CD4⁺ T-Zellen bisher wenig bekannt^{218,219}. Konkel *et al.* haben in einem murinen Mausmodell die PD-1-Expression auf transferierten CD4⁺ T-Zellen untersucht und konnten so zeigen, dass CD4⁺ T-Zellen weniger sensitiv auf PD-1 vermittelte Signale ansprechen als CD8⁺ T-Zellen. Darüber hinaus ist eine Bindung von PD-1 an PD-L1 auf DCs für die Ausbildung inhibitorischer Effekte maßgeblich²¹⁹. Des Weiteren wurde in einer Studie an Glioblastompatienten die Expression von PD-1 auf CD4⁺ T-Effektorzellen untersucht. Im Rahmen dieser Studie konnte gezeigt werden, dass PD-1⁺ CD4⁺ T-Zellen nicht mehr funktional sind und nicht mehr proliferieren, aber dennoch IFN- γ sezernieren. Weiter wurde gezeigt, dass die CD4⁺ T-Zellen durch IC-Blockaden nicht mehr reaktivierbar sind. Folglich wurde postuliert, dass die Expression von PD-1 ein Indiz für den Kontakt mit Tumorgewebe (Gewebserfahrung) ist. Diese Beobachtungen könnten nun auf das RT2-Inselzellkarzinommodell übertragen werden, denn vor allem die „Gewebsständigen“ T_H1-Zellen im Tumor weisen eine hohe Expression an PD-1 auf (4.3.2.3). Die Kombination der T_H1-Zell-Therapie mit der Injektion von anti-PD-L1 mAbs (und anti-LAG-3 mAbs) könnte den Kontakt zwischen membranständigem PD-1 auf T_H1-Zellen und PD-L1 auf DCs im TME unterbinden und somit die antitumoralen Effektorfunktionen von T_H1-Zellen steigern. Dies würde sich am ehesten durch *ex vivo* Funktionsanalysen oder immunhistochemische Färbungen mit Fokus auf die Expression von Zytokinen überprüfen lassen.

Die Expression von PD-1 ist vor allem bei den Antigen-spezifischen T_H1-Zellen stark auf das Tumorgewebe begrenzt, während andere T-Zell Populationen auch in den sekundär lymphatischen Organen höhere PD-1-Expressionsraten zeigen (4.3.2.3, 4.3.3.3, 4.3.4.3). Eine alleinige Blockade von LAG-3 in RT2-Mäusen, welche keiner initialen Immunzelldepletion ausgesetzt waren, hatte kaum einen Einfluss auf die ohnehin sehr geringe basale PD-1-Expression auf endogenen CD4⁺ T-Zellen im

PLK. Eine PD-L1 Blockade hingegen bewirkte einen starken Anstieg der PD-1-Expression (*siehe Anhang, Abb. 66*). Eine kombinierte Blockade von PD-L1 und LAG-3 wiederum resultierte zwar in einem Anstieg der PD-1-Expression, dieser war jedoch nur halb so stark wie nach der alleinigen PD-L1 Blockade (*siehe Anhang, Abb. 66*). Dies bestätigt zum einen die Synergie zwischen der Expression von PD-1 und LAG-3⁸² und liefert zum anderen einen Hinweis auf eine geringere Ligandbindung von PD-1 auf CD4⁺ T-Zellen an PD-L1 auf DCs, was wiederum einer Immunsuppression von CD4⁺ T-Zellen vorbeugen würde.

Die Unterscheidung zwischen an PD-L1 gebundenem PD-1, das inhibierende Signale ins Zellinnere vermitteln kann und freiem PD-1, welches mangels Bindungspartnern in der unmittelbaren Umgebung hochreguliert werden kann, mag einen wesentlichen Einfluss auf die Effektorfunktionen von CD4⁺ T-Zellen haben und sollte im Rahmen weiterführender Studien untersucht werden.

5.3.4 Endogene CD4⁺ T-Zellen

Endogene CD4⁺ TILs zeichneten sich, unabhängig von der Behandlung, im Tumor durch eine starke Antigenerfahrung (CD44⁺)²¹⁷ aus, was die Induktion einer spezifischen Immunantwort widerspiegeln kann (4.3.2.3).

Cao *et al.* haben bereits 2002 nach einem ACT von Tag2-spezifischen Milzzellen in RT2-Mäuse ein starkes CD4⁺ T-Zellinfiltrat im Tumorgewebe detektiert. Auch hier wurde nicht zwischen transgenen und endogenen CD4⁺ T-Zellen unterschieden. Dennoch wurde angenommen, dass ein Teil des Infiltrats aus CD4⁺ T-Zellen besteht, welche keine Spezifität für das Tumorantigen Tag2 aufweisen, sondern sogenannte „*Bystander*“ Zellen darstellen⁶³. Diese Rekrutierung von Tag2-TCR-negativen, aber Antigen-erfahrender CD4⁺ T-Zellen ins TME von RT2-Mäusen konnte nun erstmals innerhalb dieser Arbeit verifiziert werden.

„*Bystander*“ T-Zellen sind Antigen-unspezifisch und werden durch ein hochinflammatorisches Milieu aktiviert. Sie können in Abhängigkeit von IFN- γ und TNF auf das Tumorstroma einwirken und entstammen womöglich eher T-Gedächtniszellen Tumorfremder Spezifität als naiven T-Zellen, da naive T-Zellen eine höhere Schwelle zur Aktivierung überwinden müssen^{220,221}. Die meisten Erkenntnisse über die Aktivierung von „*Bystander*“ T-Zellen konnten bisher durch die

Analyse von CD8⁺ T-Zellpopulationen gewonnen werden; über CD4⁺ T-Zellen ist bis dato nur wenig bekannt²²⁰, jedoch wurde auch bereits für CD4⁺ T-Gedächtniszellen eine IL-2 vermittelte „Bystander“ Aktivierung demonstriert²²².

Auch wenig affine bzw. Neo-Antigene können für eine Aktivierung endogener TILs verantwortlich sein und eine Rekrutierung endogener CD4⁺ T-Effektorzellen nach einer IC-Blockade bewirken²²³. In RT2-Mäusen führte bereits die alleinige Blockade von ICs zu einer Rekrutierung endogener CD4⁺ T-Zellen in den Tumor (4.3.2.1). Dass nun aber eine IC-Inhibitor-Monotherapie in RT2-Mäusen für einen therapeutischen Effekt nicht ausreicht, mag an der ausgeprägten Selbst-Toleranz und der mangelnden Verfügbarkeit von (Neo-) Antigenen liegen: Das Tumor-spezifische Antigen Tag2 liegt bereits während der Embryonalentwicklung in den Mäusen vor, weshalb sich eine Selbst-Toleranz gegen dieses Antigen gebildet hat²¹⁵. Diese kann jedoch durch die Injektion von Tag2-spezifischen T_H1-Zellen überwunden werden (4.3.2.1). Dies führt zur Rekrutierung weiterer Immunzellen wie DCs und Makrophagen ins TME¹⁶⁷. Dadurch können Neo-Antigene frei werden, die wiederum über eine ICB-induzierte, erleichterte Rekrutierung von DCs in den PLK transportiert werden können, was letztendlich zu einer Induktion von endogenen T-Zellen ins TME führen könnte (4.3.2.1)²²³.

Die gesteigerte relative Präsenz von Antigen-erfahrenen endogenen CD4⁺ T-Zellen im Tumor-drainierenden PLK und in der Milz, nicht aber im ALK (4.3.3.3, 4.3.4.3), lässt vermuten, dass, unabhängig von der Therapieform, auch systemische Immunreaktionen induziert werden können. Dies betrifft vor allem die Induktion von CD4⁺ T-Effektor-Gedächtniszellen und, seitens der CD8⁺ T-Zellen, die Induktion von CD8⁺ T-Effektorzellen.

Bereits die augenscheinlich wenig effektive ICB-Monotherapie (4.1.2) zeigt diesen Effekt, was darauf hindeutet, dass eine Blockade von ICs auch gezielt am Ort der Antigenpräsentation ihre Wirkung entfaltet. Darüber hinaus kann vermutet werden, dass bereits durch eine wenig spezifische Therapieform die Selbsttoleranz eines Systems überwunden wird und sich in Kombination mit weiteren therapeutischen Komponenten eine effektive Immunantwort ausbilden kann.

Die Behandlung mit T_H1-Zellen hat global betrachtet weniger Effekt auf die Expression von PD-1, TIM-3 und CD69 auf CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen als die

Behandlung mit den IC-Inhibitoren PD-L1/LAG-3. Dies unterstützt die Theorie, dass die T_H1 -Zellen ein immunologisches Gedächtnis formen und durch eine IC-Blockade Effektorfunktionen aktiviert werden. Einzig im Tumor zeigte sich ein kombinierter Effekt der T_H1 -Zellen und der IC-Blockade auf die CD69-Expression von T-Zellen (4.3.2.3, 4.3.2.2)

5.3.5 Regulatorische T-Zellen

Nun soll kurz auf die T_{reg} Population eingegangen werden. Ein starker Anstieg dieser inhibierenden Zellpopulation wurde ausschließlich im TME und exklusiv nach den Injektionen der T_H1 -Zellen auf einem relativ identischen Niveau beobachtet (etwa 15% der endogenen $CD4^+$ T-Zellen in beiden mit T_H1 -Zellen behandelten Gruppen repräsentierten T_{regs}) (4.3.2.3).

Die bloße Anwesenheit von T_{regs} im Tumor macht deutlich, dass sich durch die T_H1 -Zelltherapie eine umfassende Immunantwort etabliert hat. Eine erfolgreiche Immunantwort zeichnet sich nicht nur durch eine Infiltration von aktivierten Effektorzellen ins TME aus, sondern bedarf auch Regulationsmechanismen, die verhindern, dass umliegendes, gesundes Gewebe geschädigt wird. Jedoch inhibieren T_{regs} die anti-tumorale Immunantwort meist zum Vorteil des Tumorwachstums. Einige Therapieansätze beinhalten daher eine komplette Eradikation von T_{regs} , um die anti-tumorale Immunantwort zu maximieren. Da sich T_{regs} aufgrund der Homöostase von Immunantworten jedoch wieder regenerieren, sowie durch eine Eradikation von T_{regs} auch andere suppressive Immunantworten verstärkt werden können, werden stets neue Konzepte untersucht, immunsuppressive T_{reg} Populationen zu minimieren²²⁴. Interessanterweise hatte die zusätzliche IC-Blockade in T_H1 -Zell-behandelten RT2-Mäusen nahezu keinen Einfluss auf die PD-1-Expression der T_{reg} Population. Die Blockade bewirkte jedoch eine starke Reduktion der TIM-3-Expression (4.3.2.3). Die Tatsache, dass durch die effektivste Therapieform (T_H1 +ICB) die Expression von TIM-3, ein IC, der die immunsuppressive Wirkung von T_{regs} auf T-Effektorzellen in der Umgebung verstärkt^{225,226}, reduziert werden kann, macht deutlich, dass die Wirkung IC-basierter Therapien nicht alleine auf einer Reaktivierung von Effektorzellen beruht, sondern durch diese Therapieform auch immunsuppressive Zellen inaktiviert werden können. Die Wirkung von IC-Inhibitoren

ist somit nicht nur auf die (Re-)Aktivierung von T-Effektorzellen beschränkt, sondern kann auch eine Suppression regulatorischer Zelltypen und folglich eine Aktivierung und Migration weiterer Immunzellen, wie beispielsweise APCs, unterstützen²²⁴.

5.3.6 CD8⁺ T-Zellen

Zudem wurden in dieser Arbeit vermehrt CD8⁺ T-Zellen im TME detektiert (4.3.2.1). Diese Daten stehen in Kontrast zu den bisherigen durch Brenner *et al.* erhobenen Erkenntnissen nach Kombinationstherapie im RT2-Mausmodell. Mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie konnten von Brenner *et al.* keine CD8⁺ T-Zellen in den Inselzellkarzinomen nachgewiesen werden¹⁶⁷. Entgegen dieser Ergebnisse wurde bereits durch Cao *et al.* und erst kürzlich von Griessinger *et al.* eine T_H1-Zell-induzierte Infiltration von CD8⁺ T-Zellen ins TME von RT2-Mäusen beobachtet^{63,216}. Das von Griessinger *et al.* beobachtete Infiltrat im Rahmen der rein T_H1-Zell-basierten Immuntherapie im frühen Inselzellkarzinom-Stadium war jedoch, bei einer gleichzeitigen Reduktion der CD8⁺ T-Zellen in den sekundär lymphatischen Organen, sehr schwach. Die Tumore wurden zudem erst nach zehnwöchiger T_H1-Zell-Monotherapie untersucht, sieben Wochen später als die hier angestellten *ex vivo* Untersuchungen im fortgeschrittenen Tumorstadium. Es wird also weiter von einer realen Infiltration der CD8⁺ T-Zellen ins TME ausgegangen, welche dennoch im Rahmen weiterführender Studien verifiziert werden sollte.

Die Tumor-infiltrierenden endogenen CD8⁺ T-Zellen im hier untersuchten RT2-Inselzellkarzinommodell wurden vor allem nach Kombinationstherapie detektiert. Nach einer ICB- bzw. T_H1-Zell-Monotherapie konnte zwar eine CD8⁺ T-Zellpopulation im Tumor beobachtet werden, das Infiltrat war jedoch jeweils sehr schwach (unter 3% der lebenden Zellen). Folglich steigert vor allem die Kombination aus T_H1-Zellen und einer Blockade von ICs maßgeblich die Infiltration von CD8⁺ T-Zellen ins TME (4.3.2.1).

Bos *et al.* und Wong *et al.* haben in einem murinen Pankreastumormodell gezeigt, dass durch einen Transfer Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zellen eine Rekrutierung von CD8⁺ T-Zellen mit geringer Avidität für das Tumorantigen in den Tumor erfolgte. Die Rekrutierung von CD8⁺ T-Zellen durch vor allem den Tumor-infiltrierende CD4⁺ T-Zellen war maßgeblich von den transferierten, durch *in vivo* Vakzinierung

aktivierten CD4⁺ T-Zellen abhängig^{227,228}. Im Gegensatz zur T_H1-Zell-Therapie in RT2-Mäusen, wurden die transferierten Lymphozyten *in vivo* durch Vakzinierung aktiviert. Dass die endogenen CD8⁺ T-Zellen in RT2-Mäusen während einer T_H1-Zell-Monotherapie das Tumorgewebe lediglich schwach infiltrieren, kann an ihrer wahrscheinlich ebenso geringen Avidität zum Tag2-Tumorantigen liegen. Dass auch im RT2-Modell ein zusätzlicher Stimulus, vermittelt über die Blockade von ICs, zur Rekrutierung der CD8⁺ T-Zellen ins TME führt, deckt sich wiederum mit den von Bos und Wong *et al.* beschriebenen Daten und bekräftigt die Hypothese der Aktivierung über wenig affine Antigene bzw. Neo-Antigene (5.3.4)²²³.

Um einen besseren Eindruck der Funktionalität der CD8⁺ T-Zellpopulation zu erhalten, wurden deren Zelloberflächenmarker für Effektor- und Gedächtnisfunktionen betrachtet. Während durch die IC-Blockade fast ausschließlich T-Effektorzellen (T_E) detektiert wurden, welche sich *ex vivo* durch eine hohe Zytotoxizität auszeichnen könnten^{171,172}, führte die Behandlung mit T_H1-Zellen zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses (T_{EM})¹⁷². Die verhältnismäßig geringe Population an zentralen CD8⁺ T-Gedächtniszellen (T_{CM}) im Tumor wurde durch jegliche therapeutische Komponente kaum beeinflusst (4.3.2.2).

CD4⁺ T-Helferzellen erleichtern die Aktivierung von Antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen und deren Ausbildung von Gedächtnisfunktionen¹⁷². CD8⁺ T-Zellen können in Abwesenheit von TLR-vermittelten Signalen durch die Kreuzpräsentation extrazellulärer Antigene via MHC-I über eine von CD4⁺ T-Zellen „lizenzierte“ DC aktiviert werden. Die CD8⁺ T-Zelle bildet daraufhin nicht nur Effektorfunktionen aus, sondern entwickelt einen Pool an Gedächtniszellen, der bei erneutem Antigenkontakt wieder schnell reaktiviert werden kann. Diese sogenannte Lizenzierung von DCs ist abhängig von der Co-Stimulation des Zelloberflächenrezeptors CD40 durch den CD4⁺ T-Zellständigen Liganden CD40L¹⁷². Durch diese CD40/CD40L-Interaktion wird die Sezernierung von Zytokinen induziert, die die Antigenpräsentation und Expression Co-stimulierender Liganden wie CD70 auf DCs steigern²²⁹. CD8⁺ T-Zellen, welche unter der Beteiligung von CD4⁺ Th1-Zellen und der Co-Stimulation von CD27 durch CD70 auf DCs aktiviert wurden, sprechen unter anderem besser auf wenig affine Tumorantigene an und zeigen eine erhöhte

Migrationsrate und Zytotoxizität²²⁹. Eickhoff *et al.* haben in Virus-infizierten Mäusen gezeigt, dass diese Prozesse zunächst räumlich voneinander getrennt sind. CD8⁺ T-Zellen werden vermutlich autonom aktiviert und bekommen anschließend durch eine XCR1⁺, „lizenzierte“, im Lymphknoten ansässige DC Signale von ebenfalls zuvor autonom aktivierten CD4⁺ T-Helferzellen vermittelt²³⁰. Die XCR1⁺ DC dient dabei als eine Art Plattform für die Kommunikation zwischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen²³⁰.

Diese Ergebnisse können nun für das Verständnis der Interaktion zwischen T_H1-Zellen, DCs und CD8⁺ T-Zellen im PLK und TME von RT2-Mäusen von maßgeblicher Bedeutung sein: Durch die IC-Blockade werden DCs im Tumor aktiviert²³¹ und erleichtern den Transport von (wenig affinen bzw. Neo-) Antigenen in den Lymphknoten. Dort können CD8⁺ T-Zellen über Kreuzpräsentation autonom aktiviert werden und als T_E-Zellen in den Tumor wandern. Diese „einfach“ aktivierten CTLs konnten bereits als wenig effizient beschrieben werden und ähnelten phänotypisch inhibierten T-Zellen mit hoher PD-1-Expression (4.3.2.2)²³². Sind nun zusätzlich T_H1-Zellen vorhanden, formt sich eine CD8/DC/T_H1-Interaktionsplattform und es kommt durch die Ausbildung von CD8⁺ T-Zell-Gedächtnisfunktionen zu einer nachhaltigen Immunantwort im TME, welche durch eine vergrößerte CD8⁺ T-Zellpopulation mit Effektor- und Gedächtnisfunktionen definiert ist (4.3.2.2). Um dies zu verifizieren, sind selbstverständlich funktionelle *ex vivo* Analysen der CD8⁺ T-Zellpopulation notwendig.

Interessanterweise ging mit der zunehmenden Ausbildung an T-Zell-Gedächtnisfunktionen die Expression der ICs auf CD8⁺ TILs verloren. Deren Expression beschränkte sich im Tumor ausschließlich auf CD8⁺ T-Effektorzellen (T_E) (4.3.2.2). Dies deckt sich mit Beobachtungen von Kurtulus *et al.*, dass vor allem CD8⁺ T-Zellen, welche in der Lage sind, sich selbst zu erhalten, neben einer geringen PD-1-Expression Eigenschaften von Gedächtniszellen aufweisen²³³. Da umgekehrt mit steigender T-Zell-Aktivierung und somit zunehmender Ausbildung von Effektor-Funktionen eine steigende Expression von ICs verbunden ist⁷⁶, wurden die verschiedenen CD8⁺ T-Zell-Subpopulationen auf die Expression von PD-1 und TIM-3 untersucht. Die dominanteste Population an CD8⁺ T_E-Zellen mit gleichzeitig hoher

PD-1 und TIM-3-Expression wurde durch die Kombination von T_H1-Zellen und einer IC-Blockade beobachtet. Eine T_H1-Zell-Monotherapie äußerte sich zwar in der Ausbildung von T_E- und T_{EM}-Funktionen, die mangelnde Expression an ICs, vor allem dem Aktivierungsmarker PD-1, lässt jedoch auf eine reduzierte Aktivität der Effektor-T-Zellen schließen (4.3.2.2).

Inhibierende ICs wie PD-1, LAG-3 und TIM-3 werden durch andauernden Antigenkontakt und permanenter Stimulation des TCRs vermehrt an der Zelloberfläche exprimiert. Dies äußert sich zunehmend in einer Verringerung von Effektorfunktionen und hat Auswirkungen auf das Stoffwechselprogramm, die Epigenetik und das Expressionsprofil der Zelle^{74,76, 234,235}. Diese dynamische Entwicklung von einer dysfunktionalen T-Effektorzelle bis hin zu einer final erschöpften T-Zelle, beeinflusst maßgeblich die Fähigkeit zur Reaktivierung in Folge eines erneuten Antigenkontakts oder einer therapeutischen Blockade von ICs⁷⁴. Final erschöpfte T-Zellen lassen sich schwer wieder reaktivieren und limitieren somit die Effizienz einer therapeutischen IC-Blockade^{74,234,236}.

Eine Pionierarbeit von Im *et al.* in Mäusen mit chronischer Virusinfektion unterteilte erstmals die durch eine PD-1-Expression gekennzeichnete, sehr heterogene Population von CD8⁺ T-Effektorzellen in zwei grundlegende Phänotypen. Diese sind vor allem durch die zusätzliche Expression des Transkriptionsfaktors „*T cell factor 1*“ (Tcf1) oder die Expression weiterer inhibierender ICs, wie LAG-3 und TIM-3, gekennzeichnet²³⁷. PD-1⁺ Tcf1⁺ T-Zellen persistieren in Abwesenheit des spezifischen Antigens, besitzen die Fähigkeit, sich selbst zu erneuern und bilden eine Vorläufergeneration für eine Population an hoch zytotoxischen T-Effektorzellen, welche kein Tcf1 mehr benötigen und unter anderem die Expression von TIM-3 an der Zelloberfläche hochregulieren. Daher werden den Tcf1⁺ PD-1⁺ T-Zellen Stammzell-ähnliche Eigenschaften zugeschrieben („*stem cell-like cells*“, weiterhin als „**T_{SC}**“ bezeichnet) und Tcf1^{neg} PD-1^{hi} T-Zellen als eine eher erschöpfte Population beschrieben, welche sich vor allem durch eine hohe PD-1 und TIM-3 Co-Expression auszeichnet („*terminally-exhausted*“ T_E-Zellen, weiterhin als „**T_{ex}**“ bezeichnet)²³⁶⁻²³⁸. Im Gegensatz zu T_{ex}-Zellen sind T_{SC}-Zellen nach deren Isolation aus chronisch kranken Mäusen und einem ACT in ebenfalls Virus-infizierte Mäuse in der Lage, unter PD-L1-Blockade zu proliferieren und wiederum eine Population an T_{ex}-Zellen

mit starken anti-viralen Eigenschaften hervorzubringen²³⁷. Diese zwei neuartigen CD8⁺ T-Zellpopulationen wurden nun auch in murinen Tumormodellen untersucht und konnten die von Im *et al.* angestellten Beobachtungen, vor allem auch im Kontext von IC-basierten Therapien, bestätigen^{236,238}.

Die in RT2-Mäusen untersuchten CD8⁺ TILs lassen sich in zwei ähnliche Populationen unterteilen: T_E-Zellen mit hoher PD-1-Expression, aber fehlender TIM-3-Expression (PD-1^{hi} T_E-Zellen) und T_E-Zellen mit Co-Expression von PD-1 und TIM-3 (PD-1^{hi}TIM-3^{hi} T_E-Zellen). Eine dritte Population zeichnet sich durch eine geringe Expression von PD-1 und TIM-3 (PD-1^{lo} T_E Zellen) aus (4.3.2.2).

PD-1 wird sehr schnell, innerhalb von 24 Stunden nach Antigenkontakt, an der Zelloberfläche exprimiert²¹⁷. Miller *et al.* haben gezeigt, dass T_E-Zellen mit zunehmender PD-1-Expression weniger IL-2 und TNF produzieren, die Expression von Zytotoxinen aber ansteigt²³⁶. Die detektierten T_E-Zellen mit geringer PD-1-Expression befinden sich folglich in einer noch sehr frühen Phase der T-Zell-Aktivierung, könnten jedoch auch eine anerge, selbst-tolerante Population darstellen, welche durch eine unzureichende Co-Stimulation entstehen kann⁷⁵.

CD8⁺ T-Zellen mit einer geringen PD-1 Expression waren, wenn auch nur in geringem Maße, vor allem im Kontext der T_H1-Zell-Monotherapie im TME von RT2-Mäusen präsent. Die gesamte CD8⁺ T-Zellpopulation erhöhte sich erst durch die zusätzliche IC-Blockade unter gleichzeitiger Ausbildung von Effektorfunktionen (4.3.2.2). Die Vermutung liegt also nahe, dass es sich bei den PD-1^{lo} T_E-Zellen um eine zunächst anerge CD8⁺ T-Zell-Effektorpopulation handelte, welche sich durch eine verbesserte Antigenpräsentation im TME und im Lymphknoten (4.3) stimulieren ließ²⁰⁹.

Die beobachtete Population an PD-1^{lo} T_E-Zellen könnte aber auch eine Subpopulation an T_{SC}-Zellen repräsentiert haben. Wie bereits Im *et al.* und Miller *et al.*, haben Kurtulus *et al.* in einer kürzlich veröffentlichten Arbeit die proliferativen und anti-tumoralen Eigenschaften von Tcf1⁺CD8⁺ T-Zellen demonstriert. Im Gegensatz zu den bisher veröffentlichten Arbeiten, wurden diese Eigenschaften jedoch einer Population an PD-1^{-negativen}, aber Tcf1-positiven CD8⁺ T-Zellen zugeschrieben²³³. Neben der Fähigkeit, sich selbst zu erneuern und eine PD-1⁺CD8⁺ T-Effektor-Zell-Generation hervorzubringen, war auch diese PD-1^{neg} Tcf1⁺ CD8⁺ T-Zellpopulation für

die therapeutische Wirkung einer IC-Blockade (anti-PD-1/TIM-3 mAbs) unabdingbar²³³.

Ob T_{SC} und T_{ex}-ähnliche Populationen innerhalb der Kombinationstherapie im RT2-Mausmodell nun tatsächlich eine Rolle spielen, konnte anhand der in dieser Arbeit verwendeten Auswahl an fluoreszierenden Antikörpern nicht weiter untersucht werden. Allerdings ermöglichen die Ergebnisse einen Eindruck über die potentiellen zellulären Wirkmechanismen der zytotoxischen T-Zellantwort. Erst kürzlich haben Jansen *et al.* Immunzellinfiltrate in Tumorbiopsien von Patienten untersucht und konnten die Anwesenheit von T_{SC}- und T_{ex}-Zellen mit einem verbesserten Behandlungserfolg im Rahmen von konventionellen Therapieformen korrelieren. Zudem haben sie eine Population an APCs identifiziert, welche zusammen mit T_{SC}-Zellen immunologische Nischen innerhalb des TMEs ausbilden und eine Voraussetzung zur Generierung von T_{ex}-Zellen darstellten²¹⁴. T_{SC}-T-Zellpopulationen können in den sekundär lymphatischen Organen und im TME zu T_{ex}-Zellen expandieren²³⁶⁻²³⁸.

Im RT2-Mausmodell wird die PD-1-Expression auf CD8⁺ T-Zellen in Folge der therapeutischen IC-Blockade in der Milz (4.3.4.2), im PLK (4.3.3.2) wie auch im ALK (4.3.3.2) erhöht, dabei war die PD-1-Expression im Tumor-drainierenden PLK gegenüber dem nicht-drainierenden ALK doppelt so hoch. Hinsichtlich der TIM-3-Expression wurden, verglichen mit der Milz, im PLK lediglich geringe Mengen an PD-1^{hi} TIM-3^{hi}-Zellen detektiert. Gegenüber der korrespondierenden Population im TME waren PD-1^{hi} TIM-3^{hi}-Zellen wiederum in der Milz, wie auch in den Lymphknoten, in sehr geringer Zahl vorhanden.

Siddiqui *et al.* haben nach Vakzinierung neben Tumor-ständigen T_{SC}-Zellen diese auch im drainierenden Lymphknoten und in der Milz nachgewiesen²³⁸. Eine verbesserte Antigenpräsentation durch die Aktivierung von CD103⁺ DCs im PLK in Folge einer IC-Blockade^{209,233} kann die Migration von T_{ex}-Zellen (CD8⁺ PD-1^{hi} TIM-3^{hi} Zellen) in den Tumor fördern. Dies wäre auch eine mögliche Erklärung für den additiven Effekt der T_H1-Zell-Therapie und der IC-Blockade und in Folge dessen eine Erklärung für die reduzierten CD8⁺ T-Zellpopulationen im PLK (4.1.3).

Diese Daten weisen im Kontext der aktuellen Studien darauf hin, dass sich im RT2-Mausmodell eine effektive CD8-T-Zellantwort ausschließlich aufgrund der adoptiv transferierten T_H1 -Zellen ausbilden kann, welche durch eine verbesserte Kreuzpräsentation im PLK in Folge der durch die IC-Blockade aktivierten DCs, nochmals unter der Bildung von T_{SC} und T_{ex} Zellen, verstärkt wird. In wie weit der additive Therapieeffekt der Kombinationstherapie gegenüber der T_H1 -Zell-Monotherapie auf das Überleben der RT2-Mäuse von einer Verstärkung der $CD8^+$ T-Zellantwort abhängt und wie nachhaltig diese ist, sollte weiter untersucht werden. Die Ergebnisse könnten maßgeblich zur Verbesserung von adoptiven T-Zelltherapien beitragen und die Translation kombinierter Therapieansätze in die Klinik unterstützen.

5.3.7 Implikation für die molekulare Bildgebung

Um die Detektion von malignen Tumoren, deren Wachstum und Behandlungserfolg mittels bildgebender Verfahren wie der PET fortlaufend zu optimieren, wird neben der Verbesserung der Hardware und Datenrekonstruktion stets am Einsatz neuer molekularer Marker geforscht. Während der Einsatz von ^{18}F -FDG immer noch den Goldstandard zur Detektion von malignen Läsionen darstellt, wird mit Hochdruck an der Entwicklung neuer molekularer Tracer, wie radiomarkierter Antikörper, geforscht.

Neben Studien zur Perfusion solider Tumorgewebe, um beispielsweise die Verteilung der Radiotracer zu charakterisieren, bedarf es pharmakologischer Studien, um ein spezifisches PET-Signal bei einer möglichst geringen Injektionsmenge und gleichzeitig geringer Hintergrundstrahlung zu erhalten. Die Kombination mit Techniken wie der MRT ermöglicht zudem die Generierung multidimensionaler Daten, um im Idealfall ein genaues, personalisiertes Bild der molekularen Strukturen und Eigenschaften von malignen Tumoren zu generieren¹³⁴.

Die revolutionäre Entwicklung klinischer Immuntherapien konnte erst durch die Erforschung der zellulären und molekularen Mechanismen von Immunantworten in Tiermodellen, aber auch in humanen Geweben, zustande kommen. Genauso kann die Entwicklung von molekularen Biomarkern von diesen neuen Erkenntnissen profitieren. Tumore können je nach Entität und Entwicklungsstadium ein individuelles Immunprofil aufweisen. Tumore, welche keinerlei Immuninfiltrat aufweisen, werden

oft als „Immunwüsten“ oder „kalte Tumore“ bezeichnet. Ein stark von Immunzellen infiltriertes Tumorgewebe hingegen wird als „heißer Tumor“ deklariert. Kalte und heiße Tumore lassen sich via PET/CT oder PET/MRT durch den Einsatz von radiomarkierten Antikörpern oder Antikörperfragmenten gegen beispielweise CD3, CD4 oder CD8 detektieren²³⁹⁻²⁴¹.

Weiter kann man Tumore anhand der Expression von ICs wie PD-1 oder PD-L1 charakterisieren²⁴². Die Aussagekraft und Zuverlässigkeit dieser Untersuchungen ist aufgrund der biologischen Eigenschaften dieser Marker jedoch sehr individuell, was die Interpretation der Ergebnisse erschwert. Daher wird mit Hochdruck an der Erforschung neuartiger Marker gearbeitet, um eine anti-tumorale Immunantwort im TME, aber auch in sekundären Lymphatischen Organen, bestmöglich und so minimal invasiv wie nötig charakterisieren zu können.

Die Charakterisierung einer Therapieform in einem murinen Tumormodell auf zellulärer und molekularer Ebene kann dabei einen wichtigen Beitrag leisten. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Expression des ICs TIM-3 in RT2-Mäusen weitgehend auf das Tumorgewebe beschränkt ist und unter anderem eine Population von möglicherweise CD8⁺ CTLs markiert²³⁷. Solch ein Marker könnte eine fortgeschrittene Immunantwort anzeigen und durch seine lokal begrenzte und spezifische Expression den Vorteil eines geringen Hintergrundsignals mit sich bringen. Andererseits könnte die Expression auch unter der Detektionsgrenze von PET-Signalen liegen, was den Einsatz solch gering, aber spezifisch exprimierten Markern in der molekularen Bildgebung limitieren kann.

Weiter könnte eine Tcf1⁺ CD8⁺ T-Zellpopulation, welche beispielsweise über den korrespondierenden Zelloberflächenmarker Slamf6 detektiert werden kann²³⁶, oder eine Population an CD103⁺ DCs mit einem positiven Therapieeffekt korreliert werden^{22,164,205,214}. Die Ergebnisse aus dem RT2-Inselzellkarzinommodell verdeutlichen zudem, dass beispielsweise die bloße Detektion von CTLs keine Aussage über den T-Zellaktivierungszustand zulässt. Ein CD8-positives Infiltrat kann zu einem Zeitpunkt auch gänzlich aus final inhibierten T-Effektorzellen, welche sich nur sehr schwer reaktivieren lassen, bestehen, oder eine Population anzeigen, welche nicht in der Lage ist, sich selbst zu erneuern²³⁶.

Das Zelloberflächenmolekül CD4 wiederum markiert neben T-Effektorzellen auch T_{regs} und NK-T-Zellen⁸⁴. Die Detektion von PD-1 könnte hier ein genaueres Bild liefern, jedoch ist auch die Expression von PD-1 nicht auf CD4⁺ T-Zellen limitiert^{84,85} und je nach Aktivierungszustand nur sehr schwach vorhanden (5.3.3, 5.3.4).

All diese Umstände können zu Fehleinschätzungen der Immunantwort führen. Ein eingehend charakterisiertes Mausmodell schafft daher eine ideale Basis zur Evaluierung neuartiger Marker und Radiotracer für die molekulare Bildgebung und darüber hinaus zur Verbesserung und Neuentwicklung von Immuntherapien.

5.4 Beurteilung des Therapieansprechens anhand des Glukosemetabolismus in der Milz

IC-basierte Therapieformen verzeichnen seit der klinischen Zulassung des ersten IC-Blockers, Ipilimumab (anti-CTLA-4 mAb) im Jahr 2011, zur Behandlung von Lymphomen und soliden Tumoren große Erfolge²⁴². Auch wenn die Erfolgsquoten dieser neuartigen Therapien im Vergleich zu konventionellen Therapieformen, wie der Chemotherapie, sehr viel besser ausfallen können, bleibt die Bewertung des Therapieerfolgs eine große Herausforderung und führt aufgrund geringer Erfahrungswerte häufig zu Fehlinterpretationen. Dies kann sich negativ auf die weitere Behandlung der Tumorpatienten auswirken.

Die Neubildung kleinerer, maligner Läsionen oder ein kurzzeitiger Anstieg des Volumens bereits bekannter Läsionen (Pseudoprogression) stellt eine der Hauptursachen für diagnostische Fehlinterpretationen dar^{242,243}. Diese noch wenig erforschten, neuartigen morphologischen Veränderungen eines Tumors als Antwort auf Immuntherapien, welche vielmehr durch infiltrierende Immunzellen als durch die Tumorzellen selbst bestimmt werden, können mittels konventioneller Methoden zur Bewertung des Therapieverlaufs (z. B. RECIST, 1.6) irrtümlicherweise als Therapieversagen eingestuft werden^{151,242}. Neue oder angepasste Methoden zur Bewertung des Therapieerfolgs, wie „immune-related“ RECIST (iRECIST, 1.6), basieren ebenso wie RECIST auf radiologischen Befunden, berücksichtigen aber zudem den Umgang mit Pseudoprogression^{163,242}. Wann eine Pseudoprogression auftritt, wie lange sie anhalten kann und wie man sie von einer realen Tumorprogression unterscheiden kann, bleibt dennoch eine Herausforderung.

Die Analyse molekularer Marker wie z. B. die Zytokinlevel im Blut oder die PD-L1-Expression und Mutationsraten von Tumoren stellen eine vielversprechende Erweiterung zur Charakterisierung von Immuntherapien dar. Deren Verknüpfung mit radiologischen Untersuchungen und Bewertungen des Therapieerfolgs könnten einen großen Beitrag zur Patientenstratifikation leisten und werden daher intensiv erforscht²⁴². Weiter bieten moderne, nicht invasive Methoden wie die molekulare Bildgebung die Möglichkeit durch die Kombination anatomischer und funktioneller Informationen nicht nur das Wachstum von Tumoren zu beurteilen, sondern liefern

zudem Informationen über beispielsweise den Stoffwechsel (^{18}F -FDG) und die Proliferationsrate (^{18}F -FLT) im Gewebe^{134,151}. So lassen sich die Heterogenität eines Tumor-Gewebes darstellen und nekrotische von hoch-proliferierenden Zentren abgrenzen.

Die Effekte von IC-Inhibitor-Therapien beschränken sich nicht nur auf das Tumorgewebe (TME). Essentielle Interaktionen von T-Zellen und APCs finden vor allem in den sekundär lymphatischen Organen statt²⁴⁴. So haben Derclé *et al.* beispielsweise in Patienten mit Hodkin-Lymphom, welche auf eine anti-PD-1 Therapie ansprachen, einen Anstieg des metabolischen Markers ^{18}F -FDG in der Milz beobachten können, ein Effekt, welcher unter ähnlichen Umständen vereinzelt auch in sekundären Lymphatischen Organen von Melanompatienten beobachtet werden konnte^{151,173,245,246}. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde im RT2-Mausmodell der Einfluss von IC-basierten Immuntherapien auf die Aufnahme von ^{18}F -FDG in sekundäre Organe wie die Milz untersucht.

5.4.1 Die Bedeutung der Milz im Kontext von Immuntherapien

Obwohl die Milz kein essentielles lymphatisches Organ darstellt, übt sie durch ihre Kompartimentierung viele zentrale Funktionen aus. Als einer der größten Blutfilter ist sie in den Abbau von Erythrozyten durch Makrophagen in der roten Pulpa und einer damit verbundenen Wiederverwertung von Eisen, der Erkennung und Eliminierung von Pathogenen durch das angeborene Immunsystem, in die Differenzierung von Plasmazellen, deren Freisetzung von Antikörpern und an der Initiierung von adaptiven Immunantworten involviert²⁴⁷. Über die Rolle der Milz an der Initiierung und Aufrechterhaltung einer anti-tumoralen Immunantwort ist bisher jedoch wenig bekannt.

Beobachtungen an Mäusen nach einer Entfernung der Milz (Splenektomie) fallen sehr unterschiedlich aus. Eine Splenektomie resultierte in Mäusen mit anschließend induzierten, orthotopen Pankreastumoren in einem verstärkten Tumorwachstum und einer hohen Neigung zur intraperitonealen Metastasenbildung²⁴⁸. Im Gegensatz dazu hatte eine Entfernung der Milz inhibierende Effekte auf das Wachstum muriner Lungenkarzinome und deren Metastasierung, jedoch ausschließlich im fortgeschrittenem Stadium²⁴⁹. Hauptsächlich waren dafür myeloide Zellen mit

immunsupprimierenden Eigenschaften verantwortlich (MDSCs), eine Zellpopulation, die während einer aktiven Immunantwort vermehrt in den sekundären lymphatischen Organen zu finden ist²⁴⁹. In wie weit die immun-modulatorischen Eigenschaften der Milz für den Therapieerfolg von Immuntherapien eine Rolle spielen, ist bisher wenig untersucht. Spitzer *et al.* haben systemische Effekte einer IC-basierten Therapie auf sekundär lymphatische Organe untersucht und dabei gezeigt, dass eine andauernde Proliferation von Immunzellen nach der Initiierung einer anti-tumoralen Immunantwort unter effektiver Immuntherapie nicht im TME selbst, sondern vor allem in der Milz zu beobachten war¹⁶⁴.

5.4.2 ¹⁸F-FDG-Aufnahme in der Milz unter Checkpoint-basierter Immuntherapie

Da über die Dynamik der ¹⁸F-FDG Aufnahme in die Milz von RT2-Mäusen noch nichts bekannt war, wurden zunächst Zeitpunkt und Messdauer mittels dynamischer PET-Scans ermittelt. Eine 15-minütige Aufnahmedauer nach einer ¹⁸F-FDG-Verteilungszeit von 45 min wurde dabei als geeignetes Protokoll zur Datenakquisition evaluiert (4.4.1). Mittels dieses Protokolls konnte eine erhöhte Aufnahme des radioaktiven Glukoseanalogons ¹⁸F-FDG in die Milz von Mäusen unter Kombinationstherapie (T_H1+ICB) im Vergleich zur Scheinbehandlung (Sham) detektiert werden (4.4.2). Auch das Milzvolumen war leicht vergrößert (4.4.2).

In vitro aktivierte T_H1-Zellen stellen ein zentrales Element der Kombinationstherapie (T_H1+ICB) in RT2-Mäusen dar (5.1). Ein wiederholter ACT von T_H1-Zellen war mit einer erhöhten Glukoseaufnahme in die Milz der Tiere verbunden, welcher zudem durch die additive Behandlung mit Immun-Checkpoint-Blockern nochmals gesteigert werden konnte. Nun liegt also nahe, dass dieser erhöhte Glukoseumsatz vor allem auf die transferierten T_H1-Zellen zurückzuführen ist.

Aktivierte T-Zellen unterliegen, wie auch Tumorzellen, dem Warburg-Effekt und besitzen somit eine hohe Glykolyserate^{176,177}. Dieser Effekt wurde 1924 erstmals von Otto Warburg beschrieben und ist dadurch charakterisiert, dass Zellen auch in Anwesenheit von Sauerstoff Laktat produzieren und somit den weniger energieeffizienten Weg der „aeroben“ Glykolyse einschlagen, anstatt ihre Energie über die oxydative Phosphorylierung von Pyruvat, dem Endprodukt der Glykolyse, zu

gewinnen^{175,250}. Die Milchsäuregärung liefert zwar weniger Energie, stellt aber mehr Stoffwechselintermediate und Co-Faktoren zur Nukleotid- und Aminosäure-Biosynthese zur Verfügung und fördert somit die Zellproliferation²⁵⁰.

Aktivierte T-Zellen exprimieren vermehrt den Glukosetransporter 1 (GLUT-1) und besitzen eine hohe Glukoseaufnahme bei gleichzeitig hoher Laktatproduktion²⁵¹. Die erhöhte Glukose-Aufnahme und Milchsäuregärung wird in diesen Zellen durch eine Co-Stimulation von CD28 induziert¹⁷⁶. Speziell den Th1-Zellen dient eine Erhöhung der Glukoserate nicht nur einer gesteigerten Proliferation, sondern gewährleistet auch optimale Bedingungen zur Ausbildung von Effektorfunktionen. Zum Einen stehen IFN- γ -Inhibitoren durch ihre erhöhte Beteiligung an der Glykolyse nur noch eingeschränkt zur Verfügung und zum Anderen sorgen Intermediate des Laktatstoffwechsels durch epigenetische Modifikationen für die Induktion der IFN- γ Transkription^{252,253}.

Mit zunehmender Ausübung von T-Zell-Effektorfunktionen werden vermehrt ICs wie CTLA-4, LAG-3 und PD-1 auf der Zelloberfläche exprimiert, um einer Hyperaktivität dieser Zellen entgegenzuwirken (1.3.2)⁷⁶. Interessanterweise führt die Aktivierung von ICs nicht nur zu einer Inhibierung von Effektorfunktionen, sondern auch zu einer Veränderung des metabolischen Programms. Frauwirth *et al.* haben bereits 2002 gezeigt, dass eine Aktivierung von CTLA-4 eine Reduktion der GLUT-1-Expression hervorruft und in Folge dessen die Glukoseaufnahme aktivierter T-Zellen reduziert wird¹⁷⁶. Patsoukis *et al.* haben ähnliche Ergebnisse erzielt und konnten zudem zeigen, dass, im Gegensatz zu CTLA-4, durch eine Aktivierung von PD-1 die Glykolyserate ebenfalls reduziert wird und zusätzlich dazu die Oxidation von Fettsäuren gesteigert wird²³⁵. Über den metabolischen Einfluss von LAG-3 auf aktivierte T-Zellen ist bisher nichts bekannt, jedoch zeigen zumindest naive T-Zellen aus LAG-3-defizienten (LAG-3^{-/-}) Mäusen eine erhöhte Glykolyse, ein Hinweis auf eine mögliche metabolische Funktion dieses ICs²⁵⁴.

Eine phänotypische Untersuchung der Leukozyten in der Milz zum Zeitpunkt der ¹⁸F-FDG-PET Analysen zeigte, dass die gesamte Population der T-Zellen, wie auch die der B-Zellen, nach Kombinationstherapie im Vergleich zu den Scheinbehandelten Kontrolltieren deutlich reduziert vorlag und auch keine erhöhte

Expression des Aktivierungsmarkers CD69 zu erkennen war (4.4.3.1). Wie bereits in vorangegangenen Kapiteln demonstriert, stellen die *in vitro* aktivierten T_H1-Zellen etwa ein Viertel der CD4⁺ T-Zellpopulation dar (4.1.3). Durch eine relativ geringe PD-1-Expression (4.3.4.3) unterliegen diese potentiell weniger metabolischen Einflüssen, die zu einer Reduktion der Glukoseaufnahme führen könnten.

Die hier vorliegenden Ergebnisse vermitteln lediglich einen Eindruck über die potentiellen Ursachen des erhöhten Glukosebedarfs der Milz. Um die Aktivität der T-Zellen und deren Einfluss auf die Glukoseaufnahme in die Milz jedoch detailliert zu charakterisieren, sind weitere Analysen notwendig. Dazu sollte in erster Linie eine *ex vivo* Validierung der ¹⁸F-FDG Aufnahme im Anschluss an die PET/MRT-Messungen zur Analyse der Verteilung des Radiotracers in der Milz durchgeführt werden. Histologische Färbungen könnten Aufschluss über die globale GLUT-1-Expression der Milz geben. Die GLUT-1-Expression definierter Zelltypen ließe sich zudem durchflusszytometrisch ermitteln. Darüber hinaus könnten *ex vivo* Kulturen der Milzzellen Aufschluss über den Glukoseverbrauch, die Laktatproduktion und die Produktion von Zytokinen wie IL-2 und IFN- γ geben.

Doch nicht nur aktivierte T-Zellen können zu einem erhöhten Glukoseumsatz in der Milz führen. Weiter ergab die phänotypische Analyse der Milzzellen in Folge jeglicher T_H1-Zell-Applikationen eine Erhöhung der Anzahl von Neutrophilen und Monozyten (4.4.3.1).

Monozyten haben, je nach Phänotyp, einen hohen Glukosebedarf oder nutzen alternative Stoffwechselwege. Klassisch aktivierte M1 Makrophagen mit starken anti-tumoralen Eigenschaften benötigen viel Glukose, wohingegen die Immunsupprimierenden M2 Makrophagen keinen erhöhten Bedarf haben und Energieeffizientere Wege wie die oxidative Phosphorylierung nutzen²⁵⁵. Da die Monozyten in der Milz jedoch nicht weiter charakterisiert wurden, lässt sich über deren Glukosebedarf nur spekulieren.

(Immun-)histologische Färbungen der Milz konnten die erhöhten Populationen an Neutrophilen, ermittelt durch die durchflusszytometrischen Analysen, bestätigen (4.4.3.2): Milzen, welche aus Versuchstieren nach der Kombinationstherapie isoliert wurden, zeigten im Vergleich zu denen scheinbehandelter Tiere eine reduzierte B220⁺ und CD3⁺ Zellpopulationen und eine Erhöhung der Neutrophilen Population

(MPO⁺ Zellen). Die Therapie-induzierte Verringerung von B- und T-Zellen resultiere in einer Verkleinerung der weißen Pulpa, welche die Germinalzentren der B- und T-Zellen beinhaltet. Das vergrößerte Volumen der Milz lässt sich eindeutig der deutlich vergrößerten roten Pulpa zuordnen, welche gleichzeitig ein starkes Infiltrat von Neutrophilen beinhaltet (4.4.3.2).

Neutrophile enthalten nur wenige Mitochondrien - Zellkompartimente, in denen die oxidative Phosphorylierung stattfindet. Daher ist auch diese Immunzellpopulation auf einen erhöhten Glukosebedarf zur Einspeisung in die Milchsäuregärung angewiesen. Vor allem die Formation extrazellulärer Fasern („*Neutrophil extracellular traps*“, NETs), welche vorwiegend aus Chromatin und antimikrobiellen Proteinen bestehen, benötigt viel Glukose²⁵⁵. Daher können auch Neutrophile für den erhöhten ¹⁸F-FDG-Umsatz in der Milz verantwortlich sein.

Da auch in Versuchstieren, welche lediglich mit den IC-Blockern anti-PD-L1 und anti-LAG-3 mAbs behandelt wurden, ein leicht erhöhtes ¹⁸F-FDG PET-Signal detektiert wurde, wurde der Glukosemetabolismus der Milz weiter an RT Mäusen unter exklusiver ICB-Behandlung und ohne initiale Bestrahlung (CIT) untersucht. Diese Form der Immuntherapie orientiert sich näher an der klinischen Praxis, in welche CIT-basierte Therapien längst Einzug gehalten haben¹¹⁶.

Zunächst wurde eine initiale ¹⁸F-FDG-PET/MRT Untersuchung vor Behandlungsbeginn vorgenommen (Basisscan). Das Ergebnis des Folgescans nach viermaliger CIT wurde anschließend in Relation zum jeweiligen Basisscan gesetzt und analysiert. Die Untersuchungen zeigten, dass Mäuse unter CIT eine im Vergleich zum Basisscan deutlich erhöhte ¹⁸F-FDG Aufnahme in der Milz aufweisen (4.4.4). Wenn auch das Therapieansprechen, bewertet über den Blutglukosespiegel der Mäuse, sich nur wenig verbesserte, zeigte sich dennoch zum Zeitpunkt des Folgescans ein eindeutig positiver Effekt durch die CIT auf den Blutglukosespiegel (4.4.4). Ob die CIT auch einen positiven Effekt auf das Überleben der Mäuse haben könnte, blieb an dieser Stelle, bedingt durch das kurze Beobachtungsfenster, jedoch offen.

Eine durchflusszytometrische Untersuchung der Milzen im Anschluss an die *in vivo* Scans aus Teilgruppen CIT- und scheinbehandelter Mäuse zeigte eine ebenfalls reduzierte T-Zellpopulation in Folge der Immuntherapie. Diese Reduktion wirkte sich auf die CD4⁺ sowie auf CD8⁺ T-Zellpopulation aus. Auch der Aktivierungsmarker

CD69 war im Vergleich zu den Lymphozyten in der Milz scheinbehandelter Tiere reduziert (4.4.5).

Der Zelloberflächenrezeptor CD69 gilt seit jeher als Aktivierungsmarker von T- und B-Zellen, welcher sehr früh nach deren Aktivierung verstärkt auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Neuere Forschungsarbeiten weisen jedoch darauf hin, dass die Expression von CD69 differenzierter betrachtet werden sollte. CD69 wird auch von T_{regs} exprimiert oder kann allgemein regulatorische Funktionen bestimmen, indem die Migration von Immunzellen beeinflusst wird^{256,257}. Shio *et al.* konnten mit Hilfe von CD69-defizienten (CD69^{-/-}) Mäusen eine Interaktion zwischen CD69 und dem Sphingosin 1-Phosphat Rezeptor-1 (S1P1) beschreiben, welcher essentiell für den Austritt von T-Zellen aus primären und sekundären lymphatischen Organen ist²⁵⁸. Durch diese Interaktion wurden T-Zellen von einer Rezirkulation abgehalten²⁵⁷. Die Interaktion zwischen CD69 und S1P1, und somit die Blockade von S1P1, kann lokal dafür sorgen, dass eine Immunantwort durch eine Verlängerung der T-Zellstimulation verstärkt wird, die Populationsgröße von Lymphozyten ansteigt und Gedächtnisfunktionen ausgebildet werden. Systemisch kann eine Blockade von S1P1 durch CD69 jedoch Immun-supprimierend wirken, da Lymphozyten in den lymphatischen Organen zurückgehalten werden und die Migration zum Infektionsherd oder Tumor erschwert wird²⁵⁷. Verringerte CD3⁺ T-Zellpopulationen in der Milz, gepaart mit einer verringerten CD69-Expression als Konsequenz der CIT, könnte also auch ein Hinweis auf eine andauernde anti-tumorale Immunantwort sein. Unter Berücksichtigung dieser Studien kann nun angenommen werden, dass trotz einer größeren T-Zellpopulation in der Milz scheinbehandelter Mäuse diese Zellen weniger aktiviert sind, von einer Auswanderung abgehalten werden und zudem durch eine vermehrte Anwesenheit von T_{regs} inhibiert werden.

Die Analyse der T-Zellpopulationen im PLK zeigte nach CIT ebenso wie in der Milz eine verringerte Population an CD3⁺ T-Zellen, bedingt durch eine Verringerung der CD8⁺ T-Zellpopulation. Im Gegensatz zu den CD3⁺ T-Zellen in der Milz zeigten die CD3⁺ T-Zellen im PLK von Versuchstieren unter CIT jedoch eine verstärkte CD69-Expression (4.4.5). Ob die vermehrte Expression von CD69 im PLK mit einer Expansion von T-Effektorzellen und der Induktion von Gedächtnisfunktionen

zusammenhängt, wurde nicht weiter untersucht, stellt aber dennoch eine interessante Frage dar.

Die Auswertung der CD69-Expression macht deutlich, was für ein enormes Potential dieser Marker für die Charakterisierung von T-Zellantworten haben kann und dass ein leichtfertiger Umgang ebenso zu Fehlinterpretationen führen kann. Es sollten daher unbedingt weitere Marker zur Definition von T-Zell-Subpopulationen, beispielsweise T_{regs} (Foxp3, CD25) oder T-Gedächtniszellen (CD44/CD62L/CD127), herangezogen werden. Auch an dieser Stelle könnten *ex vivo* Analysen, wie sie bereits oben genannt wurden, eine umfassendere Auskunft über die Effektorfunktionen und Glukoseaufnahme der Milzzellen geben.

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen einen hoch interessanten, aber dennoch komplexen Zusammenhang zwischen der Glukoseaufnahme und der Immunantwort in sekundär lymphatischen Organen wie der Milz. Der PLK war aufgrund seiner geringen Größe und ungünstigen Lage im Abdomen der Versuchstiere nicht zur Auswertung des ¹⁸F-FDG Signals geeignet.

Neben der Aufnahme des Radiotracers wurde ebenfalls das Milzvolumen der Mäuse zum Zeitpunkt der ¹⁸F-FDG-PET/MRT-Scans anhand der anatomischen MRT-Aufnahmen ermittelt. Dabei wurde eine leichte Erhöhung des Volumens unter CIT und eine deutliche Volumenreduktion der Milz scheinbehandelter Mäuse festgestellt. Da die ¹⁸F-FDG-Aufnahme in die Milz während der Scheinbehandlung nur leicht zurückging, wurde eine Verzerrung des Ergebnisses aufgrund einer Volumenreduktion ausgeschlossen.

Neben der Berücksichtigung des Volumens sollten vielmehr metabolische Effekte durch eine erhöhte Insulinsekretion der Inselzellkarzinome scheinbehandelter Mäuse im Vergleich zu behandelten Mäusen berücksichtigt werden. Die Aufnahme von Glukose kann durch verschiedene Glukosetransporter, in Abhängigkeit von Insulin oder unabhängig davon, vermittelt werden. Im Gegensatz zu GLUT4, welcher hauptsächlich in Muskelgewebe und Fettzellen exprimiert wird, ist die Glukoseaufnahme in die Zelle durch den universell exprimierten GLUT1-Transporter nicht Insulin-abhängig²⁵⁹. Da die Milz hauptsächlich als Reservoir für Immunzellen gilt, wird eine Insulin-abhängige ¹⁸F-FDG Aufnahme über GLUT4 als

unwahrscheinlich betrachtet. Tatsächlich exprimieren aktivierte T-Zellen im Vergleich zu T_{regs} mehr GLUT1. Diese erhöhte Expression an GLUT1 bildet eine wesentliche Voraussetzung zur Ausbildung von Effektorfunktionen aktivierter T-Zellen²⁵¹. Wäre die Aufnahme von Glukose in die Milz von RT2-Mäusen dennoch Insulin-abhängig, könnte daraus mit steigendem Tumorwachstum ein erhöhtes ¹⁸F-FDG Signal resultieren. Dies ist in scheinbehandelten RT2-Mäusen jedoch nicht der Fall, daher kann auch dieser Effekt als vernachlässigbar betrachtet werden¹⁷³.

5.4.3 Bedeutung der ¹⁸F-FDG-PET Aufnahme in der Milz von Mäusen für die Klinik

Ob die Ergebnisse aus der Maus eine Bedeutung für die Klinik haben, wurde nun in Patienten untersucht. Schwenck *et al.* haben hierfür die Aufnahme von ¹⁸F-FDG in lymphatische Organe von Patienten, welche unterschiedlich auf CITs ansprachen, retrospektiv analysiert. In der Milz wurden jedoch keine deutlichen Unterschiede in der Glukoseaufnahme zwischen Therapieansprechern und Patienten, welche nicht auf die Therapie angesprochen haben, detektiert¹⁷³. Dies kann mehrere Gründe haben:

Zum einen wurden alle Patienten mit IC-Blockern behandelt. Diese können - unabhängig von einer anti-tumoralen Antwort - weitere immunstimulierende Effekte und Autoimmunreaktionen auslösen, was die Ausbildung von Nebenwirkungen begünstigt und in Therapie-Ansprechern, sowie Nicht-Ansprechern, auftreten kann²⁶⁰. Im Gegensatz zu der sterilen Umgebung in der Versuchstierhaltung sind Menschen kontinuierlich Umwelteinflüssen ausgesetzt, welche Immunreaktionen hervorrufen können und sich wiederum durch die Aktivierung von Immunzellen in der Milz auf deren Glukosemetabolismus auswirken können¹⁷³.

Darüber hinaus kann sich der Zeitpunkt der ¹⁸F-FDG PET-Scans entscheidend auf die Glukoseaufnahme in der Milz auswirken¹⁷³. Aus Versuchen an Mäusen, welche einer Splenektomie unterzogen wurden, kann man erkennen, dass die Milz zu unterschiedlichen Zeitpunkten innerhalb der Tumorentstehung und Metastasierung immun-aktivierende sowie supprimierende Eigenschaften ausüben kann. Eine Splenektomie vor der Applikation von Tumorzellen bzw. während früher Tumorstadien förderte das Tumorwachstum und dessen Aggressivität^{52,248}. Die Milz

scheint also zur Initiierung einer anti-tumoralen Antwort beizutragen. Eine Splenektomie, nachdem sich bereits aggressive Tumore gebildet hatten, konnte diesen wiederum entgegenwirken. Folglich scheint die Milz auch an immunsupprimierenden Effekten beteiligt zu sein²⁴⁹. Eine genauere Untersuchung unter genau definierten Gegebenheiten könnte sich also lohnen und zur Verbesserung der Risikostratifizierung und der Bewertung des Behandlungserfolgs von IC-basierten Therapien in der Klinik beitragen.

Immuntherapien können starke systemische Effekte auslösen¹⁶⁴. Dies konnte auch innerhalb dieser Arbeit *ex vivo* durch die durchflusszytometrischen Analysen von Immunzellpopulationen und *in vivo* mittels ¹⁸F-FDG-PET der Milz gezeigt werden. Vor allem die Analyse des Glukosemetabolismus könnte großen Einfluss auf die Entwicklung von Immuntherapien und der Bewertung des Therapieansprechens haben. Die Einbindung systemischer Parameter in Bewertungskataloge wie iRECIST könnte einen weiteren Beitrag zur Verbesserung der Zuverlässigkeit solcher Verfahren ermöglichen.

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Evaluierung einer T-Zell- und Immuncheckpoint-basierten kombinierten Immuntherapie im fortgeschrittenen murinen RIP1-Tag2 (RT2) Inselzellkarzinommodell sowie die Charakterisierung der einem Therapieerfolg zugrundeliegenden zellulären und molekularen Wirkmechanismen. Zudem sollte der Glukosemetabolismus der Milz zur Beurteilung des Ansprechens auf Immuncheckpoint-basierte Therapieformen mittels molekularer Bildgebungsmethoden wie der PET untersucht werden.

Die detaillierte Untersuchung und Evaluierung der kombinierten Immuntherapie im endogenen RT2-Mausmodell kann die Effizienz der einzelnen Therapiekomponenten ermitteln und deren Wirkungsweise aufdecken und so letztendlich die klinische Translation T-Zell-basierter Therapieformen unterstützen. Zudem besteht heutzutage nach wie vor ein Mangel an schnellen und zuverlässigen Methoden, einen Therapieerfolg während einer laufenden Behandlung nicht invasiv zu bewerten.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde der Therapieerfolg *in vivo* anhand der Wirkung auf den Blutglukosespiegel der RT2-Mäuse mit fortgeschrittenen Inselzellkarzinomen und deren Überlebensraten untersucht. Es wurde festgestellt, dass ein wiederholter adoptiver T_H1 -Zelltransfer, welcher als protektive Behandlung jüngerer RT2-Mäuse mit lediglich hyperplastischen Inseln bereits von der Arbeitsgruppe um Prof. Röcken (Universitäts-Hautklinik Tübingen) erfolgreich untersucht wurde, auch in älteren, symptomatischen RT2-Mäusen mit fortgeschrittenen Inselzellkarzinomen sehr gut wirksam ist. Dies wurde vor allem durch die Verdoppelung der Behandlungsdauer der älteren RT2-Mäuse mit fortgeschrittenen Tumoren und somit einer Verbesserung des Überlebens deutlich. Die zusätzliche Antikörper-vermittelte Blockade der Immuncheckpoints PD-L1 und LAG-3 hatte zudem einen positiven Effekt auf den Blutglukosespiegel und konnte das Überleben der Tiere mit fortgeschrittenen Tumoren nochmals signifikant steigern. Ferner wurde demonstriert, dass die initiale Immunzelldepletion, vermittelt durch eine niedrig dosierte Ganzkörperbestrahlung, für die Behandlung unabdingbar ist, da in Folge dessen die Blutzirkulation der transferierten T_H1 -Zellen und deren Einnisten in die sekundär lymphatischen Organe erleichtert wurde. MRT-Aufnahmen sowie histologische Untersuchungen konnten die

Therapie-bedingte Verringerung des Tumorwachstums bestätigen. Auch eine (immun-)histochemische *ex vivo* Charakterisierung des Tumorgewebes zeigte einen durch die T_H1-Zellen induzierten Wachstumsarrest, der sich durch die IC-Blockade nochmals steigern ließ. Dieser Wachstumsarrest ließ sich in den untersuchten RT2-Mäusen mit fortgeschrittenen Inselzellkarzinomen auf eine durch die T_H1-Zellen vermittelte und IFN- γ -induzierte Induktion des Zellzyklus-kontrollierenden Proteins p16^{Ink4a} zurückführen. Die Ergebnisse wurden durch die immuntherapeutische Behandlung von RT2-Mäusen mit unterbrochenem IFN- γ Signalweg (RT2xStat1^{-/-}-Mäuse) und anschließenden *ex vivo* Analysen der behandelten Tumore bekräftigt. In diesen Mäusen wurde weder ein Therapieansprechen noch die Induktion eines T_H1-Zell-vermittelten Wachstumsarrests der Inselzellkarzinome festgestellt.

Weiter wurde die immuntherapeutische Wirkung auf die lokale und systemische T-Zellantwort der RT2-Mäuse mit fortgeschrittenen Inselzellkarzinomen mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dabei wurden im TME der Inselzellkarzinome überraschenderweise hauptsächlich endogene CD4⁺ T-Zellen mit hoher CD44-Expression und weniger die adoptiv transferierten T_H1-Zellen detektiert; die transgenen T_H1-Zellen siedelten sich bevorzugt im PLK an. In Folge der T_H1-Zellinjektionen konnte ferner eine Population an regulatorischen T-Zellen detektiert werden, die durch eine zusätzliche Blockade der Immuncheckpoints PD-L1 und LAG-3 eine Verringerung der TIM-3-Zelloberflächenexpression zeigte und somit möglicherweise zu deren Suppression beitrug. Zudem wurde als additiver Effekt der kombinierten Behandlung mit T_H1-Zellen und der Blockade von PD-L1 und LAG-3 ein starkes Infiltrat von CD8⁺ T-Zellen beobachtet, welches wiederum eine hohe PD-1 und TIM-3 Expression zeigte. Diese Expression stellte sich in Konsequenz der IC-Blockade ein und war mit der Expression von Zelloberflächenmarkern für Effektorfunktionen verknüpft. Die Ausbildung von T-Zell-Gedächtnisfunktionen war wiederum mit der Anwesenheit von T_H1-Zellen verbunden.

Als ein systemischer Effekt offenbarte sich vor allem in Folge der IC-Blockade eine vermehrte Einwanderung von dendritischen Zellen in den PLK, was vermutlich zu der erleichterten Rekrutierung von CD8⁺ T-Effektorzellen in das TME der Inselzellkarzinome führte. Die CD44-Expression war auf den adoptiv transferierten und endogenen CD4⁺ T-Zellen sowohl im PLK als auch in der Milz erhöht.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss IC-basierter Therapieformen in RT2-Mäusen mit fortgeschrittenen Inselzellkarzinomen auf den Glukosemetabolismus der Milz mittels ^{18}F -FDG PET und MRT untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass während einer erfolgreichen Immuntherapie ein erhöhtes ^{18}F -FDG Signal in der Milz detektiert werden kann. Dies konnte sowohl nach der Kombinationstherapie (2Gy+T_H1+ICB), als auch nach exklusiver Behandlung mit den IC-blockierenden Antikörpern PD-L1/LAG-3, ohne vorige Immunzelldepletion, beobachtet werden. Immunhistochemische *ex vivo* Analysen der Milz zeigten eine erhöhte Neutrophilen-Population, welche mit einer erhöhten Aufnahme von ^{18}F -FDG verknüpft sein können.

In dieser Arbeit wurde das klinisch relevante RT2-Inselzellkarzinommodell mit fortgeschrittenen Tumoren eingehend auf die therapeutische Wirkung und molekularen und zellulären Mechanismen der kombinierten Immuntherapie evaluiert. Die Ergebnisse demonstrieren die Effizienz eines adoptiven Zelltransfers von CD4⁺ T-Zellen und untermauern die jüngsten Erkenntnisse zur T_H1-vermittelten Seneszenz-Induktion maligner Zellen als alternativen Mechanismus zur Tumorkontrolle. Weiter kann die umfassende Charakterisierung der lokalen und systemischen zellulären Immunantwort für die Entwicklung T-Zell- und Immuncheckpoint-basierter Therapieformen sehr hilfreich sein. Die Aussagekraft der vorliegenden Ergebnisse bietet einen ersten umfassenden Eindruck und soll die Grundlage für weiterführende Studien zellulärer Wirkmechanismen der kombinierten Immuntherapie darstellen.

7 Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel „Etablierung und Evaluierung einer kombinierten Immuntherapie im murinen RIP1-Tag2 Inselzellkarzinommodell und deren Einfluss auf den *in vivo* Glukosemetabolismus der Milz“ selbstständig verfasst, nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche gekennzeichnet habe. Ich erkläre, dass die Richtlinien zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis der Universität Tübingen (Beschluss des Senats vom 25.05.2000) beachtet wurden. Ich versichere an Eides statt, dass diese Angaben wahr sind und dass ich nichts verschwiegen habe. Mir ist bekannt, dass die falsche Abgabe einer Versicherung an Eides statt mit Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft wird.

Tübingen, Juli 2021

8 Erklärung zum Eigenanteil

Die in dieser Arbeit aufgeführten Studien wurden unter der Leitung von Prof. Dr. Bernd Pichler im Institut für Präklinische Bildgebung und Radiopharmazie durchgeführt. Ich, Barbara Schörg, erkläre hiermit, dass die hier vorliegende Dissertation auf meiner eigenen Arbeit beruht. Ausnahmen sind sorgfältig durch einen Hinweis auf die jeweilige Referenz gekennzeichnet und zitiert.

Folgende Arbeiten wurden mit freundlicher Unterstützung durch Dritte durchgeführt: Das Design der *in vivo* Studien zur Kombinationstherapie in RT2-Mäusen und die Analyse der Daten wurde in enger Zusammenarbeit mit Dr. med. Manfred Kneilling und freundlicher Unterstützung von Dr. med. Dominik Sonanini unter der Leitung von Prof. Dr. Bernd Pichler durchgeführt.

Das Design der *in vivo* Studien zur Untersuchung des Glukosemetabolismus der Milz von RT2-Mäusen *in vivo* und die Analyse der Daten wurde in enger Zusammenarbeit mit Dr. med. Manfred Kneilling und freundlicher Unterstützung von Dr. med. Johannes Schwenck unter der Leitung von Prof. Dr. Bernd Pichler durchgeführt.

Alle Paraffinschnitte, H&E-Färbungen und (immun-)histochemische Färbungen sowie die Analysen am Mikroskop wurden von Dr. med. vet. Ursula Kohlhofer und Dr. Irene Gonzalez Menendez unter der Leitung von Prof. Dr. Leticia Quintanilla de Fend am Institut für Allgemeine und Molekulare Pathologie des Universitätsklinikums Tübingen durchgeführt. Die Interpretation der Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit der AG Quintanilla de Fend.

Alle Kryoschnitte und Immunfluoreszenzfärbungen sowie die Detektion der SA- β -Gal-Aktivität und Aufnahmen am Mikroskop wurden von Birgit Fehrenbacher und Renate Nordin unter der Leitung von Prof. Dr. med. Martin Röcken an der Universitäts-Hautklinik Tübingen durchgeführt. Die Analyse und Interpretation der Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit der AG Röcken.

Das Design der Studien zur Kombinationstherapie in RT2xStat1^{-/-}-Mäusen wurde von Prof. Dr. med. Martin Röcken, Ellen Brenner (Universitäts-Hautklinik Tübingen) und Dr. med. Manfred Kneilling entwickelt. Die Analyse und Interpretation der Daten erfolgte in enger Zusammenarbeit mit der AG Röcken.

Die Antikörpercocktails für die durchflusszytometrischen Multifarbenanalysen am LSR Fortessa („*Panel*“ D und „*Panel*“ E) wurden zusammen mit Herrn Dr. med Dominik Sonanini (Institut für Präklinische Bildgebung und Radiopharmazie) und in Kooperation mit Dr. Stella Autenrieth und Dr. Kristin Bieber in der „*Core Facility* Durchflusszytometrie Berg“ des Universitätsklinikums Tübingen entwickelt.

Die statistischen Analysen wurden in Kooperation mit Prof. Dr. Martin Eichner angefertigt.

9 Publikationsverzeichnis

9.1 Publikationen in wissenschaftlichen Fachzeitschriften

E. Brenner*, **B.F. Schörg***, F. Ahmetlić*, T. Wieder, F. J. Hilke, N. Simon, C. Schroeder, G. Demidov, T. Riedel, B. Fehrenbacher, M. Schaller, A. Forschner, T. Eigentler, H. Niessner, T. Sinnberg, K. S. Böhm, N. Hömberg, H. Braumüller, D. Dauch, S. Zwirner, L. Zender, D. Sonanini, A. Geishausner, J. Bauer, M. Eichner, K. J. Jarick, A. Beilhack, S. Biskup, D. Döcker, D. Schadendorf, L. Quintanilla-Martinez, B. J. Pichler, M. Kneilling, R. Mocikat and M. Röcken **(2020)**. "Cancer immune control needs senescence induction by interferon-dependent cell cycle regulator pathways in tumours." *Nature Communications* **11(1): 1335**.

J. Schwenck*, **B. Schörg***, F. Fiz, D. Sonanini, A. Forschner, T. Eigentler, B. Weide, M. Martella, I. Gonzalez-Menendez, C. Campi, G. Sambuceti, F. Seith, L. Quintanilla-Martinez, C. Garbe, C. Pfannenberger, M. Röcken, C. I. Fougere, B. J. Pichler and M. Kneilling **(2020)**. "Cancer immunotherapy is accompanied by distinct metabolic patterns in primary and secondary lymphoid organs observed by non-invasive *in vivo* ¹⁸F-FDG-PET." *Theranostics* **10(2): 925-937**.

*gleichberechtigte Erstautoren

9.2 Teilnahme an wissenschaftlichen Konferenzen

9.2.1 Wissenschaftliche Vorträge

Schörg, B.F., Schwenck, J., Knopf, P., Boecke, S., Ehrlichmann, W., Reischl, G., Thorwarth, D., Röcken, M., La Fougère, C., Pichler, B.J., Kneilling, M.: The metabolic glucose profile of the spleen as a surrogate of peripheral immune cell activation after immune checkpoint blockade in melanoma bearing mice. European Molecular Imaging Meeting (EMIM) 2018, San Sebastián, Spanien

Schörg, B.F., Brenner, E., Krüger, D., Griessinger, C.M., Braumüller, H., Fehrenbacher, B., Schaller, M., Eichner, M., Kohlhofer, U., Quintanilla-Martinez, L., Pichler, B.J., Röcken, M., Kneilling, M.: Combining tumor antigen (TA) specific Th1 cells with immune checkpoint blocking antibodies induces tumor regression in advanced carcinomas. Annual Meeting of the Association for Cancer Immunotherapy (CIMT) 2016, Mainz, Deutschland

Schörg, B.F., Krüger, D., Griessinger, C.M., Eilenberger, S.H.L., Reischl, G., Ehrlichmann, W., Röcken, M., Pichler, B.J., Kneilling, M.K.: Measuring T cell activity of a highly efficient T cell and checkpoint inhibitor-based immunotherapy with F-18-FDG-PET and MRI. 54. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nuklearmedizin (DGN) 2016, Dresden, Deutschland

Schörg, B.F., Krüger, D., Griessinger, C.M., Eilenberger, S.H.L., Reischl, G., Ehrlichmann, W., Röcken, M., Pichler, B.J., Kneilling, M.K.: Therapy response monitoring of a highly efficient T cell and checkpoint inhibitor-based immunotherapy in mice with progressed pancreatic cancer with ¹⁸F-FDG-PET/MRI. World Molecular Imaging Congress (WMIC) 2016, Honolulu, Hawaii, USA

Schörg, B.F., Thunemann, M., Griessinger, C.M., Reischl, G., Ehrlichmann, W., Birk, B., Aidone, S., Harant, M., Waisman, A., Feil, R., Pichler, B.J., Kneilling, M.: Examination of a new PET Reporter Mouse Model by tracking endogenously Herpes Simplex Virus I Thymidine Kinase expressing CD4⁺ T Cells during Chronic Contact Hypersensitivity of the Skin. European Molecular Imaging Meeting (EMIM) 2015, Tübingen, Deutschland

Schörg, B.F., Thunemann, M., Griessinger, C.M., Reischl, G., Ehrlichmann, W., Birk, B., Aidone, S., Harant, M., Waisman, A., Feil, R., Pichler, B.J., Kneilling, M.: Tracking of endogenously herpes simplex virus 1 thymidine kinase expressing T cells in mice with contact hypersensitivity reaction. Hot Topics in Molecular Imaging (TOPIM) 2015, Les Houches, Frankreich

Schörg, B.F., Thunemann, M., Griessinger, C.M., Reischl, G., Ehrlichmann, W., Birk, B., Aidone, S., Harant, M., Waisman, A., Feil, R., Pichler, B.J., Kneilling, M.: Endogenously Herpes Simplex 1 Thymidine Kinase (HSV1-sr39tk) Expressing CD4⁺ T Cells Enable Temporal and Quantitative *in vivo* Tracking into Inflamed Tissues and Lymph Nodes by PET. World Molecular Imaging Congress (WMIC) 2014, Seoul, Südkorea

9.2.2 Präsentationen wissenschaftlicher Poster

Schörg, B.F., Sonanini, D., Schwenck, J., Gonzalez Menendez, I., Ehrlichmann, W., Reischl, G., Quintanilla-Martinez, L., Röcken, M., La Fougère, C., Pichler, B.J., Kneilling, M.: The spleen functions as a window of a systemic response to detect responders to immune checkpoint inhibitor treatment in murine progressed solid carcinomas by [¹⁸F]FDG positron emission tomography (PET). Annual Meeting of the Association for Cancer Immunotherapy (CIMT) 2018, Mainz, Deutschland

Schörg, B.F., Sonanini, D., Schwenck, J., Griessinger, C.M., Fehrenbacher, B., Schaller, M., Kohlhofer, U., Quintanilla-Martinez, L., La Fougère, C., Pichler, B.J., Röcken, M., Kneilling, M.: Combining CD4⁺ T cell transfer and immune checkpoint blockade demonstrates the power of combined immunotherapies for treatment of progressed solid carcinomas in mice. Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (AACR) 2018, Chicago, Illinois, USA

Schörg, B.F., Sonanini, S., Schwenck, J., Reischl, G., Ehrlichmann, W., Quintanilla-Martinez, I., Röcken, M., La Fougère, C., Pichler, B.J., Kneilling, M.: ¹⁸F-FDG PET/MRI of the spleen as a monitor of T-cell activation during immune checkpoint blockade in tumor bearing mice. Annual Meeting of the Interdisciplinary German Network Molecular Imaging (MoBI) 2017, Aachen, Deutschland

Schoerg B.F., Schwenck J., Knopf P., Boecke S., Ehrlichmann W., Reischl G., Thorwarth D., Roecken M., la Fougère C., Pichler B.J., Kneilling M.: Treatment monitoring by ^{18}F -FDG-PET/MRI in the spleens of melanoma bearing mice demonstrates the induction of a peripheral immune response during a new combined immunotherapy. Third CRI-CIMT-EATI-AACR International Cancer Immunotherapy Conference 2017, Mainz, Deutschland

Schörg, B.F., Sonanini, D., Schwenck, J., Reischl, G., Ehrlichmann, W., Kohlhofer, U., Quintanilla-Martinez, I., Röcken, M., La Fougère, C., Pichler, B.J., Kneilling, M.: Uncovering immune checkpoint blockade induced T cell activation with ^{18}F -FDG PET/MRI in the spleens of tumor bearing mice. European Molecular Imaging Meeting (EMIM) 2017, Köln, Deutschland

Schörg, B.F., Krüger, D. Schwenck, J., Reischl, G., Ehrlichmann, W., Kohlhofer, U., Quintanilla-Martinez, U., Röcken, M., La Fougère, C., Pichler, B.J., Kneilling, M.: Early detection of response to antibody-mediated immune checkpoint blockade with [^{18}F]FDG PET even before clinically visible tumor remission. World Molecular Imaging Congress (WMIC) 2016, New York City, New York, USA

Schörg B.F., Krüger D., Griessinger C.M., Eilenberger S.H.L., Reischl G., Ehrlichmann W., Kohlhofer U., Quintanilla-Martinez L., Röcken M., Pichler B.J., Kneilling M.: Monitoring with ^{18}F -FDG-position emission tomography (^{18}F -FDG-PET) enables the identification of responders to a highly efficient immune checkpoint-blockade and T cell based immunotherapy. 46. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGfI) 2016, Hamburg, Deutschland

10 Literaturverzeichnis

1. Hanahan, D. & Weinberg, R.A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100, 57-70 (2000).
2. Hanahan, D. & Weinberg, Robert A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646-674 (2011).
3. Janeway, C.A., Travers, P. & Walport, M. Janeway Immunologie. *Spektrum Akademischer Verlag* 7. Auflage (2009).
4. Vogelstein, B. A deadly inheritance. *Nature* 348, 681-682 (1990).
5. Lane, D.P. p53, guardian of the genome. *Nature* 358, 15-16 (1992).
6. Vogelstein, B. & Kinzler, K.W. The multistep nature of cancer. *Trends in genetics : TIG* 9, 138-141 (1993).
7. Finn, O.J. Human Tumor Antigens Yesterday, Today, and Tomorrow. *Cancer Immunology Research* 5, 347 (2017).
8. Hausen, H.z. Papillomavirus infections — a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1288, F55-F78 (1996).
9. Ahuja, D., Saenz-Robles, M.T. & Pipas, J.M. SV40 large T antigen targets multiple cellular pathways to elicit cellular transformation. *Oncogene* 24, 7729-7745 (2005).
10. van der Bruggen, P. et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254, 1643 (1991).
11. Restifo, N.P., Dudley, M.E. & Rosenberg, S.A. Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nat Rev Immunol* 12, 269-281 (2012).
12. Mai, J., Virtue, A., Shen, J., Wang, H. & Yang, X.F. An evolving new paradigm: endothelial cells--conditional innate immune cells. *J Hematol Oncol* 6, 61 (2013).
13. Seong, S.Y. & Matzinger, P. Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat Rev Immunol* 4, 469-478 (2004).
14. Medzhitov, R. & Janeway, C.A., Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* 9, 4-9 (1997).
15. Kawai, T. & Akira, S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med* 13, 460-469 (2007).
16. Rakoff-Nahoum, S. & Medzhitov, R. Toll-like receptors and cancer. *Nature Reviews Cancer* 9, 57-63 (2009).
17. Sun, J.C. Re-educating natural killer cells. *J Exp Med* 207, 2049-2052 (2010).
18. Ye, M. & Graf, T. Early decisions in lymphoid development. *Curr Opin Immunol* 19, 123-128 (2007).
19. Campbell, J.J. & Butcher, E.C. Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. *Curr Opin Immunol* 12, 336-341 (2000).
20. Starr, T.K., Jameson, S.C. & Hogquist, K.A. Positive and negative selection of T cells. *Annual review of immunology* 21, 139-176 (2003).
21. Lieberman, J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol* 3, 361-370 (2003).

22. Barnes, T.A. & Amir, E. HYPE or HOPE: the prognostic value of infiltrating immune cells in cancer. *Br J Cancer* 118, e5 (2018).
23. Herbst, R.S. et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* 515, 563-567 (2014).
24. Lauvau, G. & Glaichenhaus, N. Mini-review: Presentation of pathogen-derived antigens in vivo. *Eur J Immunol* 34, 913-920 (2004).
25. Knutson, K.L. & Disis, M.L. Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 54, 721-728 (2005).
26. Walker, J.A. & McKenzie, A.N.J. TH2 cell development and function. *Nature Reviews Immunology* 18, 121-133 (2018).
27. McGeachy, M.J. & Cua, D.J. Th17 cell differentiation: the long and winding road. *Immunity* 28, 445-453 (2008).
28. Qi, H. T follicular helper cells in space-time. *Nat Rev Immunol* 16, 612-625 (2016).
29. Kasprawicz, D.J., Smallwood, P.S., Tyznik, A.J. & Ziegler, S.F. Scurfin (FoxP3) Controls T-Dependent Immune Responses In Vivo Through Regulation of CD4+ T Cell Effector Function. *The Journal of Immunology* 171, 1216 (2003).
30. Facciabene, A., Motz, G.T. & Coukos, G. T-regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis. *Cancer research* 72, 2162-2171 (2012).
31. Vignali, D.A.A., Collison, L.W. & Workman, C.J. How regulatory T cells work. *Nature reviews. Immunology* 8, 523-532 (2008).
32. Takeuchi, A. & Saito, T. CD4 CTL, a Cytotoxic Subset of CD4(+) T Cells, Their Differentiation and Function. *Frontiers in immunology* 8, 194-194 (2017).
33. Yadav, D. & Lowenfels, A.B. The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology* 144, 1252-1261 (2013).
34. Behring & Kitasato Ueber das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität und der Tetanus-Immunität bei Thieren. *Dtsch med Wochenschr* 16, 1113-1114 (1890).
35. Coley, W.B. The Treatment of Inoperable Sarcoma by Bacterial Toxins (the Mixed Toxins of the Streptococcus erysipelas and the Bacillus prodigiosus). *Proc R Soc Med* 3, 1-48 (1910).
36. Rosenberg, S.A. & Restifo, N.P. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science* 348, 62 (2015).
37. Rosenberg, S.A. IL-2: the first effective immunotherapy for human cancer. *J Immunol* 192, 5451-5458 (2014).
38. Russell, S.J. & Barber, G.N. Oncolytic Viruses as Antigen-Agnostic Cancer Vaccines. *Cancer Cell* 33, 599-605 (2018).
39. Morgan, D.A., Ruscetti, F.W. & Gallo, R. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* 193, 1007 (1976).
40. Donohue, J.H. et al. The systemic administration of purified interleukin 2 enhances the ability of sensitized murine lymphocytes to cure a disseminated syngeneic lymphoma. *The Journal of Immunology* 132, 2123 (1984).
41. Muul, L.M., Spiess, P.J., Director, E.P. & Rosenberg, S.A. Identification of specific cytolytic immune responses against autologous tumor in humans bearing malignant melanoma. *J Immunol* 138, 989-995 (1987).

42. Rosenberg, S.A. et al. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *N Engl J Med* 319, 1676-1680 (1988).
43. Dudley, M.E. et al. Cancer Regression and Autoimmunity in Patients After Clonal Repopulation with Antitumor Lymphocytes. *Science* 298, 850 (2002).
44. Yao, X. et al. Levels of peripheral CD4(+)FoxP3(+) regulatory T cells are negatively associated with clinical response to adoptive immunotherapy of human cancer. *Blood* 119, 5688-5696 (2012).
45. Sica, A. & Bronte, V. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *J Clin Invest* 117, 1155-1166 (2007).
46. Curiel, T.J. Tregs and rethinking cancer immunotherapy. *J Clin Invest* 117, 1167-1174 (2007).
47. Bronte, V. et al. Apoptotic death of CD8+ T lymphocytes after immunization: induction of a suppressive population of Mac-1+/Gr-1+ cells. *J Immunol* 161, 5313-5320 (1998).
48. Gattinoni, L. et al. Removal of homeostatic cytokine sinks by lymphodepletion enhances the efficacy of adoptively transferred tumor-specific CD8+ T cells. *J Exp Med* 202, 907-912 (2005).
49. Dudley, M.E. et al. Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens. *J Clin Oncol* 26, 5233-5239 (2008).
50. Ma, A., Koka, R. & Burkett, P. Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis. *Annual review of immunology* 24, 657-679 (2006).
51. Besser, M.J. et al. Clinical responses in a phase II study using adoptive transfer of short-term cultured tumor infiltration lymphocytes in metastatic melanoma patients. *Clin Cancer Res* 16, 2646-2655 (2010).
52. Besser, M.J. et al. Adoptive transfer of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with metastatic melanoma: intent-to-treat analysis and efficacy after failure to prior immunotherapies. *Clin Cancer Res* 19, 4792-4800 (2013).
53. Gross, G., Waks, T. & Eshhar, Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 10024-10028 (1989).
54. Casucci, M. & Bondanza, A. Suicide gene therapy to increase the safety of chimeric antigen receptor-redirected T lymphocytes. *J Cancer* 2, 378-382 (2011).
55. Klebanoff, C.A. et al. Central memory self/tumor-reactive CD8⁺ T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 9571 (2005).
56. Berger, C. et al. Adoptive transfer of effector CD8+ T cells derived from central memory cells establishes persistent T cell memory in primates. *J Clin Invest* 118, 294-305 (2008).
57. Chamoto, K. et al. Critical role of the Th1/Tc1 circuit for the generation of tumor-specific CTL during tumor eradication in vivo by Th1-cell therapy. *Cancer Sci* 94, 924-928 (2003).
58. Chamoto, K. et al. Potentiation of tumor eradication by adoptive immunotherapy with T-cell receptor gene-transduced T-helper type 1 cells. *Cancer Res* 64, 386-390 (2004).

59. Muranski, P. et al. Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood* 112, 362-373 (2008).
60. Shen, Y. & Fujimoto, S. A tumor-specific Th2 clone initiating tumor rejection via primed CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activation in mice. *Cancer Res* 56, 5005-5011 (1996).
61. Perez-Diez, A. et al. CD4 cells can be more efficient at tumor rejection than CD8 cells. *Blood* 109, 5346-5354 (2007).
62. Muller-Hermelink, N. et al. TNFR1 signaling and IFN-gamma signaling determine whether T cells induce tumor dormancy or promote multistage carcinogenesis. *Cancer Cell* 13, 507-518 (2008).
63. Cao, Z.A., Daniel, D. & Hanahan, D. Sub-lethal radiation enhances anti-tumor immunotherapy in a transgenic mouse model of pancreatic cancer. *BMC Cancer* 2, 11-11 (2002).
64. Braumuller, H. et al. T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature* 494, 361-365 (2013).
65. Qin, Z. & Blankenstein, T. CD4+ T cell-mediated tumor rejection involves inhibition of angiogenesis that is dependent on IFN gamma receptor expression by nonhematopoietic cells. *Immunity* 12, 677-686 (2000).
66. Ganss, R., Ryschich, E., Klar, E., Arnold, B. & Hammerling, G.J. Combination of T-cell therapy and trigger of inflammation induces remodeling of the vasculature and tumor eradication. *Cancer Res* 62, 1462-1470 (2002).
67. Hunder, N.N. et al. Treatment of Metastatic Melanoma with Autologous CD4+ T Cells against NY-ESO-1. *New England Journal of Medicine* 358, 2698-2703 (2008).
68. Tran, E. et al. Cancer Immunotherapy Based on Mutation-Specific CD4+ T Cells in a Patient with Epithelial Cancer. *Science* 344, 641 (2014).
69. Shiao, S.L., Ganesan, A.P., Rugo, H.S. & Coussens, L.M. Immune microenvironments in solid tumors: new targets for therapy. *Genes & development* 25, 2559-2572 (2011).
70. Zajac, A.J. et al. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J Exp Med* 188, 2205-2213 (1998).
71. Blackburn, S.D. et al. Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol* 10, 29-37 (2009).
72. Fourcade, J. et al. PD-1 is a regulator of NY-ESO-1-specific CD8+ T cell expansion in melanoma patients. *J Immunol* 182, 5240-5249 (2009).
73. Ahmadzadeh, M. et al. Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood* 114, 1537-1544 (2009).
74. Schietinger, A. et al. Tumor-Specific T Cell Dysfunction Is a Dynamic Antigen-Driven Differentiation Program Initiated Early during Tumorigenesis. *Immunity* 45, 389-401 (2016).
75. Schietinger, A. & Greenberg, P.D. Tolerance and exhaustion: defining mechanisms of T cell dysfunction. *Trends in Immunology* 35, 51-60 (2014).
76. Wherry, E.J. T cell exhaustion. *Nature Immunology* 12, 492-499 (2011).
77. Krummel, M.F. & Allison, J.P. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med* 182, 459-465 (1995).

78. Waterhouse, P. et al. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl α -4. *Science* 270, 985-988 (1995).
79. Tivol, E.A. et al. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 3, 541-547 (1995).
80. Nishimura, H., Minato, N., Nakano, T. & Honjo, T. Immunological studies on PD-1 deficient mice: implication of PD-1 as a negative regulator for B cell responses. *International immunology* 10, 1563-1572 (1998).
81. Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H., Minato, N. & Honjo, T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 11, 141-151 (1999).
82. Woo, S.R. et al. Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape. *Cancer Res* 72, 917-927 (2012).
83. Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K. & Honjo, T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *The EMBO journal* 11, 3887-3895 (1992).
84. Keir, M.E., Butte, M.J., Freeman, G.J. & Sharpe, A.H. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annual review of immunology* 26, 677-704 (2008).
85. Pesce, S. et al. PD-1/PD-Ls Checkpoint: Insight on the Potential Role of NK Cells. *Frontiers in immunology* 10, 1242 (2019).
86. Baumeister, S.H., Freeman, G.J., Dranoff, G. & Sharpe, A.H. Coinhibitory Pathways in Immunotherapy for Cancer. *Annual review of immunology* 34, 539-573 (2016).
87. Raimondi, G., Shufesky, W.J., Tokita, D., Morelli, A.E. & Thomson, A.W. Regulated compartmentalization of programmed cell death-1 discriminates CD4⁺CD25⁺ resting regulatory T cells from activated T cells. *J Immunol* 176, 2808-2816 (2006).
88. Kinter, A.L. et al. The common gamma-chain cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 induce the expression of programmed death-1 and its ligands. *J Immunol* 181, 6738-6746 (2008).
89. Davis, A.A. & Patel, V.G. The role of PD-L1 expression as a predictive biomarker: an analysis of all US Food and Drug Administration (FDA) approvals of immune checkpoint inhibitors. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 7, 278 (2019).
90. Quandt, D., Jasinski-Bergner, S., Müller, U., Schulze, B. & Seliger, B. Synergistic effects of IL-4 and TNF α on the induction of B7-H1 in renal cell carcinoma cells inhibiting allogeneic T cell proliferation. *J Transl Med* 12, 151-151 (2014).
91. Garcia-Diaz, A. et al. Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression. *Cell reports* 19, 1189-1201 (2017).
92. Voron, T. et al. VEGF-A modulates expression of inhibitory checkpoints on CD8⁺ T cells in tumors. *J Exp Med* 212, 139-148 (2015).
93. Allen, E. et al. Combined antiangiogenic and anti-PD-L1 therapy stimulates tumor immunity through HEV formation. *Science translational medicine* 9, eaak9679 (2017).
94. Francisco, L.M. et al. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J Exp Med* 206, 3015-3029 (2009).

95. Azuma, T. et al. B7-H1 is a ubiquitous antiapoptotic receptor on cancer cells. *Blood* 111, 3635-3643 (2008).
96. Gato-Canas, M. et al. PDL1 Signals through Conserved Sequence Motifs to Overcome Interferon-Mediated Cytotoxicity. *Cell reports* 20, 1818-1829 (2017).
97. Triebel, F. et al. LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4. *J Exp Med* 171, 1393-1405 (1990).
98. Kisielow, M., Kisielow, J., Capoferri-Sollami, G. & Karjalainen, K. Expression of lymphocyte activation gene 3 (LAG-3) on B cells is induced by T cells. *Eur J Immunol* 35, 2081-2088 (2005).
99. Huang, C.T. et al. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* 21, 503-513 (2004).
100. Andrews, L.P., Marciscano, A.E., Drake, C.G. & Vignali, D.A. LAG3 (CD223) as a cancer immunotherapy target. *Immunol Rev* 276, 80-96 (2017).
101. Huard, B., Prigent, P., Tournier, M., Bruniquel, D. & Triebel, F. CD4/major histocompatibility complex class II interaction analyzed with CD4- and lymphocyte activation gene-3 (LAG-3)-Ig fusion proteins. *Eur J Immunol* 25, 2718-2721 (1995).
102. Workman, C.J., Rice, D.S., Dugger, K.J., Kurschner, C. & Vignali, D.A. Phenotypic analysis of the murine CD4-related glycoprotein, CD223 (LAG-3). *Eur J Immunol* 32, 2255-2263 (2002).
103. Maruhashi, T. et al. LAG-3 inhibits the activation of CD4+ T cells that recognize stable pMHCII through its conformation-dependent recognition of pMHCII. *Nature Immunology* 19, 1415-1426 (2018).
104. Workman, C.J., Dugger, K.J. & Vignali, D.A.A. Cutting Edge: Molecular Analysis of the Negative Regulatory Function of Lymphocyte Activation Gene-3. *The Journal of Immunology* 169, 5392 (2002).
105. Grosso, J.F. et al. LAG-3 regulates CD8+ T cell accumulation and effector function in murine self- and tumor-tolerance systems. *J Clin Invest* 117, 3383-3392 (2007).
106. Workman, C.J. et al. Lymphocyte activation gene-3 (CD223) regulates the size of the expanding T cell population following antigen activation in vivo. *J Immunol* 172, 5450-5455 (2004).
107. Macon-Lemaitre, L. & Triebel, F. The negative regulatory function of the lymphocyte-activation gene-3 co-receptor (CD223) on human T cells. *Immunology* 115, 170-178 (2005).
108. Woo, S.R. et al. Differential subcellular localization of the regulatory T-cell protein LAG-3 and the coreceptor CD4. *Eur J Immunol* 40, 1768-1777 (2010).
109. Li, N. et al. Metalloproteases regulate T-cell proliferation and effector function via LAG-3. *The EMBO journal* 26, 494-504 (2007).
110. Zarour, H.M. Reversing T-cell Dysfunction and Exhaustion in Cancer. *Clinical Cancer Research* 22, 1856 (2016).
111. Leach, D.R., Krummel, M.F. & Allison, J.P. Enhancement of Antitumor Immunity by CTLA-4 Blockade. *Science* 271, 1734 (1996).
112. Hodi, F.S. et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 363, 711-723 (2010).

113. Schadendorf, D. et al. Pooled Analysis of Long-Term Survival Data From Phase II and Phase III Trials of Ipilimumab in Unresectable or Metastatic Melanoma. *J Clin Oncol* 33, 1889-1894 (2015).
114. Freeman, G.J. et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 192, 1027-1034 (2000).
115. Iwai, Y., Terawaki, S. & Honjo, T. PD-1 blockade inhibits hematogenous spread of poorly immunogenic tumor cells by enhanced recruitment of effector T cells. *International immunology* 17, 133-144 (2005).
116. Ribas, A. & Wolchok, J.D. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science* 359, 1350-1355 (2018).
117. Larkin, J. et al. Five-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. 381, 1535-1546 (2019).
118. Butler, N.S. et al. Therapeutic blockade of PD-L1 and LAG-3 rapidly clears established blood-stage Plasmodium infection. *Nat Immunol* 13, 188-195 (2011).
119. Goding, S.R. et al. Restoring immune function of tumor-specific CD4+ T cells during recurrence of melanoma. *J Immunol* 190, 4899-4909 (2013).
120. Hanahan, D. Heritable formation of pancreatic beta-cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes. *Nature* 315, 115-122 (1985).
121. Casanovas, O., Hicklin, D.J., Bergers, G. & Hanahan, D. Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer Cell* 8, 299-309 (2005).
122. Bergers, G., Javaherian, K., Lo, K.M., Folkman, J. & Hanahan, D. Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice. *Science* 284, 808-812 (1999).
123. Nozawa, H., Chiu, C. & Hanahan, D. Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 12493-12498 (2006).
124. Schmid, A., Braumuller, H., Wehrl, H.F., Rocken, M. & Pichler, B.J. Non-invasive monitoring of pancreatic tumor progression in the RIP1-Tag2 mouse by magnetic resonance imaging. *Mol Imaging Biol* 15, 186-193 (2013).
125. Teitelman, G., Alpert, S. & Hanahan, D. Proliferation, senescence, and neoplastic progression of beta cells in hyperplastic pancreatic islets. *Cell* 52, 97-105 (1988).
126. Speiser, D.E. et al. Self antigens expressed by solid tumors Do not efficiently stimulate naive or activated T cells: implications for immunotherapy. *J Exp Med* 186, 645-653 (1997).
127. Meraz, M.A. et al. Targeted Disruption of the Stat1 Gene in Mice Reveals Unexpected Physiologic Specificity in the JAK-STAT Signaling Pathway. *Cell* 84, 431-442 (1996).
128. Dunn, G.P., Koebel, C.M. & Schreiber, R.D. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nature Reviews Immunology* 6, 836-848 (2006).
129. Agnello, D. et al. Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights. *Journal of clinical immunology* 23, 147-161 (2003).

130. Zaidi, M.R. & Merlino, G. The Two Faces of Interferon- γ in Cancer. *Clinical Cancer Research* 17, 6118 (2011).
131. Manguso, R.T. et al. In vivo CRISPR screening identifies Ptpn2 as a cancer immunotherapy target. *Nature* 547, 413-418 (2017).
132. Lee, S. & Schmitt, C.A. The dynamic nature of senescence in cancer. *Nature Cell Biology* 21, 94-101 (2019).
133. Cherry, S.R. Fundamentals of Positron Emission Tomography and Applications in Preclinical Drug Development. *The Journal of Clinical Pharmacology* 41, 482-491 (2001).
134. Judenhofer, M.S. et al. Simultaneous PET-MRI: a new approach for functional and morphological imaging. *Nature medicine* 14, 459-465 (2008).
135. Pichler, B.J., Wehrl, H.F. & Judenhofer, M.S. Latest Advances in Molecular Imaging Instrumentation. *Journal of Nuclear Medicine* 49, 5S-23S (2008).
136. Alessio, A. & Kinahan, P. PET Image Reconstruction. Henkin (Hrsg.): *Nuclear Medicine*, Edn. 2. (Elsevier, 2006).
137. Qi, J. & Leahy, R.M. Iterative reconstruction techniques in emission computed tomography. *Phys Med Biol* 51, R541-578 (2006).
138. Cherry, S.R. & Dalbohm, M. PET: Physics, Instrumentation, and Scanners. In: Phelps M.E. (eds) PET. (Springer, New York, NY, 2006).
139. Mannheim, J.G. et al. Quantification accuracy and partial volume effect in dependence of the attenuation correction of a state-of-the-art small animal PET scanner. *Physics in Medicine and Biology* 57, 3981-3993 (2012).
140. Watson, C., Byars, L., Michel, C. & Rothfuss, H. Scatter/trues detection efficiency compensation in scatter correction of PET emission data. (2008).
141. Karp, J.S. et al. Performance standards in positron emission tomography. *J Nucl Med* 32, 2342-2350 (1991).
142. Griessinger, C.M. et al. ^{64}Cu antibody-targeting of the T-cell receptor and subsequent internalization enables in vivo tracking of lymphocytes by PET. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, 1161 (2015).
143. Natarajan, A. & Gambhir, S.S. Radiation Dosimetry Study of [(89)Zr]rituximab Tracer for Clinical Translation of B cell NHL Imaging using Positron Emission Tomography. *Molecular imaging and biology* 17, 539-547 (2015).
144. Deri, M.A., Zeglis, B.M., Francesconi, L.C. & Lewis, J.S. PET imaging with ^{89}Zr : from radiochemistry to the clinic. *Nuclear medicine and biology* 40, 3-14 (2013).
145. Hevesy, G. Application of isotopes in biology. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 1213-1223 (1939).
146. Tewson, T.J., Welch, M.J. & Raichle, M.E. [18F]-labeled 3-deoxy-3-fluoro-D-glucose: synthesis and preliminary biodistribution data. *J Nucl Med* 19, 1339-1345 (1978).
147. Phelps, M.E. et al. Tomographic measurement of local cerebral glucose metabolic rate in humans with (F-18)2-fluoro-2-deoxy-D-glucose: validation of method. *Ann Neurol* 6, 371-388 (1979).
148. Park, S.G., Lee, J.H., Lee, W.A. & Han, K.M. Biologic correlation between glucose transporters, hexokinase-II, Ki-67 and FDG uptake in malignant melanoma. *Nuclear medicine and biology* 39, 1167-1172 (2012).
149. Ferda, J., Hromadka, M. & Baxa, J. Imaging of the myocardium using (18)F-FDG-PET/MRI. *Eur J Radiol* 85, 1900-1908 (2016).

150. Thunemann, M. et al. Cre/lox-assisted non-invasive in vivo tracking of specific cell populations by positron emission tomography. *Nat Commun* 8, 444 (2017).
151. Derclé, L. et al. (18)F-FDG PET and CT Scans Detect New Imaging Patterns of Response and Progression in Patients with Hodgkin Lymphoma Treated by Anti-Programmed Death 1 Immune Checkpoint Inhibitor. *J Nucl Med* 59, 15-24 (2018).
152. Lauterbur, P.C. Image Formation by Induced Local Interactions: Examples Employing Nuclear Magnetic Resonance. *Nature* 242, 190-191 (1973).
153. van Geuns, R.J. et al. Basic principles of magnetic resonance imaging. *Prog Cardiovasc Dis* 42, 149-156 (1999).
154. Pflugfelder, A. et al. Malignant melanoma S3-guideline "diagnosis, therapy and follow-up of melanoma". *J Dtsch Dermatol Ges* 11 Suppl 6, 1-116, 111-126 (2013).
155. Schreiber, R.D., Old, L.J. & Smyth, M.J. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science* 331, 1565 (2011).
156. Friedman, C.F., Proverbs-Singh, T.A. & Postow, M.A. Treatment of the Immune-Related Adverse Effects of Immune Checkpoint Inhibitors: A Review. *JAMA Oncol* 2, 1346-1353 (2016).
157. Pike, E., Hamidi, V., Saeterdal, I., Odgaard-Jensen, J. & Klemp, M. Multiple treatment comparison of seven new drugs for patients with advanced malignant melanoma: a systematic review and health economic decision model in a Norwegian setting. *BMJ Open* 7, e014880 (2017).
158. Meng, Y. et al. The cost-effectiveness of nivolumab monotherapy for the treatment of advanced melanoma patients in England. *Eur J Health Econ* 19, 1163-1172 (2018).
159. Brahmer, J.R. et al. Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J Clin Oncol* 28, 3167-3175 (2010).
160. Pyo, J.S., Kang, G. & Kim, J.Y. Prognostic role of PD-L1 in malignant solid tumors: a meta-analysis. *Int J Biol Markers* 32, e68-e74 (2017).
161. Eisenhauer, E.A. et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* 45, 228-247 (2009).
162. Persigehl, T., Lennartz, S. & Schwartz, L.H. iRECIST: how to do it. *Cancer Imaging* 20, 2 (2020).
163. Seymour, L. et al. iRECIST: guidelines for response criteria for use in trials testing immunotherapeutics. *Lancet Oncol* 18, e143-e152 (2017).
164. Spitzer, M.H. et al. Systemic Immunity Is Required for Effective Cancer Immunotherapy. *Cell* 168, 487-502.e415 (2017).
165. Dunn, T.B. Normal and pathologic anatomy of the reticular tissue in laboratory mice, with a classification and discussion of neoplasms. *Journal of the National Cancer Institute* 14, 1281-1433 (1954).
166. Constantinescu, C.C. & Mukherjee, J. Performance evaluation of an Inveon PET preclinical scanner. *Physics in Medicine and Biology* 54, 2885-2899 (2009).

167. Brenner, E. et al. Cancer immune control needs senescence induction by interferon-dependent cell cycle regulator pathways in tumours. *Nature Communications* 11, 1335 (2020).
168. Yu, N. et al. CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} T Cells: A More Specific Treg Population in Human Peripheral Blood. *Inflammation* 35, 1773-1780 (2012).
169. Liu, W. et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *The Journal of experimental medicine* 203, 1701-1711 (2006).
170. Seddiki, N. et al. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *The Journal of experimental medicine* 203, 1693-1700 (2006).
171. Huster, K.M. et al. Selective expression of IL-7 receptor on memory T cells identifies early CD40L-dependent generation of distinct CD8⁺ memory T cell subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 5610-5615 (2004).
172. Bachmann, M.F., Wolint, P., Schwarz, K., Jäger, P. & Oxenius, A. Functional Properties and Lineage Relationship of CD8⁺ T Cell Subsets Identified by Expression of IL-7 Receptor α and CD62L. *The Journal of Immunology* 175, 4686 (2005).
173. Schwenck, J. et al. Cancer immunotherapy is accompanied by distinct metabolic patterns in primary and secondary lymphoid organs observed by non-invasive in vivo 18F-FDG-PET. *Theranostics* 10, 925-937 (2020).
174. Mikhak, Z. et al. STAT1 in peripheral tissue differentially regulates homing of antigen-specific Th1 and Th2 cells. *J Immunol* 176, 4959-4967 (2006).
175. Warburg, O. Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *Naturwissenschaften* 12, 1131-1137 (1924).
176. Frauwirth, K.A. et al. The CD28 Signaling Pathway Regulates Glucose Metabolism. *Immunity* 16, 769-777 (2002).
177. Michalek, R.D. et al. Cutting edge: distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic programs are essential for effector and regulatory CD4⁺ T cell subsets. *J Immunol* 186, 3299-3303 (2011).
178. Tang, J., Hubbard-Lucey, V.M., Pearce, L., O'Donnell-Tormey, J. & Shalabi, A. The global landscape of cancer cell therapy. *Nature Reviews Drug Discovery* 17, 465-466 (2018).
179. Xin Yu, J., Hubbard-Lucey, V.M. & Tang, J. The global pipeline of cell therapies for cancer. *Nature reviews. Drug discovery* 18, 821-822 (2019).
180. Gengenbacher, N., Singhal, M. & Augustin, H.G. Preclinical mouse solid tumour models: status quo, challenges and perspectives. *Nature Reviews Cancer* 17, 751-765 (2017).
181. Antony, P.A. et al. CD8⁺ T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4⁺ T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells. *J Immunol* 174, 2591-2601 (2005).
182. Robbins, P.F. et al. Cutting edge: persistence of transferred lymphocyte clonotypes correlates with cancer regression in patients receiving cell transfer therapy. *J Immunol* 173, 7125-7130 (2004).
183. Sonanini, D. et al. Low-dose total body irradiation facilitates antitumoral Th1 immune responses. *Theranostics* 11, 7700-7714 (2021).

184. Krüger, D. Effekte einer 2 Gy-Ganzkörperbestrahlung von Mäusen auf die Verteilung und Migration von Immunzellen im Kontext einer TH1-Zell-basierten Immuntherapie. *Dissertation, Universität Tübingen* (2015).
185. Bogdandi, E.N. et al. Effects of low-dose radiation on the immune system of mice after total-body irradiation. *Radiation research* 174, 480-489 (2010).
186. Parisi, G. et al. Persistence of adoptively transferred T cells with a kinetically engineered IL-2 receptor agonist. *Nature Communications* 11, 660 (2020).
187. Johnson, C.B. et al. Enhanced Lymphodepletion Is Insufficient to Replace Exogenous IL2 or IL15 Therapy in Augmenting the Efficacy of Adoptively Transferred Effector CD8(+) T Cells. *Cancer Res* 78, 3067-3074 (2018).
188. Pitzalis, C., Jones, G.W., Bombardieri, M. & Jones, S.A. Ectopic lymphoid-like structures in infection, cancer and autoimmunity. *Nature Reviews Immunology* 14, 447-462 (2014).
189. Chiou, V.L. & Burotto, M. Pseudoprogression and Immune-Related Response in Solid Tumors. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 33, 3541-3543 (2015).
190. Antkowiak, P.F. et al. Noninvasive assessment of pancreatic beta-cell function in vivo with manganese-enhanced magnetic resonance imaging. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296, E573-E578 (2009).
191. Michelotti, F.C. et al. PET/MRI enables simultaneous in vivo quantification of beta-cell mass and function. *Theranostics* 10, 398-410 (2020).
192. Kusminski, C.M., Shetty, S., Orzi, L., Unger, R.H. & Scherer, P.E. Diabetes and apoptosis: lipotoxicity. *Apoptosis* 14, 1484-1495 (2009).
193. Ioan-Facsinay, A. et al. Adipocyte-derived lipids modulate CD4+ T-cell function. *Eur J Immunol* 43, 1578-1587 (2013).
194. de Jong, A.J., Kloppenburg, M., Toes, R.E.M. & Ioan-Facsinay, A. Fatty acids, lipid mediators, and T-cell function. *Frontiers in immunology* 5, 483-483 (2014).
195. Tannenbaum, C.S. et al. The CXC Chemokines IP-10 and Mig Are Necessary for IL-12-Mediated Regression of the Mouse RENCA Tumor. *The Journal of Immunology* 161, 927 (1998).
196. Peng, W. et al. PD-1 blockade enhances T-cell migration to tumors by elevating IFN-gamma inducible chemokines. *Cancer Res* 72, 5209-5218 (2012).
197. Ohm, J.E. & Carbone, D.P. VEGF as a mediator of tumor-associated immunodeficiency. *Immunologic research* 23, 263-272 (2001).
198. Gabrilovich, D.I. et al. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nature medicine* 2, 1096-1103 (1996).
199. Hodi, F.S. et al. Bevacizumab plus Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *Cancer Immunology Research* 2, 632 (2014).
200. Spitzer, M.H. et al. An interactive reference framework for modeling a dynamic immune system. *Science* 349, 1259-1265 (2015).
201. Abbas, A.K., Murphy, K.M. & Sher, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383, 787-793 (1996).
202. Kang, T.-W. et al. Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature* 479, 547-551 (2011).

203. Spranger, S. et al. Mechanism of tumor rejection with doublets of CTLA-4, PD-1/PD-L1, or IDO blockade involves restored IL-2 production and proliferation of CD8(+) T cells directly within the tumor microenvironment. *Journal for immunotherapy of cancer* 2, 3-3 (2014).
204. Arasanz, H. et al. Early Detection of Hyperprogressive Disease in Non-Small Cell Lung Cancer by Monitoring of Systemic T Cell Dynamics. *Cancers* 12 (2020).
205. Fransen, M.F. et al. Tumor-draining lymph nodes are pivotal in PD-1/PD-L1 checkpoint therapy. *JCI insight* 3 (2018).
206. Gasteiger, G. et al. Cellular Innate Immunity: An Old Game with New Players. *Journal of Innate Immunity* 9, 111-125 (2017).
207. Jenkins, R.W., Barbie, D.A. & Flaherty, K.T. Mechanisms of resistance to immune checkpoint inhibitors. *Br J Cancer* 118, 9-16 (2018).
208. Spranger, S., Dai, D., Horton, B. & Gajewski, T.F. Tumor-Residing Batf3 Dendritic Cells Are Required for Effector T Cell Trafficking and Adoptive T Cell Therapy. *Cancer Cell* 31, 711-723.e714 (2017).
209. Salmon, H. et al. Expansion and Activation of CD103(+) Dendritic Cell Progenitors at the Tumor Site Enhances Tumor Responses to Therapeutic PD-L1 and BRAF Inhibition. *Immunity* 44, 924-938 (2016).
210. Chamoto, K. et al. Mitochondrial activation chemicals synergize with surface receptor PD-1 blockade for T cell-dependent antitumor activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114, E761 (2017).
211. Hamilton, J.A. & Anderson, G.P. GM-CSF Biology. *Growth factors (Chur, Switzerland)* 22, 225-231 (2004).
212. Wang, T.-t. et al. Tumour-activated neutrophils in gastric cancer foster immune suppression and disease progression through GM-CSF-PD-L1 pathway. *Gut* 66, 1900 (2017).
213. He, G. et al. Peritumoural neutrophils negatively regulate adaptive immunity via the PD-L1/PD-1 signalling pathway in hepatocellular carcinoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 34, 141 (2015).
214. Jansen, C.S. et al. An intra-tumoral niche maintains and differentiates stem-like CD8 T cells. *Nature* 576, 465-470 (2019).
215. Förster, I., Hirose, R., Arbellt, J.M., Clausen, B.E. & Hanahant, D. Limited capacity for tolerization of CD4+ T cells specific for a pancreatic β cell neo-antigen. *Immunity* 2, 573-585 (1995).
216. Griessinger, C.M. et al. The administration route of tumor-antigen-specific T-helper cells differentially modulates the tumor microenvironment and senescence. *Carcinogenesis* 40, 289-302 (2019).
217. Ahn, E. et al. Role of PD-1 during effector CD8 T cell differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115, 4749-4754 (2018).
218. Goods, B.A. et al. Functional differences between PD-1+ and PD-1- CD4+ effector T cells in healthy donors and patients with glioblastoma multiforme. *PLOS ONE* 12, e0181538 (2017).
219. Konkel, J.E. et al. PD-1 signalling in CD4(+) T cells restrains their clonal expansion to an immunogenic stimulus, but is not critically required for peptide-induced tolerance. *Immunology* 130, 92-102 (2010).

220. Whiteside, S.K., Snook, J.P., Williams, M.A. & Weis, J.J. Bystander T Cells: A Balancing Act of Friends and Foes. *Trends in immunology* 39, 1021-1035 (2018).
221. Zhang, B., Karrison, T., Rowley, D.A. & Schreiber, H. IFN-gamma- and TNF-dependent bystander eradication of antigen-loss variants in established mouse cancers. *J Clin Invest* 118, 1398-1404 (2008).
222. Di Genova, G., Savelyeva, N., Suchacki, A., Thirdborough, S.M. & Stevenson, F.K. Bystander stimulation of activated CD4+ T cells of unrelated specificity following a booster vaccination with tetanus toxoid. *Eur J Immunol* 40, 976-985 (2010).
223. Beavis, P.A. et al. Dual PD-1 and CTLA-4 Checkpoint Blockade Promotes Antitumor Immune Responses through CD4(+)Foxp3(-) Cell-Mediated Modulation of CD103(+) Dendritic Cells. *Cancer Immunol Res* 6, 1069-1081 (2018).
224. Li, C., Jiang, P., Wei, S., Xu, X. & Wang, J. Regulatory T cells in tumor microenvironment: new mechanisms, potential therapeutic strategies and future prospects. *Molecular Cancer* 19, 116 (2020).
225. Gautron, A.-S., Dominguez-Villar, M., de Marcken, M. & Hafler, D.A. Enhanced suppressor function of TIM-3+ FoxP3+ regulatory T cells. *European journal of immunology* 44, 2703-2711 (2014).
226. Sakuishi, K. et al. TIM3(+)FOXP3(+) regulatory T cells are tissue-specific promoters of T-cell dysfunction in cancer. *Oncoimmunology* 2, e23849-e23849 (2013).
227. Wong, S.B.J., Bos, R. & Sherman, L.A. Tumor-Specific CD4⁺ T Cells Render the Tumor Environment Permissive for Infiltration by Low-Avidity CD8⁺ T Cells. *The Journal of Immunology* 180, 3122 (2008).
228. Bos, R. & Sherman, L.A. CD4+ T-cell help in the tumor milieu is required for recruitment and cytolytic function of CD8+ T lymphocytes. *Cancer Res* 70, 8368-8377 (2010).
229. Ahrends, T. & Borst, J. The opposing roles of CD4(+) T cells in anti-tumour immunity. *Immunology* 154, 582-592 (2018).
230. Eickhoff, S. et al. Robust Anti-viral Immunity Requires Multiple Distinct T Cell-Dendritic Cell Interactions. *Cell* 162, 1322-1337 (2015).
231. Brown, J.A. et al. Blockade of Programmed Death-1 Ligands on Dendritic Cells Enhances T Cell Activation and Cytokine Production. *The Journal of Immunology* 170, 1257 (2003).
232. Ahrends, T. et al. CD4(+) T Cell Help Confers a Cytotoxic T Cell Effector Program Including Coinhibitory Receptor Downregulation and Increased Tissue Invasiveness. *Immunity* 47, 848-861.e845 (2017).
233. Kurtulus, S. et al. Checkpoint Blockade Immunotherapy Induces Dynamic Changes in PD-1(-)CD8(+) Tumor-Infiltrating T Cells. *Immunity* 50, 181-194.e186 (2019).
234. Pauken, K.E. et al. Epigenetic stability of exhausted T cells limits durability of reinvigoration by PD-1 blockade. *Science* 354, 1160-1165 (2016).
235. Patsoukis, N. et al. PD-1 alters T-cell metabolic reprogramming by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty acid oxidation. *Nature communications* 6, 6692-6692 (2015).

236. Miller, B.C. & Sen, D.R. Subsets of exhausted CD8(+) T cells differentially mediate tumor control and respond to checkpoint blockade. *20*, 326-336 (2019).
237. Im, S.J. et al. Defining CD8+ T cells that provide the proliferative burst after PD-1 therapy. *Nature* *537*, 417-421 (2016).
238. Siddiqui, I. et al. Intratumoral Tcf1(+)PD-1(+)CD8(+) T Cells with Stem-like Properties Promote Tumor Control in Response to Vaccination and Checkpoint Blockade Immunotherapy. *Immunity* *50*, 195-211.e110 (2019).
239. Beckford Vera, D.R. et al. Immuno-PET imaging of tumor-infiltrating lymphocytes using zirconium-89 radiolabeled anti-CD3 antibody in immune-competent mice bearing syngeneic tumors. *PLoS One* *13*, e0193832 (2018).
240. Tavare, R. et al. Immuno-PET of Murine T Cell Reconstitution Postadoptive Stem Cell Transplantation Using Anti-CD4 and Anti-CD8 Cys-Diabodies. *J Nucl Med* *56*, 1258-1264 (2015).
241. Tavaré, R. et al. An Effective Immuno-PET Imaging Method to Monitor CD8-Dependent Responses to Immunotherapy. *Cancer research* *76*, 73-82 (2016).
242. Nishino, M., Ramaiya, N.H., Hatabu, H. & Hodi, F.S. Monitoring immune-checkpoint blockade: response evaluation and biomarker development. *Nature reviews. Clinical oncology* *14*, 655-668 (2017).
243. Wolchok, J.D. et al. Guidelines for the evaluation of immune therapy activity in solid tumors: immune-related response criteria. *Clin Cancer Res* *15*, 7412-7420 (2009).
244. Pardoll, D.M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature reviews. Cancer* *12*, 252-264 (2012).
245. Tsai, K.K. et al. Increased FDG avidity in lymphoid tissue associated with response to combined immune checkpoint blockade. *J Immunother Cancer* *4*, 58 (2016).
246. Schule, S.C., Eigentler, T. & Pfannenberger, C. [Multiple enlarged metabolically active lymph nodes in 18F-FDG PET/CT after anti-CTLA-4 antibody therapy in metastatic melanoma - disease progression or immunologically induced side effect?]. *Rofo* *187*, 1036-1037 (2015).
247. Mebius, R.E. & Kraal, G. Structure and function of the spleen. *Nature Reviews Immunology* *5*, 606-616 (2005).
248. Hwang, H.K. et al. Splenectomy is associated with an aggressive tumor growth pattern and altered host immunity in an orthotopic syngeneic murine pancreatic cancer model. *Oncotarget* *8*, 88827-88834 (2017).
249. Levy, L. et al. Splenectomy inhibits non-small cell lung cancer growth by modulating anti-tumor adaptive and innate immune response. *Oncoimmunology* *4*, e998469-e998469 (2015).
250. Lunt, S.Y. & Vander Heiden, M.G. Aerobic Glycolysis: Meeting the Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* *27*, 441-464 (2011).
251. Macintyre, A.N. et al. The glucose transporter Glut1 is selectively essential for CD4 T cell activation and effector function. *Cell metabolism* *20*, 61-72 (2014).
252. Chang, C.-H. et al. Posttranscriptional Control of T Cell Effector Function by Aerobic Glycolysis. *Cell* *153*, 1239-1251 (2013).
253. Peng, M. et al. Aerobic glycolysis promotes T helper 1 cell differentiation through an epigenetic mechanism. *Science* *354*, 481 (2016).

254. Previte, D.M. et al. Lymphocyte Activation Gene-3 Maintains Mitochondrial and Metabolic Quiescence in Naive CD4(+) T Cells. *Cell reports* 27, 129-141.e124 (2019).
255. Wada, J. Reprogramming of metabolism in immune-mediated cells. *Diabetology International* 8, 244-247 (2017).
256. Yu, L. et al. CD69 enhances immunosuppressive function of regulatory T-cells and attenuates colitis by prompting IL-10 production. *Cell Death & Disease* 9, 905 (2018).
257. Shiow, L.R. et al. CD69 acts downstream of interferon- α/β to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nature* 440, 540-544 (2006).
258. Matloubian, M. et al. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* 427, 355-360 (2004).
259. Ebeling, P., Koistinen, H.A. & Koivisto, V.A. Insulin-independent glucose transport regulates insulin sensitivity. *FEBS letters* 436, 301-303 (1998).
260. Khan, S. & Gerber, D.E. Autoimmunity, checkpoint inhibitor therapy and immune-related adverse events: A review. *Seminars in cancer biology* (2019).

11 Anhang

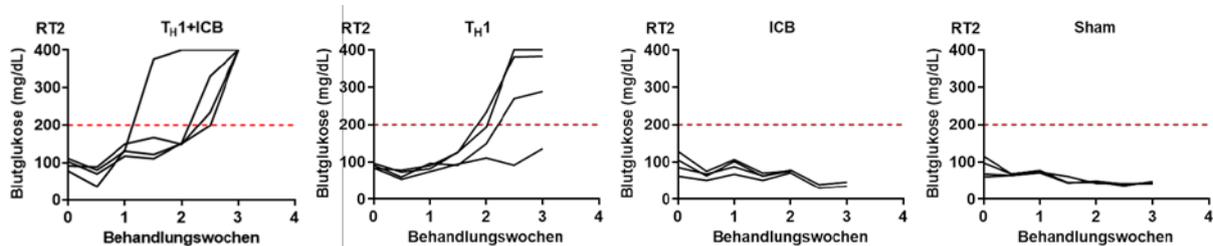


Abb. 65: Entwicklung eines Diabetes mellitus in RT2-Mäusen. Blutglukosewerte repräsentativer RT2-Mäuse, welche im Verlauf der T_H1 -basierten Therapieformen im Vergleich zu den Kontrollgruppen erhöhte Blutglukosewerte zeigten. Die gestrichelte Linie repräsentiert den Schwellenwert von 200 mg/dL. Jede schwarze Linie stellt den Verlauf der Blutglukose einer behandelten RT2-Maus dar (T_H1+ICB , $n = 4$; T_H1 , $n = 4$; ICB, $n = 4$; Sham $n = 4$).

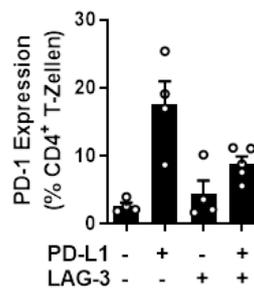


Abb. 66: PD-1 Expression im PLK von RT2-Mäusen nach CIT. RT2-Mäuse im Alter von zehn bis elf Wochen wurden viermal mit den IC-Inhibitoren anti-PD-L1 mAb und/oder. anti-LAG-3 mAb behandelt. Eine Gruppe erhielt lediglich PBS. Eine Durchfluss-zytometrische Analyse erfolgte am vierten Tag nach der letzten Injektion der IC-Inhibitoren. Die Expression von PD-1 auf den CD4⁺ T-Zellen wurde anhand der in „Panel“ C (**Tab. 7**) aufgelisteten Antikörper am LSR-II untersucht. Zur Detektion von CD4 wurde jedoch anstatt des „APC-Cy7-anti-CD4 mAbs“ ein an APC-gekoppelter anti-CD4 mAb (Klon: GK1.5; Biolegend, San Diego, CA, USA) verwendet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Jeder Punkt repräsentiert eine mittels Durchflusszytometrie untersuchte PLK-Zellsuspension einer entsprechend behandelten RT2-Maus (Sham (-/-): $n = 4$, PD-L1: $n = 4$, LAG-3: $n = 4$, PD-L1/LAG-3: $n = 5$).