

Aus der Neurologischen Klinik  
der Universitätsmedizin Mannheim  
(Direktor: Prof. Dr. med. Michael Platten)

Veränderungen des Tumormikromilieus durch zelluläre Immuntherapien  
in experimentellen Tumormodellen

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades  
der  
Medizinischen Fakultät Mannheim  
der Ruprecht-Karls-Universität  
zu Heidelberg

vorgelegt von  
Xin Wen Zhang

aus  
Hamburg  
2021

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd  
Referent: Prof. Dr. med. Michael Platten

# INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	1
1 EINLEITUNG.....	5
1.1 Immunantwort und Immunsuppression im Tumor.....	5
1.2 Immuntherapien gegen den Tumor .....	9
1.3 Ziel der Arbeit: Kombinierte Immuntherapien zur Behandlung solider Tumore .....	12
2 MATERIAL UND METHODEN .....	13
2.1 Material.....	13
2.2 Tierexperimentelle Methoden.....	17
2.3 Zellbiologische Methoden .....	21
2.4 Molekularbiologische und Proteinbiochemische Methoden .....	24
2.5 Statistische Methoden.....	27
3 TEIL I: EINFLUSS VON ARC/ARG 3.1 AUF DIE DENDRITISCHE ZELLVAKZINIERUNG IM MELANOM.....	28
3.1 Einleitung.....	28
3.1.1 Immuntherapien im Melanom .....	28
3.1.2 Dendritische Zellvakzinierung (DC-Vakzinierung).....	28
3.1.3 Dendritische Zellen in der Antitumor-Immunität .....	29
3.1.4 Arc/Arg3.1-abhängige DC-Migration.....	31
3.1.5 B16 Melanome .....	31
3.2 Ergebnisse.....	33
3.2.1 Antigen-spezifische DC-Vakzinierung im B16 Melanom-Modell.....	33
3.2.2 Die Rolle von Arc/Arg3.1 für die antigen-spezifische DC-Vakzinierung.....	39
3.2.3 Vakzinierung mit Arc/Arg3.1-überexprimierenden dendritischen Zellen ....	47
3.3 Diskussion .....	55
3.3.1 Die Rolle von Arc/Arg3.1 für dendritische Zellen im Tumormikromilieu .....	55
3.3.2 Verstärkung der Effektivität einer DC-Vakzinierung durch genetisch modifizierte dendritische Zellen .....	59

4	TEIL II: EINFLUSS EINER LOKALEN BESTRAHLUNG AUF DAS TUMORMIKROMILIEU MALIGNER GLIOME .....	62
4.1	Einleitung .....	62
4.1.1	Immuntherapie im malignen Gliom .....	62
4.1.2	Kombination aus Radiotherapie und Immuntherapie im malignen Gliom ..	64
4.1.3	Das GL261-gp100 Gliom-Modell .....	65
4.1.4	Vorarbeiten: Lokale Tumorbestrahlung und Peptidvakzinierung wirken synergistisch im experimentellen Gliom-Modell und verstärken die Infiltration und Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen im Tumor.....	66
4.2	Ergebnisse .....	71
4.2.1	Einfluss der lokalen Bestrahlung auf die T-Zell Rekrutierung und Aktivierung .....	71
4.2.2	Einfluss der lokalen Bestrahlung auf myeloide Zellen im Tumormikromilieu .	79
4.2.3	Einfluss der lokalen Bestrahlung auf das vaskuläre Kompartiment im Tumormikromillieu .....	85
4.3	Diskussion .....	89
4.3.1	Wirkungsmechanismen der Immunaktivierung durch lokale Tumorbestrahlung .....	89
4.3.2	Klinische Perspektiven für den Einsatz einer lokale Tumorbestrahlung zur Verstärkung von Immuntherapien gegen maligne Gliome.....	94
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	96
6	LITERATURVERZEICHNIS .....	98
7	EIGENE VERÖFFENTLICHUNG .....	113
8	LEBENS LAUF .....	114
9	DANKSAGUNG .....	116

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACK	Ammoniumchlorid-Kalium
ANOVA	Analysis of variance
APC	Antigenpräsentierende-Zelle
Arc/Arg3.1	Activity-regulated cytoskeleton-associated protein/activity-regulated gene 3.1
AT	Adoptiver Transfer
bFGF	Basic fibroblast growth factor
CAR	Chimeric Antigen Receptor
CCL	CC-Chemokin Ligand
CCR	CC-Chemokin Rezeptor
CD	Cluster of differentiation
cDC	Konventionelle DCs
cDNA	Complementary desoxyribonucleic acid
CDP	Common DC progenitor
CMP	Common myeloid progenitors
CMTMR	5-(-6)-(((4-chloromethyl)benzoyl)amino)tetramethylrhodamine
CSF	Colony stimulating factor
CTA	Cancer testis antigen
CTLA4	Cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4
CXCL	(C-X-C motif) Chemokin Ligand
DAPI	4',6 Diamidin-2-phenylindol
DC	Dendritische Zelle
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
dLK	Tumor-drainierende Lymphknoten
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DIPG	Diffuse intrinsische Ponsgliome
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFRvIII	Epidermal growth factor receptor variant III
ELISA	Enzyme-linked immunoadsorbent assay

FACS	Fluorescence-activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
FBS	Fetal bovine serum
FeOx	Ferrumoxytol
FFPE	Formalin-fixed, paraffin-embedded
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
FoxP3	Forkhead Box Protein O3
GFP	Green fluorescent protein
GMCSF	Granulocyte macrphage colony stimulating factor
Gp100	Glykoprotein 100
Gy	Gray
HBS	Hank's Balanced Salt Solution
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
ICAM	Intracellular adhesion molecule
ICI	Immunchekpoint-Inhibitor
IDH	Isozitatdehydrogenase
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
Ig	Immunglobulin
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IRES	Internal ribosomal entry site
i.v.	intravenös
KO	knock out
LAG3	Lymphocyte activation gene 3
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	Magnetic activated cell sorting
MAGE1	Melanoma associated antigen 1
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MART1	Melanoma antigen recognized by T cells 1
MCSF	Macrophage stimulating factor
MFI	Mean fluorescence intensity
MGMT	O6-Methylguanin-DNA-Methytransferase
MHC	Major Histocompatibility Complex
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MRT	Magnetresonanz Tomographie

MS	Multiple Sklerose
MDSC	Myeloid derived suppressor cells
NaCl	Natriumchlorid
NCT	National Clinical Trial
NGS	Next Generation Sequencing
NK	Natürliche Killer Zellen
NO	Stickstoffoxid
NOS	NO Synthase
OVA	Ovalbumin
PBMC	Peripheren Blutmonozyten
PCR	Polymerase chain reaction
PD1	Programmed cell death protein 1
PD1-L	Programmed cell death protein 1 ligand
pDC	Plasmazytoide DCs
PGE-2	Prostaglandin E2
Pmel	Premlanosome protein
PSA	Prostata spezifisches Antigen
RNA	Ribonucleid acid
ROS	Reactive oxygen species
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Radiotherapie
SCF	Stem cell factor
s.c.	Subkutan
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS polyacrylamide gel electrophoresis
SELE	Selectin
SEM	Standardfehler
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TAA	Tumor assoziiertes Antigen
TAM	Tumor assoziierte Makrophagen
TCR	T-Zell Rezeptor
TDO	Tryptophan-2,3-Dioxygenase
TGF	Transforming growth factor
TIL	Tumorerfiltrierende Lymphozyten

TIM	T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3
TLR	Toll like receptor
TMZ	Temozolomid
TNF	Tumornekrose Faktor
TPO	Thrombopoeitin
T <sub>reg</sub>	Regulatorische T-Zellen
TME	Tumormikromilieu
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
WHO	World Health Organisation
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem



# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Immunantwort und Immunsuppression im Tumor

Die Regulation der Immunabwehr gegen den Tumor erfolgt über zelluläre und nicht-zelluläre Komponenten im Tumormikromilieu (Chen and Mellman, 2013; Motz and Coukos, 2013).

Am Anfang dieser Immunantwort steht die Antigenaufnahme durch dendritische Zellen (DCs) im Tumor (Banchereau and Steinman, 1998) (Abb. 1-1). Hierfür werden Tumorantigene zunächst entweder direkt durch Tumorzellen präsentiert oder nach Ablauf eines immunogenen Zelltods freigesetzt. Immunogene Tumorantigene werden vom Immunsystem als „Fremdantigene“ detektiert. Diese sind einerseits Tumor-assoziierte Antigene, welche eine verstärkte Expression im Tumor als im Normalgewebe aufzeigen, oder Neoantigene, welche durch tumorspezifische Mutationen entstehen und im Normalgewebe nicht expremiert werden (Coulie et al., 2014). Die Bindung des auf DCs exprimierten Chemokinrezeptors CCR7 an die Chemokine CCL19 und CCL21 reguliert die DC-Migration und den Transport der Tumorantigene zu den Lymphknoten (Roberts et al., 2016). Dort werden die Antigene als *Major histocompatibility complex* (MHC)-gebundene Epitope den T-Zellen zur Aktivierung präsentiert (Abb. 1-2) (Mempel et al., 2004). Zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen werden durch die Bindung an MHC-I gebundene Epitope auf DCs aktiviert. Die kostimulatorische Bindung der Liganden CD80 und CD86 auf DCs an ihre Rezeptoren CD27 und CD28 auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen unterstützt die T-Zell Aktivierung (Raskov et al., 2021) (Abb. 1-3). Die Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen erfolgt durch die Bindung an MHC-II gebundene Epitope. CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen unterstützen durch die Bindung ihres CD40-Rezeptors an den auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen exprimierten Liganden CD40L die Proliferation der CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Kreiter et al., 2015). Chemokine wie CXCL9, CXCL10 und CXCL11 rekrutieren die aktivierten T-Zellen zum Tumor (Franciszkievicz et al., 2012) (Abb. 1-4). Eine erfolgreiche Extravasation der T-Zellen durch die Endothelbarriere setzt die Expression von Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1, ICAM-1 und Selectin auf Endothelzellen voraus (Griffioen et al., 1996) (Abb. 1-5). Die Tumorzellen werden von aktivierten, zytotoxischen T-Zellen abgetötet (Raskov et al., 2021). Die Voraussetzung hierfür ist die Bindung der auf MHC-I Molekülen präsentierten Tumorantigene an den Tumorantigen-spezifischen T-Zell Rezeptor

(TCR) (Abb. 1-6). Die Abtötung der Tumorzellen erfolgt über die Sekretion proinflammatorischer zytotoxischer Zytokine  $IFN\gamma$  und  $TNF\alpha$  sowie die Expression von Zelltod-Signalmolekülen wie Perforin und Granzyme B. Durch die Abtötung der Tumorzellen werden weitere Tumorantigene freigesetzt, wodurch die Immunantwort aufrechterhalten wird (Abb. 7-7). Die beschriebene Immunantwort ist im Idealfall ein sich selbst verstärkender Kreislauf, der zur Elimination des Tumors führt (Chen and Mellman, 2013).

Weitere Immunzellen im Tumormikromilieu können je nach Phänotyp und umgebenden löslichen Mediatoren den Ablauf der Immunantwort sowohl unterstützen als auch verhindern.

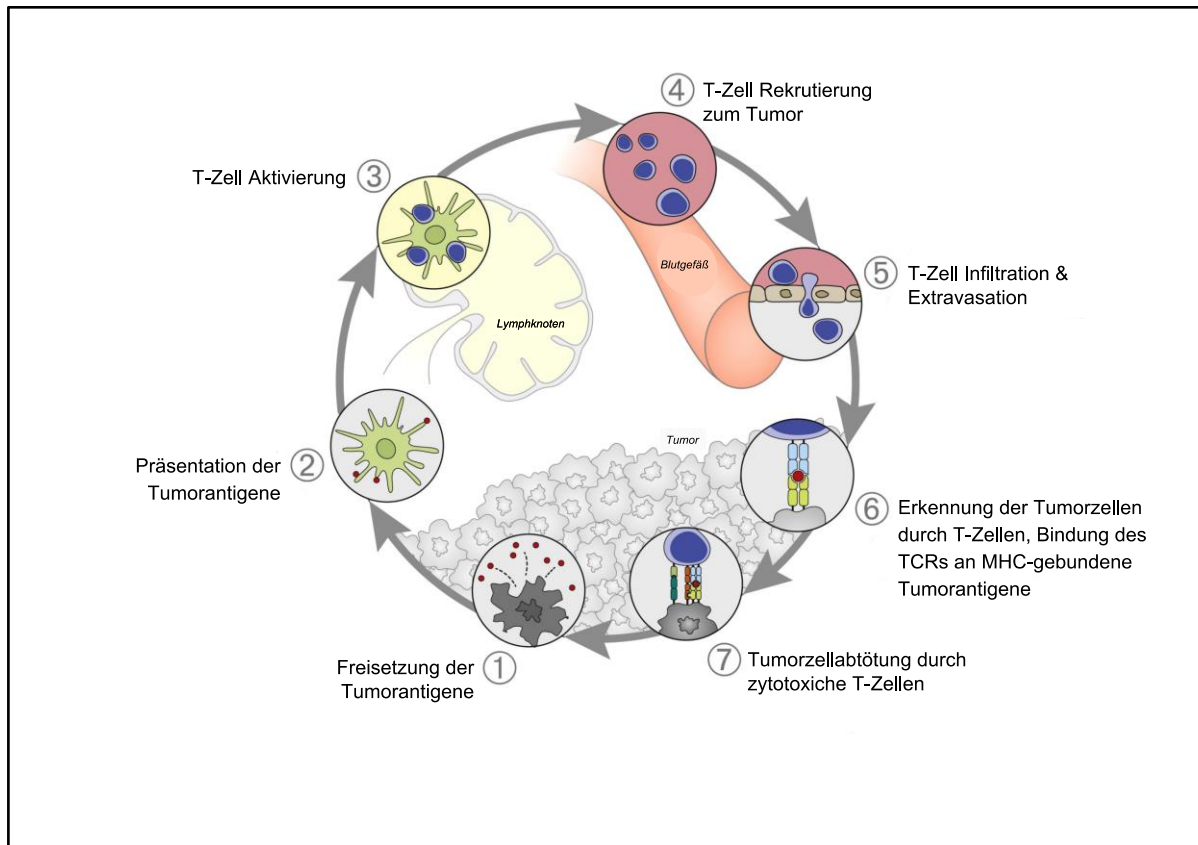
Die Voraussetzung für die Aktivierung der T-Zellen gegen den Tumor ist die Antigenpräsentation durch ausgereifte, aktivierte DCs. Proinflammatorische Signalmoleküle unterstützen die Ausreifung der DCs (Mellman and Steinman, 2001). Ein apoptotischer Zelltod oder immunsuppressive Zytokine führen zu einer unvollständigen Ausreifung der DCs und fördern die Aktivität von immuninhibitorischen Zellen wie regulatorischen T-Zellen ( $T_{reg}$ ) und immunsuppressiven Makrophagen (Gabrilovich, 2004; Ghiringhelli et al., 2005).

$T_{reg}$  verhindern eine überschießende Immunreaktion durch Hemmung der Effektor T-Zellen. Über die Sekretion immunsuppressiver Zytokine hemmen  $T_{reg}$  im Tumor die Effektorfunktion und Proliferation zytotoxischer T-Zellen (Facciabene et al., 2012).

Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM) können je nach Zytokin-Zusammensetzung im Tumor sowohl zur Immunsuppression als auch zur Immunaktivierung führen (Aras and Zaidi, 2017). Statt einer zuvor postulierten dichotomen Einteilung zwischen proinflammatorischen M1 Makrophagen und antiinflammatorischen M2 Makrophagen geht man heute davon aus, dass die Makrophagen auf einer kontinuierlichen Bandbreite zwischen den zwei Polen eingeteilt werden können (Mantovani et al., 2002). Proinflammatorische, „M1-typische“ Makrophagen werden über  $IFN\gamma$  oder TLR-Liganden aktiviert. Sie unterstützen die Abtötung der Tumorzellen indirekt über eine zytokinvermittelte Stimulation der zytotoxischen Effektor-T-Zellen und direkt über die Freisetzung reaktiver Sauerstoff- oder Stickstoffspezies (ROS, NO) (Vicetti Miguel et al., 2010). Antiinflammatorische, „M2-typische“ Makrophagen werden durch IL4 und IL13 stimuliert. Sie führen zur Hemmung der T-Zellfunktion und damit zu Resistenzmechanismen gegenüber Immuntherapien im Tumor (Aslan et al., 2020).

Zusätzlich fördern sie den Umbau der extrazellulären Matrix und Tumorgefäße, wodurch die Infiltration von T-Zellen verhindert wird (Kale et al., 2014). Die Rekrutierung der TAMs zum Tumor wird u.a. über die Bindung der Chemokine CCL2 und CSF-1 an CCR2 und CSF-1R auf Makrophagen vermittelt (Aras and Zaidi, 2017). Neben den Immunzellen ist auch das vaskuläre Kompartiment an der Regulation einer antitumoralen Immunantwort beteiligt (Schaaf et al., 2018). Durch den Einfluss von VEGF, NO und Endothelin werden „aberrante“ Gefäße im Tumor ausgebildet. Diese besitzen eine geringe Expression von Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1, ICAM-1, und Selectin. Dies verhindert die Extravasation der zytotoxischen T-Zellen (Griffioen et al., 1996). Zudem können Endothelzellen direkt die Effektorfunktion zytotoxischer T-Zellen in der unmittelbaren Gefäßumgebung inhibieren (Motz et al., 2014). Eine durch aberrante Gefäße verursachte mangelhafte Sauerstoffzufuhr führt zur Hypoxie im Tumorgewebe, wodurch immunsuppressive Immunzellen wie T<sub>reg</sub> und myeloide Suppressorzellen (*myeloid derived suppressor cells* - MDSC) rekrutiert werden (Ben-Shoshan et al., 2008).

Basierend auf der vorhandenen Immunaktivität wird zwischen „kalten“ und „heißen“ Tumoren unterschieden (Chen and Mellman, 2017). „Kalte“ Tumore zeichnen sich durch eine geringe Infiltration von Antitumor-effektiven Immunzellen wie zytotoxischen T-Zellen, jedoch einen hohen Anteil an immunsuppressiven Immunzellen und eine verstärkte Sekretion immuninhibitorischer Zytokine im Tumormikromilieu aus. „Heiße“ Tumore besitzen eine hohe Immunaktivität durch Infiltration zytotoxischer T-Zellen und Sekretion von zytotoxischen Effektorzytokinen wie IFN  $\gamma$  und GranzymeB. Die Entschlüsselung der zugrundeliegenden Mechanismen jedes einzelnen Tumors ermöglicht die Entwicklung gezielter Immuntherapien zur Aufhebung immunsuppressiver Mechanismen (Galon and Bruni, 2019).



**Abbildung 1. Der Krebs-Immunitäts Kreislauf** (von Chen, D.S., and Mellman, I. (2013). Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity* 39, 1–10, übersetzt und bearbeitet).

Die Generierung einer Immunantwort gegen den Tumor. (1) Zu Beginn der Immunantwort steht die Freisetzung von Tumorantigenen, z.B. durch den Zelltod der Tumorzellen. (2) Im nächsten Schritt werden die Antigene von Antigenpräsentierenden-Zellen (APCs) wie z.B. Dendritischen Zellen aufgenommen und auf MHC-Komplexen gebunden präsentiert. (3) Antigenpräsentierende-Zellen transportieren die aufgenommenen Tumorantigene in sekundäre lymphatische Organe, wie z.B. den Lymphknoten, wo durch Antigenpräsentation die T-Zell Aktivierung stattfindet. (4) Aktivierte T-Zellen wandern zum Tumor und (5) infiltrieren diesen. (6) Tumorantigenspezifisch aktivierte zytotoxische T-Zellen können über den T-Zell Rezeptor (TCR) die auf Tumorzellen präsentierten Tumorantigene erkennen und binden. (7) Nach Bindung des TCRs an MHC-gebundene Tumorantigene kommt es durch Freisetzung zytotoxischer Zytokine zur Abtötung der Tumorzellen durch zytotoxische T-Zellen.

## 1.2 Immuntherapien gegen den Tumor

Ziel der Immuntherapien ist die Generierung, Aufrechterhaltung oder Wiederherstellung einer Immunantwort gegen den Tumor.

### 1.2.1 Immuncheckpoint-Inhibitoren

Immuncheckpoint-Inhibitoren (ICIs) heben immunsuppressive Mechanismen im Tumor auf zur Verstärkung der Immunantwort gegen den Tumor.

Die Expression von CTLA-4 auf der T-Zelloberfläche blockiert die Bindung der auf APCs exprimierten Kostimulatoren CD80/CD86 an CD28 auf T-Zellen und führt damit zu einer Inhibition der CD28-vermittelten T-Zell-Aktivierung (Chambers et al., 2001). Die Expression von PD-L1 auf Tumorzellen erfolgt als Reaktion auf die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (z.B. IFN $\gamma$ ) im Tumor (Sharpe and Pauken, 2018). Die Bindung von PD-L1 an die PD-1 Rezeptoren der T-Zellen führt zur Inhibition der T-Zell Effektorfunktion gegen den Tumor (Ishida et al., 1992).

Die Blockierung der Checkpoint-Moleküle PD-1 und CTLA-4 durch monoklonale Antikörper führte in murinen Tumormodellen durch eine Aktivierung der zytotoxischen T-Zell Funktion zur Tumorregression (Iwai et al., 2002; Leach et al., 1996). Der klinische Einsatz von Immuncheckpoint-Inhibitoren führte zum Therapieansprechen sowie zum therapeutischen Vorteil gegenüber den damaligen Standardtherapien zunächst am Melanom, anschließend auch an einzelnen weiteren Tumorentitäten wie z.B. Nierenzellkarzinomen oder Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen (Brahmer et al., 2012; Gandhi et al., 2018; Hodi et al., 2010; Maio et al., 2015; Ribas and Wolchok, 2018; Rini et al., 2019; Weber et al., 2015).

Weitere Inhibitoren immunsuppressiver Moleküle (anti-LAG3, anti-TIM3) sowie Agonisten immunaktivierender Moleküle im Tumormikromilieu (CD40 Agonist, 41BB) werden in präklinischen und klinischen Studien getestet (Lee et al., 2021; Torphy et al., 2017).

### 1.2.2 Vakzinierung

Ziel der Vakzinierung ist die Induktion einer tumorspezifischen Immunantwort durch die exogene Gabe von Tumorantigenen.

Das optimale Antigen für eine Vakzinierung sollte exklusiv im Tumor exprimiert sein, als MHC-gebundenes Epitop vom TCR der T-Zellen erkannt werden und schließlich

auch die Aktivierung der T-Zellen ermöglichen (Coulie et al., 2014; Kreiter et al., 2015; Tran et al., 2015).

Neben der Identifikation des immunogenen Epitops ist auch die Form der Applikation des Vakzins entscheidend für deren Wirksamkeit. Die Ko-Administration von Adjuvantien wie Zytokine (z.B. IL-2, (Rosenberg et al., 1998)) oder Toll-like Rezeptor Agonisten zur Aktivierung der dendritischen Zellen erhöhen die Wirksamkeit einer reinen Peptidvakzinierung (Temizoz et al., 2016). Durch die direkte Vakzinierung *ex vivo* beladener dendritischer Zellen kann eine unzureichende DC-Beladung und -Aktivierung nach Vakzinierung *in vivo* verhindert und so die Effektivität der Vakzinierung erhöht werden (Nestle et al., 1998).

### 1.2.3 Adoptiver T-Zell Transfer

Zwei Formen genetisch modifizierter T-Zellen haben sich in der Tumor-spezifischen T-Zell Therapie durchgesetzt: CAR (Chimeric Antigen Receptor)-T-Zellen und TCR – transduzierte T-Zellen (Rosenberg and Restifo, 2015).

Die Therapie mit CD19-gerichteten CAR-T-Zellen wird bereits in der Behandlung verschiedener hämatologischer Krebserkrankungen, wie z.B. B-Zell Lymphomen und Akuten lymphatischen Leukämien, eingesetzt (Kochenderfer et al., 2010; Porter et al., 2011). Der Chimeric Antigen Receptor (CAR) wird aus einer extrazellulären und einer intrazellulären Domäne zusammengesetzt. Der extrazelluläre Anteil ist eine Antikörper-Einheit, welcher spezifisch an einen Oberflächenmarker auf Tumorzellen bindet. An diese Antikörpereinheit sind intrazellulär kostimulatorische Signalmoleküle gebunden, welche durch eine Kopplung an T-Zell Rezeptoren die T-Zell Aktivierung stimulieren können (Maher et al., 2002). Trotz einer hohen Wirksamkeit bei hämatologischen Erkrankungen konnte nur ein begrenzter Therapieerfolg beim Einsatz von CAR-T-Zellen gegen solide Tumore beobachtet werden. Einer der Ursachen hierfür ist die Polyklonalität der soliden Tumore, sodass eine gegen ein einzelnes Ziel-Antigen gerichtete CAR-T-Zelle keine ausreichende Tumorkontrolle erreichen kann. Zudem exprimieren solide Tumorzellen im Gegensatz zu hämatologischen Tumorzellen ihre tumorspezifischen Antigene oft nicht auf ihrer Zelloberfläche, sodass eine Bindung durch die Antikörper-Einheit der CAR-T-Zelle nicht möglich ist.

T-Zell Rezeptoren binden an MHC-gebundene Antigene. Dadurch beschränkt sich ihre Reaktivität nicht nur auf Moleküle, die auf der Oberfläche exprimiert werden, sondern kann auf alle Tumorantigene ausgeweitet werden, die als MHC-gebundenen Epitope

präsentiert werden (Morgan et al., 2013). Die Herausforderung in der Entwicklung der TCR-transduzierten T-Zellen liegt in der Identifikation der Gensequenz des reaktiven T-Zell Rezeptors passend zum entsprechend auf MHC-Molekülen präsentierten Epitop des Tumorantigens (Yanagi et al., 1984). Für eine anhaltende Effektivität der adoptiv transferierten T-Zellen in der Tumormikroumgebung solider Tumore müssen zusätzlich immunsuppressive Mechanismen im Tumor überwunden werden.

#### 1.2.4 Kombinationstherapien mit Immuntherapien

Die Komplexität der immunsuppressiven Mechanismen im Tumormikromilieu und die auf spezielle Mechanismen begrenzten Wirkprofile einzelner Immuntherapien implizieren die Notwendigkeit für einen kombinierten Einsatz verschiedener Immuntherapien. Neben der Kombination verschiedener Formen der Immuntherapien untereinander führt auch die Kombination von Immuntherapien mit anderen medikamentösen Antitumor-Therapien zu einer verbesserten Tumorkontrolle.

Die Induktion eines Zelltods der Tumorzellen durch konventionelle Therapien wie Chemotherapie oder Radiotherapie führen durch die Induktion der Antigenfreisetzung sowie die Sekretion immunstimulatorischer Zytokine zur Immunaktivierung im Tumor (Zitvogel and Kroemer, 2009). Dies bildet eine Rationale für die Anwendung kombinierter Therapien aus Immuntherapien und anderen zytotoxischen Therapiemodalitäten.

Die Radiotherapie führt zusätzlich zu einer Förderung der Immunzellinfiltration, Aktivierung der infiltrierenden Immunzellen und Veränderung der Tumor-assoziierten Gefäße im Tumor. Diese Modulation der immunologischen Umgebung des Tumors kann zusätzlich die Wirkung von Immuntherapien verstärken (Formenti and Demaria, 2013).

Die Wahl der geeigneten Immuntherapie hängt von der immunologischen Zusammensetzung des Tumormikromilieus ab. Bei einem Tumor mit ausgeprägter Infiltration durch Immunzellen kann bereits eine alleinige ICI-Therapie zur Wiederherstellung der T-Zell Funktion im Tumor ausreichen. Hingegen benötigt ein immunologisch „kalter“ Tumor ohne Immunzellinfiltration mehrere Therapiemodalitäten, um die einzelnen Schritte der Immunantwort zu induzieren (Galon and Bruni, 2019).

### 1.3 Ziel der Arbeit: Kombinierte Immuntherapien zur Behandlung solider Tumore

In dieser Arbeit wird der Einfluss von Immuntherapien auf das Tumormikromilieu in zwei verschiedenen Tumorentitäten in experimentellen Mausmodellen untersucht. Die Arbeit gliedert sich im Folgenden in zwei separate Teile:

Im ersten Teil wird die Kombinationstherapie aus einer Vakzinierung mit Tumorantigen-beladenen DCs und einem adoptiven Transfer Tumorantigen-spezifischer T-Zellen im B16 Melanom-Modell untersucht. Das Melanom gehört zu den immunogenen „heißen“ Tumoren. Ziel dieses Abschnitts ist, die Auswirkungen der DC-Vakzinierung auf die T-Zell vermittelte Immunantwort im Tumor zu verstehen. Durch Verwendung von migrationsinkompetenten Arc/Arg3.1<sup>-/-</sup>-DCs soll in diesem Zusammenhang speziell die DC-Migration in der Immunantwort gegen den Tumor untersucht und als ein Ansatzpunkt zur Verbesserung der Effektivität einer DC-Vakzinierung getestet werden.

Im zweiten Teil wird der Einfluss einer Kombination aus Bestrahlung und Immuntherapie auf das Tumormikromilieu im syngenem Gliom-Modell GL261-gp100 untersucht. Das maligne Gliom gehört zu den nicht-immunogenen, „kalten“ Tumoren. In diesem Teil der Arbeit soll untersucht werden, ob die Bestrahlung als immunmodulatorisches Adjuvanz zur Verstärkung der Immuntherapien im malignen Gliom genutzt werden kann. Dabei werden die genauen Auswirkungen der Bestrahlung auf die T-Zellen, myeloiden Zellen und vaskulären Zellen sowie auf die Sekretion löslicher Chemokine und Zytokine im Tumormikromilieu untersucht.

Diese Arbeit stellt am Beispiel der ausgewählten Tumorentitäten immunmodulatorische Mechanismen verschiedener Therapiemodalitäten dar und bietet damit Ansatzpunkte für die Weiterentwicklung und Verbesserung von Immuntherapien.



## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Zellkulturmedium

Medium/Puffer	Inhalte
Standard Zellkultur Medium (GL261, B16, Phoenix <sup>TM</sup> – Eco)	DMEM high-glucose, 10% FBS, 100U/ml Penicillin, 0.1mg/ml Streptomycin
HCMEC/D3 Medium	Millipore, EndoGro Basal Medium, EndoGRO MV Supplemental Kit mit: 0.2% EndoGRO-LS Supplement, 5ng/ml rhEGF, 10mM L-Glutamin, 1µg/ml Hydrocortison Hemisuccinat, 0.75U/ml Heparinsulfat, 50µg/ml Ascorbinsäure, 5% FBS, 1ng/ml FGF-2, kultiviert auf Zellplatten ge-coated mit 6-10µg/cm <sup>2</sup> Kollagen
BMDM Medium	IMDM, 10% FBS, 100U/ml Penicillin, 0.1mg/ml Streptomycin, 30ng/ml M-CSF
BMDC Medium	RPMI-1640, 10% FBS, 100U/ml Penicillin, 0.1mg/ml Streptomycin, 5x10 <sup>-5</sup> M 2 Mercaptoethanol, 20ng/ml GM-CSF
T-Zell Medium	RPMI-1640, 2mM L-Glutamin, 10% FBS, 100U/ml Penicillin, 0.1mg/ml Streptomycin, 25mM Hepes pH 7.4, 1mM Natriumpyruva, 0.1mM NEAA, 5x10 <sup>-5</sup> M 2 Mercaptoethanol

#### 2.1.2 Puffer

Puffer	Inhalte
FACS Puffer	PBS, 3% FBS, 2mM EDTA
MACS Puffer	PBS, 3% FBS, 10mM EDTA
ACK Lyse Puffer, pH 7.2	VE H <sub>2</sub> O, >0.15 M NH <sub>4</sub> Cl, 10mM KHCO <sub>3</sub> , 0.1mM Na <sub>2</sub> EDTA

#### 2.1.3 Peptide

Peptid	Aminosäuresequenz	Hersteller
gp100 <sub>25-33</sub>	KVPRNQDWL	Custom made, Research Group GMP & T cell therapy, DKFZ
OVA <sub>257-264</sub>	SINFEKL	InvivoGen

## 2.1.4 Primer

Zielgen	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'
hGAPDH	CTGGGCTACACTGAGCACC	AAGTGGTCGTTGAGGGCAATG
hCXCL9	CCAGTAGTGAGAAAGGGTCGC	AGGGCTTGGGGCAAATTGTT
hCXCL10	GTGGCATTCAAGGAGTACCTC	TGATGGCCTTCGATTCTGGATT
hCCL2	CAGCCAGATGCAATCAATGCC	TGGAATCCTGAACCCACTTCT
hVCAM-1	TTTGACAGGCTGGAGATAGACT	TCAATGTGTAATTTAGCTCGGCA
hSELECTIN	CTGTTACCCTGGATTCTATGGGC	GCTGCACTGCGAGTTAAAAGA
mGAPDH	TTGAGGTCAATGAAGGGGTC	TCGTCCCGTAGACAAAATGG
mCXCL10	CCTATGGCCCTCATTCTCAC	CGTCATTTTCTGCCTCATCC

## 2.1.5 Antikörper

## 2.1.5.1 Durchflusszytometrie: Konjugierte FACS-Antikörper

Antigen	Wirt	Klon	Fluorophor	Hersteller	Verdünnung (Konz.)
CD16/32 (Fc-Block)					
Viability dye			APC-Cy 7	Biologend	1:1.000
CD45	Ratte	30-F11	BV510	Biologend	(1:150) 0.2mg/ml
CD3	Ratte	17-A2	BV711	Biologend	1:100 (0.2mg/ml)
CD8a	Ratte	53-6.7	AF700	Biologend	1:200 (0.5mg/ml)
CD4	Ratte	RM4-5	PE-TxRed	ThermoFischer	1:100 (0.2mg/ml)
CD90.1	Maus	OX-7	PE	Biologend	1:100 (0.2mg/ml)
PD-1	Ratte	29F.1A12	BV421	Biologend	1:150 (0.2mg/ml)
Ki67	Ratte	16A8	BV605	Biologend	1:100 (0.2mg/ml)
IFN $\gamma$	Ratte	XMG1.2	PE-Cy7	Biologend	1:150 (0.2mg/ml)
Perforin	Ratte	S16009A	APC	Biologend	1:200 (0.2mg/ml)
GranzymeB	Ratte	NGZB	PerCP-eFl1710	ThermoFischer	1:300 (0.2mg/ml)
CD45.2	Maus	104	APC	Biologend	1:80 (0.2mg/ml)
CD11b	Ratte	M1/70	PE-Cy7	Biologend	(1:80) 0.2mg/ml
CD11c	Armenischer Hamster	N418	eFluor 450	ThermoFischer	1:150 (0.2mg/ml)
I-A/I-E	Ratte	M5/114.15.2	BV605	Biologend	1:50 (0.2mg/ml)
CD103	Ratte	2E7	PerCP-Cy5.5	Biologend	1:40 (0.2mg/ml)
PD-1	Ratte	29F.1A12	APC-Cy7	Biologend	1:200 (0.2mg/ml)

CXCR3	Armenischer Hamster	CXCR3-173	BV421	Biologend	1:40 (0.2mg/ml)
CD44	Ratte	IM7	BV605	Biologend	1:40 (0.2mg/ml)
CD62L	Ratte	MEL-14	APC	Biologend	1:100 (0.2mg/ml)
CD11b	Ratte	M1/70	PerCP	Biologend	1:100 (0.2mg/ml)
I-A/I-E	Ratte	M5/114.15.2	BV711	Biologend	1:100 (0.2mg/ml)
CD86	Ratte	GL-1	BV605	Biologend	1:100
CD11c	Armenischer Hamster	N418	APC	Biologend	1:100 (0.2mg/ml)
CD103	Armenischer Hamster	2E7	PE	Biologend	1:100 (0.2mg/ml)

### 2.1.5.2 Immunoblot-Antikörper

Antigen	Wirt	Hersteller	Verdünnung (Konz.)
Arc/Arg3.1	Maus	Paul Worley	1:4000
H3	Kaninchen	Cell Signaling	1:1000

### 2.1.5.3 Immunhistochemie-Färbung Antikörper

#### a) Primärantikörper

Antigen	Wirt	Hersteller	Verdünnung (Konz.)
CD8a	Ratte	ThermoFischer	1:100 (5µg/ml)
Iba-1	Kaninchen	Fujifilm WAKO	1:500 (0.5-0.7mg/ml)
CXCL10	Ziege	R&D	5-15µg/ml
CD31	Ziege	R&D	10µg/ml
CD31	Kaninchen	Abcam	1µg/ml

#### b) Sekundärantikörper

Antigen	Wirt	Klon	Fluorophor	Hersteller	Verdünnung (Konz.)
Kaninchen-IgG	Esel	polyclonal	AF488	ThermoFischer	1:200 (2mg/ml)
Ziege-IgG	Esel	polyclonal	AF 633	ThermoFischer	1:200 (2mg/ml)
Ratte-IgG	Ziege	polyclonal	AF488	ThermoFischer	1:200 (2mg/ml)

## 2.1.6 Vektoren

Bezeichnung	Hersteller
pMXS-IRES-GFP	Cell Biolabs Inc.
pDONR	ThermoFischer

## 2.1.7 Kits

Kit	Hersteller
CD8a+ T cell isolation kit, mouse, MACS	Miltenyi Biotec
High-capacity cDNA Reverse transcription Kit	Applied Biosystems
MultiSite Gateway® Three-Fragment Vector Construction Kit	Life technologies
Qiagen® Plasmid Mini and Midi Kits	Qiagen
RNeasy Kit	Qiagen
Proteome Profiler Array, Mouse Cytokine Array Panel A	R&D

## 2.1.8 Weitere Chemikalien und Materialien (alphabetisch)

Reagenzien/Materialien	Hersteller
Albumin Fraktion V	Roth GmbH
Attune™ Debubble Solution (1x)	ThermoFischer Scientific
Attune™ NxT Flow Cell Cleaning Solution	ThermoFischer Scientific
Attune™ Focusing Fluid	ThermoFischer Scientific
Attune™ Shutdown Solution (1x)	ThermoFischer Scientific
Attune™ Performance Tracking Beads	ThermoFischer Scientific
Attune™ Wash Solution	ThermoFischer Scientific
β-Mercaptoethanol	SigmaAldrich
Brefeldin A	SigmaAldrich
Collagenase D	Roche
DNase I	Sigma Aldrich
D-Luciferin, Potassium Salt	BioVision
DMEM	Sigma-Aldrich
FACS Clean	BD Bioscience
FACS Flow	BD Bioscience
FACS Shutdown Solution	BD Bioscience
FBS	Sigma-Aldrich
hFGF	Peprotech
Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set	eBioscience
FuGene HD Transfektionsreagenz (TR)	Promega
rmGM-CSF	Peprotech
HBSS	SigmaAldrich
HEPES pH 7.1	Gibco™ Life Technologies
Histo-Clear™ II	National Diagnostics
rmIFNγ	Peprotech
IL-2 (Proleukin) 18x10 <sup>6</sup> IU	Novartis
rmIL-2	Peprotech
rmIL-3	Peprotech
rmIL-6	Peprotech

L-Glutamin	Gibco™ Life Technologies
Lipopolysaccharide	SigmaAldrich
Matrigel	Corning
rmM-CSF	Peprotech
Natriumpyruvat	Gibco™ Life Technologies
Opti-MEM™ Medium	Gibco™ Life Technologies
PBS	Gibco™ Life Technologies
Penicillin/Streptomycin	Gibco™ Life Technologies
Polybrene	SigmaAldrich
Prussian blue iron staining kit	Sigma-Aldrich
RetroNectin®	TAKARA
RPMI 1640	PAN Biotech
SCF	Peprotech
StemPro™ Accutase	Gibco™ Life Technologies
SYBR-Green Master Mix	Applied Biosystems
TPO	Peprotech
Trypsin	Gibco™ Life Technologies
Vectashield HardSet Mounting Medium with DAPI	Vector Laboratories

## 2.2 Tierexperimentelle Methoden

### 2.2.1 Versuchstiere und deren Haltung

Für diese Doktorarbeit wurden Versuchstiere der Gattung *mus musculus*, die sogenannte Hausmaus, verwendet. Die Tiere wurden unter standardisierten Bedingungen und spezifiziert pathogenfrei (SPF) in der Tierhaltung des Zentrums für präklinische Forschung (ZPF) des Deutschen Krebsforschungszentrums Heidelberg (DKFZ) gezüchtet und gehalten. Alle Experimente wurden von der zuständigen Tierschutzkommission (Regierungspräsidium Karlsruhe, TVA Nr. G97-16, G27-17) genehmigt und gemäß des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

Für die vorliegende Arbeit wurden folgende Mauslinien verwendet:

- C57BL/6J Wildtyp (WT): Die Tiere wurden gezüchtet im zentralen Tierlabor des Zentrums für präklinische Forschung des DKFZ Heidelberg.
- C57BL/6J Ly5.1 (B6-SJL-Ptprc<sup>a</sup> Pepc<sup>b</sup>/BoyJ): Eine zu C57BL/6J Wildtyp kongene Mauslinie mit Expression des veränderten Pan Leukozyten Markers CD45.1 statt CD45.2. Die Tiere wurden gezüchtet im zentralen Tierlabor des Zentrums für präklinische Forschung des DKFZ Heidelberg oder gekauft von *The Jackson Laboratory*.
- Arc/Arg3.1-knockout Mäuse: Eine zu C57BL/6J kongene Mauslinie mit einem vollständigen Knockout des Arc/Arg3.1-Gens. Die Generierung der Mauslinie sowie die genaue Beschreibung des Genotyps und Phänotyps der Arc/Arg3.1-

knockout Mäuse sind aufgeführt in der Arbeit von Plath et al. (Plath et al., 2006). Die Tiere wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dietmar Kuhl, Uniklinikum Eppendorf, Hamburg.

- Pmel-1 [B6.Cg-Thy1<sup>a</sup>/Cy Tg(TcraTcrb)<sup>8Rest/J</sup>]: Eine transgene Mauslinie mit einem transgen veränderten, für das humane Melanomantigen hgp100<sup>25-33</sup> spezifischen, T-Zell Rezeptor (Pmel-1 TCR). Die Mauslinie ist zudem homozygot für das T-Zell spezifische Thy1<sup>a</sup> Allel (Overwijk et al., 1998). Die Tiere wurden gekauft von *The Jackson Laboratory* und gezüchtet im zentralen Tierlabor des Zentrums für präklinische Forschung des DKFZ Heidelberg.
- Pmel/luc-mcherry (B6-Tg(Actb-Luc,mCherry)#Platt): Die Tiere wurden *in-house* generiert durch Kreuzung von Pmel-1 Mäusen mit Luc-mCherry Mäusen (Pmel-1 [B6.Cg-Thy1a/Cy Tg(TcraTcrb)<sup>8Rest/J</sup>] x Luc-mCherry [B6-Tg(Actb-Luc,mCherry)]). In Luc-mCherry Mäusen werden Luciferase und mCherry unter dem Actb-Promoter exprimiert. Die Tiere wurden generiert und gezüchtet im Zentrum für präklinische Forschung des DKFZ Heidelberg.

### 2.2.2 Subkutane Injektion von B16-Melanomzellen, Tumorvermessung und Behandlung

Zur Tumorinokulation wurden  $5 \times 10^6$ /ml B16 Wildtyp Zellen in PBS gelöst. Die Zell-Suspension wurde im 1:1 Verhältnis mit Matrigel gemischt. Pro Maus wurden 200µl der Zell-Matrigel-Mischung mit Hilfe einer 27G Nadel nach Rasur subkutan in die rechte Flanke injiziert.

Die Vermessung der Tumorfläche erfolgte mit Hilfe eines elektronischen Messschiebers durch Ermittlung der Tumurlänge x Tumorbreite in der größten Ausdehnung. An Tag 6 nach Tumorinokulation erfolgte die Ausmessung der Ausgangs-Tumorgröße. Die Tiere wurden anschließend anhand der Tumorgröße gleichmäßig in die verschiedenen Behandlungsgruppen randomisiert eingeteilt.

Ab Tag 7 nach Tumorinokulation erfolgte die erste Behandlung mit einer subkutanen DC-Vakzinierung von  $4 \times 10^6$  Peptid-beladenen dendritischen Zellen (s. 2.3.2), gefolgt von einer zweimal täglichen Gabe von 50.000IU IL-2. Eine zweite DC-Vakzinierung erfolgte 4-6 Tage danach. Zusätzlich wurden die Tiere mit einem adoptiven Transfer von  $5 \times 10^6$  pmel-1 CD8<sup>+</sup> T-Zellen i.v. (s. 2.3.3.) an Tag 7 nach Tumorinokulation behandelt.

Bis zur Terminierung wurden die Tiere täglich in Hinblick auf Tumor-assoziierte Symptome untersucht. Bei Auftreten von Symptomen oder bei Überschreiten einer Tumorgröße von 1.5x1.5cm erfolgte die vorzeitige Terminierung.

Die reguläre Terminierung erfolgte jeweils fünf Tage nach der ersten oder zweiten DC-Vakzinierung.

### 2.2.3 Intrakranielle Inokulation von GL261-gp100 Tumorzellen, Tumorvermessung und Behandlung

Zur Tumordinokulation wurden  $5 \times 10^7$ /ml GL261-gp100 Tumorzellen in PBS gelöst. Pro Maus wurden 2µl der Zellsuspension mit Hilfe einer 10µl Hamilton-Mikronadel (Stoeltin, Wood Dale, IL, USA) über eine stereotaktische Apparatur in die rechte Gehirnhemisphäre injiziert. Hierbei erfolgte die Injektion jeweils 1mm lateral und 2mm ventral der Bregma in einer Tiefe von 3mm unter der Dura.

Die Tumorgröße wurde über eine MRT-Bildgebung mit Hilfe eines 9.4 Tesla Kleintier MRT-Scanners durch die Abteilung für Neuroradiologie der Universitätsklinik Heidelberg (Dr. Michael O. Breckwoldt/Manuel Fischer) ermittelt. An Tag 10-11 nach Tumordinokulation erfolgte die erste Ausgangs-MRT-Bildgebung. Die Tiere wurden anschließend anhand der Tumorgröße gleichmäßig in die verschiedenen Behandlungsgruppen randomisiert eingeteilt.

Von Tag 12 bis Tag 15 nach Tumordinokulation wurde die stereotaktische Tumorbestrahlung mit jeweils 2Gy an vier aufeinanderfolgenden Tagen mit einem 2x2cm großem Bestrahlungsfeld durchgeführt. Die Bestrahlung erfolgte über die Abteilung für Physikalisch-Technische Qualitätssicherung in der Strahlentherapie (Dr. Peter Häring) des DKFZ Heidelberg. An Tag 14 nach Tumordinokulation erfolgte der adoptive T-Zell Transfer mit  $5 \times 10^6$  pmel-1 CD8<sup>+</sup> T-Zellen i.v. (s. 2.3.3.), ggf. in Kombination mit einem adoptivem Transfer von M1-polarisierten Makrophagen i.v. (s. 2.3.2)

Bis zur Terminierung wurden die Tiere täglich in Hinblick auf Tumor-assoziierte Symptome untersucht. Bei Auftreten von Symptomen erfolgte die vorzeitige Terminierung.

Die reguläre Terminierung erfolgte 7-10 Tage nach Behandlungsbeginn.

#### 2.2.4 In vivo Bildgebung mittels Biolumineszenz Messung (IVIS)

Die *in vivo* Biolumineszenz Messungen wurden am IVIS Lumina Series III von Perkin-Elmer durchgeführt. Die Mäuse wurden im Gebiet des Tumors, der Tumor drainierenden zervikalen oder inguinalen Lymphknoten und der Milz rasiert.

Für die Bildgebung wurden 50mg/kg-Körpergewicht D-Luciferin i.p. pro Tier injiziert. Die Narkoseeinleitung erfolgte mit 3-4% Isofluran. Anschließend wurden die Tiere an den vorgesehenen Plätzen in der IVIS-Kammer platziert. 10 Minuten nach D-Luciferin Injektion erfolgten die Bildaufnahmen mit einer Belichtungszeit von 30, 60 und 90 Sekunden. Während der Bildaufnahmen wurde die Narkose mit 1,5% Isofluran innerhalb der Kammer aufrechterhalten.

Die Bildauswertung und Quantifizierung des Biolumineszenz Signals wurde mit der Living Image 4.3 Software (Perkin Elmer) durchgeführt. Die Signale in den zu quantifizierbaren Bereichen des Tumors und der lymphatischen Organe wurden in Photonen/Sekunde gemessen.

#### 2.2.5 In vivo 2-Photon Mikroskopie

Die zugehörigen Versuche und *in vivo* Aufnahmen mittels 2 Photon-Mikroskopie wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Experimentelle Neuroonkologie (Prof. Frank Winkler) des DKFZ Heidelberg durchgeführt. Für die 2 Photonen-Mikroskopie wurde ein Zeiss 7M Mikroskop mit einem Coherent Chameleon Ultra II Laser (Coherent) verwendet.

Für die *in vivo* Darstellung der gp100-spezifischen pmel T-Zellen wurden die T-Zellen vor adoptivem Transfer mit dem 2.5µmol/l CMTMR-Farbstoff für 30 Minuten bei 37°C gefärbt. Zur Fluoreszenzkontrastierung der Gefäße wurden vor Beginn der Bildaufnahmen 10mg/ml FITC-dextrane Farbstoff (2000kDa, FD2000S, Sigma Aldrich) i.v. injiziert.

Die Aufnahmen der T-Zellen erfolgte über drei Tage nach adoptivem T-Zell Transfer.

#### 2.2.6 Isolation von Leukozyten aus Organen

Zunächst erfolgte die terminale kardiale Blutentnahme von 1-2mL Blut. Anschließend wurden die Mäuse durch eine kardiale Perfusion mit 20ml PBS terminiert und die entsprechenden Organe herauspräpariert.

Der Tumor wurde zunächst mit einem Skalpell mechanisch zerkleinert und für 1h unter ständigem Schütteln bei 37°C in HBSS mit 0.5ng/ml Collagenase D und 20µg/ml



DNase I zum Kollagenverdau inkubiert. Vor der weiteren Prozessierung wurde der Tumorüberstand abgenommen und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  für weitere Analysen gelagert (s. 2.4.2). Anschließend wurde das verdaute Tumorgewebe durch einen  $100\mu\text{m}$  und anschließend einen  $70\mu\text{m}$  Zellfilter zu einer Zellsuspension mechanisch dissoziiert. Bei Bedarf wurden Erythrozyten mit ACK Lyse Puffer für 2 Minuten lysiert.

Zur Aufreinigung der Immunzellen aus den GL261-Gliomen (Hirntumorgewebe) erfolgte eine Auftrennung des dissoziierten Tumorgewebes mittels einer Percoll Dichtegradient Zentrifugation unter Verwendung von Easycoll (Biochrom AG) Lösungen verschiedener Dichten (9ml  $1\text{mg/ml}$ , 9ml  $1072\text{mg/ml}$ , 10ml  $1088\text{mg/ml}$ , 5ml  $1124\text{mg/ml}$ ). Die Zentrifugation erfolgte für 45 Minuten bei Raumtemperatur bei  $1250g$  ohne Bremse. Anschließend wurde die Immunzellen-enthaltende Phase abgenommen und weiter prozessiert.

Das Blut wurde zunächst zur Trennung des Plasmas von den zellulären Bestandteilen bei  $1200g$  für 10 Minuten zentrifugiert. Das Plasma wurde anschließend für weitere Zytokinanalysen abgenommen (s. 2.4.2). Zur Erythrozytenlyse wurde die Zellsuspension für 10 Minuten mit ACK-Lyse Puffer auf Eis inkubiert.

Die Milz und die Lymphknoten wurden nach Entnahme durch einen  $70\mu\text{m}$  Zellfilter mechanisch dissoziiert. Bei Bedarf wurden Erythrozyten mittels ACK Lyse Puffer für 2 Minuten lysiert.

Die erhaltenen Zellsuspensionen aus den jeweiligen Organen wurden in PBS aufgenommen und für die weitere durchflusszytometrische Analyse prozessiert (s. 2.4.3).

## 2.3 Zellbiologische Methoden

### 2.3.1 Zellkultur und Zelllinien

Die Kultivierung der B16 Wildtyp, Phoenix<sup>TM</sup> – Eco und GL261-gp100-GFP Zelllinien erfolgte im Standard Zellkultur Medium bei  $37^{\circ}\text{C}$ ,  $5\%\text{CO}_2$ . Zur Zellernte wurden die Zellen mit Trypsin oder StemPro Accutase für 3 Minuten bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert und anschließend mit PBS von der Zellplattenoberfläche abgespült.

Für die vorliegende Arbeit wurden folgende Zelllinien verwendet:

- Murine Melanomzelllinie B16 Wildtyp (WT) (freundlicherweise von Günter J. Hämmerling, Abteilung für Molekulare Immunologie, DKFZ, Heidelberg zur Verfügung gestellt) zur Inokulation subkutaner muriner Melanome.

- Immortalisierte embryonale Nierenzelllinie Phoenix<sup>TM</sup> – Eco (Allele Biotech) zur Herstellung retroviraler Verpackungsviren.
- Murine syngene Gliom-Zelllinie GL261-gp100-GFP (GL261 von DSMZ Braunschweig) zur Inokulation intrakranieller murine Gliome. Die Generierung der syngenen GL261-gp100-GFP Zelllinie erfolgte über retrovirale Transduktion, durchgeführt in Vorarbeiten von Dr. Katharina Sahn und Dr. Martina Ott.
- Immortalisierte humane zerebrale mikrovaskuläre Endothelzelllinie HCMEC/D3 (Merck Millipore) für *in vitro* Experimente.

### 2.3.2 Isolation und Ausreifung von murinen Knochenmarkszellen

Murines Knochenmark wurde aus Ober- und Unterschenkel-Knochen von 5-8 Wochen alten C57BL/6J- bzw. Arc/Arg3.1<sup>-/-</sup>-Mäusen isoliert. Das Knochenmark wurde über eine 20G Nadel mit PBS aus den Röhrenknochen gespült und durch einen 70µm Zellfilter mechanisch dissoziiert.

Für die Ausreifung dendritischer Zellen wurden die isolierten Knochenmarkszellen in BMDM-Medium aus RPMI-1640 mit 10% FBS, 100U/ml Penicillin, 0.1mg/ml Streptomycin, 5x10<sup>-5</sup> M 2-Mercaptoethanol und 2mM L-Glutamin unter Zugabe von 20ng/ml GM-CSF für 7 Tage bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Das Medium wurde jeden zweiten Tage ausgetauscht, indem der Zellüberstand vorsichtig abgenommen und durch frisches Medium mit 20ng/ml GM-CSF ersetzt wurde. Nach Ausreifung befanden sich die semiadherenten dendritischen Zellen sowohl im Medium als auch an der Oberfläche der Zellkulturplatte. Zur Zellernte wurde zunächst das Zellmedium vorsichtig abgenommen und aufgehoben. Die restlichen Zellen an der Oberfläche der Zellkulturplatte wurden mit StemPro Accutase für 5 Minuten bei 37°C inkubiert, anschließend mit PBS von der Zelloberfläche abgespült und zum abgenommenen Medium hinzugegeben. Vor dendritischer Zellvakzinierung wurden die Zellen für 24h mit 100ng/ml LPS stimuliert und für 4 Stunden mit 10µg/ml Peptid (OVA<sub>257-264</sub> oder hgp100<sub>25-33</sub>) beladen.

Die Ausreifung von Makrophagen erfolgte in BMDM-Medium aus IMDM mit 10% FBS, 100U/ml Penicillin und 0.1mg/ml Streptomycin unter Zugabe M-CSF. Die Zellen wurden für 7 Tage bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Am ersten Tag der Ausreifung erfolgte die Zugabe von 30ng/ml M-CSF. An den darauffolgenden drei Tagen wurden jeweils

10ng/ml M-CSF pro Tag hinzugegeben. Der Mediumwechsel erfolgte vier bis fünf Tage nach Beginn der Kultur. Sieben Tage nach Beginn der Kultur erfolgte die Polarisierung der Makrophagen. Zur M1 Polarisierung wurden 100ng/ml LPS und 50ng/ml IFN $\gamma$  hinzugegeben. Die Makrophagen wurden zusätzlich mit 3 $\mu$ l/ml Ferumoxytol zur anschließenden *ex vivo* Detektion markiert. Die Polarisierung erfolgte über eine Inkubation für drei weitere Tage bei 37°C, 5% CO $_2$ . Zur Ernte wurden die adhärennten Makrophagen nach Abnahme des Zellüberstandes zunächst für 5 Minuten mit StemPro Accutase bei 37°C inkubiert und unter Verwendung eines Zellschabers vorsichtig von der Zellplattenoberfläche abgelöst.

### 2.3.3 Isolation und Ausreifung von T-Zellen

Die Isolation muriner T-Zellen erfolgte aus der Milz und den Lymphknoten von 6-10 Wochen alten pmel-1 oder pmel-luc-mcherry Mäusen. Nach Organentnahme wurden die Milzen und Lymphknoten durch einen 70 $\mu$ m Zellfilter mechanisch dissoziiert. Die Erythrozyten wurden mittels ACK-Lyse Puffer lysiert. Die isolierten T-Zellen wurden in T-Zell Medium aus RPMI-1640 mit 10% FBS, 100 U/ml Penicillin, 0.1mg/ml Streptomycin, 25mM HEPES pH 7.4, 1mM Natriumpyruvat und 5x10 $^{-5}$  2-Mercaptoethanol und 2mM L-Glutamin kultiviert. Zur antigenspezifischen Stimulation wurden 30IU/ml IL-2 und 2 $\mu$ g/ml hgp100 $_{25-33}$  hinzugegeben. Die Ausreifung und Stimulation erfolgte über 3 Tage unter Inkubation bei 37°C, 5%CO $_2$ .

Für den adoptiven T-Zell Transfer wurden CD8a $^+$  T-Zellen mit dem „Mouse CD8a $^+$  T cell isolation MACS Kit“ gemäß der Herstellerangaben aus den kultivierten T-Zellen selektioniert.

### 2.3.4 Überexpression von Arc/Arg3.1 in primären murinen dendritischen Zellen

Für eine homogene Überexpression von Arc/Arg3.1 wurden primäre, aus murinem Knochenmark ausgereifte dendritische Zellen (BMDCs) mit dem retroviralen Vektor pMXS-Arc/Arg3.1-IRES-GFP transduziert.

Zunächst wurde die komplette cDNA des Arc/Arg3.1-Gens mit attB-Enden flankiert und über die Multisite-Gateway Reaktion in den retroviralen Zielvektor pMXS-IRES-GFP kloniert.

Zur Virusproduktion wurde der pMXS-Arc/Arg3.1-IRES-GFP Vektor mit Hilfe des FuGene® HD Transfektionsreagenzes in Phoenix $^{\text{TM}}$  – Eco Zellen transfeziert. Der

Zellüberstand mit den Viruspartikeln wurde nach 48h für die Transduktion abgenommen.

Die Knochenmarkszellen wurden nach Isolation für 4 Tage mit einem Zytokin-Mix bestehend aus 20ng/ml IL-3, 50ng/ml IL-6, 50ng/ml SCF und 50ng/ml TPO für vier Tage vorbehandelt. Zwei Tage nach Beginn der Kultur wurden 20ng/ml GM-CSF zur Ausreifung dendritischer Zellen hinzugegeben. Die Transduktion erfolgte an Tag 5 nach Beginn der Kultur. Die vorbehandelten Knochenmarkszellen wurden in RetroNectin-beschichteten Zellkulturplatten (6-well Platten) ausgesät und mit 10µg/ml Polybren und dem Virus-enthaltenden Zell-Überstand für 90 Minuten bei 1200g zentrifugiert, um den Kontakt zwischen den Viruspartikeln und den Zellen herzustellen. Am darauffolgenden Tag wurde der Zellüberstand mit den verbliebenen Viruspartikeln abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die weitere Ausreifung der Knochenmarkszellen zu dendritischen Zellen in GM-CSF enthaltendem BMDC-Medium für vier weitere Tage.

Die Transduktionseffizienz wurde mittels Durchflusszytometrie auf GFP<sup>+</sup> Zellen ermittelt.

### 2.3.5 In vitro Bestrahlung

Zur *in vitro* Bestrahlung wurden  $0,5 \times 10^6$  M1-polarisierte primäre murine Makrophagen bzw. humane hCMEC/D3 Endothelzellen in 1ml pro well in einer 6-well Platte ausgesät und bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Bestrahlung erfolgte am Gammacell 40 (Best Theratronics) des DKFZ an 1-4 aufeinanderfolgenden Tagen mit jeweils 2Gy.

24h nach jedem Bestrahlungszeitpunkt wurden die jeweiligen Zellen mit Trypsin geerntet. Die erhaltene Zellsuspension wurde zur Trennung der Zellen und des Zellüberstandes für 5 Minuten bei 600g zentrifugiert. Das Zellpellet und der Zellüberstand wurden getrennt für weitere Analysen (s. 2.4.1, 2.4.2) bei -80°C gelagert.

## 2.4 Molekularbiologische und Proteinbiochemische Methoden

### 2.4.1 Reverse Transkription-Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR)

Mit Hilfe des Qiagen RNAeasy Mini Kits wurde die gesamten RNA aus den zuvor bestrahlten und geernteten primären murinen Makrophagen und hCMEC/D3-Endothelzellen (s. 2.3.5) isoliert. Die cDNA wurde mit dem „High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit“ gemäß Herstellerangaben synthetisiert. Die RT-qPCR erfolgte unter Verwendung des SYBR-Green Master Mix und der entsprechenden

Primer (s. 2.1.4) am QuantStudio 3 PCR System. Die Ct-Werte wurden zur Expression des Housekeeping Gens *Gapdh* normalisiert und als  $2^{-\Delta\Delta^{ct}}$  dargestellt.

#### 2.4.2 Zytokin Array

Die Zytokinanalysen im Tumor-Überstand und im Serum der Blutproben wurden mit Hilfe des Proteome Profiler<sup>TM</sup> Array – Mouse Cytokine Array Panel A gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Für die Analysen wurden 400µl der zu messenden Proben mit 600µl Array Puffer 6 versetzt, um ein Gesamtvolumen von 1000µl zu erhalten.

#### 2.4.3 Durchflusszytometrie (FACS)

Zur durchflusszytometrischen Analyse wurden die Einzelzellsuspensionen aus den einzelnen Organen zunächst in PBS gewaschen. Zur Blockierung unspezifischer Bindungen wurden die Zellen zunächst mit anti-CD16/32 geblockt. Anschließend erfolgte die Färbung der extrazellulären Marker mit den spezifischen, konjugierten Antikörpern (s. 2.1.5.1) für 30 Minuten auf Eis. Nach der Färbung wurden die Zellen nach mehrmaligem Waschen in PBS entweder direkt gemessen oder mit Formalin (4% PFA) für eine spätere Messung fixiert.

Zur Färbung der intrazellulären Marker Perforin, IFN  $\gamma$  und Ki67 wurden die Zellsuspensionen vor Beginn der Färbung für 5 Stunden mit 5µg/ml Brefeldin A und 10mg/ml hgp100<sub>25-33</sub> zur Restimulation bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Vor der Färbung wurden die Zellen mit dem Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Kit nach Anweisungen des Herstellers über Nacht bei 4°C inkubiert. Die intrazelluläre Färbung erfolgte mit den spezifischen, konjugierten Antikörpern (s. 2.1.5.1) für 45 Minuten auf Eis. Nach der Färbung wurden die Zellen mehrmals in PBS gewaschen.

Die Messung erfolgte entweder am BD FACS Canto II oder am Attune NxT.

#### 2.4.4 Immunoblot

Der Immunoblot auf Arc/Arg3.1-Proteinexpression erfolgte in Zusammenarbeit mit Marcel Seungsu Woo des Instituts für Neuroimmunologie und Multiples Sklerose der Universitätsklinik Hamburg, Eppendorf (AG Friese).

Der Immunoblot wurde mit Gesamt-Zelllysaten der WT, Arc/Arg3.1<sup>-/-</sup> sowie pMXS-Arc/Arg3.1 transduzierten dendritischen Zellen durchgeführt. 40µg des daraus erhaltenen Proteins wurden auf einem Polyacrylamid sodium dodecyl sulfat (SDS)-Gel elektrophoretisch getrennt (SDS-Page) und anschließend auf eine Nitrocellulose-

Membran transferiert. Nach Blockierung unspezifischer Bindungen mit dem Western Blot Blockierungspuffer (5% Milchpulver in 0.5M TBS, pH 7.4, 0.05% Tween 20) erfolgte die Inkubation der Membran mit Antikörpern gegen Arc/Arg3.1 (Maus, 1:4000, Worley Lab) und dem Housekeeping-Gen H3 (Kaninchen, 1:1000, Cell Signaling) bei 4°C über Nacht. Nach Inkubation wurde die Membran gewaschen und für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit dem Wirt-spezifischen Sekundärantikörper inkubiert (1:20000, LI-COR, Biosciences). Die Visualisierung und Entwicklung des Chemilumineszenz-Signals der Membranen wurde mit ECL (LI-COR, Biosciences) durchgeführt. Die Bildaufnahme wurden eingescannt und in digitalisierter Form mit ImageJ kontrastiert.

#### 2.4.5 Immunfluoreszenz und Immunhistochemie

Die Immunfluoreszenz-Färbung erfolgte am Formalin-fixiertem und in Paraffin-eingebettetem Gewebe (FFPE).

Nach Organentnahme wurde das Gewebe zunächst in flüssigem N<sub>2</sub> tiefgefroren. Anschließend erfolgte die Fixierung mit 4% Paraformaldehyd in PBS für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nach Fixierung wurde das Gewebe mit einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert und in Paraffin eingebettet. Für die Färbung wurde das im Paraffinblock eingebettete Gewebe in 3-5µm dicke Schichten geschnitten und auf Objektträgern fixiert.

Zur Färbung wurden die Gewebeschnitte mit Xylol deparaffinisiert und in einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert. Anschließend wurden die Schnitte zur Antigendemaskierung für 3x5 Minuten im 0.2% Citrat-Puffer (pH 6.0) erhitzt.

Zur Färbung wurden die unspezifischen Bindungen mit einer 4%-igen Lösung des Wirtsorganismus-Serums des Sekundärantikörpers in PBS geblockt. Zunächst erfolgte die Färbung mit dem Primärantikörper in angegebener Konzentration (s. 2.1.5.3 a) bei 4°C über Nacht. Nach 3-maligem Waschen mit PBS erfolgte anschließend die Färbung mit dem Sekundärantikörper (s. 2.1.5.3 b) in einer 1:200 Verdünnung bei 4°C für eine Stunde. Zur abschließenden Fixierung und Färbung der Zellkerne mit DAPI wurden die gefärbten Schnitte mit „VECTASHIELD® HardSet Mounting Medium with DAPI“ gedeckelt.

Die Färbung der Ferumoxytol-markierten Makrophagen *in vitro* sowie *ex vivo* am Tumorgewebe erfolgte mit dem Prussian blue iron staining kit gemäß Herstellerangaben. Zur Färbung der Zellkerne wurde hierbei Hämatoxylin verwendet.

Die Bildaufnahmen der Immunfluoreszenzfärbungen erfolgten am konfokalen Laser Scanning Mikroskop LSM 710 von Zeiss mit Unterstützung der Zentralen Einheit Lichtmikroskopie des DKFZ. Kontrast und Helligkeit wurden mit ImageJ optimiert.

## 2.5 Statistische Methoden

### 2.5.1 Graphische Darstellung und statistische Analysen

Die graphische Darstellung wurde mit GraphPad Prism Version 8 durchgeführt. Alle Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler dargestellt. Für den Vergleich zwischen zwei Gruppen wurde ein zwei-seitiger Students t-Test und für den Vergleich zwischen mehr als zwei Gruppen ein *analysis of variance* (ANOVA) Test nach Welch mit Bonferroni-Korrektur angewendet. Die Korrelationstestung erfolgte durch Ermittlung des Pearson Korrelationskoeffizienten. Zum Vergleich von Veränderungen über die Zeit wurde die area under the curve (a.u.c.) für die jeweiligen Verlaufskurven errechnet. Ein p-Wert  $<0.05$  wurde als statistisch signifikant bewertet (\*:  $p<0.05$ , \*\*:  $p<0.01$ , \*\*\*:  $p<0.001$ , n.s.:  $p>0.05$ ).

### 3 TEIL I: EINFLUSS VON ARC/ARG 3.1 AUF DIE DENDRITISCHE ZELLVAKZINIERUNG IM MELANOM

#### 3.1 Einleitung

##### 3.1.1 Immuntherapien im Melanom

Für die Systemtherapie metastasierter Melanome werden als leitliniengerechte Standardtherapien aktuell Immuncheckpoint-Inhibitoren (Nivolumab, Pembrolizumab, Ipilimumab) sowie BRAF/MEK-Inhibitoren bei vorliegender BRAF-V600-Mutation eingesetzt (Pasquali et al., 2018; Seth et al., 2020).

Das Melanom ist ein immunologisch aktiver Tumor. Die Expression von Tumor-assoziierten Antigenen wie den Melanozyten-spezifischen Antigenen (MART1, gp100, Tyrosinase) sowie den Cancer Testis Antigenen führen zur Induktion spontaner T-Zell basierter Immunantworten gegen den Tumor (Kawakami et al., 1994).

Dies bildet die Rationale für die Entwicklung verschiedener Immuntherapien gegen das Melanom (Rosenberg, 1997; Rosenberg et al., 1985). Eine gp100-spezifische Peptidvakzinierung in Kombination mit der Gabe von IL-2 zeigte in einer Phase 3 Studie in der Behandlung des metastasierten Melanoms einen therapeutischen Vorteil gegenüber der alleinigen IL-2 Gabe, welche zu dem Zeitpunkt einer der Standardtherapien darstellte (Schwartzentruber et al., 2011). Die Anwendung von ICIs brachte einen revolutionären Fortschritt für die Melanom Therapie. ICIs zeigen eine hohe Wirksamkeit gegen Melanome mit langfristiger Tumorkontrolle (Larkin et al., 2015; Hodi et al., 2018; Hamid et al., 2018).

Weitere Formen der Immuntherapien wie zelluläre Therapien und tumorspezifische Vakzinierungen gegen das Melanom werden aktuell entwickelt.

##### 3.1.2 Dendritische Zellvakzinierung (DC-Vakzinierung)

Der Einsatz Antigen-beladener dendritischer Zellen induzierte bei fortgeschrittenen Melanomen eine tumorspezifische Immunantwort und bietet einen vielversprechenden Ansatz zur Verstärkung der Effektivität einer Vakzinierung in der Melanom Therapie (Nestle et al., 1998; Palucka et al., 2006).

In präklinischen Studien konnte die Induktion einer tumorspezifischen T-Zell basierten Immunantwort nach Vakzinierung mit Tumorantigen-beladenen DCs nachgewiesen werden (Mayordomo et al., 1995). In der klinischen Erprobung erwies sich die



Vakzinierung mit beladenen DCs als sichere Antitumor-Therapie mit nachgewiesener Effektivität (Anguille et al., 2014).

Die erste FDA-zugelassene DC-Vakzinierung wurde in der Therapie des Prostata-Karzinoms angewendet und besteht aus isolierten autologen peripheren Blutmonozyten (PBMCs), welche durch Zugabe des Fusionsproteins aus dem Prostata-spezifischen Antigen (PSA) und dem Wachstumsfaktor GM-CSF zu tumorspezifischen DCs ausgereift wurden (Kantoff et al., 2010).

Gerade das günstige Nebenwirkungsprofil macht die DC-Vakzinierung zu einem attraktiven Kandidaten unter den Immuntherapien (Leonhartsberger et al., 2012). Daten aus klinischen Anwendungen zeigen bisher allerdings eine mangelnde lang anhaltende Wirksamkeit der DC Vakzinierung (Boudewijns et al., 2016).

Entscheidend für die Wirksamkeit der DC-Vakzinierung ist die korrekte *ex vivo* DC-Ausreifung durch Zugabe von Zytokinen wie GM-CSF und IL4 sowie deren Aktivierung durch TLR-Liganden wie Poly-I:C oder LPS (Schuler et al., 2003). Die Immunsuppression im Tumormikromilieu stellt eine Herausforderung für die langfristige Wirksamkeit der DC-Vakzinierung dar. Eine Verstärkung der Wirkung von DC-Vakzinierungen durch einen zusätzlichen adoptiven Transfer zytotoxischer T-Zellen konnte im Mausmodell (Lou et al., 2004) und in klinischen Untersuchungen gezeigt werden (Kandalajt et al., 2013; Poschke et al., 2014). Eine weitere Möglichkeit zur Verbesserung der therapeutischen Wirksamkeit von DC-basierten Immuntherapien ist die selektive Verwendung anti-Tumor aktiver DCs für die Vakzinierung. Eine anti-Tumor Effektivität konnte im Mausmodell spezifisch für konventionelle DCs vom Subtyp cDC1 gezeigt werden (Fujita et al., 2009; Okada et al., 2011; Wculek et al., 2019). Auch eine genetische Modifikation der DCs kann zu einer Verbesserung der Wirksamkeit der DC-Vakzinierung führen. So wurde in einem präklinischen Modell die Antitumor-Effektivität einer DC-basierten Therapie durch eine Verstärkung der DC-Migration mittels adenoviraler Transduktion des Chemokinrezeptors CCR7 verstärkt (Okada et al., 2005). Die Identifikation der Rolle der DCs in der Antitumor Immunität und die Identifikation zugrunde liegender mechanistischer Hintergründe sind entscheidend für die Entwicklung verbesserter DC-Vakzinierungen mit erhöhter Antitumor-Effektivität.

### 3.1.3 Dendritische Zellen in der Antitumor-Immunität

Dendritische Zellen spielen als Antigenpräsentierende-Zellen im Tumormikromilieu eine entscheidende Rolle für die Immunantwort gegen den Tumor (Broz et al., 2014).

Die Rolle einzelner DC-Subtypen für die Antitumor-Immunität wurde in den letzten Jahren näher beschrieben (Gardner and Ruffell, 2016; Helft et al., 2010; Veglia and Gabrilovich, 2017). Die Ausreifung der DCs erfolgt aus Vorläuferzellen des Knochenmarks (*common myeloid progenitors* - CMP). Gemäß ihren Vorstufen werden monozytäre DCs, welche aus Monozyten ausreifen, von den plasmazytoiden (pDCs) und konventionellen DCs (cDCs), welche aus der gemeinsamen DC-Vorläuferzelle (*common DC progenitors*, CDP) entstehen, unterschieden. cDCs sind wesentlich an der Antitumor-Immunantwort beteiligt (Gardner and Ruffell, 2016). Unreife cDCs sind im peripheren Gewebe, so u.a. auch im Tumorgewebe, lokalisiert, wo sie als „Wächter“ des Immunsystems pathogene Fremdantigene aufnehmen. Nach Kontakt zu Pathogenen kommt es zur Ausreifung dieser DCs, wobei es zu einer Hochregulation kostimulatorischer Moleküle wie MHCII, CD80 und CD86 und zu einer verstärkten Sekretion von Zytokinen wie IL2 und IL12 kommt. Daraufhin transportieren sie die Fremdantigene CCR7-abhängig zu den lymphatischen Organen. Dort werden die Antigene durch die DCs mit Hilfe von Kostimulatoren den T-Zellen präsentiert und diese somit antigenspezifisch aktiviert. Die cDCs werden wiederum in zwei Subtypen, konventionelle DC 1 (cDC1) und konventionelle DC 2 (cDC2) eingeteilt. cDC1, welche abhängig von den Transkriptionsfaktoren BATF3 und IRF8 aus ihren Vorstufen ausreifen, werden u.a. durch die Expression von CD8a und CD103 in Mäusen (Edelson et al., 2010) und von CD141 und XCR1 im Menschen (Zhang et al., 2021) charakterisiert. Vor allem in Mäusen sind DCs vom cDC1-Subtyp für die Kreuzpräsentation von Antigenen gegenüber zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen zuständig (Theisen et al., 2018). In murinen Melanom-Modellen konnte gezeigt werden, dass das Vorhandensein von cDC1 im Tumormikromilieu ein entscheidender Faktor für die Wirksamkeit von Immuntherapien mit ICIs oder adoptivem T-Zell Transfer ist (Salmon et al., 2016; Spranger et al., 2015). Auch in humanen Melanomen konnte eine Korrelation zwischen dem Anteil der cDC1 im Tumor und einer verbesserten Prognose gezeigt werden (Barry et al., 2018). Der cDC2 Subtyp, welcher abhängig von IRF4 ausreift und in der Maus durch die CD11b Expression charakterisiert wird, ist indirekt über eine Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen an der zytotoxischen Immunantwort beteiligt (Sittig et al., 2016).

Die Entschlüsselung der mechanistischen Hintergründe einer DC-vermittelten Antitumor-Immunität bietet neue therapeutische Ansatzpunkte zur Verstärkung einer spezifischen Immunantwort gegen den Tumor.

### 3.1.4 Arc/Arg3.1-abhängige DC-Migration

Die Funktion der einzelnen DC-Subtypen in der Antitumor-Immunantwort ist abhängig von einer effizienten DC-Migration (Worbs et al., 2017). Während einer spontanen natürlichen Immunantwort müssen Tumorantigene nach deren Aufnahme durch Migration der DCs zu den lymphatischen Organen transportiert werden (Seyfizadeh et al., 2016). Auch bei einer exogen induzierten Immunantwort durch DC-Vakzinierung können die injizierten DCs nur durch eine effiziente Migration vom Injektionsort zum Zielort der Antigenpräsentation und T-Zell Aktivierung in den Lymphknoten oder im Tumormikromilieu gelangen (Verdijk et al., 2009). Daher ist die Verbesserung der DC-Migration ein vielversprechender Ansatz, um die DC-abhängige Antitumor-Immunantwort zu verstärken.

Vorarbeiten in murinen Modellen der Autoimmunerkrankung Multiple Sklerose (Experimentelle Autoimmune Enzephalitis - EAE) und autoimmuner Dermatitis zeigten eine Abhängigkeit der DC-Migration von dem Zytoskelett-assoziierten Protein *Activity-regulated cytoskeleton-associated protein/activity-regulated gene 3.1 (Arc/Arg3.1)* (Ufer et al., 2016). Die Expression von Arc/Arg3.1 war hierbei exklusiv in migratorischen DCs zu finden und bestimmte die T-Zell abhängige Immunantwort sowie die inflammatorische Aktivität der Autoimmunerkrankung. Weitere Untersuchungen zeigten, dass Arc/Arg3.1-exprimierende DCs unter verschiedenen DC-Subtypen wie Langerhanszellen, cDC1 und cDC2 zu finden sind, wobei die Arc/Arg3.1-Expression in 10-40% der migratorischen DC-Population *in vivo* detektiert wurde. Somit kann Arc/Arg3.1 als ein funktioneller Marker für DC-Migration für alle DC-Subtypen verwendet werden (Tintelnot et al., 2019).

Basierend auf diesen Erkenntnissen wird in der vorliegenden Arbeit die Bedeutung der Arc/Arg3.1-abhängigen DC-Migration für die therapeutische Effektivität einer DC-Vakzinierung im murinen Melanom-Modell B16 untersucht.

### 3.1.5 B16 Melanome

Das B16 Melanom ist ein häufig für Immuntherapien in immunkompetenten C57BL/6 Mäusen verwendetes Tumormodell subkutaner Flankentumore (Overwijk and Restifo, 2000). In der vorliegenden Arbeit wird eine Kombinationstherapie aus gp100-spezifischem adoptivem T-Zell Transfer und DC-Vakzinierung zur Behandlung der B16 Melanome eingesetzt.

Wie bei den meisten Melanomen wird auch in den B16 Melanom-Zellen das Tumorantigen gp100 (pmel) exprimiert. Die Verwendung einer veränderten, immunogenen gp100-Peptidsequenz (hgp100<sub>25-33</sub>, KVPRNQDWL) zur Immunisierung führte zur Induktion einer antigenspezifischen T-Zell Reaktion und ermöglichte die Isolation eines pmel-spezifischen T-Zell Klons (Kawakami et al., 1994; Overwijk et al., 1998), was der Identifikation eines pmel-spezifischen T-Zell Rezeptors diente. Basierend auf der Gensequenz des T-Zell Rezeptors konnten pmel TCR-transgene Mäuse als Spender für gp100-spezifische T-Zellen generiert werden. Der adoptive Transfer dieser gp100-spezifischen T-Zellen wurde schließlich in B16 Melanomen getestet, wobei das Tumorstadium durch eine Kombination der T-Zellen mit einer gp100-Peptidvakzinierung und der Zugabe von IL-2 verhindert werden konnte (Overwijk et al., 2003). Diese Versuche bieten die Grundlage für die in dieser Arbeit verwendete Kombinationstherapie aus adoptivem T-Zell Transfer von gp100-spezifischen T-Zellen und einer Vakzinierung mit gp100-beladenen DCs.

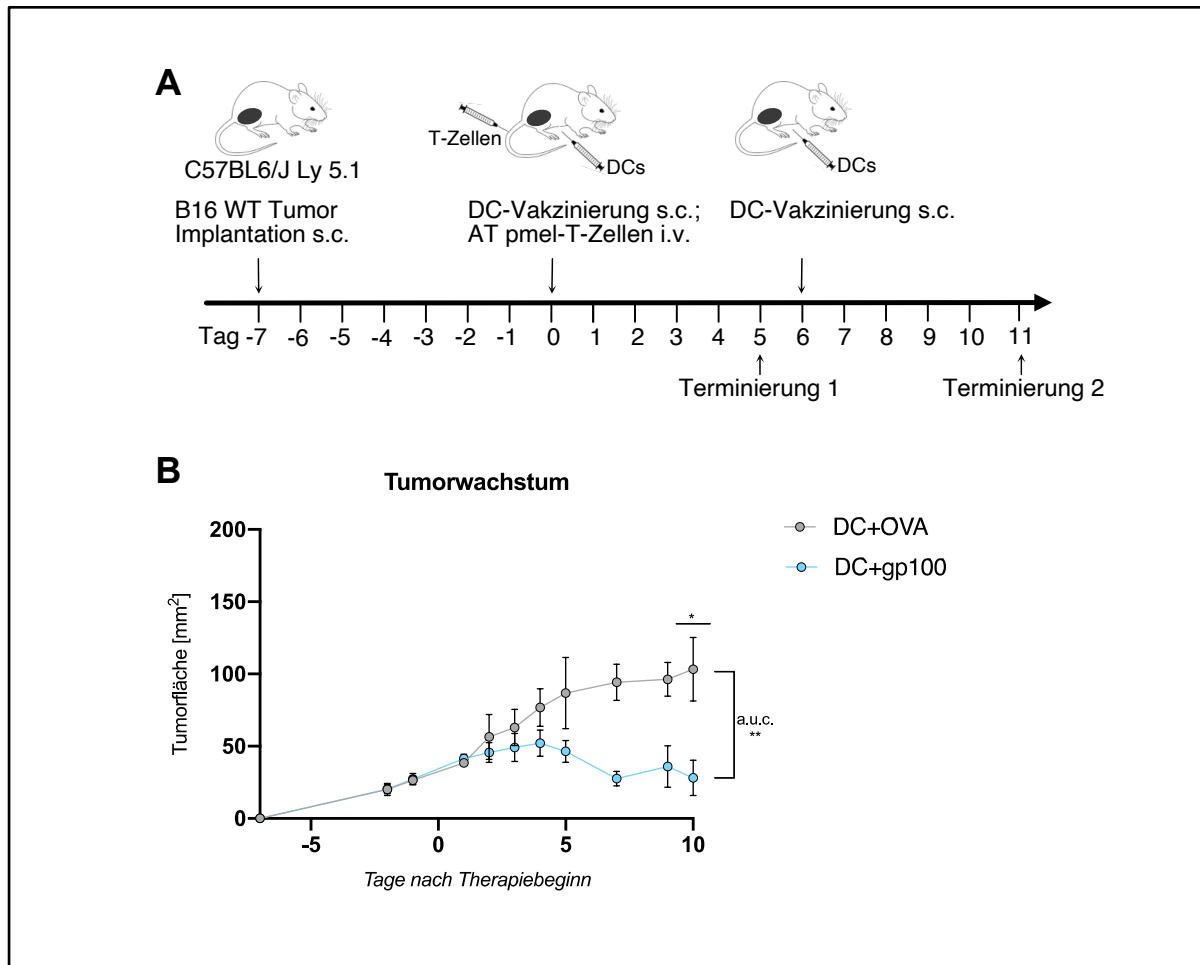
## 3.2 Ergebnisse

### 3.2.1 Antigen-spezifische DC-Vakzinierung im B16 Melanom-Modell

#### 3.2.1.1 Einfluss der dendritischen Zellen im Tumormikromilieu auf die therapeutische Effektivität der DC-Vakzinierung

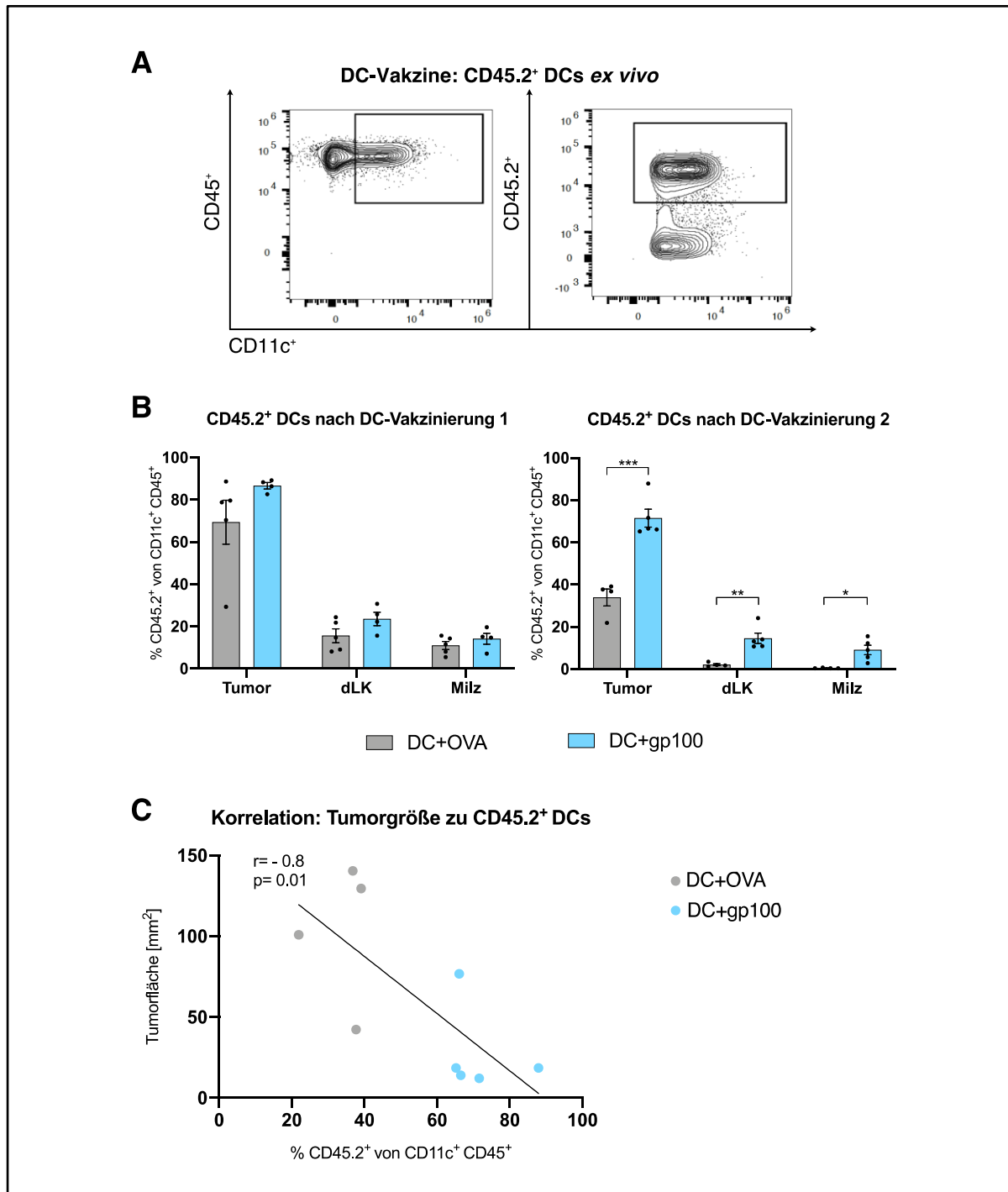
Zur Untersuchung einer antigen-spezifischen DC-Vakzinierung wurden C57BL/6J Ly5.1 Mäuse nach subkutaner Implantation von B16 Melanomen in der rechten Flanke mit einer Kombinationstherapie aus zweimaliger DC-Vakzinierung mit hgp100<sub>25-33</sub> (gp100) - beladenen dendritischen Zellen und einem adoptivem Transfer von gp100-spezifischen pmel-1 T-Zellen behandelt (Abb.2A). Die Kontrollgruppe erhielt DC-Vakzinierungen mit dem Kontrollpeptid OVA<sub>257-264</sub> (OVA), welches im Gegensatz zu gp100 nicht von B16 Melanom-Zellen exprimiert wird.

Zur Beurteilung der therapeutischen Effektivität der antigen-spezifischen DC-Vakzinierung wurde die Fläche der B16 Flankentumore bis zu zehn Tage nach Therapiebeginn gemessen. Während das Tumorstadium mit der unspezifischen DC-Vakzinierung (DC+OVA) nicht kontrolliert wurde, kam es nach antigen-spezifischer DC-Vakzinierung (DC+gp100) zu einer deutlichen Verlangsamung des Tumorstadiums und einem therapeutischen Ansprechen mit Verkleinerung der Tumore (Abb. 2B).



**Abbildung 2. Therapeutische Effektivität einer Tumorantigen-spezifischen DC-Vakzinierung.** (A) Therapieschema zur Behandlung von B16 Melanom tragenden Mäusen mit einer Kombinationstherapie aus subkutaner DC-Vakzinierung (DC-Vakzinierung s.c.) und intravenösem adoptivem Transfer von gp100-spezifischen pmel-1 T-Zellen (AT pmel-T-Zellen i.v.). Am 7. Tag nach subkutaner Tumorumplantation (B16 WT Tumor Implantation s.c.) erfolgte die erste DC-Vakzinierung sowie der adoptive Transfer der pmel-1 T-Zellen. Am 13. Tag nach Tumorumplantation erfolgte eine zweite DC-Vakzinierung. Die DC-Vakzinierung war gefolgt von den Gaben von 50.000IU-IL2 2x/Tag an drei aufeinanderfolgenden Tagen. Jeweils fünf Tage nach der ersten oder zweiten Vakzinierung erfolgte die Terminierung der Versuchstiere für weitere Analysen der Immunzellen. (B) Tumorstadien, gemessen als Tumoriäche, im Verlauf über zehn Tage nach Therapiebeginn (n=7). DC+OVA: DC-Vakzinierung mit OVA-beladenen DCs und adoptiver T-Zell-Transfer, DC+gp100: DC-Vakzinierung mit gp100-beladenen DCs und adoptiver T-Zell-Transfer. a.u.c.: area under the curve. Alle Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler ( $\pm$  SEM) dargestellt.

Die Immunzellpopulationen im Tumor und in den sekundären lymphatischen Organen wurden mittels Durchflusszytometrie fünf Tage nach der ersten Vakzinierung sowie fünf Tage nach der zweiten Vakzinierung *ex vivo* untersucht. Die injizierten DCs wurden anhand ihrer CD45.2 Expression von den endogenen CD45.1<sup>+</sup> Immunzellen unterschieden (Abb. 3A). Während nach einer einzelnen Vakzinierung die Peptidbeladung keinen signifikanten Einfluss auf die Menge der CD45.2<sup>+</sup> DCs im Tumor und in den lymphatischen Organen hatte, zeigten sich sowohl im Tumor als auch in den Tumor-drainierenden Lymphknoten und in der Milz nach einer zweiten Vakzinierung eine signifikant höhere DC Infiltration nach gp100-spezifischer DC-Vakzinierung als nach Kontrollvakzinierung mit OVA-beladenen DCs (Abb.3B). Ein erhöhter Anteil an injizierten, CD45.2<sup>+</sup> dendritischen Zellen korrelierte hierbei signifikant mit kleineren Tumorgrößen (Abb. 3C). Somit ergeben sich Hinweise für eine entscheidende Rolle der dendritischen Zellen im Tumor für die Induktion einer effektiven Immunantwort gegen den Tumor.

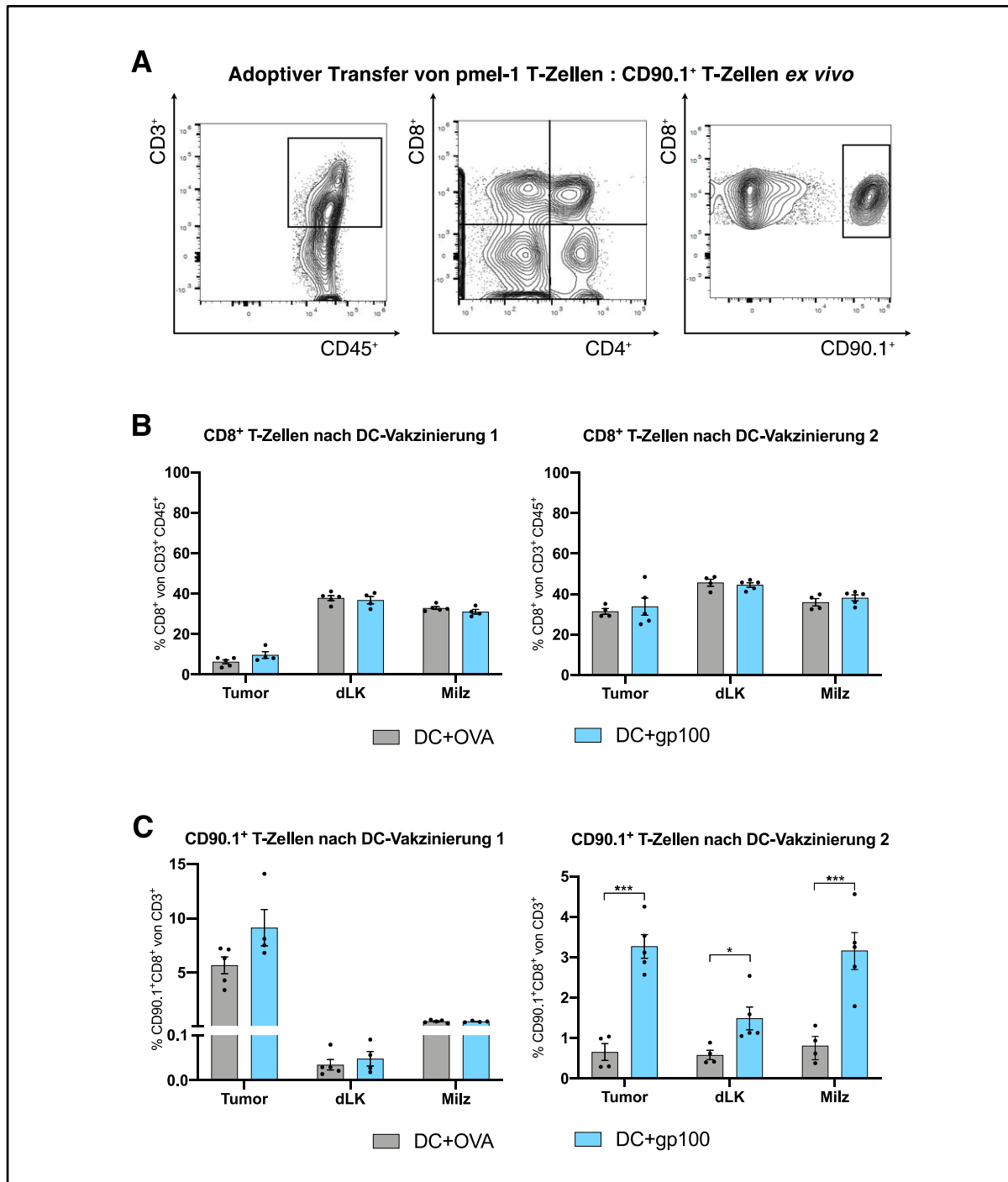


**Abbildung 3. Dendritische Zellen im Tumor und in den sekundären lymphatischen Organen nach Tumorantigen-spezifischer DC-Vakzinierung.** (A) Durchflusszytometrische Detektion der injizierten CD45.2<sup>+</sup> DCs unter allen CD11c<sup>+</sup> DCs. (B) Anteil an CD45.2<sup>+</sup> DCs an allen CD11c<sup>+</sup> DCs im Tumor, in den Tumor-drainierenden Lymphknoten (dLK) und in der Milz jeweils fünf Tage nach der ersten und zweiten DC-Vakzinierung (n=4-5). (C) Korrelationsanalyse der finalen Tumorgröße zum Anteil der CD45.2<sup>+</sup> DCs im Tumor (n=9). DC+OVA: DC-Vakzinierung mit OVA-beladenen DCs und adoptiver T-Zell-Transfer, DC+gp100: DC-Vakzinierung mit gp100-beladenen DCs und adoptiver T-Zell-Transfer. Alle Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler ( $\pm$  SEM) dargestellt.



### 3.2.1.2 Einfluss der dendritischen Zellen im Tumormikromilieu auf die T-Zell Rekrutierung

Im Anschluss wurde der Einfluss der Tumorantigen-spezifischen DC-Vakzinierung auf die T-Zell Immunität im Tumor untersucht. Die antigenspezifische DC-Vakzinierung führte im Vergleich zur Kontrollvakzinierung zu keiner Erhöhung der CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen im Tumor und in den sekundären lymphatischen Organen (Abb. 4A, B). Adoptiv transferierte gp100-spezifische pmel-1 T-Zellen wurden anhand ihrer Expression von CD90.1 detektiert (Abb. 4A). Die zweite Vakzinierung mit gp100-beladenen DCs führte im Vergleich zur Vakzinierung mit OVA-beladenen DCs zu einer signifikant höheren Infiltration von CD90.1<sup>+</sup> T-Zellen im Tumor und in den lymphatischen Organen (Abb. 4C). Dies spricht für die Notwendigkeit einer zweiten Vakzinierung mit Tumorantigen-beladenen DCs zur Verstärkung der tumorspezifischen T-Zell Immunität.



**Abbildung 4. T-Zell Infiltration nach Tumorantigen spezifischer DC-Vakzinierung.** Durchflusszytometrische Analyse der T-Zellen im Tumor, in den Tumor-drainierenden Lymphknoten (dLK) und in der Milz jeweils fünf Tage nach erster und nach zweiter DC-Vakzinierung (n=4-5). (A) Durchflusszytometrische Detektion von CD8<sup>+</sup> und CD90.1<sup>+</sup> T-Zellen. (B) Anteil zytotoxischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen an allen CD3<sup>+</sup> T-Zellen. (C) Anteil CD90.1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen an allen CD3<sup>+</sup> T-Zellen. DC+OVA: DC-Vakzinierung mit OVA-beladenen DCs und adoptiver T-Zell-Transfer, DC+gp100: DC-Vakzinierung mit gp100-beladenen DCs und adoptiver T-Zell-Transfer. Alle Daten sind als Mittelwert ± Standardfehler (± SEM) dargestellt.

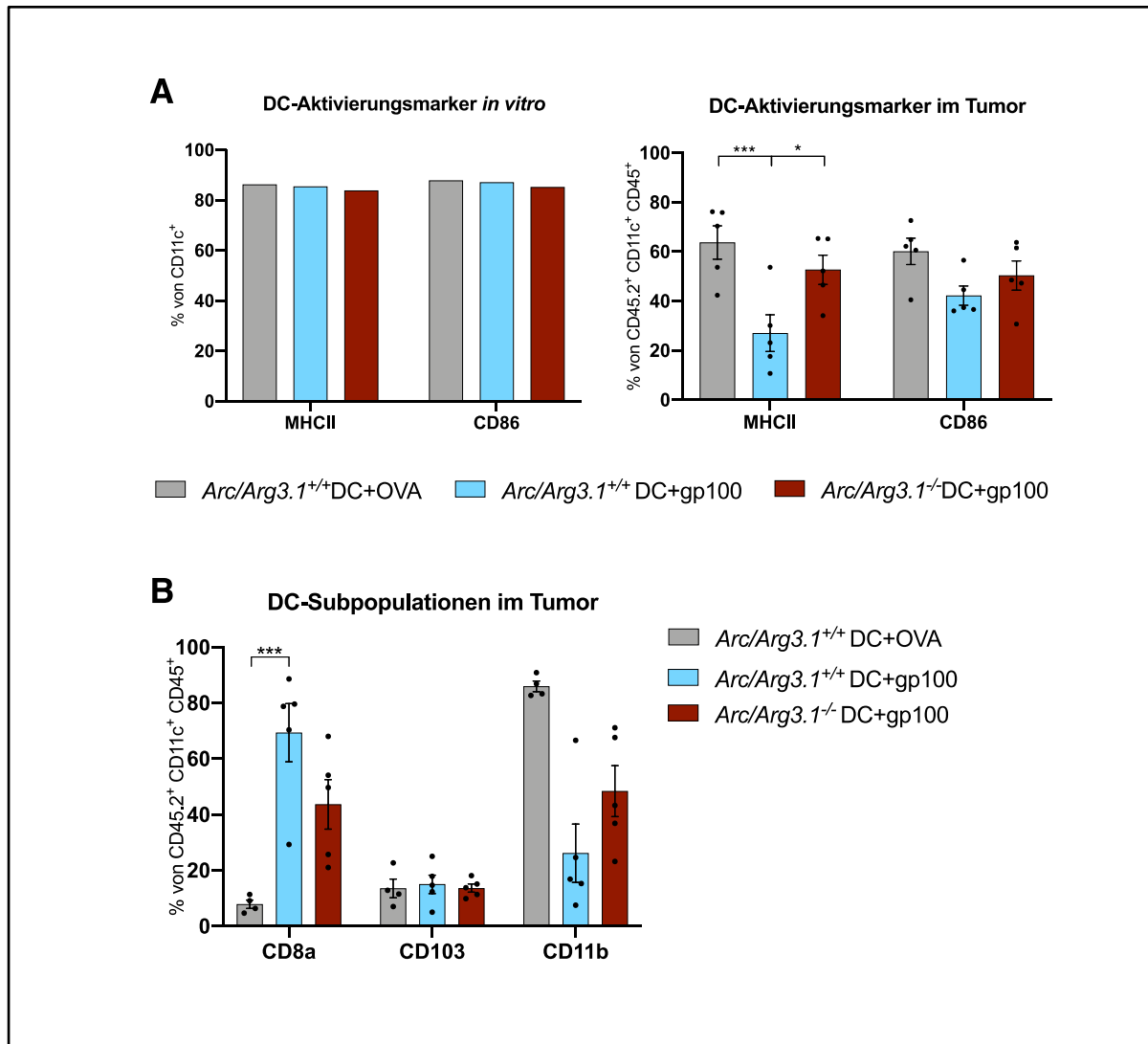
### 3.2.2 Die Rolle von Arc/Arg3.1 für die antigenspezifische DC-Vakzinierung

#### 3.2.2.1 Einfluss der Arc/Arg3.1-Expression auf den Phänotyp der dendritischen Zellen im Tumormikromilieu

Nachdem in der Arbeit von Ufer et al. eine entscheidende Rolle der Arc/Arg3.1-Expression in dendritischen Zellen für die DC-Migration in murinen Modellen autoimmuner Inflammation gezeigt wurde (Ufer et al., 2016), soll in dieser Arbeit analog dazu der Effekt von Arc/Arg3.1 auf die DC-Migration und die resultierende Immunantwort nach einer antigenspezifischen DC-Vakzinierung gegen den Tumor näher untersucht werden.

Zur Ermittlung der Rolle der Arc/Arg3.1-Expression wurde die Vakzinierung mit Arc/Arg3.1-defizienten DCs, welche aus Arc/Arg3.1<sup>-/-</sup>-Mäusen (Plath et al., 2006) isoliert wurden, mit einer DC-Vakzinierung mit Arc/Arg3.1-exprimierenden DCs aus Wildtyp (WT, Arc/Arg3.1<sup>+/+</sup>) Tieren verglichen. Die Kombinationstherapie aus DC-Vakzinierungen und adoptivem T-Zell Transfer wurde wie bereits beschrieben durchgeführt (Abb. 2A).

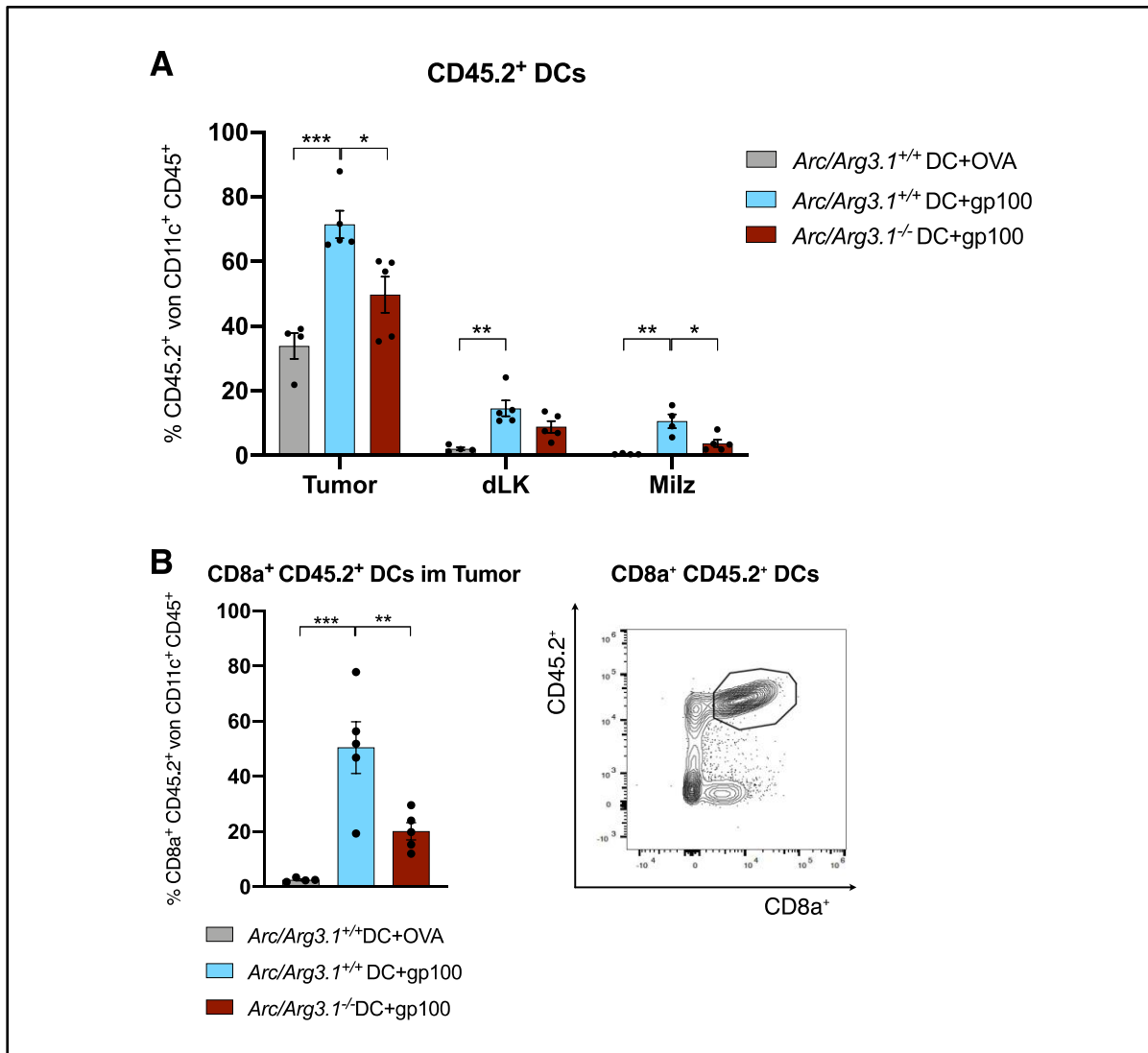
Zunächst wurde der Einfluss der Arc/Arg3.1-Expression auf Veränderungen des Phänotyps der migrierenden DCs nach DC-Vakzinierung untersucht. *In vitro* zeigten sich keine Unterschiede zwischen Arc/Arg3.1<sup>-/-</sup>- und WT-DCs in der Expression der DC-Aktivierungsmarker MHCII und CD86 (Abb. 5A) (Tintelnot et al., 2019; Ufer et al., 2016). Nach Vakzinierung zeigten sich im Tumor Expressionsveränderungen der DC-Aktivierungsmarker. Gp100-beladene Arc/Arg3.1-exprimierende DCs hatten nach Injektion im Tumor eine signifikant erniedrigte Expression von MHCII im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 5A). Zusätzlich führte die Tumorantigen-spezifische Vakzinierung mit Arc/Arg3.1-exprimierenden DCs im Vergleich zu den Kontrollgruppen zu einem erhöhten Anteil an CD8a<sup>+</sup> und CD103<sup>+</sup> DCs sowie zu einem erniedrigten Anteil an CD11b<sup>+</sup> DCs im Tumor (Abb. 5B). Damit ergeben sich Hinweise für eine Dominanz einer cDC1-Subpopulation im Tumor nach einer Tumorantigen-spezifischen DC-Vakzinierung.



**Abbildung 5. Einfluss der Arc/Arg3.1-Expression in DCs auf deren Phänotyp *in vitro* und *ex vivo* nach DC-Vakzinierung.** (A) Expression der DC-Aktivierungsmarker MHCII und CD86 auf *in vitro* generierten DCs (BMDCs) vor Vakzinierung und auf injizierten CD45.2<sup>+</sup> DCs im Tumor nach Vakzinierung (n=4-5). (B) Anteil an CD8a<sup>+</sup>, CD103<sup>+</sup> und CD11b<sup>+</sup> DCs unter allen injizierten CD45.2<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> DCs im Tumor (n=4-5). *Arc/Arg3.1*<sup>+/+</sup>DC + OVA: DC-Vakzinierung mit OVA-beladenen *Arc/Arg3.1*<sup>+/+</sup>-DCs und adoptiver T-Zell-Transfer, *Arc/Arg3.1*<sup>+/+</sup>DC + gp100: DC-Vakzinierung mit gp100-beladenen *Arc/Arg3.1*<sup>+/+</sup>-DCs und adoptiver T-Zell-Transfer, *Arc/Arg3.1*<sup>-/-</sup>DC + gp100: DC-Vakzinierung mit gp100-beladenen *Arc/Arg3.1*<sup>-/-</sup>-DCs und adoptiver T-Zell-Transfer. Alle Daten sind als Mittelwert ± Standardfehler (± SEM) dargestellt.

### 3.2.2.2 Einfluss der Arc/Arg3.1-Expression auf die Migration der dendritischen Zellen nach Vakzinierung

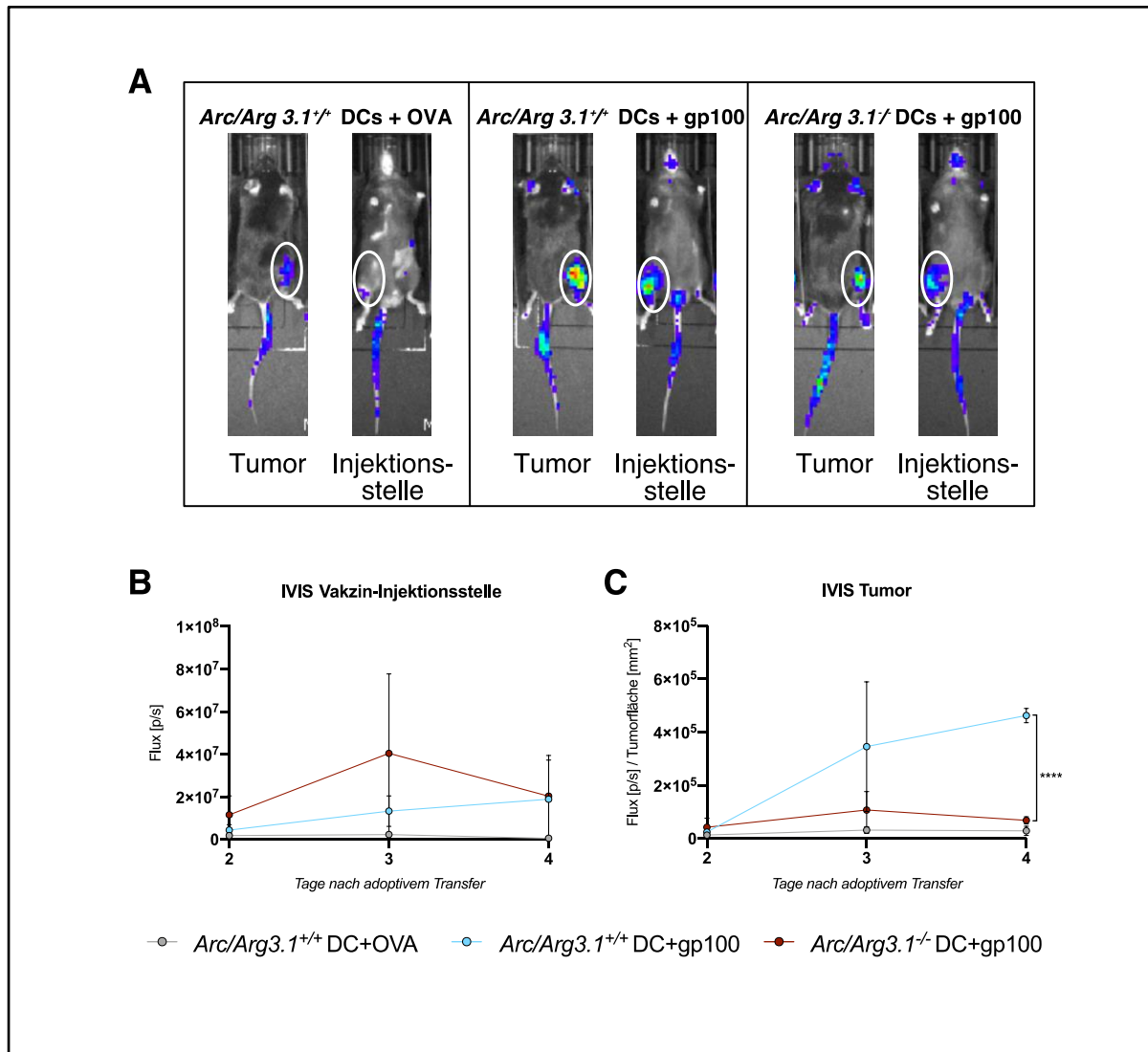
Anschließend wurde der Einfluss der Arc/Arg3.1-Expression in injizierten DCs auf das Migrationsverhalten der DCs zum Tumor und zu den lymphatischen Organen untersucht. Sowohl im Tumor als auch in den lymphatischen Organen wurden nach DC-Vakzinierung mit Arc/Arg3.1<sup>-/-</sup>-DCs weniger injizierte CD45.2<sup>+</sup> DCs detektiert als nach Vakzinierung mit WT- DCs (Abb. 6A). Dies deutet auf eine Arc/Arg3.1-abhängige Migration der DCs zum Tumor. Die Vakzinierung mit Tumorantigen-beladenen WT-DCs führte hierbei im Vergleich zur unspezifischen DC-Vakzinierung sowie auch im Vergleich zur Vakzinierung mit Arc/Arg3.1<sup>-/-</sup>-DCs zu einem erhöhten Anteil an CD8a<sup>+</sup> DCs unter allen injizierten CD45.2<sup>+</sup> DCs im Tumor (Abb. 6B).



**Abbildung 6. Einfluss der Arc/Arg3.1-Expression auf die DC-Migration nach DC-Vakzinierung.** Durchflusszytometrische Analysen der DCs im Tumor, in den Tumordrainierenden Lymphknoten (dLK) und in der Milz elf Tage nach Therapiebeginn (n=4-5). (A) Anteil der injizierten CD45.2<sup>+</sup> DCs an allen CD11c<sup>+</sup> DCs. (B) Anteil der CD8a<sup>+</sup>CD45.2<sup>+</sup> DCs an allen CD11c<sup>+</sup> DCs im Tumor (n=4-5). *Arc/Arg3.1*<sup>+/+</sup>DC + OVA: DC-Vakzinierung mit OVA-beladenen *Arc/Arg3.1*<sup>+/+</sup>-DCs und adoptiver T-Zell-Transfer, *Arc/Arg3.1*<sup>+/+</sup>DC + gp100: DC-Vakzinierung mit gp100-beladenen *Arc/Arg3.1*<sup>+/+</sup>-DCs und adoptiver T-Zell-Transfer, *Arc/Arg3.1*<sup>-/-</sup>DC + gp100: DC-Vakzinierung mit gp100-beladenen *Arc/Arg3.1*<sup>-/-</sup>-DCs und adoptiver T-Zell-Transfer. Alle Daten sind als Mittelwert ± Standardfehler (± SEM) dargestellt.

### 3.2.2.3 Einfluss der Arc/Arg3.1-Expression auf die T-Zell Rekrutierung nach DC-Vakzinierung

Gp100-spezifische Luciferase-exprimierende CD8<sup>+</sup> T-Zellen (*pmel luc mcherry*) wurden adoptiv transferiert und anschließend *in vivo* mittels Biolumineszenz-Messungen beobachtet. Gp100-spezifische T-Zellen wurden vorwiegend im Tumor und an der DC-Vakzin-Injektionsstelle detektiert (Abb. 7A). Eine Rekrutierung der gp100-spezifischen T-Zellen zur Injektionsstelle konnte nur nach Vakzinierung mit gp100-beladenen DCs beobachtet werden (Abb. 7B). Vier Tage nach adoptivem Transfer wurden im Tumor signifikant mehr antigenspezifische T-Zellen nach Vakzinierung mit WT-DCs als nach Vakzinierung mit Arc/Arg3.1<sup>-/-</sup>-DCs detektiert (Abb. 7C), was auf eine Arc/Arg3.1-abhängige T-Zell Rekrutierung zum Tumormikromilieu hindeutet.



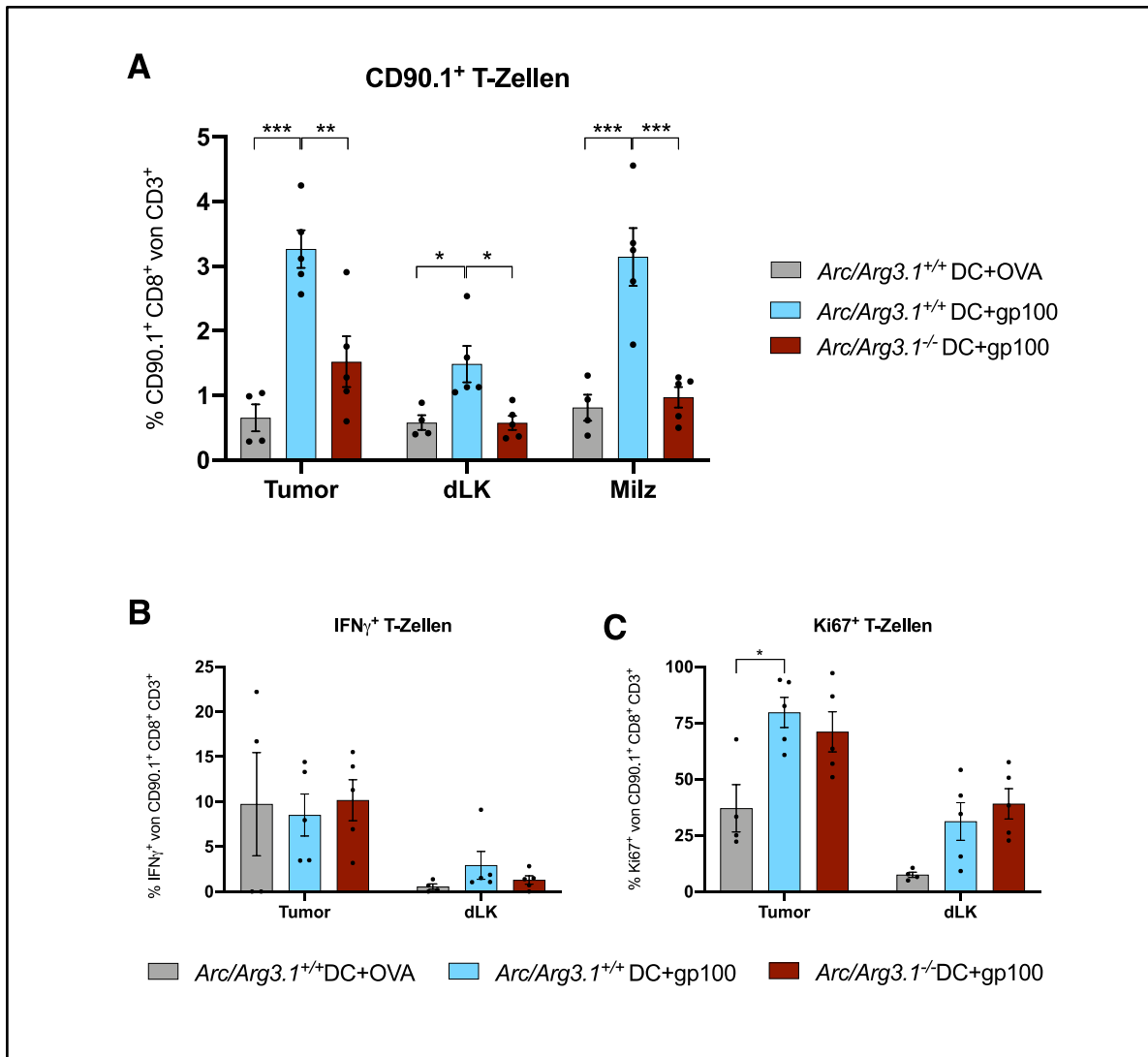
**Abbildung 7. T-Zell Rekrutierung nach DC-Vakzinierung mit Arc/Arg3.1-exprimierenden DCs.** *In vivo* Biolumineszenzmessung (IVIS) von adoptiv transferierten Luciferase-exprimierenden pmel T-Zellen (pmel luc mcherry) nach DC-Vakzinierung über vier Tage nach Therapiebeginn (n=3). (A) Repräsentative Bilder des Lumineszenz-Signals im Tumor an der rechten Flanke und an der DC-Vakzin-Injektionsstelle an der Innenseite des rechten Oberschenkels am Tag 4 nach adoptivem Transfer. (B-C) Quantifizierung des Lumineszenz-Signals in Photonen/Sekunde an der DC-Vakzin-Injektionsstelle (B) und im Tumor normalisiert zur Tumorgröße (C). *Arc/Arg3.1<sup>+/+</sup>*DC + OVA: DC-Vakzinierung mit OVA-beladenen *Arc/Arg3.1<sup>+/+</sup>*-DCs und adoptiver T-Zell-Transfer, *Arc/Arg3.1<sup>+/+</sup>*DC + gp100: DC-Vakzinierung mit gp100-beladenen *Arc/Arg3.1<sup>+/+</sup>*-DCs und adoptiver T-Zell-Transfer, *Arc/Arg3.1<sup>-/-</sup>*DC + gp100: DC-Vakzinierung mit gp100-beladenen *Arc/Arg3.1<sup>-/-</sup>*-DCs und adoptiver T-Zell-Transfer. Alle Daten sind als Mittelwert ± Standardfehler (± SEM) dargestellt.



#### 3.2.2.4 Einfluss der Arc/Arg3.1-Expression auf die T-Zell Aktivität und Proliferation im Tumormikromilieu nach DC-Vakzinierung

Durchflusszytometrische Analysen der adoptiv transferierten T-Zellen zeigten ebenfalls eine höhere Infiltration der antigenspezifischen T-Zellen im Tumor und zusätzlich auch in den sekundären lymphatischen Organen nach DC-Vakzinierung mit WT-DCs als nach Vakzinierung mit Arc/Arg3.1<sup>-/-</sup>-DCs (Abb. 8A).

Messungen der IFN  $\gamma$  Sekretion zeigten einen aktiven Phänotyp der antigenspezifischen T-Zellen im Tumor, allerdings keine Unterschiede in der T-Zell Aktivierung zwischen den Behandlungsgruppen (Abb. 8B). Nach gp100-spezifischer DC-Vakzinierung zeigte sich im Tumor eine signifikant gesteigerte Proliferation der antigenspezifischen T-Zellen als nach unspezifischer DC-Vakzinierung (Abb. 8C), was auf die Induktion einer antigenspezifischen T-Zell Antwort durch eine antigenspezifische DC-Vakzinierung hindeutet.

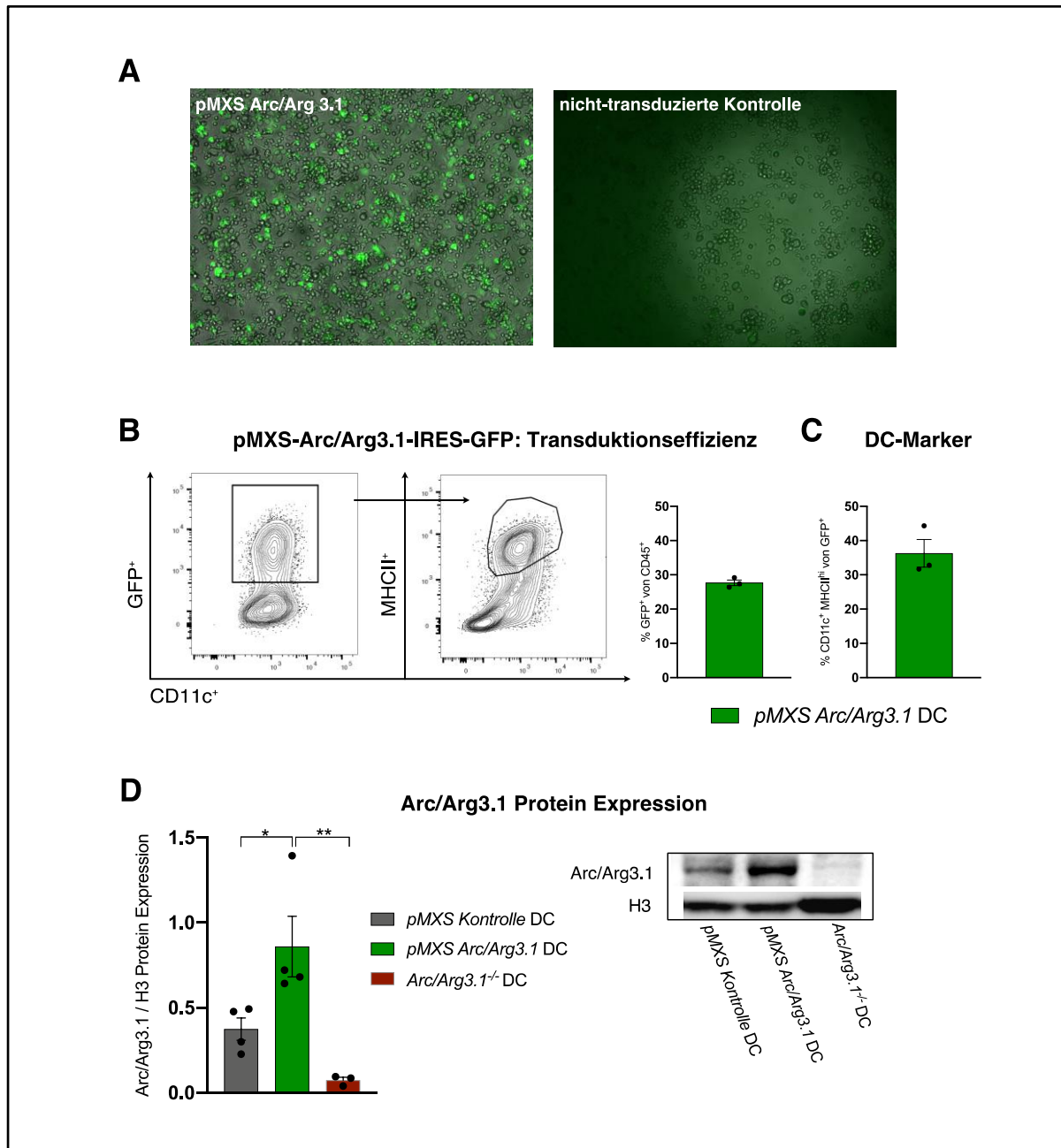


**Abbildung 8. Einfluss der Arc/Arg3.1-Expression auf injizierten DCs für den T-Zell Phänotyp im Tumormikromilieu.** Durchflusszytometrische Analysen von adoptiv transferierten, antigenspezifischen CD90.1<sup>+</sup> T-Zellen im Tumor, in den Tumor-drainierenden Lymphknoten (dLk) und in der Milz elf Tage nach Therapiebeginn (n=4-5). (A) Anteil der CD90.1<sup>+</sup> T-Zellen an allen CD3<sup>+</sup> T-Zellen. (B-C) Anteil der aktivierten IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen (B) und der proliferativen Ki67<sup>+</sup> T-Zellen (C) an allen antigenspezifischen CD90.1<sup>+</sup> T-Zellen. *Arc/Arg3.1*<sup>+/+</sup>DC + OVA: DC-Vakzinierung mit OVA-beladenen *Arc/Arg3.1*<sup>+/+</sup>-DCs und adoptiver T-Zell-Transfer, *Arc/Arg3.1*<sup>+/+</sup>DC + gp100: DC-Vakzinierung mit gp100-beladenen *Arc/Arg3.1*<sup>+/+</sup>-DCs und adoptiver T-Zell-Transfer, *Arc/Arg3.1*<sup>-/-</sup>DC + gp100: DC-Vakzinierung mit gp100-beladenen *Arc/Arg3.1*<sup>-/-</sup>-DCs und adoptiver T-Zell-Transfer. Alle Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler ( $\pm$  SEM) dargestellt.

### 3.2.3 Vakzinierung mit Arc/Arg3.1-überexprimierenden dendritischen Zellen

#### 3.2.3.1 Retrovirale Transduktion zur Generierung von Arc/Arg3.1-überexprimierenden dendritischen Zellen

Basierend auf der verstärkten DC-Migration und T-Zell Immunität im Tumor nach Vakzinierung mit Arc/Arg3.1-exprimierenden DCs soll darauffolgend untersucht werden, ob dieser Effekt durch eine Verstärkung der Arc/Arg3.1-Expression induziert und damit therapeutisch genutzt werden kann. Hierfür wurden über eine retrovirale Transduktion Arc/Arg3.1-überexprimierende DCs generiert (Abb. 9A). Nach Transduktion mit dem retroviralen Vektor pMXS-Arc/Arg3.1-IRES-GFP wurde mittels Durchflusszytometrie eine Transduktionseffizienz von 30% GFP<sup>+</sup> DCs ermittelt (Abb. 9B). Der Nachweis der DC-Marker CD11c und MHCII auf den transduzierten Zellen bestätigte deren DC-Phänotyp (Abb. 9C). Auf Proteinebene konnte die Überexpression von Arc/Arg3.1 in transduzierten pMXS-Arc/Arg3.1-DCs bestätigt werden (Abb. 9D).



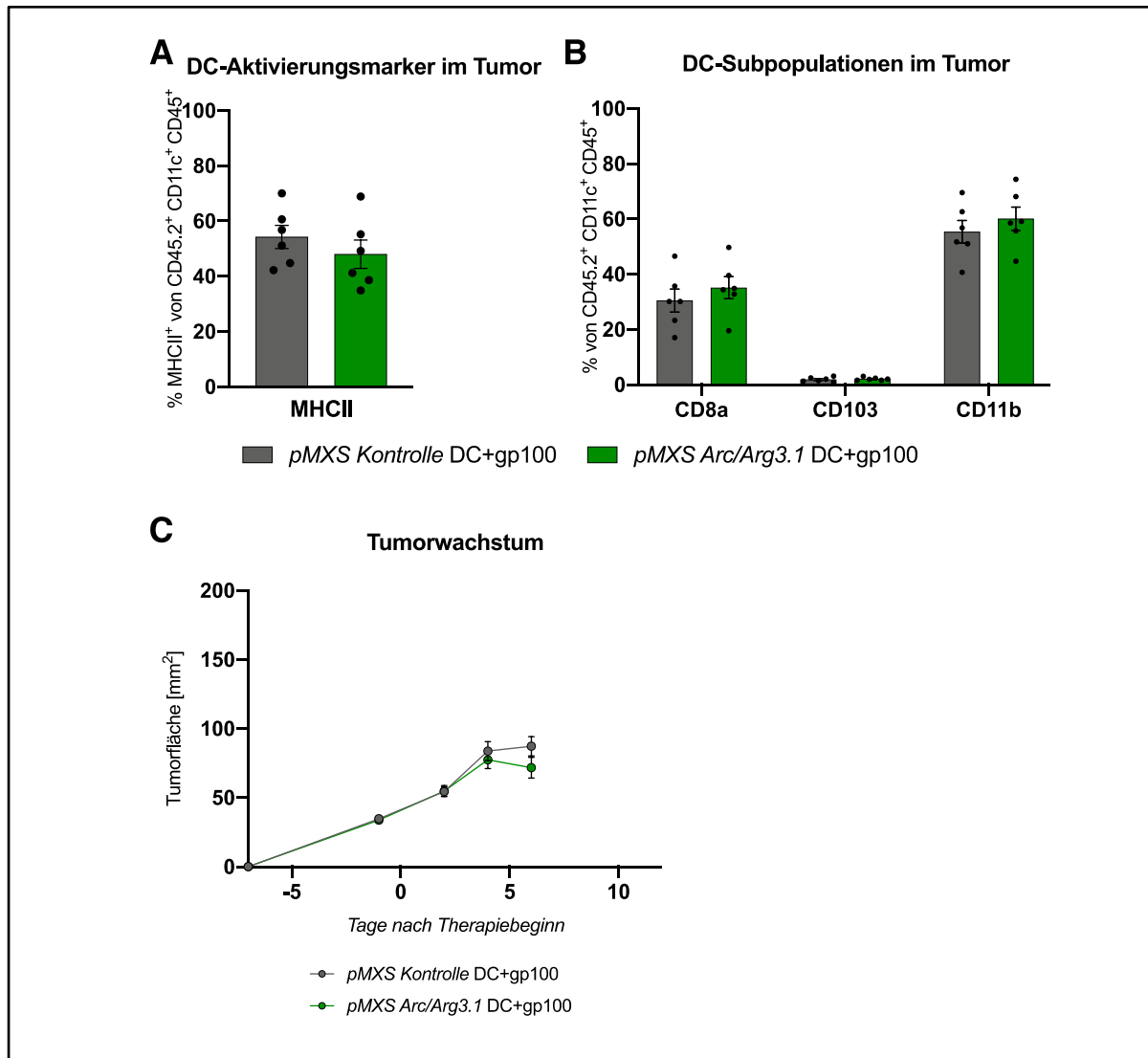
**Abbildung 9. Retrovirale Transduktion zur Generierung von Arc/Arg3.1-überexprimierenden DCs mit dem retroviralen Vektor pMXS-Arc/Arg3.1-IRES-GFP.** (A) Fluoreszenzmikroskopie der positiv transduzierten GFP<sup>+</sup> DCs. Als Kontrolle sind nicht-transduzierte DCs dargestellt. (B-C) Durchflusszytometrische Analyse der transduzierten DCs auf GFP<sup>+</sup> Zellen zur Beurteilung der Transduktionseffizienz (B) und auf die DC Marker CD11c und MHCII zur Bestimmung des DC-Phänotyps (C). (D) Immunoblot auf Arc/Arg3.1 zur Ermittlung der Arc/Arg3.1-Überexpression in pMXS-Arc/Arg3.1-transduzierten DCs. Als Kontrolle dienen pMXS-Kontrollvektor (pMXS-GFP-IRES-GFP)-transduzierte DCs und nicht-transduzierte Arc/Arg3.1<sup>-/-</sup>-DCs. Die Normalisierung erfolgte zur Expression von H3 (Housekeeping Gen) (n=3-4). *pMXS Kontrolle DC*: pMXS-GFP-IRES-GFP-(pMXS Kontrollvektor)-transduzierte DCs, *pMXS Arc/Arg3.1 DC*: pMXS-Arc/Arg3.1-IRES-GFP-(pMXS Arc/Arg3.1)-transduzierte DCs, *Arc/Arg3.1<sup>-/-</sup>DC*: untransduzierte Arc/Arg3.1<sup>-/-</sup>-DCs. Alle Daten sind als Mittelwert ± Standardfehler (± SEM) dargestellt.

### 3.2.3.2 Therapeutische Effektivität der DC-Vakzinierung mit Arc/Arg3.1-überexprimierenden dendritischen Zellen

Zur Ermittlung der therapeutischen Effektivität einer Arc/Arg3.1-Überexpression in DCs führten wir die Kombinationstherapie aus DC-Vakzinierung und adoptivem T-Zell Transfer mit pMXS-Arc/Arg3.1-DCs durch. Die Kontrollgruppe wurde mit pMXS-Kontrollvektor (*pMXS-GFP-IRES-GFP*, *pMXS-Kontrolle*) - transduzierten DCs vakziniert.

Messungen der Oberflächenexpression von MHCII, CD8a, CD103 und CD11b auf Tumor-infiltrierenden DCs zeigten keine phänotypischen Unterschiede zwischen pMXS-Arc/Arg3.1- und pMXS-Kontrollvektor-transduzierten DCs im Tumor (Abb. 10A, B).

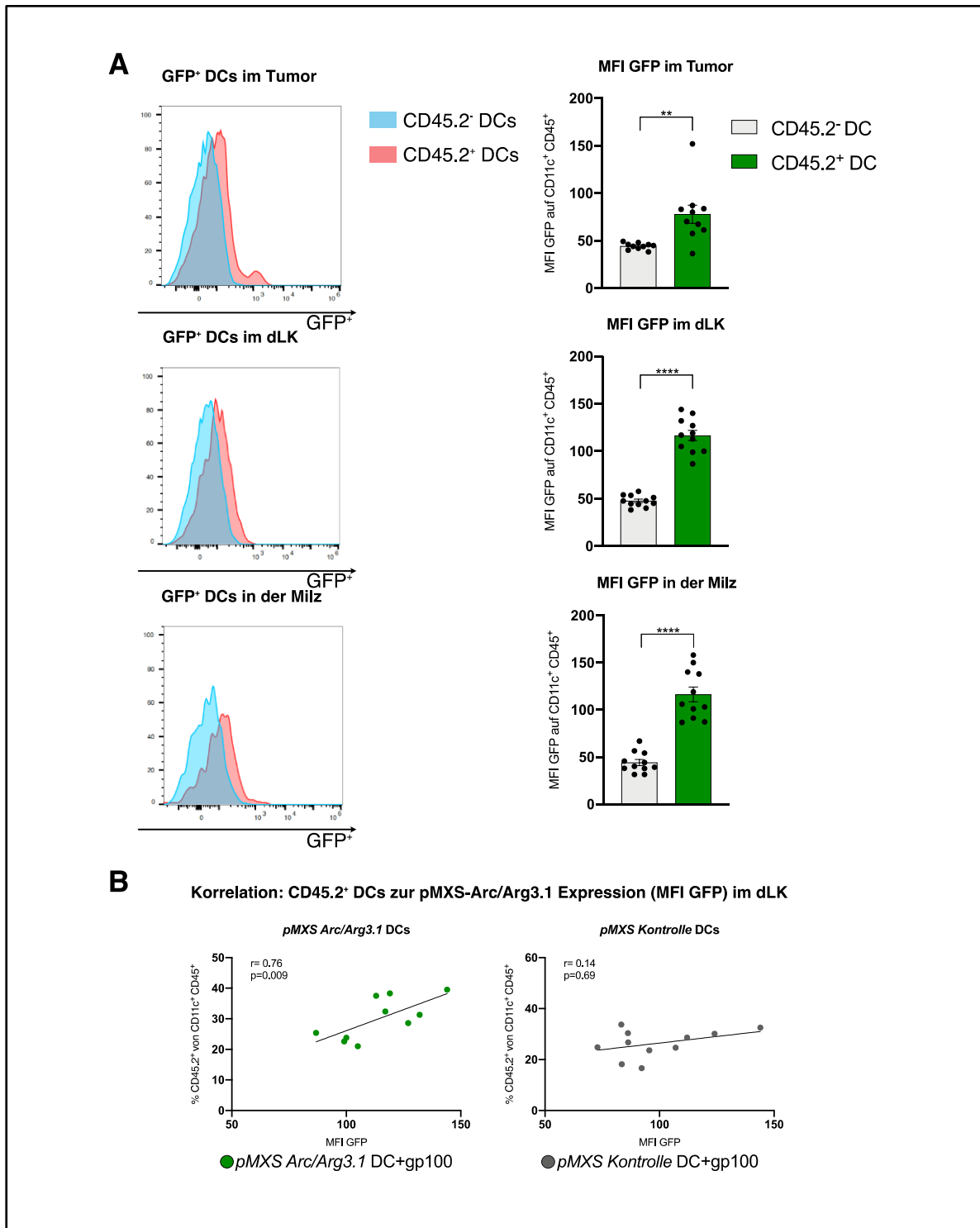
Der Vergleich der Tumorgrößen zwischen beiden Behandlungsgruppen zeigte allerdings keinen therapeutischen Vorteil der DC-Vakzinierung mit pMXS-Arc/Arg3.1-DCs gegenüber der Kontrollvakzinierung (Abb. 10C).



**Abbildung 10. Einfluss der Arc/Arg3.1-Überexpression auf die Antitumor-Effektivität der DC-Vakzinierung.** (A) Expression des DC-Aktivierungsmarkers MHCII auf transduzierten und injizierten CD45.2<sup>+</sup> DCs im Tumor nach DC-Vakzinierung (n=5-6). (B) Anteile der CD8a<sup>+</sup>, CD103<sup>+</sup> und CD11b<sup>+</sup> DCs auf transduzierten und injizierten CD45.2<sup>+</sup> DCs im Tumor nach DC-Vakzinierung (n=5-6). (C) Verlauf der Tumorgößen gemessen als Tumorfläche über sieben Tage nach Therapiebeginn (n=32-33). *pMXS Kontrolle DC + gp100*: DC-Vakzinierung mit gp100-beladenen pMXS-Kontrollvektor-transduzierten DCs und adoptiver T-Zell-Transfer, *pMXS Arc/Arg3.1 DC + gp100*: DC-Vakzinierung mit gp100-beladenen pMXS-Arc/Arg3.1-transduzierten DCs und adoptiver T-Zell-Transfer. Alle Daten sind als Mittelwert ± Standardfehler (± SEM) dargestellt.

### 3.2.3.3 Migration der Arc/Arg3.1-überexprimierenden dendritischen Zellen zum Tumormikromilieu nach Vakzinierung

Anhand des GFP-Signals (MFI GFP) wurden Arc/Arg3.1-überexprimierende DCs nach Vakzinierung im Tumor und in den sekundären lymphatischen Organen detektiert (Abb. 11A). In den Tumor-drainierenden Lymphknoten zeigte sich nach Vakzinierung mit pMXS-Arc/Arg3.1-transduzierten DCs eine signifikant positive Korrelation zwischen dem Anteil der injizierten DCs und ihrer Arc/Arg3.1-Expression (Abb. 11B). Diese Korrelation konnte nach Vakzinierung mit den pMXS-Kontrollvektor-transduzierten DCs nicht ermittelt werden (Abb. 11B), was für eine Arc/Arg3.1-abhängige Migration der injizierten DCs zur Tumorumgebung spricht.

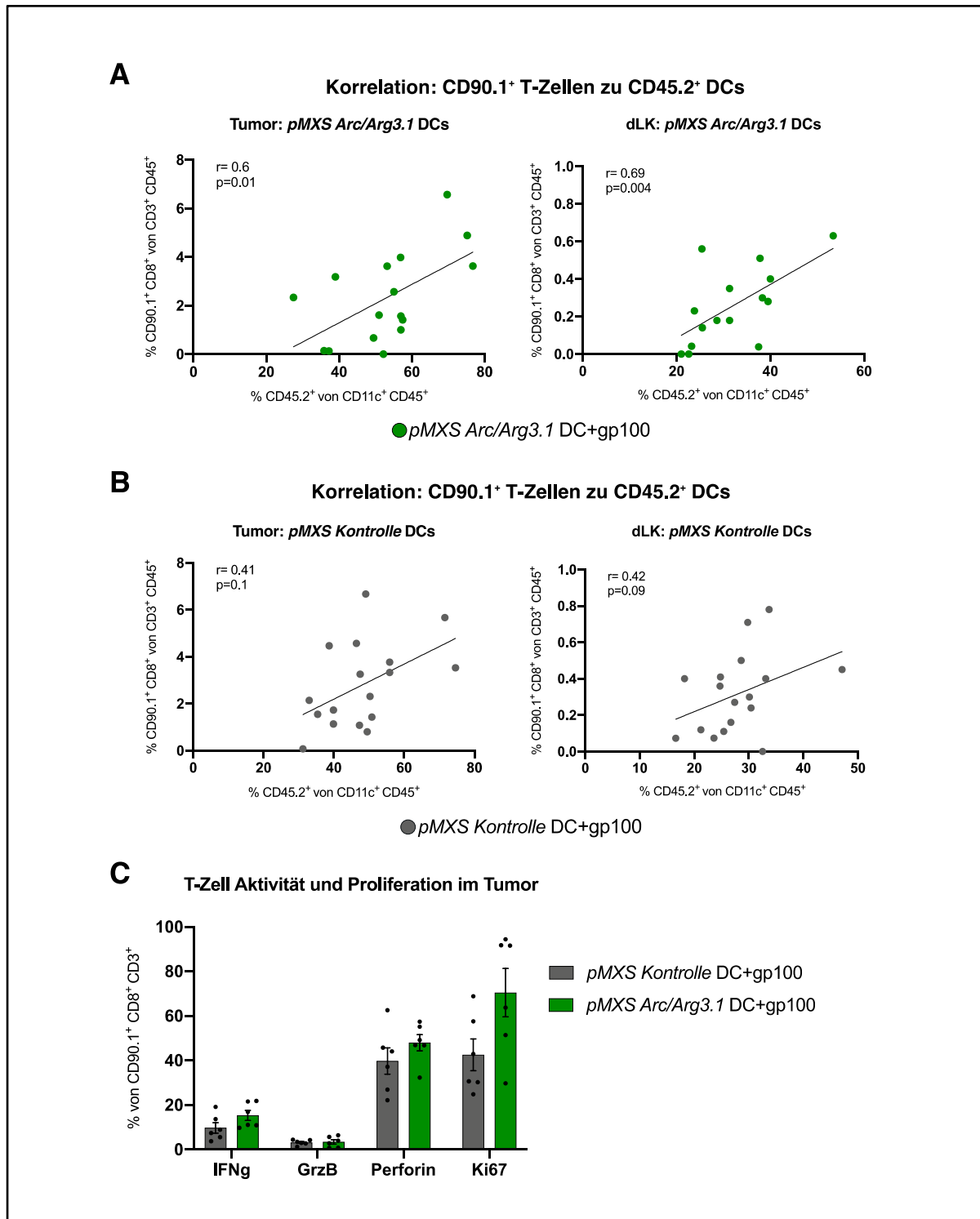


**Abbildung 11. Migration von Arc/Arg3.1-überexprimierenden DCs nach DC-Vakzinierung.** Durchflusszytometrische Analysen der DCs im Tumor, in den Tumordrainierenden Lymphknoten (dLK) und in der Milz sieben Tage nach Therapiebeginn (n=10-11). (A) Quantifizierung der Mean Flow Intensity des GFP Signals (MFI GFP) auf CD45.2<sup>+</sup> und endogenen CD45.2<sup>-</sup> DCs. (B) Korrelation des Anteils der CD45.2<sup>+</sup> DCs in den Tumordrainierenden Lymphknoten zu deren GFP-Expression (MFI GFP). *pMXS Kontrolle DC + gp100*: DC-Vakzinierung mit gp100-beladenen pMXS-Kontrollvektor-transduzierten DCs und adoptiver T-Zell-Transfer, *pMXS Arc/Arg3.1 DC + gp100*: DC-Vakzinierung mit gp100-beladenen pMXS-Arc/Arg3.1-transduzierten DCs und adoptiver T-Zell-Transfer. Alle Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler ( $\pm$  SEM) dargestellt.



#### 3.2.3.4 Einfluss der Arc/Arg3.1-Überexpression in dendritischen Zellen auf die T-Zellen im Tumormikromilieu

Nach Vakzinierung mit pMXS-Arc/Arg3.1-DCs zeigte sich sowohl im Tumor als auch in den Tumor-drainierenden Lymphknoten eine signifikant positive Korrelation zwischen den CD90.1<sup>+</sup> T-Zellen und den CD45.2<sup>+</sup> DCs (Abb. 12A). Diese konnte nach Vakzinierung mit Kontrollvektor-transduzierten DCs nicht nachgewiesen werden (Abb. 12B). Die Vakzinierung mit Arc/Arg3.1-überexprimierenden DCs führte allerdings zu keiner Verstärkung der zytotoxischen Aktivität oder der Proliferation der adoptiv transferierten voraktivierten T-Zellen im Tumor (Abb. 12C).



**Abbildung 12. Einfluss der Arc/Arg3.1-Überexpression auf die antigenspezifische T-Zell Infiltration.** (A-B) Korrelation des Anteils der CD90.1<sup>+</sup> T-Zellen zu CD45.2<sup>+</sup> DCs im Tumor und in den Tumor-drainierenden LK (dLK) nach DC-Vakzinierung mit *pMXS*-Arc/Arg3.1-transduzierten (A) und Kontrollvektor-(*pMXS*-Kontrolle)-transduzierten DCs (B) (n=15-16). (C) Durchflusszytometrische Analyse der T-Zell Aktivierungsmarker IFN $\gamma$ , Granzyme B, Perforin und des Proliferationsmarkers Ki67 auf allen antigenspezifischen CD90.1<sup>+</sup> T-Zellen (n=6). *pMXS Kontrolle* DC + gp100: DC-Vakzinierung mit gp100-beladenen *pMXS*-Kontrollvektor-transduzierten DCs und adoptiver T-Zell-Transfer, *pMXS Arc/Arg3.1* DC + gp100: DC-Vakzinierung mit gp100-beladenen *pMXS*-Arc/Arg3.1-transduzierten DCs und adoptiver T-Zell-Transfer. Alle Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler ( $\pm$  SEM) dargestellt.

### 3.3 Diskussion

#### 3.3.1 Die Rolle von Arc/Arg3.1 für dendritische Zellen im Tumormikromilieu

Die mehrfache Vakzinierung mit *in vitro* gp100-beladenen DCs verstärkte die therapeutische Wirkung adoptiv transferierter gp100-spezifischer T-Zellen im B16 Melanom-Modell (Lou et al., 2004).

In dieser Arbeit führte die DC-Beladung mit dem Melanom-spezifischen Tumorantigen gp100 im Vergleich zu einer Beladung mit dem unspezifischen Kontrollpeptid OVA zu einer verbesserten Kontrolle des Tumorwachstums nach DC-Vakzinierung (Abb. 2B). Die signifikante Korrelation zwischen dem Anteil injizierter DCs im Tumor und der Verkleinerung der Tumorgrößen impliziert eine entscheidende Funktion der injizierten DCs im Tumor für die therapeutische Wirksamkeit der DC-Vakzinierung (Abb. 3C). Die Interaktion zwischen gp100-beladenen DCs und gp100-spezifischen T-Zellen induziert die T-Zell Aktivierung und damit die Sekretion zytotoxischer Zytokine im Tumor (Abb. 8B), was wiederum die Rekrutierung weiterer DCs zum Tumor fördert (Garris et al., 2018; Nguyen-Pham et al., 2011).

Die zweifache Vakzinierung von gp100-beladenen DCs erhöht die Infiltration an gp100-spezifischen T-Zellen im Tumor (Abb. 4C). Die Tumorantigen-spezifische DC-Vakzinierung führte im Vergleich zur unspezifischen DC-Vakzinierung sowohl zu einer signifikant erhöhten T-Zell Rekrutierung (Abb. 7C, 8A) als auch zur erhöhten intratumoralen T-Zell Proliferation (Abb. 8C). Dies verdeutlicht die Bedeutung der antigenspezifischen Beladung der DCs für die antigenspezifische T-Zell Immunität im Tumor.

Basierend auf der Arc/Arg3.1-abhängigen DC-Migration in murinen Modellen autoimmuner Erkrankungen (Ufer et al., 2016) wurde in dieser Arbeit die Bedeutung der Arc/Arg3.1-abhängigen DC-Migration für die Generierung einer Antitumor-Immunantwort untersucht. Eine Arc/Arg3.1-abhängige Migration subkutan injizierter DCs konnte dabei auch am Tumormodell (B16 Melanom-Modell) *in vivo* bestätigt werden. Die fehlende Arc/Arg3.1-Expression führte hierbei zu einer reduzierten DC-Migration sowohl zum Tumor als auch zu den lymphatischen Organen (Abb. 6A). Dies suggeriert, so wie bereits in Vorarbeiten beschrieben, dass die Arc/Arg3.1-abhängige

DC-Migration unabhängig von den organabhängigen Chemokingradienten oder der Expression von Chemokinrezeptoren reguliert wird (Ufer et al., 2016).

Nach zweifacher DC-Vakzinierung mit Arc/Arg3.1-exprimierenden DCs kam es zu einer signifikanten Vermehrung einer CD8a<sup>+</sup> DC-Subpopulation im Tumor (Abb. 6B). Murine CD8a<sup>+</sup> DCs gehören gemeinsam mit CD103<sup>+</sup> DCs zur cDC1 DC-Subpopulation und sind in lymphatischen Organen an der Antigen-Kreuzpräsentation (*cross presentation*) für die Aktivierung CD8<sup>+</sup> zytotoxischer T-Zellen verantwortlich (Hildner et al., 2008). Auch im Tumor selbst konnte gezeigt werden, dass die BATF3-abhängig ausgereiften cDC1 wesentlich an der Induktion einer T-Zell basierten Immunantwort beteiligt sind. Studien am murinen Tumormodell demonstrierten eine von den lymphatischen Organen unabhängige, entscheidende Rolle der BATF3-abhängigen DC-Subpopulation im Tumor für die Antitumor-Effektivität von adoptiv transferierten T-Zellen (Broz et al., 2014). Im Prozess der Antigen-Kreuzpräsentation müssen DCs zunächst die Tumorantigene über Phagozytose aufnehmen, wobei es zu einer Herunterregulation der MHC-II Moleküle kommt. Während die Antigene von DCs an T-Zellen präsentiert werden, werden wiederum MHC-II und kostimulatorische Moleküle wie CD86 hochreguliert (Gardner and Ruffell, 2016). Es bleibt zu klären, ob die in dieser Arbeit beobachtete Herunterregulation der MHC-II Expression auf Arc/Arg3.1-exprimierenden gp100-beladenen DCs im Tumor (Abb. 5A) im Rahmen einer möglichen Antigen-Kreuzpräsentation stattfindet.

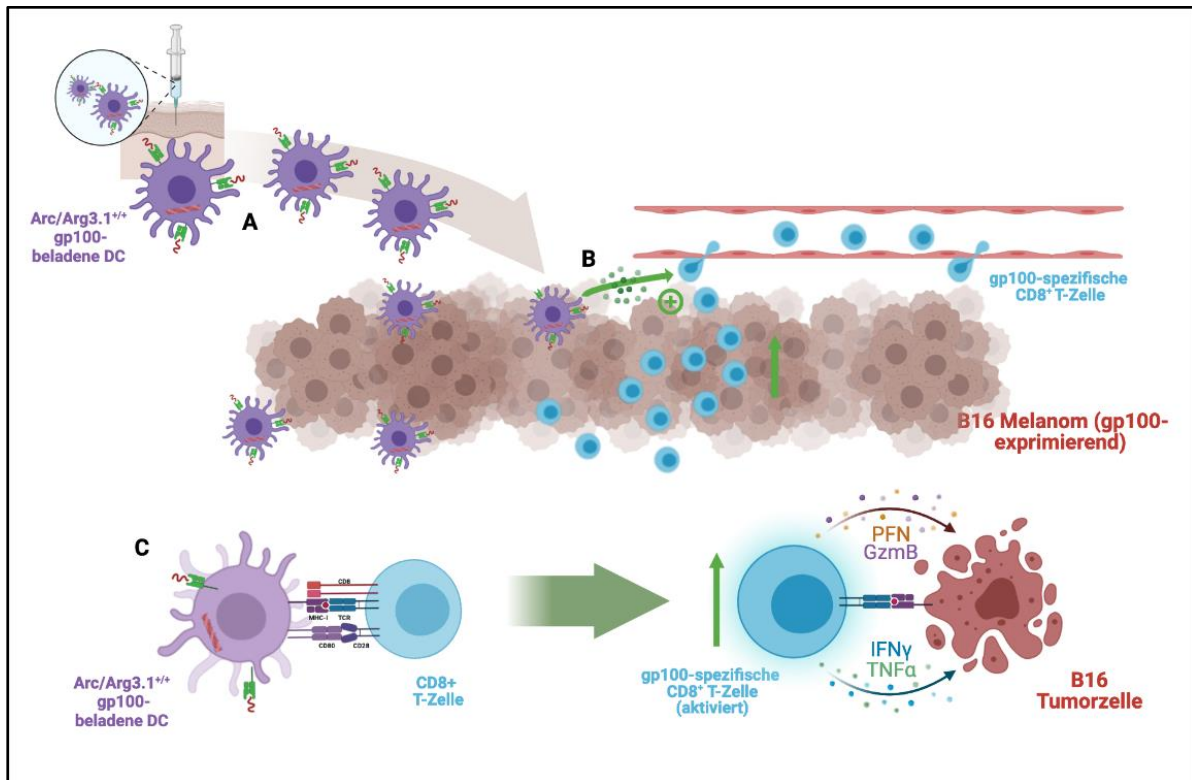
BATF3-abhängige DCs führen im Tumor zur T-Zell Rekrutierung. Unter verschiedenen Subtypen Antigenpräsentierender-Zellen aus dem Tumor konnte eine verstärkte Expression der T-Zell-rekrutierenden Chemokine CXCL9 und CXCL10 spezifisch auf CD103<sup>+</sup>/CD8a<sup>+</sup> DCs nachgewiesen werden (Spranger et al., 2017). Eine reduzierte T-Zell Infiltration in den Tumor nach gezielter Depletion BATF3-abhängiger CD103<sup>+</sup> DCs bestätigte dabei die entscheidende Funktion dieser DC-Subgruppe für die T-Zell Rekrutierung (Spranger et al., 2017).

Die Vakzinierung mit Arc/Arg3.1-exprimierenden DCs führte in dieser Arbeit zu einer signifikant erhöhten Infiltration von gp100-spezifischen T-Zellen im Tumor und in den lymphatischen Organen als eine Vakzinierung mit Arc/Arg3.1<sup>-/-</sup>-DCs (Abb. 7C, 8A). Dies impliziert die Abhängigkeit der T-Zell Infiltration von der Arc/Arg3.1-Expression der injizierten DCs. Die positive Korrelation zwischen den injizierten DCs und den

gp100-spezifischen T-Zellen sowohl im Tumor als auch in den Tumor-drainierenden Lymphknoten nach einer Vakzinierung mit Arc/Arg3.1-überexprimierenden DCs bekräftigt den positiven Einfluss der Arc/Arg3.1-exprimierenden DCs auf die Rekrutierung zytotoxischer T-Zellen zum Tumor (Abb. 12A). Weitere Untersuchungen zur Arc/Arg3.1-abhängigen Sekretion T-Zell rekrutierender Chemokine im Tumormikromilieu sind notwendig, um zu erklären, ob die verstärkte T-Zell Rekrutierung allein durch das Vorhandensein einer erhöhten Menge an Arc/Arg3.1-abhängig migrierten DCs im Tumor oder auch durch Arc/Arg3.1-abhängige funktionelle Veränderungen der DCs vermittelt wird.

Diese Arbeit liefert Hinweise für einen wichtigen Einfluss der Arc/Arg3.1-abhängigen DC-Migration zum Tumor (Abb. 13A) für die Tumordinfiltration von adoptiv transferierten tumorspezifischen T-Zellen (Abb. 13B). Hierbei konnte die Arc/Arg3.1-abhängige DC Migration zum Tumor spezifisch für eine CD8a<sup>+</sup> DC-Subpopulation nachgewiesen werden. Aktuelle Studien deuten auf eine entscheidende Rolle einer CD8a/CD103-exprimierenden cDC1 DC-Subpopulation für die T-Zell Immunität im Tumor (Broz et al., 2014; Roberts et al., 2016). Eine weiterführende funktionelle Einordnung der hier identifizierten CD8a<sup>+</sup> DC-Subpopulation im Tumor ist notwendig, um ihre Relevanz für die DC-basierte Antitumor-Immunantwort erklären zu können (Abb. 13C).

Die Ergebnisse dieser Arbeit demonstrieren eine wichtige Rolle der Arc/Arg3.1-Expression der DCs für die Induktion einer effektiven und tumorspezifischen T-Zell-basierten Immunantwort und liefern damit eine Rationale für die Verwendung Arc/Arg3.1-exprimierender DCs für eine Verbesserung der DC-basierten Immuntherapien.

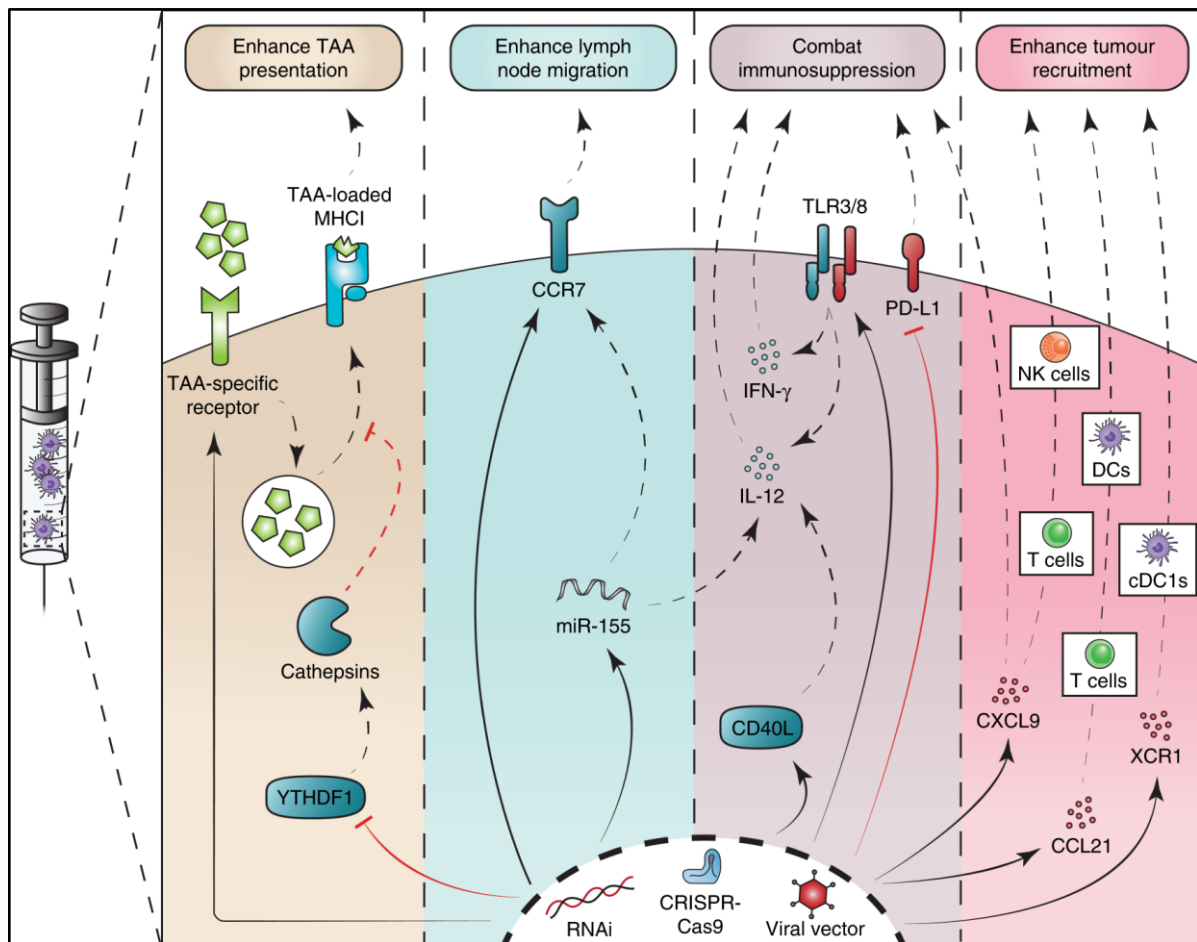


**Abbildung 13. Arc/Arg3.1-exprimierende DCs im Tumor.** (Abbildung erstellt auf [www.biorender.com](http://www.biorender.com)).

Die DC-Vakzinierung mit Arc/Arg3.1-exprimierenden DCs führt zur Veränderung der T-Zell Immunität im Tumormikromilieu. (A) Arc/Arg3.1-exprimierende gp100-beladene DCs migrieren nach subkutaner Vakzinierung zum Tumor. (B) Nach Vakzinierung mit Arc/Arg3.1-exprimierenden DCs kommt es zur erhöhten Rekrutierung von gp100-spezifischen T-Zellen zum Tumor. (C) Die Arc/Arg3.1-Expression in injizierten DCs führt zur Vermehrung von CD8<sup>+</sup> DCs im Tumor, welche möglicherweise zur Kreuzpräsentation von Tumorantigenen und damit zur Aktivierung zytotoxischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Tumormikromilieu beitragen.

### 3.3.2 Verstärkung der Effektivität einer DC-Vakzinierung durch genetisch modifizierte dendritische Zellen

Genetisch modifizierte DCs werden zur Verstärkung der Effektivität einer DC-Vakzinierung eingesetzt (Perez and De Palma, 2019). Die Induktion einer stabilen Expression von Tumor assoziierten Antigenen durch DCs kann die Antigenpräsentation verbessern. Durch die Verstärkung der Expression von Signalmolekülen oder Rezeptoren, welche an der Aktivierung, Migration und Funktion der DCs beteiligt sind, können immunsuppressive Einflüsse der Tumorumgebung für eine verbesserte Funktionalität der injizierten DCs überwunden werden (Abb. 14).



**Abbildung 14. Genetische Modifikation dendritischer Zellen zur Verstärkung der Antitumor-Effektivität** (von Perez, C.R., and De Palma, M. (2019). Engineering dendritic cell vaccines to improve cancer immunotherapy. Nat. Commun. 10, 5408.)

Mit Hilfe kleiner RNA-interferenz Moleküle (RNAi), CRISPR-Cas9 basierter Methoden oder viraler Transduktion können dendritische Zellen vor Vakzinierung genetisch modifiziert werden, um so die Antitumor-Effektivität der Vakzinierung zu verstärken. Genetische Modifikationen werden genutzt für eine stabile oder verstärkte Antigenpräsentation auf DCs, zur Verstärkung der DC-Migration oder zur Veränderung der Expression von immunaktivierenden- und immunsupprimierenden Zytokinen bzw. Chemokinen der DCs. Dies soll die Immunantwort gegen den Tumor verstärken.

Die mangelnde therapeutische Effektivität der dendritischen Zellen kann unter anderem auf eine unzureichende DC-Migration zum Tumor oder zu den lymphatischen Organen zurückgeführt werden. Diese Arbeit zeigt, dass die Arc/Arg3.1-Expression in DCs eine wichtige Rolle für die Migration injizierter DCs zum Tumor und zu den Tumor-drainierenden Lymphknoten spielt. Um die therapeutische Wirkung der DC-Vakzinierung zu verstärken, wurden in dieser Arbeit über retrovirale Transduktion Arc/Arg3.1-überexprimierende DCs generiert.

In vorherigen präklinischen Arbeiten konnte eine verstärkte migratorische Kapazität adenoviral transduzierter CCR7 überexprimierender DCs gezeigt werden (Okada et al., 2005). In dieser Arbeit führte eine genetisch induzierte Arc/Arg3.1-Expression ebenso zu einer verstärkten Migration der injizierten DCs zu den Tumor-drainierenden Lymphknoten (Abb. 11B).

Allerdings konnte trotz verstärkter Migration sowie unverändertem *in vivo* Phänotyp der DCs (Abb. 10A, B) kein therapeutischer Vorteil durch die Vakzinierung mit Arc/Arg3.1-überexprimierenden DCs im Vergleich zur Vakzinierung mit Kontrollvektor-transduzierten DCs erzielt werden (Abb. 10C). Eine hier erzielte Transduktionseffizienz von 30% Arc/Arg3.1-überexprimierender DCs ist möglicherweise nicht ausreichend, um die therapeutische Wirksamkeit dieser DCs *in vivo* gegenüber der Kontrolle zu erhöhen (Abb. 9B). Durch eine Vakzinierung mit selektionierten und erfolgreich mit pMXS-Arc/Arg3.1 transduzierten DCs könnte eine erhöhte therapeutischen Effektivität von Arc/Arg3.1-überexprimierenden DCs erzielt werden.

Eine weitere Limitierung der therapeutischen Wirksamkeit der DC-Vakzinierung stellt die Inhibition der Effektorfunktion tumorinfiltrierender T-Zellen im immunsuppressiven Tumormikromilieu dar. Die Arc/Arg3.1-Expression in injizierten DCs hat keinen signifikanten Einfluss auf den Aktivitätsstatus von adoptiv transferierten, *in vitro* voraktivierten T-Zellen im Tumor (Abb. 8B, 8C, 12C). Trotz einer verstärkten Rekrutierung dieser T-Zellen zum Tumor nach zweifacher Vakzinierung mit Arc/Arg3.1-exprimierenden DCs könnte eine unzureichende Entfaltung der zytotoxischen T-Zell Funktion einen Grund für den fehlenden therapeutischen Vorteil darstellen. In einem murinen Tumormodell war die Wirksamkeit von Immuncheckpoint-Inhibitoren abhängig von dem Vorhandensein BATF3-abhängiger DCs im Tumor (Sánchez-Paulete et al., 2017). Ein Vergleich der therapeutischen Effektivität zwischen einer DC-Vakzinierung mit Arc/Arg3.1-überexprimierenden DCs und einer



Vakzinierung mit WT-DCs, jeweils in Kombination mit Immuncheckpoint-Inhibitoren, könnte weitere Informationen zum therapeutischen Nutzen der Arc/Arg3.1-Expression für die DC-Vakzinierung liefern.

Diese Arbeit demonstriert die Anwendung gentechnischer Methoden zur Überexpression migrationsfördernder Proteine in *in vitro* generierten primären DCs. Der therapeutische Nutzen Arc/Arg3.1-überexprimierender DCs mit erhöhter migratorischer Kapazität für die Behandlung des Melanoms muss unter Berücksichtigung der Einflüsse des immunsuppressiven Tumormikromilieus weiterführend optimiert werden.

## 4 TEIL II: EINFLUSS EINER LOKALEN BESTRAHLUNG AUF DAS TUMORMIKROMILIEU MALIGNER GLIOME

### 4.1 Einleitung

#### 4.1.1 Immuntherapie im malignen Gliom

Die Standardtherapie für maligne Gliome besteht aus der operativen Tumorresektion und ggf. einer anschließenden Radiochemotherapie mit Temozolomid (TMZ) (Stupp et al., 2005). Die Entscheidung zur Systemtherapie wird bestimmt durch Alter und klinischen Zustand des Patienten sowie durch die Einteilung des Tumors nach der WHO Klassifikation. Die Einteilung in WHO Grad 1-4 Gliome basiert auf dem histologischen Phänotyp des Tumorgewebes. Die Analyse des gesamten Tumorgenoms durch Next Generation Sequencing liefert weitere Informationen zur Tumorentstehung, Tumorklassifikation und Prognoseabschätzung. Die Unterscheidung basierend auf dem Vorhandensein einer IDH-Mutation, einer 1p/19q Deletion sowie der MGMT-Promoter Methylierung weist eine entscheidende therapeutische und prognostische Relevanz auf (Reifenberger et al., 2017). So werden in der aktuellen Version der WHO Klassifikation molekulargenetische Marker als Klassifikationskriterien mit aufgenommen (Louis et al., 2016, 2021). Trotz des verbesserten Verständnisses über die Pathomechanismen der Gliome bleiben die therapeutischen Erfolge vor allem für hochmaligne WHO Grad 4 Glioblastome schlecht. Aktuell liegt das mediane Gesamtüberleben dieser hochaggressiven Tumorentität bei 14-15 Monaten.

Verschiedene Formen von Immuntherapien werden in präklinischen Untersuchungen entwickelt und im Rahmen von klinischen Studien bei Patienten mit malignen Gliomen getestet (Lim et al., 2018).

In klinischen Studien (CheckMate 143, CheckMate 498, NCT02617589) (Filley et al., 2017) wurde in der Behandlung maligner Gliome bisher kein therapeutischer Vorteil für die Gabe des Immuncheckpoint-Inhibitors Nivolumab nachgewiesen. Die Wirksamkeit alternativer Immuncheckpoint-Inhibitoren wie z.B. anti-TIM3 (NCT02658981) und anti-LAG3 (NCT02817633) als Mono- oder Kombinationstherapie mit Nivolumab gegen das maligne Gliom werden in weiteren klinischen Studien untersucht.

Für eine gliomspezifische Vakzinierung werden verschiedene immunogene Neoepitope in malignen Gliomen getestet. Für die mutierte Variante des EGF-

Rezeptors EGFRvIII konnte eine prinzipielle Wirksamkeit einer Peptidvakzinierung gezeigt werden (Sampson et al., 2010), allerdings wies die randomisierte Phase 3 Studie keinen Vorteil für das Gesamtüberleben (Weller et al., 2017) nach. Gegen die mutierte Form der Isozitat Dehydrogenase 1 (IDH1 R132H) wurde im präklinischen humanisierten Mausmodell eine durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen vermittelte Immunreaktion nachgewiesen (Schumacher et al., 2014). In einer klinischen Phase 1 Studie mit 33 Patienten mit WHO Grad 3-4 IDH1 R132H-mutierten Gliomen wurde die Induktion einer antigenspezifischen Immunantwort nach Peptidvakzinierung gegen das mutierte IDH1 R132H-Epitop gezeigt (Platten et al., 2021). Eine weitere immunogene, gliomspezifische Mutation ist die Histonmutation H3K27M, welche sowohl eine durch CD4<sup>+</sup> als auch durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen vermittelte Immunantwort induziert (Ochs et al., 2017). Eine therapeutische Peptidvakzinierung gegen das Epitop H3.3.K27M wird im Rahmen einer klinischen Studie bei pädiatrischen diffusen intrinsischen Ponsgliomen (DIPG) getestet (NCT02960230). Die mangelnde dauerhafte klinische Wirksamkeit der Peptidvakzinierungen mit Vakzinen, welche gegen ein einzelnes Neoepitop gerichtet sind, wird unter anderem auf einen Verlust der Neoantigen-Expression im Tumor nach Therapie zurückgeführt (Sampson et al., 2010). Weitere Studien testen daher die Wirksamkeit personalisierter Vakzine gegen multiple Epitope, welche nach Ermittlung der patientenspezifischen Tumorantigene entwickelt werden (Hilf et al., 2019).

CAR-T-Zell Therapien mit u.a. spezifisch gegen EGFRvIII (O'Rourke et al., 2017), IL12Rapha2 (Brown et al., 2015, 2016) und HER2 (Ahmed et al., 2010, 2017) gerichteten CAR-T-Zellen werden im Rahmen klinischer Studien untersucht. TCR transduzierte T-Zell-Therapien gegen maligne Gliome werden aktuell etabliert. Nach Entschlüsselung eines spezifisch gegen H3.3.K27M gerichteten T-Zell Klons konnte die therapeutische Wirksamkeit von spezifisch gegen H3.3.K27M gerichteten, TCR-transduzierten T-Zellen im Mausmodell nachgewiesen werden (Chheda et al., 2018). Die beschriebenen immuntherapeutischen Ansätze zeigten bisher noch keinen therapeutischen Vorteil gegenüber bisherigen Standardtherapien in der Behandlung des malignen Glioms.

Das maligne Gliom gehört zu den „kalten“ Tumoren. Die Immunsuppression im Tumormikromilieu maligner Gliome führt zur mangelnden Wirksamkeit von Immuntherapien (Nduom et al., 2015; Woroniecka et al., 2018). Die Untersuchung therapeutischer Ansätze, welche die Veränderung des antiinflammatorischen Tumormikromilieus hin zu einem proinflammatorischen Tumormikromilieu fördern,

ermöglichen eine Verbesserung der Wirksamkeit von Immuntherapien gegen maligne Gliome.

#### 4.1.2 Kombination aus Radiotherapie und Immuntherapie im malignen Gliom

Die Strahlentherapie ist Teil der Standardtherapie vieler solider Tumore. Eine erhöhte Konzentration proinflammatorischer Zytokine im Tumor nach lokaler Bestrahlung deutet auf einen Einfluss der Strahlentherapie auf die Immunaktivität im Tumor (Burnette et al., 2011; Hallahan et al., 1989; Lugade et al., 2008). Die Auswirkung einer lokalen Strahlentherapie auf weitere Tumorerkrankungen außerhalb des Bestrahlungsfelds (*abscopal effect*) verdeutlicht die systemische Wirkung einer Bestrahlung und begründet die Hypothese einer strahleninduzierten systemischen Antitumor-Immunantwort (Demaria et al., 2004; Golden et al., 2013).

Eine lokale Bestrahlung kann die einzelnen Schritte im Ablauf der Immunantwort gegen den Tumor modulieren. Die Bestrahlung fördert die Antigenpräsentation im Tumor einerseits durch die Induktion eines immunologischen nekrotischen Zelltods (Sauter et al., 2000) und einer damit verstärkten Freisetzung immunogener Tumorantigene und andererseits durch die Förderung der Ausreifung und Aktivierung dendritischer Zellen (Gupta et al., 2012; Huang et al., 2011). Zusätzlich verstärkt die ionische Bestrahlung auch die Präsentation von Tumorantigenen auf MHC-Molekülen der Tumorzellen, wodurch diese von zytotoxischen T-Zellen erkannt und abgetötet werden können (Reits et al., 2006; Sharma et al., 2011). Eine erhöhte Sekretion T-Zell-rekrutierender Zytokine (Meng et al., 2012) und eine „Normalisierung“ der Tumorgefäße (Ganss et al., 2002; Shrimali et al., 2010) nach Strahlentherapie ermöglichen eine verstärkte Infiltration von T-Zellen in den Tumor. Immunsuppressive Zellen im Tumor spielen eine wichtige Rolle für die Resistenzen gegen Immuntherapien. Die Depletion, Inhibition oder „Repolarisierung“ immunsuppressiver myeloider Zellen kann die strahleninduzierte Immunaktivierung zusätzlich verstärken (Liang et al., 2017; Prakash et al., 2016; Stessin et al., 2020; Zhang et al., 2019). Die Bestrahlungsdosis und die Fraktionierung der Bestrahlungseinheiten sind wichtige Einflussfaktoren für die strahleninduzierte Immunaktivierung (Ko et al., 2018). Während höhere Dosen von 8-12 Gy die durch Tumorzellen vermittelte Immunaktivierung durch eine Verstärkung des immunogenen Zelltods (Kroemer et al., 2013), eine erhöhte MHC I Expression (Reits et al., 2006) und eine Stimulation der IFN-Typ I basierten Immunantwort (Vanpouille-Box et al., 2017) fördern, erweisen sich niedrigdosierte Bestrahlungen mit 1-5 Gy als geeignet für eine immunaktivierende

Modulierung des Tumormikromilieus. Dabei kommt es zu einer verstärkten Sekretion immunstimulierender Zytokine, einer verstärkten Infiltration effektiver Immunzellen und zu einer Reduktion der Einflüsse immunsuppressiver Immunzellen (Klug et al., 2013; Niesel et al., 2021).

Die proinflammatorischen Einflüsse einer Bestrahlung begründen die Radiotherapie als Adjuvanz zur Erhöhung der Wirksamkeit von Immuntherapien. Synergistische Wirkungen von Strahlentherapie und Immuntherapien wie Vakzinierung (Garnett-Benson et al., 2015; Newcomb et al., 2006), adoptiver T-Zell Transfer (Lai et al., 2019; Weiss et al., 2018) und Imm checkpoints-Inhibitoren (Zeng et al., 2013) konnten in präklinischen Modellen nachgewiesen werden. In klinischen Studien werden in verschiedenen Tumorentitäten der Einfluss der Radiotherapie auf die Wirksamkeit der Immuntherapien retrospektiv untersucht (Shaverdian et al., 2017) und Kombinationstherapien prospektiv getestet (Barker et al., 2015).

Auch bei malignen Gliomen ist die Radiotherapie ein wesentlicher Bestandteil der Standardtherapie. In diesem Teil der Arbeit wird basierend auf der immunmodulatorischen Wirkung der Strahlentherapie der Einfluss einer lokalen, niedrigdosierten Tumorbestrahlung auf die Wirksamkeit von Immuntherapien und Veränderungen im Tumormikromilieu im murinen GL261-gp100 Gliom-Modell untersucht.

#### 4.1.3 Das GL261-gp100 Gliom-Modell

In dieser Arbeit wurde das syngene murine Gliom-Modell GL261 zur Untersuchung von Wirkmechanismen von Immuntherapien in Kombination mit einer Bestrahlung verwendet. Die Möglichkeit der Etablierung von Gliomen mit Glioblastom-typischen Charakteristika in immunkompetenten C57BL/6 Mäusen sowie einer vorhandenen MHC-I Expression auf Tumorzellen macht dieses Modell zu einem geeigneten Kandidaten zur Untersuchung von Immuntherapien (Szatmári et al., 2006). Spontane Immunaktivitäten mit Infiltration tumorantigenspezifischer T-Zellen und die Wirksamkeit von Tumorantigen-spezifischen Vakzinierungen, welche sowohl prophylaktisch als auch therapeutisch das Tumorwachstum verhindern, konnten in diesem Modell nachgewiesen werden (Prins et al., 2003, 2008).

Aufgrund der geringen Expression von MHC I und Tumorantigenen wurden in dieser Arbeit genetisch modifizierte GL261 Zellen verwendet, welche das Melanom assoziierte Antigen gp100 überexprimieren (GL261-gp100). Dieses artifizielle Gliom-Modell ermöglicht die gezielte Untersuchung antigenspezifischer Immuntherapien

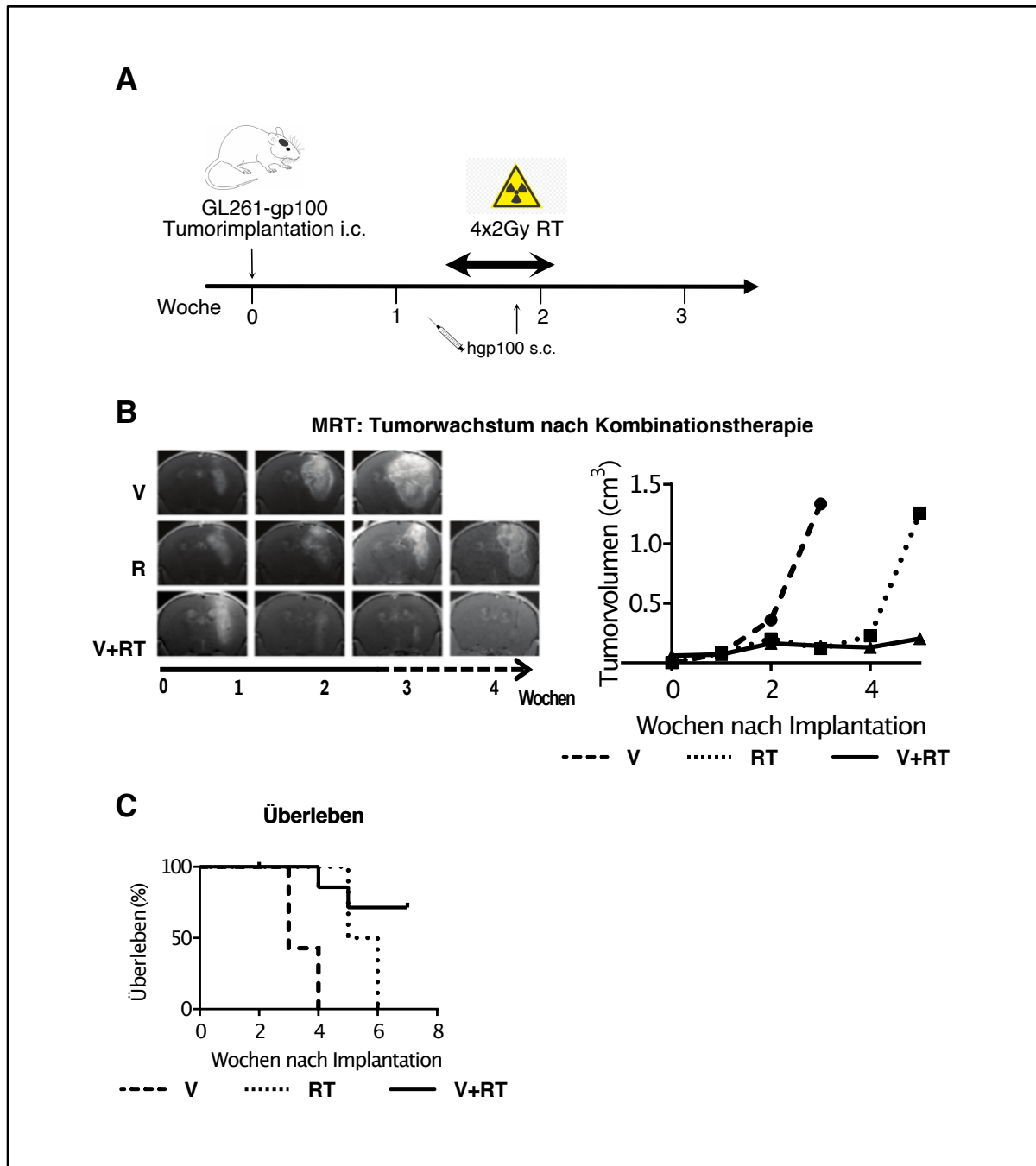
mittels gp100-Peptidvakzinierung oder adoptivem Transfer gp100-spezifischer pmel T-Zellen.

#### 4.1.4 Vorarbeiten: Lokale Tumorbestrahlung und Peptidvakzinierung wirken synergistisch im experimentellen Gliom-Modell und verstärken die Infiltration und Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen im Tumor

Dieser Teil der Doktorarbeit knüpft an bisher unveröffentlichte Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe an, welche zum Verständnis im Folgenden dargestellt werden. Diese Vorarbeiten wurden unter der Leitung von Dr. Katharina Sahm konzeptioniert und durchgeführt.

Zunächst wurde der therapeutische Effekt der Kombinationstherapie aus fraktionierter Bestrahlung und Immuntherapie im experimentellen GL261-gp100 Gliom-Modell untersucht. Nach intrakranieller Implantation von GL261-gp100 Gliomzellen wurden die C57BL/6J Mäuse mit einer hgp100<sub>25-33</sub> (gp100) - Peptidvakzinierung in Kombination mit einer fraktionierten lokalen Tumorbestrahlung mit jeweils 2 Gy über 4 aufeinanderfolgenden Tagen behandelt (Abb. 15A).

Durch MRT-Aufnahmen wurde das Tumorwachstum nach Therapie beobachtet. Hierbei zeigte sich ein synergistischer therapeutischer Effekt der Kombinationstherapie aus Bestrahlung und Peptidvakzinierung, welcher zur Kontrolle und Verringerung des Tumorwachstums (Abb. 15B) und zum verlängerten Gesamtüberleben (Abb. 15C) führte. Hingegen waren der alleinige Einsatz einer Immuntherapie oder Strahlentherapie nicht ausreichend, um das Tumorwachstum einzudämmen (Abb. 15B).



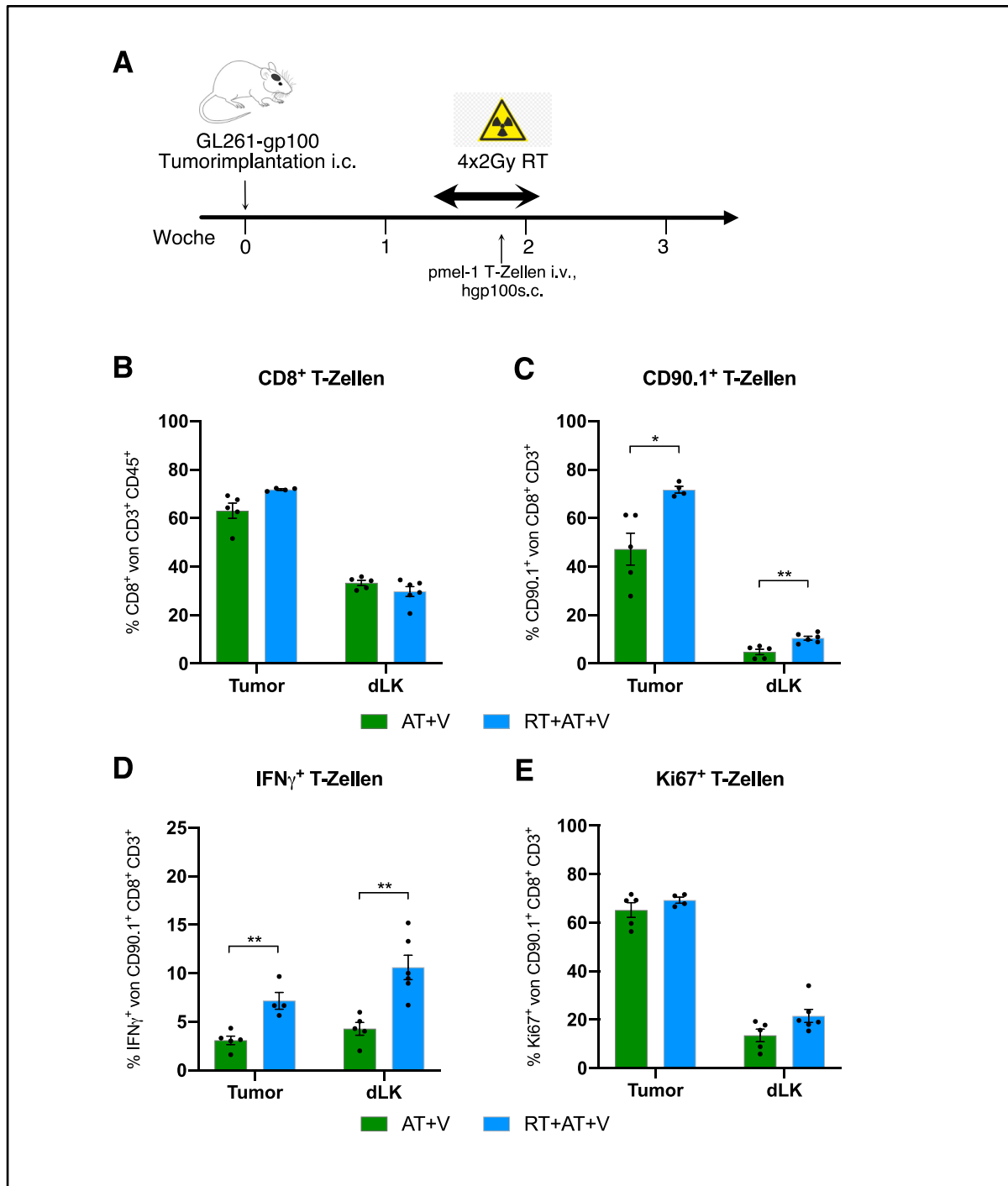
**Abbildung 15. Therapeutische Wirkung von Bestrahlung und Peptidvakzinierung im GL261-gp100 Gliom-Modell.** Behandlung GL261-gp100 tragender Mäuse mit Peptidvakzinierung (V, n=6), lokaler Tumorbestrahlung (RT, n=6) oder einer Kombinationstherapie aus Peptidvakzinierung und lokaler Tumorbestrahlung (V+RT, n=6). (A) Therapieschema zur Behandlung GL261-Gliom tragender Mäuse mit subkutaner gp100-Peptidvakzinierung (hgp100 s.c.) an Tag 14 nach intrakranieller Tumorimplantation (GL261-gp100 Tumorimplantation i.c.) und niedrigdosierter Bestrahlung mit 4x2Gy an vier aufeinanderfolgenden Tagen (Tag 12-15, 4x2Gy RT). (B) MRT Bilder und entsprechende Quantifizierung des Tumorzunahmes nach Tumorimplantation zur Beurteilung des Therapieansprechens. (C) Kaplan-Meier-Analyse des Gesamtüberlebens der einzelnen Behandlungsgruppen. Alle Daten sind als Mittelwert dargestellt.

Anschließend wurde der Einfluss einer lokalen Tumorbestrahlung auf die T-Zell Immunität im Tumor nach adoptivem Transfer von gp100-spezifischen T-Zellen untersucht (Abb. 16A). Die gp100-spezifischen T-Zellen wurden vor adoptivem Transfer für drei Tage *in vitro* mit IL-2 und dem Peptid gp100 antigenspezifisch stimuliert.

Die lokale Bestrahlung führte zu keinem signifikanten Einfluss auf die gesamten CD8<sup>+</sup> T-Zellpopulation im Tumor (Abb. 16B). Allerdings zeigte sich eine signifikante Erhöhung der transferierten Tumorantigen-spezifischen CD90.1<sup>+</sup> T-Zellen im Tumor und in den zervikalen Tumor-drainierenden Lymphknoten nach Bestrahlung (Abb. 16C). Durchflusszytometrische Messungen der T-Zell Aktivierung und Proliferation zeigten eine strahleninduzierte verstärkte Sekretion des T-Zell Aktivierungsmarkers IFN  $\gamma$  (Abb. 16D), allerdings keine erhöhte T-Zell Proliferation gemessen am Proliferationsmarker Ki67 (Abb. 16E).

Die verstärkte Infiltration und Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen im Tumor nach lokaler Bestrahlung sprechen für eine strahlenabhängige Modulation der T-Zell Immunität im Tumor.





**Abbildung 16. Einfluss der lokalen Bestrahlung auf die T-Zell Antwort im Tumormikromilieu.** (A) Therapieschema zur Behandlung GL261-Gliom tragender Mäuse mit intravenösem adoptivem T-Zell Transfer von gp100-spezifischen T-Zellen (pmel-1 T-Zellen i.v.) und subkutaner gp100-Peptidvaksinierung (hgp100 s.c.) an Tag 14 nach intrakranieller Tumorimplantation (GL261-gp100 Tumorimplantation i.c.) und niedrigdosierter Bestrahlung mit 4x2Gy an vier aufeinanderfolgenden Tagen (Tag 12-15, 4x2Gy RT). (B-E) Durchflusszytometrische Analysen der T-Zellen im Tumor und in den Tumor-drainierenden Lymphknoten (dLK) nach adoptivem T-Zell Transfer und Peptidvaksinierung (AT+V) und nach Bestrahlung mit adoptivem T-Zell Transfer und Peptidvaksinierung (RT+AT+V) (n=4-6). (B) Anteil der zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen an allen CD3<sup>+</sup> T-Zellen. (C) Anteil der adoptiv transferierten, antigenspezifischen CD90.1<sup>+</sup> T-Zellen an allen zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen. (D) Anteil der IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen an allen CD90.1<sup>+</sup> T-Zellen. (E) Anteil der Ki67<sup>+</sup> T-Zellen an allen CD90.1<sup>+</sup> T-Zellen. Alle Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler ( $\pm$  SEM) dargestellt.

Basierend auf diesen Vordaten sollen in dieser Arbeit die strahleninduzierten Veränderungen des Tumormikromilieus im murinen Gliom-Modell untersucht werden.

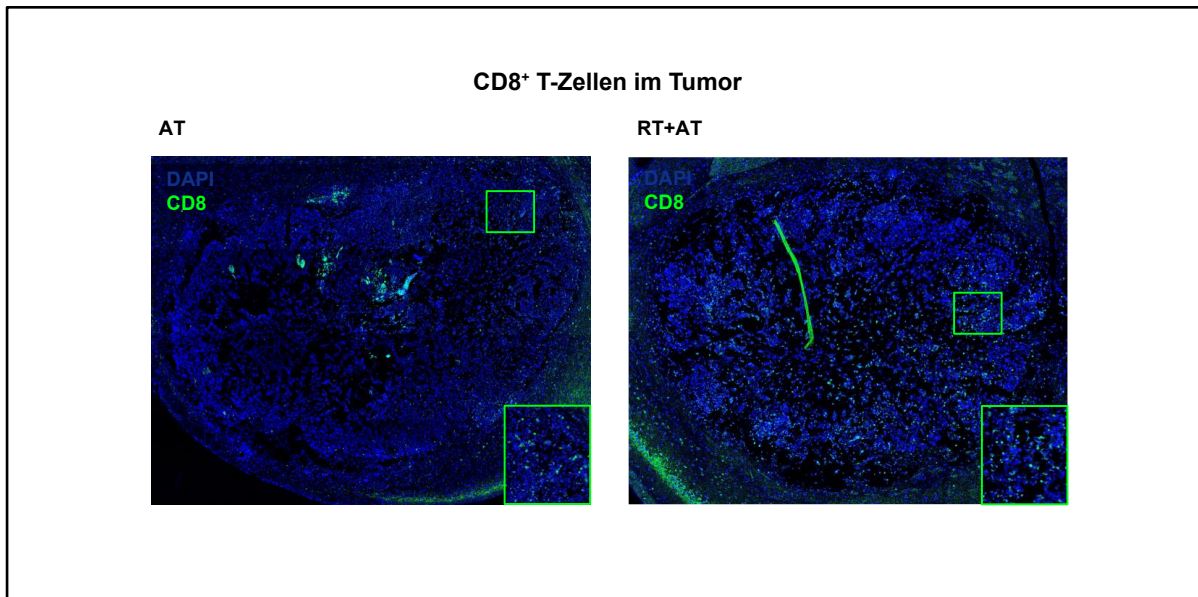
## 4.2 Ergebnisse

### 4.2.1 Einfluss der lokalen Bestrahlung auf die T-Zell Rekrutierung und Aktivierung

#### 4.2.1.1 Lokale Tumorbestrahlung verstärkt die Rekrutierung antigenspezifischer T-Zellen

Nachdem ein synergistischer Effekt einer lokalen Tumorbestrahlung mit Immuntherapien bestehend aus Vakzinierung oder Vakzinierung in Kombination mit adoptivem T-Zell Transfer im verwendeten experimentellen Gliom-Modell GL261-gp100 gezeigt wurde, soll im Anschluss die Rolle der T-Zell Immunität für die beobachtete verstärkte Antitumor-Immunantwort näher beleuchtet werden. Eine verstärkte Infiltration antigenspezifischer T-Zellen nach lokaler Tumorbestrahlung konnte bereits gezeigt werden (Abb. 16C).

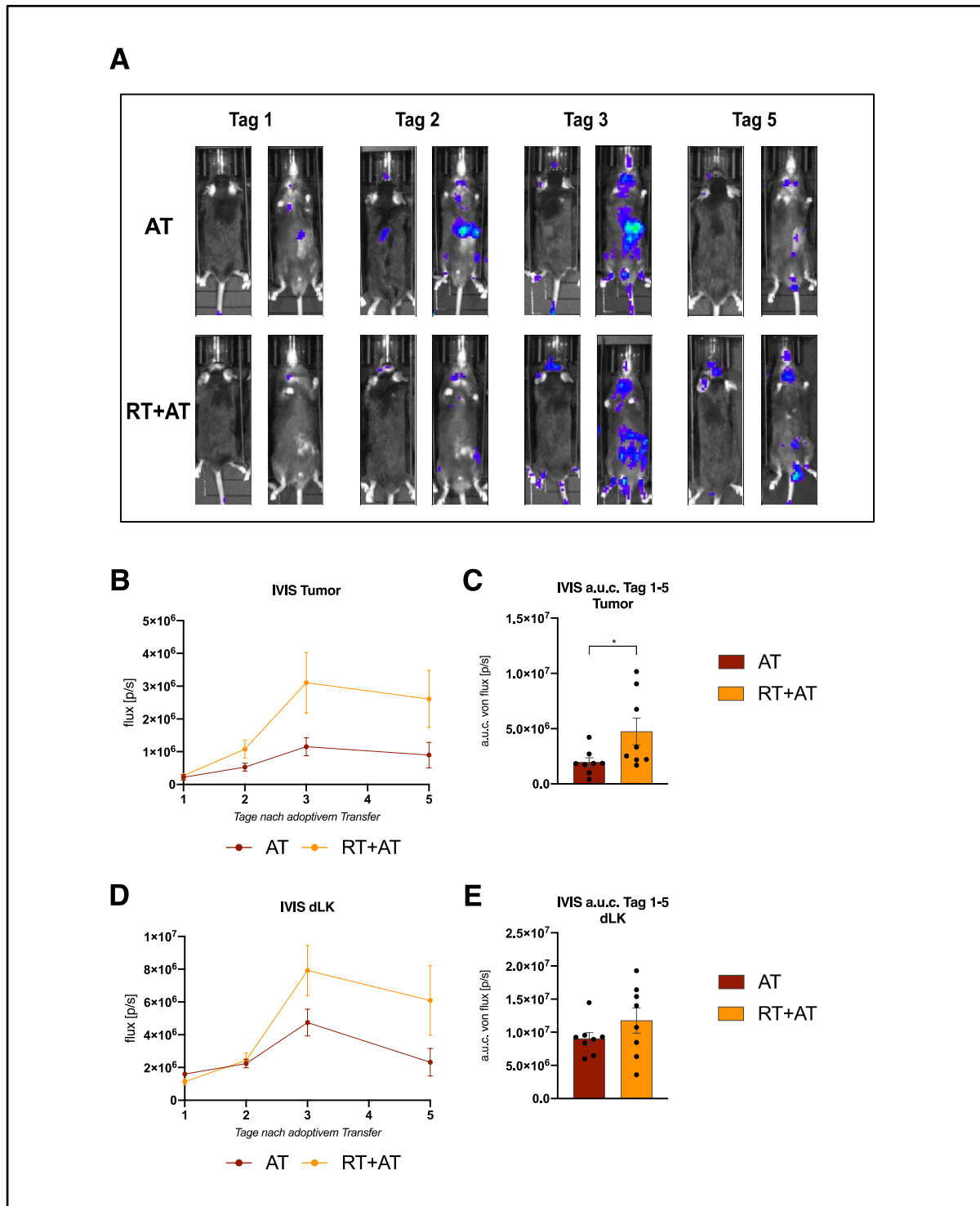
Die Immunfluoreszenzfärbung auf CD8 bestätigte die verstärkte Infiltration der CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Tumor nach lokaler Tumorbestrahlung (Abb. 17).



**Abbildung 17. T-Zell Infiltration im GL261-gp100 Tumor.** Repräsentative Bilder nach Immunfluoreszenzfärbung auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Tumor nach adoptivem T-Zell Transfer (AT) und nach Bestrahlung mit adoptivem T-Zell Transfer (RT+AT).

Mittels *in vivo* Biolumineszenz Messungen von Luciferase-exprimierenden pmel-luc mcherry T-Zellen wurde die T-Zell Wanderung und Rekrutierung zum Tumor, zu den Tumor-drainierenden Lymphknoten und zur Milz über fünf Tage nach dem adoptivem Transfer *in vivo* verfolgt (Abb. 18A). Nach lokaler Bestrahlung kam es zu einer signifikant vermehrten Rekrutierung antigenspezifischer T-Zellen zum Tumor (Abb. 18B, C). In den Tumor drainierenden zervikalen Lymphknoten wurde ebenfalls eine vermehrte, allerdings nicht signifikant verstärkte, Rekrutierung der antigenspezifischen T-Zellen nach lokaler Bestrahlung beobachtet (Abb. 18D, E).

Die Beobachtungen deuten darauf hin, dass eine lokale Tumorbestrahlung eine Tumor-gerichtete Wanderung antigenspezifischer T-Zellen nach adoptivem Transfer fördert und damit die T-Zell Immunität im Tumor begünstigt.

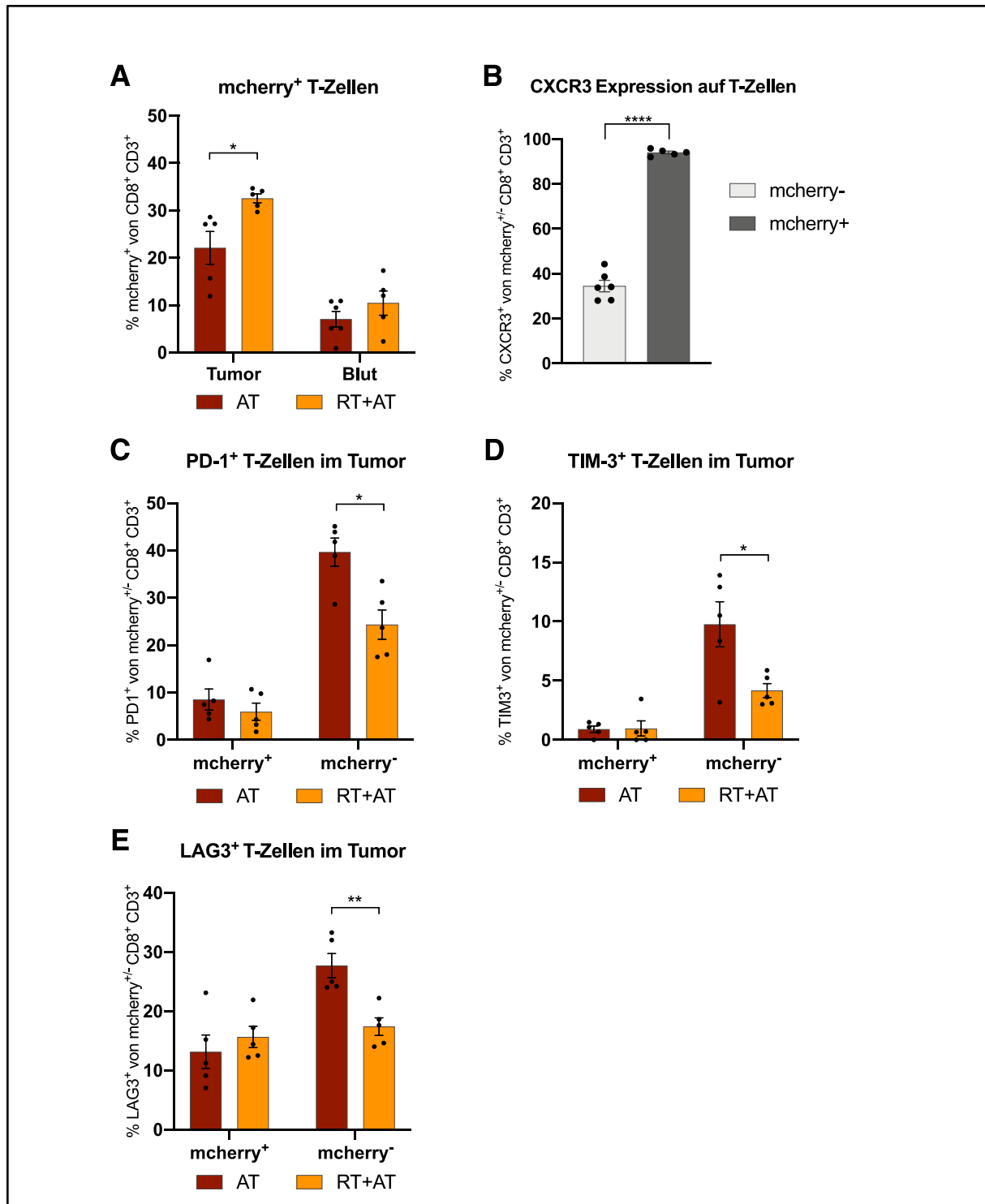


**Abbildung 18. Einfluss der lokalen Tumorbestrahlung auf die T-Zell Rekrutierung zum Tumor und zu den Tumor-drainierenden Lymphknoten.** In vivo Biolumineszenzmessungen (IVIS) zur Detektion von Luciferase exprimierenden pmel-1 T-Zellen (pmel luc mcherry) nach adoptivem T-Zell Transfer (AT) und nach Bestrahlung mit adoptivem T-Zell Transfer (RT+AT) (n=8). (A) Repräsentative Bilder zur Darstellung des Lumineszenz-Signals im Tumor und in den Tumor-drainierenden Lymphknoten über fünf Tage nach adoptivem Transfer. (B-C) Quantifizierung des Lumineszenz-Signals im Tumor mit Verlauf der absoluten Werte (B) und area under the curve (a.u.c.) (C). (D-E) Quantifizierung des Lumineszenz-Signals in den Tumor-drainierenden zervikalen Lymphknoten (dLK) mit Verlauf der absoluten Werte (D) und area under the curve (a.u.c.) (E). Alle Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler ( $\pm$  SEM) dargestellt.

#### 4.2.1.2 Lokale Tumorbestrahlung fördert einen immunaktiven Phänotyp antigenspezifischer Effektor T-Zellen im Tumor

Die durchflusszytometrische Detektion der adoptiv transferierten gp100-spezifischen T-Zellen erfolgte über deren immunfluoreszenten Marker *mcherry*. In Übereinstimmung zu den Vordaten (Abb. 16C) zeigte sich ein signifikant erhöhter Anteil der *mcherry*<sup>+</sup> antigenspezifischen T-Zellen im Tumor nach Bestrahlung im Vergleich zur unbestrahlten Kontrollgruppe (Abb. 19A). Hierbei zeigten sich auf nahezu 100% der antigenspezifischen T-Zellen die Expression des Chemokinrezeptors CXCR3 (Abb. 19B).

In Erweiterung zur bereits gezeigten verstärkten Aktivierung der tumorinfiltrierenden T-Zellen nach Bestrahlung (Abb. 16D) wurde der T-Zell Aktivitätsstatus über die Expression der T-Zell Erschöpfungs- (*Exhaustion*)-Marker näher charakterisiert. Wie erwartet, zeigten sich auf den adoptiv transferierten, *in vitro* stimulierten *mcherry*<sup>+</sup> T-Zellen eine geringere Expression der T-Zell *Exhaustion*-Marker PD-1, TIM-3 und LAG3 als auf den endogenen unspezifischen *mcherry*<sup>-</sup> T-Zellen (Abb. 19C-E). Antigen-spezifische T-Zellen im Tumor weisen somit eine höhere Aktivität als unspezifische T-Zellen auf. Auf den endogenen *mcherry*<sup>-</sup> T-Zellen im Tumor wurde allerdings eine signifikante Verringerung der entsprechenden *Exhaustion*-Marker Expression nach Bestrahlung beobachtet (Abb. 19C-E). Die lokale Tumorbestrahlung führt daher zu einem aktivierten Phänotyp der zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Tumor.



**Abbildung 19. Einfluss der lokalen Tumorbestrahlung auf die T-Zell Aktivität im Tumor.** Durchflusszytometrische Analysen der T-Zellen im Tumor und im Blut nach adoptivem T-Zell Transfer (AT) oder nach Bestrahlung mit adoptivem T-Zell Transfer (RT+AT) (n=5-6). (A) Anteil der adoptiv transferierten mcherry<sup>+</sup> T-Zellen an allen zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Tumor und im Blut. (B) CXCR3 Expression auf mcherry<sup>+</sup> und mcherry<sup>-</sup> T-Zellen im Blut. (C-E) Expression der *Exhaustion*-Marker PD-1 (C), TIM-3 (D) und LAG3 (E) auf mcherry<sup>+</sup> und mcherry<sup>-</sup> T-Zellen im Tumor. Alle Daten sind als Mittelwert ± Standardfehler (± SEM) dargestellt.

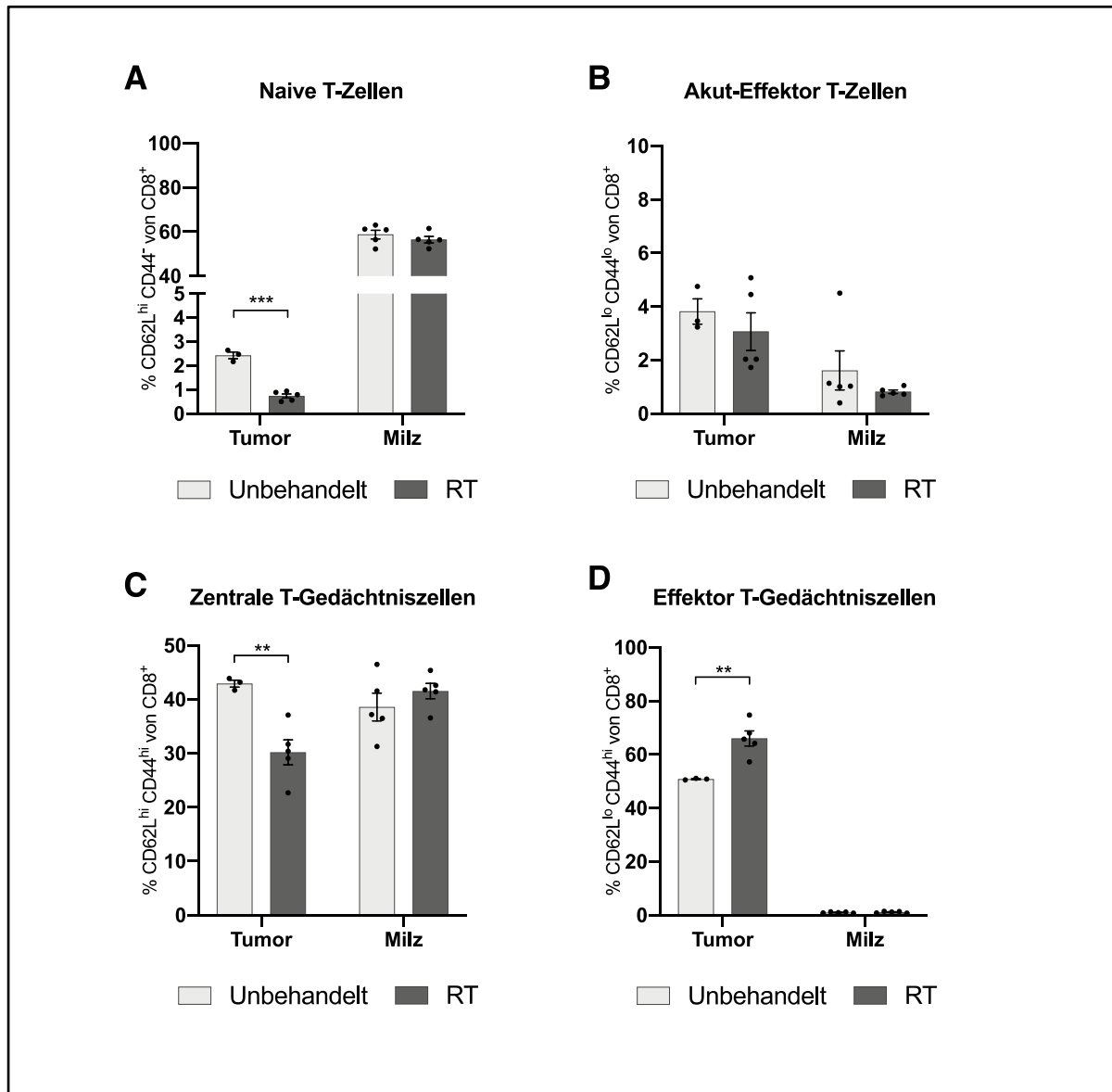


#### 4.2.1.3 Lokale Tumorbestrahlung verstärkt die Ausbildung eines effektiven T-Zell Gedächtnis

Die Ausbildung eines effektiven T-Zell Gedächtnis zeigte einen Vorteil für die Tumorkontrolle nach Immuntherapien (Duikeren et al., 2012). Hierbei war vor allem die Ausbildung von Effektor T-Gedächtniszellen ( $CD62L^{low}CD44^{high}$ ) entscheidend für die Immunaktivität in peripheren Organen, während das Vorhandensein von Zentralen T-Gedächtniszellen in den lymphatischen Organen maßgebend für die Generierung einer dauerhaften spezifische Immunantwort war (Sallusto et al., 1999).

Nach lokaler Tumorbestrahlung konnten neben naiven T-Zellen (Abb. 20A) sowohl Akut-Effektor T-Zellen (Abb. 20B) als auch T-Gedächtniszellen (Abb. 20C, D) im Tumor und in der Milz beobachtet werden. Effektor T-Gedächtniszellen waren nach Bestrahlung im Tumor signifikant erhöht und in der Milz nicht detektierbar (Abb. 20D). Hingegen wurden zentrale T-Gedächtniszellen sowohl im Tumor als auch in der Milz beobachtet, wobei diese im Tumor nach Bestrahlung signifikant erniedrigt waren (Abb. 20C), was auf eine vermehrte Wanderung dieser T-Zellen in die lymphatischen Organe hindeutet.

Somit ergeben sich Hinweise, dass die lokale Tumorbestrahlung zu einem Antitumoraktiven T-Zell Gedächtnis führt. Die Ausbildung von Effektor T-Gedächtniszellen im Tumor führt hierbei zur direkten Tumorkontrolle. Die Ausbildung einer Langzeit-Immunantwort wird durch Zentrale T-Gedächtniszellen in den lymphatischen Organen induziert.



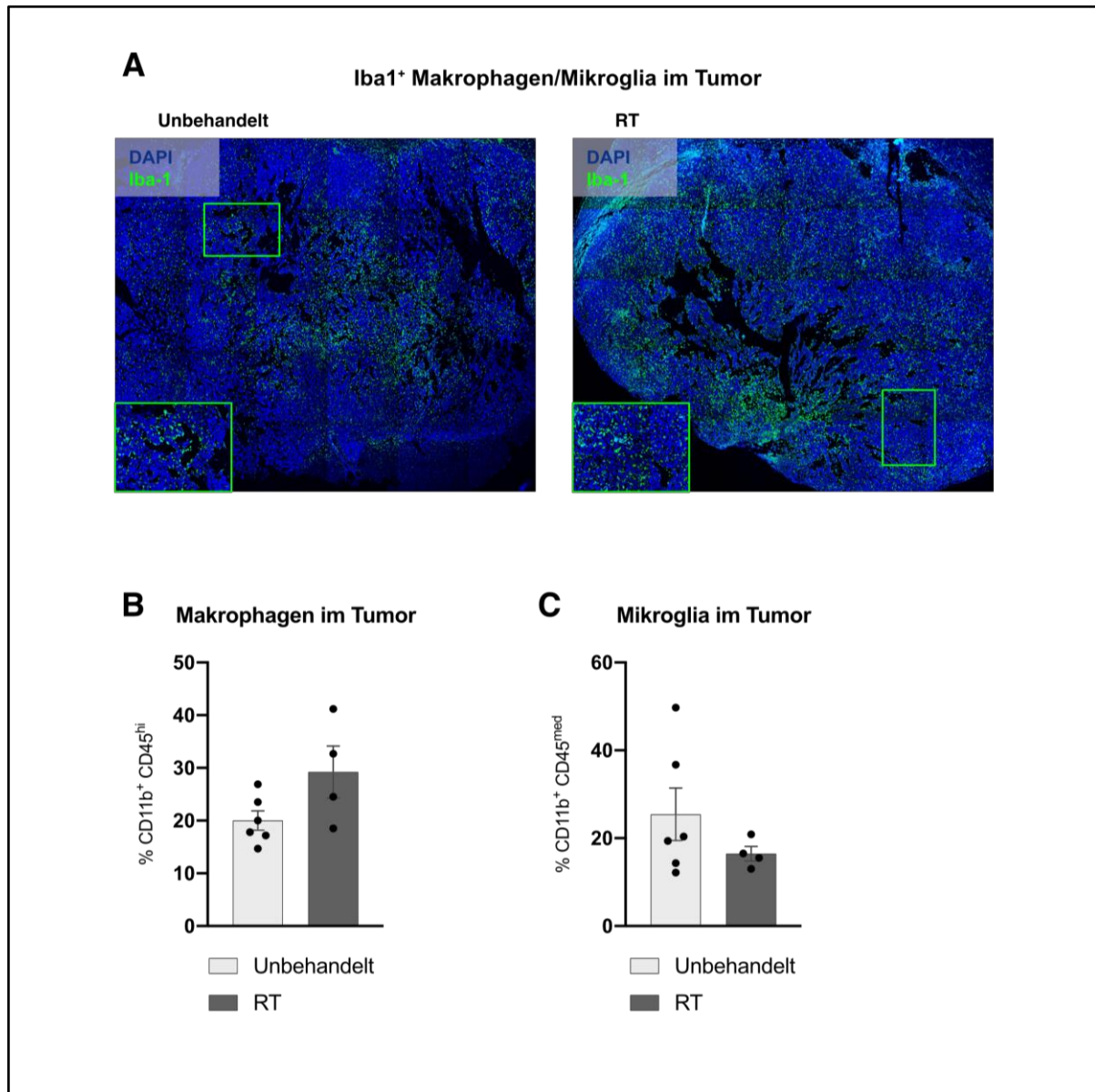
**Abbildung 20. Einfluss der lokalen Tumorbestrahlung auf die Ausbildung eines anti-Tumor aktiven T-Zell Gedächtnis.** Durchflusszytometrische Analysen der T-Zell-Populationen im Tumor und in der Milz ohne Behandlung (Unbehandelt) und nach lokaler Tumorbestrahlung (RT) (n=3-5). (A-D) Anteil der naiven T-Zellen (A), Akut-Effektor T-Zellen (B), Zentralen T-Gedächtniszellen (C) und Effektor T-Gedächtniszellen (D) im Tumor und in der Milz. Alle Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler ( $\pm$  SEM) dargestellt.

#### 4.2.2 Einfluss der lokalen Bestrahlung auf myeloide Zellen im Tumormikromilieu

##### 4.2.2.1 Lokale Tumorbestrahlung fördert die Rekrutierung von M1-polarisierten Makrophagen zum Tumor

Ein erhöhter Anteil an M1-polarisierten Makrophagen im malignen Gliom ist entscheidend für die Antitumor-Immunität und fördert das Ansprechen auf Immuntherapien (Aslan et al., 2020).

Makrophagen und Mikroglia im Tumor wurden durch Immunfluoreszenzfärbungen auf Iba-1 dargestellt (Abb. 21A) und mittels Durchflusszytometrie quantifiziert (Abb. 21B, C). Hierbei zeigte sich ein Trend zu einem erhöhten Anteil an Makrophagen im Tumor nach lokaler Bestrahlung (Abb. 21B).

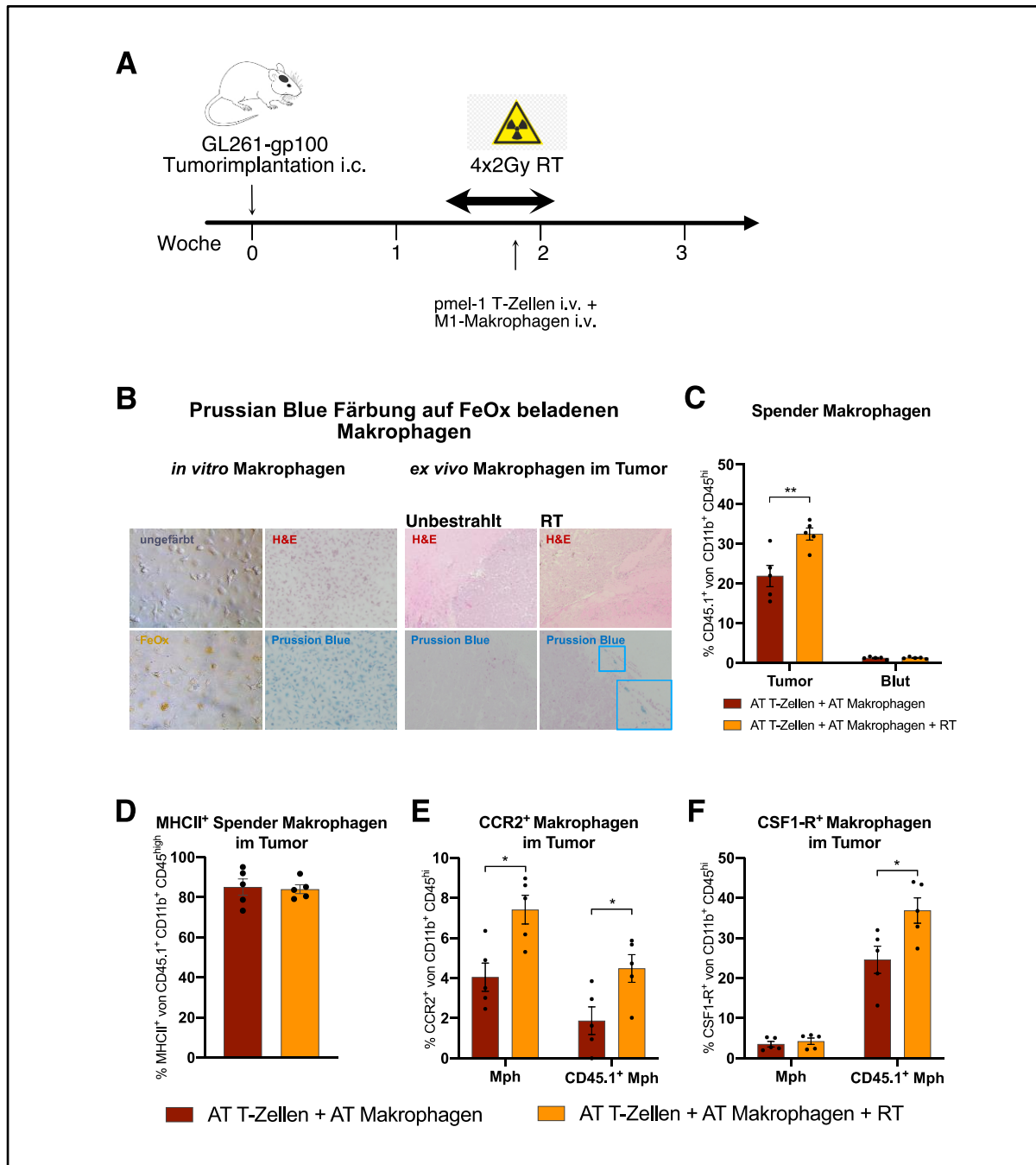


**Abbildung 21. Einfluss der lokalen Tumorbestrahlung auf myeloide Zellen im Tumor.** Vergleich der Makrophagen und myeloiden Zellen im Tumor ohne Behandlung (Unbehandelt) und nach lokaler Tumorbestrahlung (RT). (A) Repräsentative Bilder von Immunfluoreszenzfärbungen auf Iba1<sup>+</sup> Makrophagen und Mikroglia im Tumor. (B)-(C) Durchflusszytometrische Analysen der CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>hi</sup> Makrophagen (B) und CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>med</sup> Mikroglia (C) im Tumor (n=4-6). Alle Daten sind als Mittelwert ± Standardfehler (± SEM) dargestellt.

Zur gezielten Bestimmung des Einflusses einer lokalen Bestrahlung auf die Rekrutierung von M1-polarisierten Makrophagen zum Tumor wurden *in vitro* generierte M1-polarisierte Makrophagen aus C57BL6J/Ly5.1 Mäusen adoptiv transferiert (Abb. 22A). Vor dem adoptivem Transfer wurden die M1-Makrophagen mit Ferrumoxytol *in vitro* beladen. Dies ermöglichte die *ex vivo* immunhistochemische Darstellung der transferierten Makrophagen (Abb. 22B). Mittels Durchflusszytometrie wurden die transferierten Makrophagen anhand ihrer CD45.1-Expression detektiert und von endogenen CD45.2<sup>+</sup> Immunzellen differenziert (Abb. 22C). Der M1-typische Phänotyp der transferierten Makrophagen ließ sich im Tumor anhand der MHC-II Expression bestätigen (Abb. 22D).

Die Infiltration von Makrophagen im Tumor erfolgt unter anderem über Bindung von CCL2 und CSF-1 an die Chemokinrezeptoren CCR2 und CSF-1R auf Makrophagen (Aras and Zaidi, 2017). Die lokale Tumorbestrahlung führte auf endogenen und auf transferierten Makrophagen zu einer erhöhten Expression von CCR2 (Abb. 22E) und exklusiv auf transferierten M1-Makrophagen zu einer verstärkten Expression des CSF1-Rezeptors (Abb. 22F).

Diese Ergebnisse implizieren eine durch lokale Tumorbestrahlung induzierte Rekrutierung von proinflammatorischen Makrophagen zum Tumor. Ein möglicher Mechanismus für diese Rekrutierung ist die Bindung der Chemokine CCL2 und CSF-1 an deren Rezeptoren auf den Makrophagen.



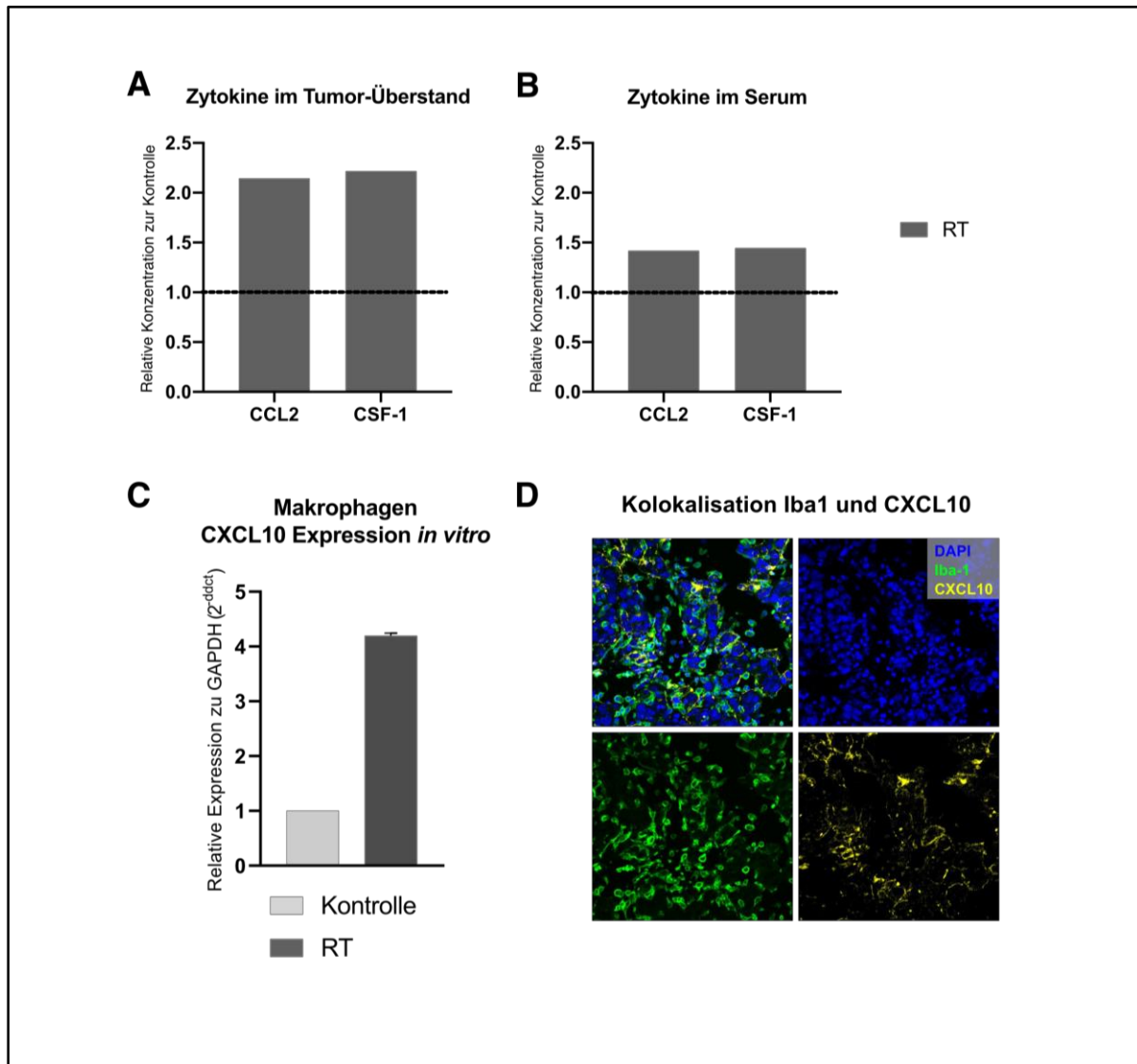
**Abbildung 22. Einfluss der lokalen Tumorbestrahlung auf die Rekrutierung M1-polarisierter Makrophagen zum Tumor.** (A) Therapieschema zur Behandlung GL261-Gliom tragender Mäuse mit intravenösem adoptivem Transfer von M1-polarisierten Makrophagen (M1-Makrophagen i.v.) und adoptivem T-Zell Transfer (pmel-1 T-Zellen i.v.) an Tag 14 nach intrakranieller Tumorimplantation (GL261-gp100 Tumorimplantation i.c.) mit zusätzlicher niedrigdosierter Bestrahlung mit 2Gy an vier aufeinanderfolgenden Tagen (Tag 12-15, 4x2Gy RT). (B) Prussian Blue Färbung FeOx beladener, M1-polarisierter Makrophagen *in vitro* vor adoptivem Transfer und *ex vivo* im Tumorgewebe. Repräsentative Bilder zum Vergleich der Makrophagen im Tumor ohne Behandlung (Unbestrahlt) und nach lokaler Tumorbestrahlung (RT). (C-F) Durchflusszytometrische Analysen von Makrophagen nach adoptivem T-Zell- und Makrophagen-Transfer ohne Bestrahlung (AT T-Zellen + AT Makrophagen) und mit Bestrahlung (AT T-Zellen + AT Makrophagen + RT) (n=5). (C) Anteil der adoptiv transferierten CD45.1<sup>+</sup> Makrophagen an allen Makrophagen im Tumor und im Blut. (D) MHCII Expression auf adoptiv transferierten Makrophagen im Tumor. (E-F) Expression von CCR2 (E) und CSF1-R (F) auf allen Makrophagen und auf adoptiv transferierten CD45.1<sup>+</sup> Makrophagen im Tumor. Alle Daten sind als Mittelwert ± Standardfehler (± SEM) dargestellt.

#### 4.2.2.2 Lokale Tumorbestrahlung fördert die Freisetzung immunaktivierender Zytokine im Tumormikromilieu

Zur weiteren Charakterisierung der strahlenbedingten Veränderungen des Tumormikromilieus wurden Zytokinkonzentrationen im Tumor und im peripheren Blut *in vitro* und *ex vivo* bestimmt. Die lokale Tumorbestrahlung führte zu einem zweifachen Anstieg der Makrophagen-rekrutierenden Chemokine CCL2 und CSF-1 im Tumor-Überstand (Abb. 23A) und zu einem 1.5-fachen Anstieg im peripheren Blut (Abb. 23B).

Nach einer fraktionierten *in vitro* Bestrahlung mit jeweils 2 Gy über vier Tage kam es *in vitro* zu einer erhöhten mRNA Expression von CXCL10 auf Makrophagen (Abb. 23C). Immunfluoreszenzfärbungen bestätigten analog die CXCL10-Expression auf myeloiden Zellen im Tumor durch den Nachweis einer Kolo-kalisation von Iba1 und CXCL10 (Abb. 23D).

Demnach führte die lokale Tumorbestrahlung zur Erhöhung der Makrophagen-rekrutierenden Chemokine CCL2 und CSF-1 im Tumor. Zusätzlich ergeben sich Hinweise für die strahleninduzierte verstärkte Expression des T-Zellen-rekrutierenden Chemokins CXCL10 in der Tumormikroumgebung.



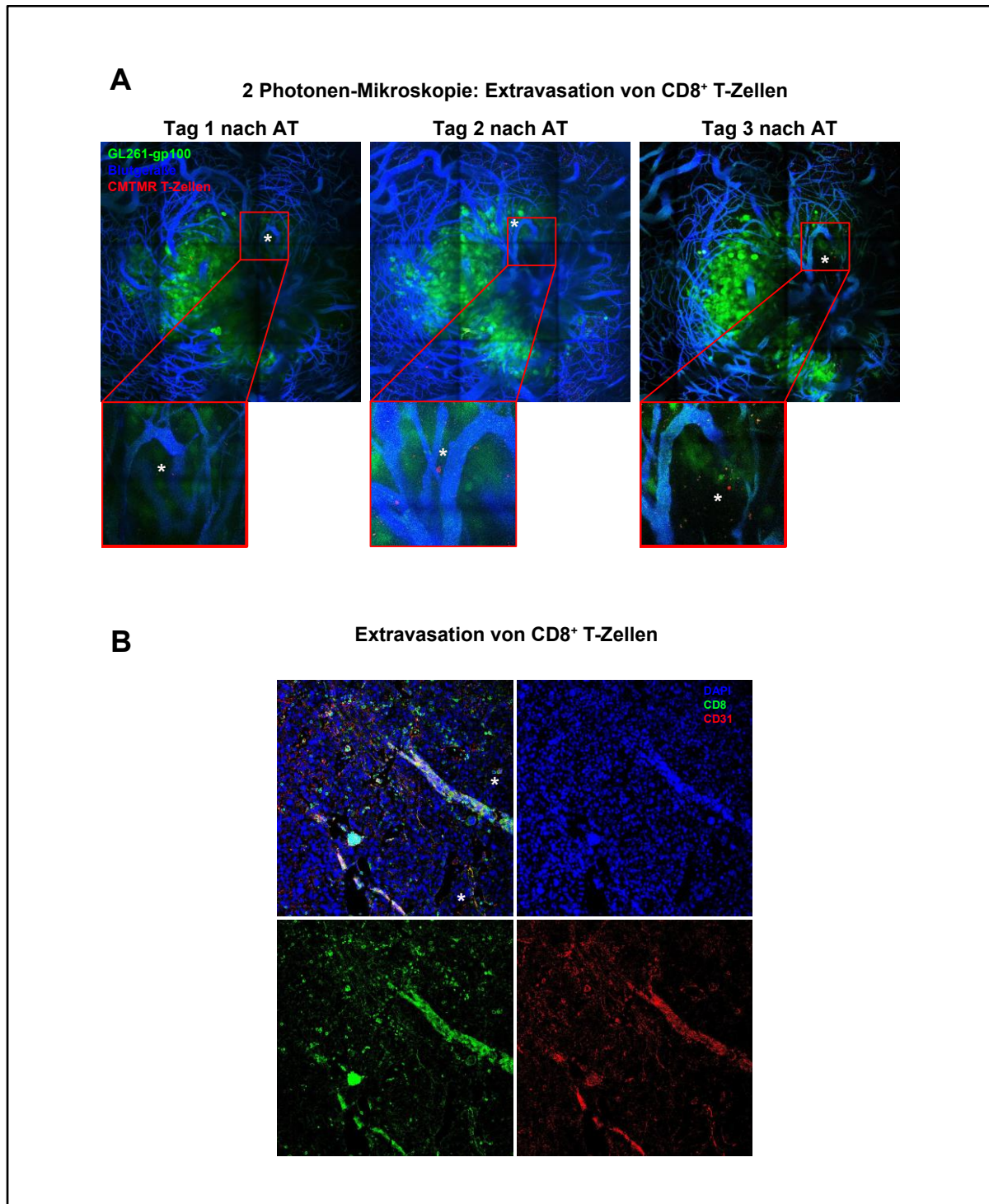
**Abbildung 23. Zytokinsekretion im Tumormikromilieu nach Bestrahlung.** (A-B) CCL2 und CSF-1 Konzentration im Tumor Überstand (A) und im Serum (B) nach Bestrahlung (RT), normalisiert als Faktor der unbestrahlten Kontrollgruppe. (C) qPCR Analyse der CXCL10 mRNA Expression auf unbestrahlten (Kontrolle) und *in vitro* bestrahlten (RT) Makrophagen (BMDM). (D) Immunfluoreszenzfärbung von Iba1 und CXCL10 zur exemplarischen Darstellung der Kolokalisation im GL261-Gliomgewebe.



#### 4.2.3 Einfluss der lokalen Bestrahlung auf das vaskuläre Kompartiment im Tumormikromilieu

##### 4.2.3.1 Lokale Tumorbestrahlung fördert die Extravasation von T-Zellen im Tumormikromilieu

Das vaskuläre Kompartiment gilt als wesentliche Zugangsbarriere für Tumorinfiltrierende Immunzellen. Mit Hilfe von 2-Photonmikroskopie wurden *in vivo* nach lokaler Tumorbestrahlung der Prozess der Extravasation der CD8<sup>+</sup> T-Zellen über mehrere Tage nach adoptivem Transfer im Tumor dargestellt (Abb. 24A). Zur Detektion mittels 2-Photonmikroskopie wurden die *in vitro* generierten gp100-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen vor adoptivem Transfer mit dem fluoreszenten Farbstoff CMTMR gefärbt. Die GL261-gp100 Tumorzellen wurden durch ihre GFP-Expression mit Hilfe der 2-Photonmikroskopie detektiert. Eine Kontrastierung der einwachsenden Gefäße durch den fluoreszenten Farbstoff FITC ermöglichte eine Darstellung der lokalen Beziehung der T-Zellen zu den Gefäßen während der Extravasation. Über drei Tage nach adoptivem Transfer zeigte sich eine Vermehrung der markierten T-Zellen im Tumor. Während in den ersten zwei Tagen nach adoptivem Transfer die meisten T-Zellen noch in oder direkt an den Gefäßen beobachtet wurden, so waren ab dem dritten Tag ein Großteil der T-Zellen außerhalb der Gefäße im Tumor. Die *ex vivo* Immunfluoreszenzfärbung auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen unterstreicht die Lokalisation der T-Zellen im Tumor in unmittelbarer Nähe zu den Gefäßen (Abb. 24B).



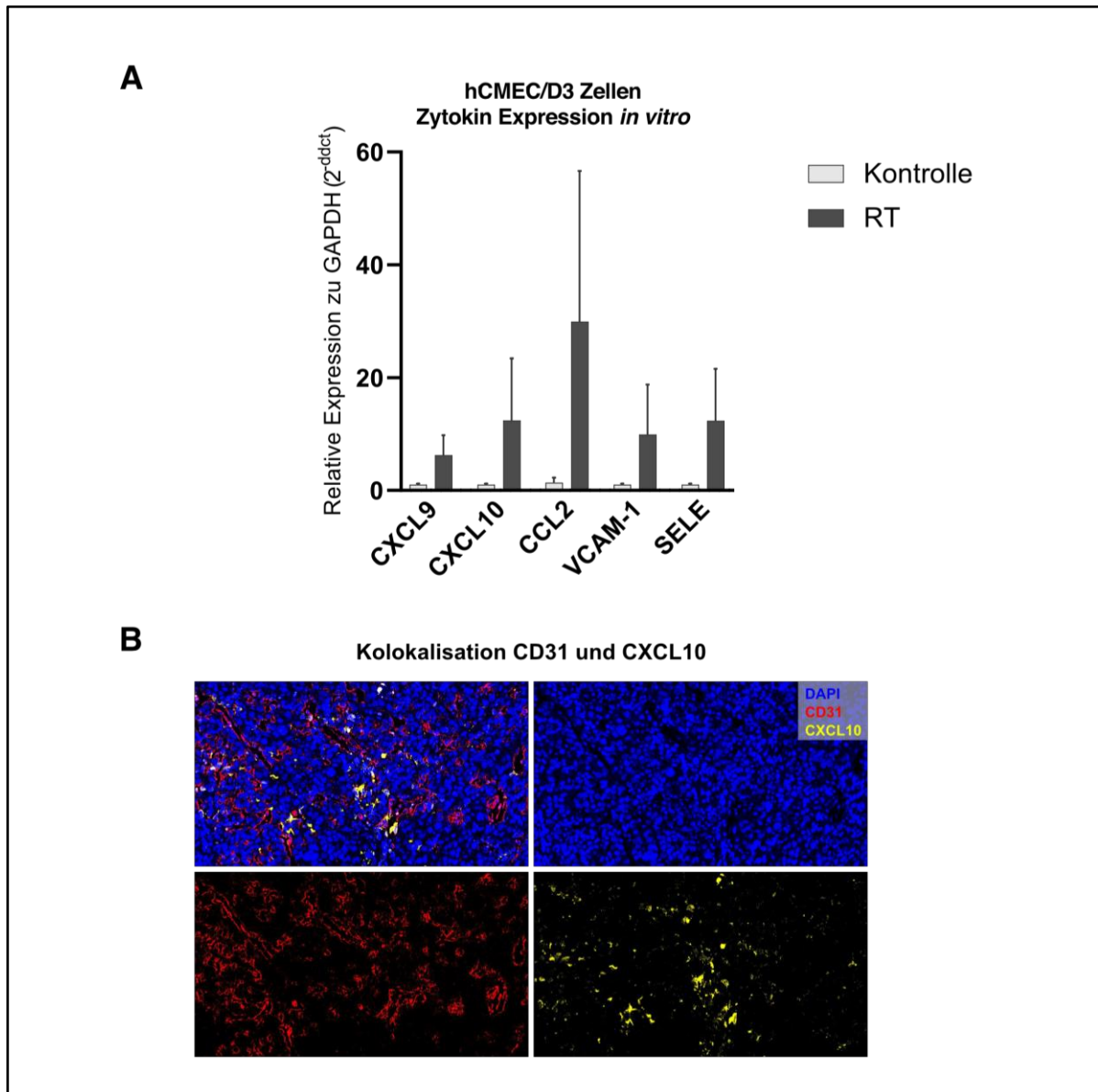
**Abbildung 24. Extravasation antigenspezifischer T-Zellen im Tumor nach lokaler Tumorbestrahlung.** (A) *In vivo* 2 Photon Mikroskopie der Extravasation CMTMR-markierter pmel-1 T-Zellen (\*) im Tumor nach lokaler Bestrahlung. Die Gefäße wurden mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes FITC dargestellt. Die GL261-gp100 Tumorzellen werden durch ihre GFP-Expression dargestellt. Repräsentative Darstellung der pmel-1 T-Zellen im Tumor 1-3 Tage nach adoptivem T-Zell Transfer. (B) Immunfluoreszenzfärbung auf CD8 und CD31 zur exemplarischen Darstellung der T-Zell Extravasation im GL261-Gliomgewebe. (\*) markiert CD8<sup>+</sup> T-Zellen in oder an den CD31<sup>+</sup> Gefäßen.

#### 4.2.3.2 Lokale Tumorbestrahlung verändert das Immunprofil der Endothelzellen

Zur *in vitro* Untersuchung der Veränderung von Endothelzellen nach Bestrahlung wurden humane zerebrale Endothelzellen hCMEC/D3 verwendet. Nach Bestrahlung zeigten sich hierbei eine erhöhte mRNA Expression der T-Zell-rekrutierenden Chemokine CXCL9, CXCL10, des Makrophagen-rekrutierenden Chemokins CCL2 sowie der an der Extravasation beteiligten Endothelzellmarker VCAM-1 und Selectin auf der Endothelzelllinie (Abb. 25A).

Die Immunfluoreszenzfärbung bestätigt *ex vivo* die Expression von CXCL10 auf Endothelzellen durch Kolokalisation von CXCL10 und CD31 im Tumor (Abb. 25B).

Damit zeigen sich sowohl *in vitro* als auch *ex vivo* Hinweise auf eine strahleninduzierte Veränderung des Immunphänotyps der Endothelzellen.



**Abbildung 25. Veränderungen des Immunprofils von Endothelzellen nach Bestrahlung.** (A) qPCR Analysen der Zytokinexpression der unbestrahlten (Kontrolle) und *in vitro* bestrahlten (RT) humanen Hirnendothelzelllinie hCMEC/D3. (B) Immunfluoreszenzfärbung auf CD31 und CXCL10 zur exemplarischen Darstellung der Kolokalisation im GL261-Gliomgewebe.

### 4.3 Diskussion

#### 4.3.1 Wirkungsmechanismen der Immunaktivierung durch lokale Tumorbestrahlung

Die strahleninduzierte Verstärkung der Immunantwort gegen maligne Gliome konnte in verschiedenen präklinischen Arbeiten nachgewiesen werden (Belcaid et al., 2014; Dovedi et al., 2017; Kim et al., 2017; Newcomb et al., 2006; Weiss et al., 2018; Zeng et al., 2013). Diese Arbeit demonstriert verschiedene Mechanismen der strahleninduzierten Immunaktivierung im murinen Gliom-Modell (Abb. 26).

Nach Bestrahlung zeigte sich eine Vermehrung der gp100-spezifischen T-Zellen im gp100-überexprimierenden Gliom, was auf eine gezielte Förderung der *antigenspezifischen* T-Zell basierten Immunantwort durch Bestrahlung hindeutet (Abb. 16C). Hierbei gab es sowohl Hinweise für eine strahleninduzierte verstärkte T-Zell Aktivierung im Tumor (Abb. 16D) als auch für die gezielte Rekrutierung von CXCR3<sup>+</sup> gp100-spezifischen T-Zellen (Abb. 19B). Die Immunsuppression im malignen Gliom bedingt einen erschöpften Phänotyp der T-Zellen im Tumor, welcher durch eine niedrige Sekretion zytotoxischer Zytokine und hohe Expression von T-Zell *Exhaustion*-Markern gekennzeichnet ist (Nduom et al., 2015; Woroniecka et al., 2018). Nach lokaler Tumorbestrahlung wurde eine Verringerung der Expression von T-Zell *Exhaustion*-Markern auf endogenen Tumor-infiltrierenden T-Zellen gezeigt (Abb. 19C-E). Somit konnte die strahleninduzierte T-Zell Aktivierung im malignen Gliom-Modell bestätigt werden (Lai et al., 2019). Die Ausbildung eines antigenspezifischen T-Zell Gedächtnis ist entscheidend für die Aufrechterhaltung einer langfristigen, gegen den Tumor gerichteten Immunantwort (Belcaid et al., 2014; Duikeren et al., 2012). Hierbei können T-Gedächtniszellen in ruhende Zentrale T-Gedächtniszellen und reaktive Effektor T-Gedächtniszellen eingeteilt werden (Sallusto et al., 1999). Unsere Untersuchungen der T-Gedächtniszellen im Tumor und den sekundären lymphatischen Organen geben Hinweise für eine strahleninduzierte Reaktivierung der Zentralen T-Gedächtniszellen zu aktiven Effektor T-Gedächtniszellen, wodurch eine verstärkte aktive Immunantwort gegen den Tumor gefördert wird (Abb. 20D) (Belcaid et al., 2014).

Mit ca. 30-40% aller infiltrierenden Immunzellen im Tumor tragen myeloide Zellen wesentlich zur Immunsuppression im malignen Gliom bei (Hambardzumyan et al., 2016; Pires-Afonso et al., 2020). Die Inhibition der Wirksamkeit von Immuncheckpoint-

Inhibitoren durch immunsuppressive Tumor assoziierte Makrophagen wurde im murinen Gliom-Modell in einer präklinischen Studie von Aslan et al. gezeigt (Aslan et al., 2020). Eine strahleninduzierte Repolarisierung der Tumor-assoziierten Makrophagen zu immunstimulierenden „M1-typischen“ Makrophagen führte in murinen Tumormodellen zur verstärkten T-Zell Rekrutierung und einer verbesserten Tumorkontrolle (Klug et al., 2013; Prakash et al., 2016; Zhang et al., 2019). Dies verdeutlicht die Bedeutung der Makrophagen in der strahlenabhängigen Immunaktivierung im Tumormikromilieu. In dieser Arbeit wurden Makrophagen über Stimulation mit LPS und  $IFN\gamma$  *in vitro* zu proinflammatorischen „M1-typischen“ Makrophagen ausdifferenziert und deren Verhalten nach lokaler Tumorbestrahlung *in vivo* untersucht. Die Ergebnisse zeigen eine verstärkte Rekrutierung der transferierten proinflammatorischen Makrophagen zum Tumor nach lokaler Bestrahlung (Abb. 22C). Die lokale Tumorbestrahlung führte dabei zu einer erhöhten Expression der Chemokinrezeptoren CCR2 und CSF1-R auf transferierten Makrophagen (Abb. 22E, F) und gleichzeitig auch zu einer erhöhten Konzentration der Chemokine CCL2 und CSF-1 im Tumor (Abb. 23A). Dies deutet auf eine strahleninduzierte Verstärkung der chemokinabhängigen Rekrutierung von immunstimulierenden „M1-typischen“ Makrophagen. Die Expression von CXCL10 auf Tumor-infiltrierenden Makrophagen konnte *ex vivo* nachgewiesen werden (Abb. 23D). Desweiteren konnte *in vitro* eine Induktion der CXCL10 Expression nach einer niedrigdosierten Bestrahlung mit 4x2Gy auf zuvor zu M1-polarisierten Makrophagen beobachtet werden (Abb. 23C). Die strahleninduzierte Sekretion von CXCL10 durch Tumor-infiltrierende Makrophagen stellt damit einen möglichen Mechanismus für die verstärkte Rekrutierung CXCR3<sup>+</sup> T-Zellen nach Tumorbestrahlung dar.

Die Vaskularisierung des Tumors ist gekennzeichnet durch die Ausbildung abnormaler Gefäße im Tumormikromilieu. In Anlehnung an die bisher beschriebenen Einflüsse der Bestrahlung auf die immunologische Funktion der Gefäße im Tumormikromilieu wurden die strahlenabhängigen Veränderungen der Endothelzellen und deren Einflüsse auf Tumor-infiltrierende Immunzellen näher untersucht (Kioi et al., 2010). Die vermehrte Lokalisation der CD8<sup>+</sup> T-Zellen an CD31-markierten Gefäßen deutet auf eine Interaktion zwischen zytotoxischen T-Zellen und Tumorgefäßen im Tumor hin (Abb. 24B). Durch die Herunterregulation wichtiger Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1, VCAM-1 und Selectin verhindern Endothelzellen der aberranten Gefäße die

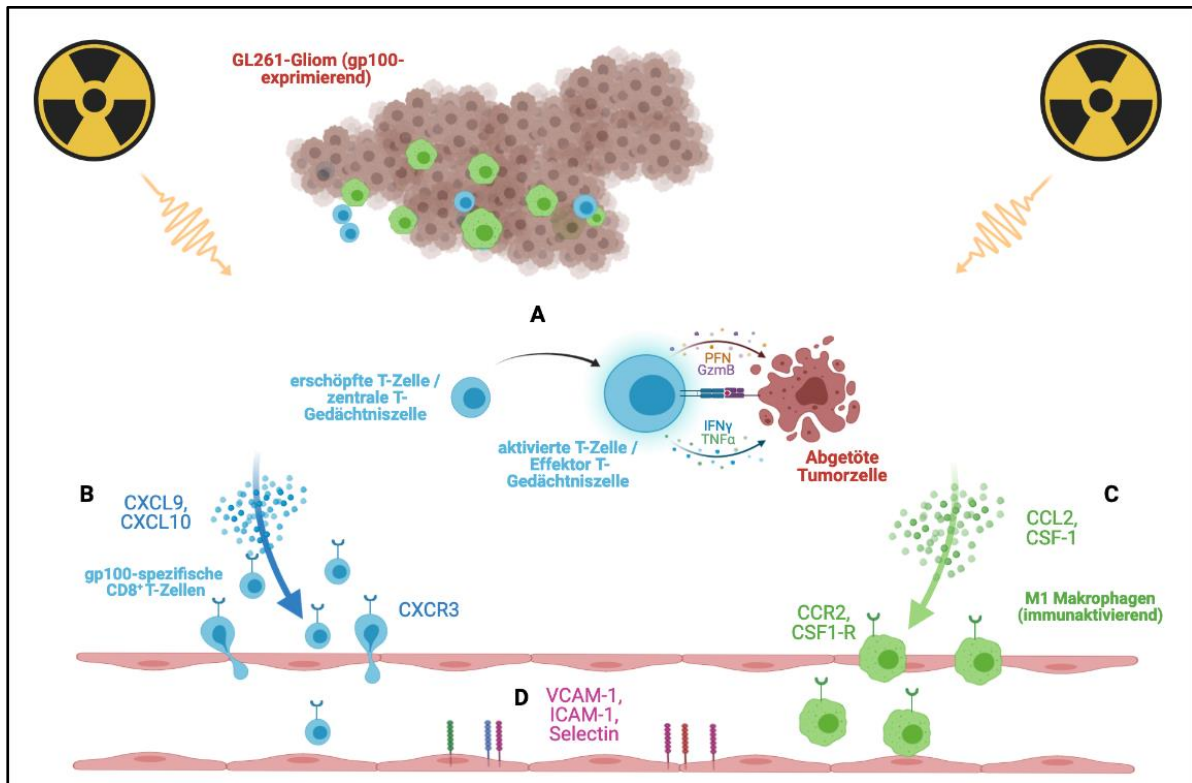
Extravasation Tumor-infiltrierender T-Zellen im Tumor (Buckanovich et al., 2008). Nach *in vitro* Bestrahlung der humanen Endothelzelllinie hCMEC/D3 konnte eine Hochregulation von VCAM-1 und Selectin beobachtet werden (Abb. 25A). Diese könnte die Extravasation infiltrierender T-Zellen im Tumor nach einer lokalen Bestrahlung begünstigen. Die vermehrte Expression der T-Zell-rekrutierenden Chemokine CXCL9 und CXCL10 auf Endothelzellen nach *in vitro* Bestrahlung (Abb. 25A) und der Nachweis einer Kolokalisation von CD31 und CXCL10 *ex vivo* (Abb. 25 C) unterstützen die Hypothese einer Endothelzellen-vermittelten T-Zell Rekrutierung nach Tumorbestrahlung. Die erhöhte Expression von CCL2 auf Endothelzellen nach *in vitro* Bestrahlung lässt auf eine mögliche Beteiligung der Endothelzellen an der Rekrutierung CCR2-exprimierender Makrophagen zum Tumormikromilieu nach Bestrahlung schließen (Abb. 22E, 25A).

Zusammenfassend demonstrieren Ergebnisse dieser Arbeit eine strahlenabhängige Veränderung in verschiedenen Kompartimenten des immunsuppressiven Tumormikromilieus des malignen Glioms. Die Infiltration und Aktivierung der T-Zellen sowie die vermehrte Rekrutierung *in vitro* polarisierter immunstimulierender Makrophagen mit einem M1-Phänotyp nach lokaler Bestrahlung sind Zeichen einer strahleninduzierten Umwandlung des immunsuppressiven Tumormikromilieus hin zu einem immunaktiven Tumormikromilieu, was wiederum die zytotoxische T-Zell Aktivität fördert (Abb. 26A). Mechanistisch ergeben sich Hinweise für eine strahleninduzierte vermehrte Sekretion der T-Zell rekrutierenden Chemokine CXCL9 und CXCL10 (Abb. 26B) sowie der Makrophagen rekrutierenden Chemokine CCL2 und CSF-1 (Abb. 26C). Eine Blockierung dieser Chemokin-vermittelten Rekrutierung über den Einsatz von Chemokin-gerichteten Antikörpern oder gezieltem Ausschalten (Knockout) der Chemokin-Gene ist notwendig, um die funktionelle Relevanz dieser Mechanismen für die strahleninduzierte Immunaktivierung nachzuweisen. Die Arbeit liefert zudem Hinweise für strahlenbedingte Veränderungen der Gefäße von Tumoren im zentralen Nervensystem, welche die Entstehung und Aufrechterhaltung der zellulären Immunantwort unterstützen (Abb. 26D).

Der Nachweis einer synergistischen Wirksamkeit von Strahlentherapie und Immuntherapie im präklinischen Gliom-Modell bildet die Grundlage für den Einsatz von Radioimmuntherapien in der Behandlung maligner Gliome. Die Aufklärung

mechanistischer Hintergründe für eine Immunaktivierung nach lokaler Tumorbestrahlung bietet hierbei neue Angriffspunkte für zielgerichtete Therapien zur Verbesserung einer strahleninduzierten Immunantwort.





**Abbildung 26. Veränderung des Tumormikromilieus nach lokaler Tumorbestrahlung** (Abbildung erstellt auf [www.biorender.com](http://www.biorender.com))

Durch die lokale Tumorbestrahlung maligner Gliome kommt es zur Immunaktivierung im Tumormikromilieu. (A) Die lokale Tumorbestrahlung führt zur T-Zell Aktivierung. Sowohl eine verringerte Expression der *Exhaustion*-Marker als auch eine erhöhte Expression und Sekretion der T-Zell Aktivierungsmarker werden beobachtet. Zusätzlich kommt es zur Reaktivierung der ruhenden Zentralen T-Gedächtniszellen zu aktiven Effektor T-Gedächtniszellen. (B) Die lokale Tumorbestrahlung führt zur Freisetzung T-Zell rekrutierender Chemokine (CXCL9, CXCL10) im Tumormikromilieu und damit zur Rekrutierung CXCR3<sup>+</sup> gp100-spezifischer T-Zellen. (C) Die erhöhte Freisetzung Makrophagen-rekrutierender Chemokine CCL2, CSF-1 lockt Makrophagen in das Tumormikromilieu. Hierbei konnte nach lokaler Tumorbestrahlung eine gezielte Rekrutierung proinflammatorischer M1-typischer Makrophagen beobachtet werden. (D) Die lokale Tumorbestrahlung erhöht die Expression der Adhäsions-Moleküle VCAM-1, ICAM-1 und Selectin auf Endothelzellen, wodurch die Extravasation der T-Zellen gefördert wird.

#### 4.3.2 Klinische Perspektiven für den Einsatz einer lokale Tumorbestrahlung zur Verstärkung von Immuntherapien gegen maligne Gliome

Bisherige klinische Phase 3 Studien wiesen keinen Vorteil der Immuntherapie gegenüber der Standardtherapie bei malignen Gliomen nach (Mende et al., 2021). Die Hinzunahme additiver Therapien zur Verstärkung einer Immunantwort bietet hierbei einen vielversprechenden Ansatz zur Verbesserung der Wirksamkeit von Immuntherapien für maligne Gliome.

Basierend auf dem Nachweis einer synergistischen Wirksamkeit von Bestrahlung und Immuntherapien in präklinischen Modellen wird die Kombination aus Bestrahlung und Immuntherapie an verschiedenen Tumorentitäten in klinischen Phase 1 Studien untersucht (Papadopoulos et al., 2020). Hierbei stehen neben der therapeutischen Wirksamkeit auch die Entwicklung optimaler Therapieschemata in Hinblick auf Dosierung, Fraktionierung und Zeitpunkten im Fokus.

Erste Ergebnisse aus klinischen Phase 1 Studien, welche die Kombinationstherapie aus Immuntherapien wie Immuncheckpoint-Inhibitoren oder IDO-Inhibitoren und Bestrahlung bei Glioblastom-Patienten im Rezidiv testeten, demonstrierten die klinische Anwendbarkeit der Radioimmuntherapie gegen Glioblastome mit einem tolerablen Nebenwirkungsprofil (Sahebjam et al., 2017).

Die Wahl der Dosierung für eine Radioimmuntherapie ist abhängig von der Biologie der jeweiligen Tumorentität und des zugrundeliegenden Mechanismus der Immunaktivierung (Wang et al., 2018). Präklinische Studien konnten zeigen, dass durch verschiedene Bestrahlungsschemata die Aktivierung unterschiedlicher Immunzellpopulationen gefördert wird (Grapin et al., 2019). Beobachtungen der vorliegenden Arbeit empfehlen die Verwendung einer niedrigdosierten Bestrahlung mit 2 Gy über vier aufeinanderfolgenden Tagen zur Verstärkung der Antitumor-Effektivität adoptiv transferierter tumorspezifischer T-Zellen im malignen Gliom. Eine Bestrahlung mit 2 Gy führte in mehreren präklinischen Studien, so wie auch in dieser Arbeit, zu einer Verstärkung der T-Zell basierten Immunantwort. Diese ist unter anderem auf eine Veränderung der Immunaktivität der myeloiden Zellen im Tumormikromilieu zurückzuführen (Klug et al., 2013; Prakash et al., 2016).

Weitere Untersuchungen zur Dosisabhängigkeit des beobachteten synergistischen Effekts aus Radiotherapie und einem adoptiven T-Zell Transfer sind notwendig, um ein optimales Therapieschema mit einer hohen therapeutischen Wirksamkeit und geringen, limitierenden Nebenwirkungen für die klinische Anwendung zu entwickeln.

Diese Arbeit liefert eine weitere präklinische Grundlage für die Hinzunahme der Strahlentherapie zur Verstärkung der Wirksamkeit zellulärer Immuntherapien mit tumorspezifischen T-Zellen. Weitere klinische Studien sind notwendig, um die Anwendbarkeit, Toxizität und Wirksamkeit der Kombinationstherapie aus Bestrahlung und T-Zell Therapien bei Patienten mit malignen Gliomen zu überprüfen und damit eine klinische Translation unserer Ergebnisse für eine Verbesserung der Immuntherapie maligner Gliome zu ermöglichen.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Immuntherapien werden eingesetzt, um die Immunantwort gegen den Tumor zu induzieren bzw. zu verstärken. Im Mikromilieu solider Tumore wirken verschiedene zelluläre und nicht-zelluläre immunsuppressive Mechanismen, welche den Ablauf einer Immunreaktion gegen den Tumor hemmen. Abhängig von der bestehenden Immunaktivität im Tumormikromilieu werden Tumore auf einer Bandbreite zwischen „heißen“ immunaktiven und „kalten“ immuninaktiven Tumoren eingeteilt. In dieser Doktorarbeit werden kombinierte zelluläre Immuntherapien jeweils in einem Modell eines „heißen“ und eines „kalten“ Tumors untersucht.

Das Melanom zählt mit einer hohen Anzahl an Tumorantigenen, einer hohen Immunzellinfiltration sowie dem Vorhandensein spontaner Immunantworten im Tumormikromilieu zu den „heißen“ immunaktiven Tumoren. Im ersten Abschnitt dieser Arbeit wurde die Kombinationstherapie aus einer DC-Vakzinierung und einem adoptiven T-Zell Transfer in einem murinen Melanom-Modell untersucht. Diese Kombinationstherapie setzt sowohl an der Antigenpräsentation durch DCs im Tumormikromilieu als auch an der spezifisch gegen den Tumor gerichteten T-Zell Antwort an. Der Fokus wurde hierbei auf die Rolle der DC-Migration für die Induktion einer effektiven T-Zell Antwort gelegt. In Modellen der autoimmunen Entzündung wurde gezeigt, dass die DC-Migration von der Expression des Aktin-assoziierten Proteins Arc/Arg3.1 abhängt und die fehlende Arc/Arg3.1-Expression zu einer verminderten Entzündungsantwort mit reduzierter T-Zell basierter Immunantwort führt. Diese Arbeit liefert analog dazu Hinweise für eine entscheidende Rolle der Arc/Arg3.1-abhängigen DC-Migration für die Induktion einer effektiven, tumorspezifischen T-Zell Antwort. Die Vakzinierung Arc/Arg3.1-exprimierender DCs führte zu einer erhöhten Anzahl injizierter DCs im Tumor und zu einer Zunahme der Rekrutierung adoptiv transferierter tumorspezifischer T-Zellen zum Tumor und zu den Tumor-drainierenden Lymphknoten. Dieser Effekt konnte durch eine retroviral induzierte Überexpression von Arc/Arg3.1 in DCs verstärkt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen die Relevanz der migratorischen Aktivität dendritischer Zellen für die T-Zell basierte Immunantwort nach DC-Vakzinierung und bieten therapeutische Ansatzpunkte zur Induktion der DC-Migration mit dem Ziel einer verbesserten Wirksamkeit einer DC-Vakzinierung.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss einer lokalen Tumorbestrahlung auf die einzelnen Kompartimente des Tumormikromilieus maligner Gliome untersucht. Das maligne Gliom zählt zu den „kalten“ immunsuppressiven Tumoren. Vorarbeiten zeigten einen synergistischen therapeutischen Effekt einer lokalen Tumorbestrahlung und einer antigenspezifischen Peptidvakzinierung. Hierbei kam es nach lokaler Tumorbestrahlung zu einer verstärkten Rekrutierung und Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen. Zusätzlich wurde auch eine Rekrutierung M1-polarisierter Makrophagen zum Tumor beobachtet. Diese verstärkte Immunzellinfiltration im Tumor ist vermutlich auf eine strahlenbedingte erhöhte Sekretion von Chemokinen wie CXCL9, CXCL10 für die Rekrutierung von CXCR3<sup>+</sup> T-Zellen und CCL2, CSF-1 für die Rekrutierung von CCR2<sup>+</sup> und CSF-1R<sup>+</sup> Makrophagen zurückzuführen. Als mögliche Quellen der Chemokinsekretion wurden sowohl CXCL10-exprimierende Makrophagen als auch CCL2-exprimierende Endothelzellen im Tumor identifiziert. Auf Endothelzellen führte die lokale Tumorbestrahlung zusätzlich zur erhöhten Expression der Adhäsionsmoleküle VCAM-1 und Selectin, welche entscheidend für die Extravasation tumorinfiltrierender T-Zellen sind. Die Ergebnisse dieses Abschnitts bieten eine präklinische Rationale für den klinischen Einsatz einer Kombinationstherapie aus Radiotherapie und Immuntherapie für die Behandlung maligner Gliome. Die mechanistische Entschlüsselung der strahleninduzierten, CXCL10 und CCL2 abhängigen Rekrutierung von Immunzellen bietet neue therapeutische Angriffspunkte für eine effektivere Immuntherapie.

Die Kombination einzelner Immuntherapien oder eine Kombination aus Immuntherapie und konventioneller Tumorthherapie verstärkt die Effektivität einer Monotherapie durch den gleichzeitigen Angriff mehrerer Mechanismen der Immunantwort. Diese Arbeit demonstriert an zwei unterschiedlichen Tumormodellen, wie durch den Einsatz verschiedener Therapiemodalitäten in Kombination die Immunantwort verstärkt bzw. die Immunsuppression im Tumormikromilieu aufgehoben wird. Die dabei dargestellten Mechanismen einer verstärkten Immunantwort bieten therapeutische Angriffspunkte für die Entwicklung weiterer kombinierter Immuntherapien.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

Ahmed, N., Salsman, V.S., Kew, Y., Shaffer, D., Powell, S., Zhang, Y.J., Grossman, R.G., Heslop, H.E., and Gottschalk, S. (2010). HER2-Specific T Cells Target Primary Glioblastoma Stem Cells and Induce Regression of Autologous Experimental Tumors. *Clin. Cancer Res.* *16*, 474–485.

Ahmed, N., Brawley, V., Hegde, M., Bielanowicz, K., Kalra, M., Landi, D., Robertson, C., Gray, T.L., Diouf, O., Wakefield, A., et al. (2017). HER2-Specific Chimeric Antigen Receptor–Modified Virus-Specific T Cells for Progressive Glioblastoma: A Phase 1 Dose-Escalation Trial. *JAMA Oncol.* *3*, 1094.

Anguille, S., Smits, E.L., Lion, E., van Tendeloo, V.F., and Berneman, Z.N. (2014). Clinical use of dendritic cells for cancer therapy. *Lancet Oncol.* *15*, e257–e267.

Aras, S., and Zaidi, M.R. (2017). TAMEless traitors: macrophages in cancer progression and metastasis. *Br. J. Cancer* *117*, 1583–1591.

Aslan, K., Turco, V., Blobner, J., Sonner, J.K., Liuzzi, A.R., Núñez, N.G., Feo, D.D., Kickingereeder, P., Fischer, M., Green, E., et al. (2020). Heterogeneity of response to immune checkpoint blockade in hypermutated experimental gliomas. *Nat. Commun.* *11*, 1–14.

Banchereau, J., and Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* *392*, 245–252.

Barker, C.A., Postow, M.A., Kronenberg, S.A., Ma, J., Yamada, Y., Beal, K., Chan, T.A., Callahan, M.K., and Wolchok, J.D. (2015). Concurrent Radiation Therapy (RT), Ipilimumab (Ipi) and/or Nivolumab (Nivo) on a Phase 1 Clinical Trial. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* *93*, S210–S211.

Barry, K.C., Hsu, J., Broz, M.L., Cueto, F.J., Binnewies, M., Combes, A.J., Nelson, A.E., Loo, K., Kumar, R., Rosenblum, M.D., et al. (2018). A natural killer-dendritic cell axis defines checkpoint therapy-responsive tumor microenvironments. *Nat. Med.* *24*, 1178–1191.

Belcaid, Z., Phallen, J.A., Zeng, J., See, A.P., Mathios, D., Gottschalk, C., Nicholas, S., Kellett, M., Ruzevick, J., Jackson, C., et al. (2014). Focal Radiation Therapy Combined with 4-1BB Activation and CTLA-4 Blockade Yields Long-Term Survival and a Protective Antigen-Specific Memory Response in a Murine Glioma Model. *PLoS ONE* *9*, e101764.

Ben-Shoshan, J., Maysel-Auslender, S., Mor, A., Keren, G., and George, J. (2008). Hypoxia controls CD4+CD25+ regulatory T-cell homeostasis via hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *Eur. J. Immunol.* *38*, 2412–2418.

Boudewijns, S., Bloemendal, M., Gerritsen, W.R., Vries, I.J.M. de, and Schreiber, G. (2016). Dendritic cell vaccination in melanoma patients: From promising results to future perspectives. *Hum. Vaccines Immunother.* *12*, 2523–2528.

Brahmer, J.R., Tykodi, S.S., Chow, L.Q.M., Hwu, W.-J., Topalian, S.L., Hwu, P., Drake, C.G., Camacho, L.H., Kauh, J., Odunsi, K., et al. (2012). Safety and Activity of Anti-PD-L1 Antibody in Patients with Advanced Cancer. *N. Engl. J. Med.* **366**, 2455–2465.

Brown, C.E., Badie, B., Barish, M.E., Weng, L., Ostberg, J.R., Chang, W.-C., Naranjo, A., Starr, R., Wagner, J., Wright, C., et al. (2015). Bioactivity and Safety of IL13R $\alpha$ 2-Redirected Chimeric Antigen Receptor CD8<sup>+</sup> T cells in Patients with Recurrent Glioblastoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **21**, 4062–4072.

Brown, C.E., Alizadeh, D., Starr, R., Weng, L., Wagner, J.R., Naranjo, A., Ostberg, J.R., Blanchard, M.S., Kilpatrick, J., Simpson, J., et al. (2016). Regression of Glioblastoma after Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy. *N. Engl. J. Med.* **375**, 2561–2569.

Broz, M.L., Binnewies, M., Boldajipour, B., Nelson, A.E., Pollack, J.L., Erle, D.J., Barczak, A., Rosenblum, M.D., Daud, A., Barber, D.L., et al. (2014). Dissecting the Tumor Myeloid Compartment Reveals Rare Activating Antigen-Presenting Cells Critical for T Cell Immunity. *Cancer Cell* **26**, 638–652.

Buckanovich, R.J., Facciabene, A., Kim, S., Benencia, F., Sasaroli, D., Balint, K., Katsaros, D., O'Brien-Jenkins, A., Gimotty, P.A., and Coukos, G. (2008). Endothelin B receptor mediates the endothelial barrier to T cell homing to tumors and disables immune therapy. *Nat. Med.* **14**, 28–36.

Burnette, B., Liang, H., Lee, Y., Chlewicki, L., Khodarev, N.N., Weichselbaum, R.R., Fu, Y.-X., and Auh, S.L. (2011). The Efficacy of Radiotherapy Relies Upon Induction of Type I Interferon-Dependent Innate and Adaptive Immunity. *Cancer Res.* **71**, 2488–2496.

Chambers, C.A., Kuhns, M.S., Egen, J.G., and Allison, J.P. (2001). CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 565–594.

Chen, D.S., and Mellman, I. (2013). Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity* **39**, 1–10.

Chen, D.S., and Mellman, I. (2017). Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature* **541**, 321–330.

Chheda, Z.S., Kohanbash, G., Okada, K., Jahan, N., Sidney, J., Pecoraro, M., Yang, X., Carrera, D.A., Downey, K.M., Shrivastav, S., et al. (2018). Novel and shared neoantigen derived from histone 3 variant H3.3K27M mutation for glioma T cell therapy. *J. Exp. Med.* **215**, 141–157.

Coulie, P.G., Van den Eynde, B.J., van der Bruggen, P., and Boon, T. (2014). Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **14**, 135–146.

Demaria, S., Ng, B., Devitt, M.L., Babb, J.S., Kawashima, N., Liebes, L., and Formenti, S.C. (2004). Ionizing radiation inhibition of distant untreated tumors (abscopal effect) is immune mediated. *Int. J. Radiat. Oncol.* **58**, 862–870.

Dovedi, S.J., Cheadle, E.J., Popple, A.L., Poon, E., Morrow, M., Stewart, R., Yusko, E.C., Sanders, C.M., Vignali, M., Emerson, R.O., et al. (2017). Fractionated Radiation Therapy Stimulates Antitumor Immunity Mediated by Both Resident and Infiltrating Polyclonal T-cell Populations when Combined with PD-1 Blockade. *Clin. Cancer Res.* *23*, 5514–5526.

Duikeren, S. van, Fransen, M.F., Redeker, A., Wieles, B., Platenburg, G., Krebber, W.-J., Ossendorp, F., Melief, C.J.M., and Arens, R. (2012). Vaccine-Induced Effector-Memory CD8<sup>+</sup> T Cell Responses Predict Therapeutic Efficacy against Tumors. *J. Immunol.* *189*, 3397–3403.

Edelson, B.T., Kc, W., Juang, R., Kohyama, M., Benoit, L.A., Klekotka, P.A., Moon, C., Albring, J.C., Ise, W., Michael, D.G., et al. (2010). Peripheral CD103<sup>+</sup> dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> conventional dendritic cells. *J. Exp. Med.* *207*, 823–836.

Facciabene, A., Motz, G.T., and Coukos, G. (2012). T Regulatory Cells: Key Players in Tumor Immune Escape and Angiogenesis. *Cancer Res.* *72*, 2162–2171.

Filley, A.C., Henriquez, M., and Dey, M. (2017). Recurrent glioma clinical trial, CheckMate-143: the game is not over yet. *Oncotarget* *8*, 91779–91794.

Formenti, S.C., and Demaria, S. (2013). Combining Radiotherapy and Cancer Immunotherapy: A Paradigm Shift. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* *105*, 256–265.

Franciszkiwicz, K., Boissonnas, A., Boutet, M., Combadière, C., and Mami-Chouaib, F. (2012). Role of chemokines and chemokine receptors in shaping the effector phase of the antitumor immune response. *Cancer Res.* *72*, 6325–6332.

Fujita, M., Zhu, X., Ueda, R., Sasaki, K., Kohanbash, G., Kasthuber, E.R., McDonald, H.A., Gibson, G.A., Watkins, S.C., Muthuswamy, R., et al. (2009). Effective Immunotherapy against Murine Gliomas Using Type 1 Polarizing Dendritic Cells—Significant Roles of CXCL10. *Cancer Res.* *69*, 1587–1595.

Gabrilovich, D. (2004). Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 941–952.

Galon, J., and Bruni, D. (2019). Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies. *Nat. Rev. Drug Discov.* *18*, 197–218.

Gandhi, L., Rodríguez-Abreu, D., Gadgeel, S., Esteban, E., Felip, E., De Angelis, F., Domine, M., Clingan, P., Hochmair, M.J., Powell, S.F., et al. (2018). Pembrolizumab plus Chemotherapy in Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* *378*, 2078–2092.

Ganss, R., Ryschich, E., Klar, E., Arnold, B., and Hämmerling, G.J. (2002). Combination of T-cell therapy and trigger of inflammation induces remodeling of the vasculature and tumor eradication. *Cancer Res.* *62*, 1462–1470.

Gardner, A., and Ruffell, B. (2016). Dendritic Cells and Cancer Immunity. *Trends Immunol.* *37*, 855–865.



Garnett-Benson, C., Hodge, J.W., and Gameiro, S.R. (2015). Combination Regimens of Radiation Therapy and Therapeutic Cancer Vaccines: Mechanisms and Opportunities. *Semin. Radiat. Oncol.* 25, 46–53.

Garris, C.S., Arlauckas, S.P., Kohler, R.H., Trefny, M.P., Garren, S., Piot, C., Engblom, C., Pfirschke, C., Siwicki, M., Gungabeesoon, J., et al. (2018). Successful anti-PD-1 cancer immunotherapy requires T cell-dendritic cell crosstalk involving the cytokines IFN- $\gamma$  and IL-12. *Immunity* 49, 1148-1161.e7.

Ghiringhelli, F., Puig, P.E., Roux, S., Parcellier, A., Schmitt, E., Solary, E., Kroemer, G., Martin, F., Chauffert, B., and Zitvogel, L. (2005). Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF- $\beta$ -secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J. Exp. Med.* 202, 919–929.

Golden, E.B., Demaria, S., Schiff, P.B., Chachoua, A., and Formenti, S.C. (2013). An Abscopal Response to Radiation and Ipilimumab in a Patient with Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Immunol. Res.* 1, 365–372.

Grapin, M., Richard, C., Limagne, E., Boidot, R., Morgand, V., Bertaut, A., Derangere, V., Laurent, P.-A., Thibaudin, M., Fumet, J.D., et al. (2019). Optimized fractionated radiotherapy with anti-PD-L1 and anti-TIGIT: a promising new combination. *J. Immunother. Cancer* 7, 160.

Griffioen, A.W., Damen, C.A., Martinotti, S., Blijham, G.H., and Groenewegen, G. (1996). Endothelial intercellular adhesion molecule-1 expression is suppressed in human malignancies: the role of angiogenic factors. *Cancer Res.* 56, 1111–1117.

Gupta, A., Probst, H.C., Vuong, V., Landshammer, A., Muth, S., Yagita, H., Schwendener, R., Pruschy, M., Knuth, A., and van den Broek, M. (2012). Radiotherapy promotes tumor-specific effector CD8+ T cells via dendritic cell activation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 189, 558–566.

Hallahan, D.E., Spriggs, D.R., Beckett, M.A., Kufe, D.W., and Weichselbaum, R.R. (1989). Increased tumor necrosis factor alpha mRNA after cellular exposure to ionizing radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 10104–10107.

Hambardzumyan, D., Gutmann, D.H., and Kettenmann, H. (2016). The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. *Nat. Neurosci.* 19, 20–27.

Hamid, O., Robert, C., Daud, A., Hodi, F.S., Hwu, W.-J., Kefford, R., Wolchok, J.D., Hersey, P., Joseph, R.W., Weber, J.S., et al. (2018). 5-year survival outcomes in patients (pts) with advanced melanoma treated with pembrolizumab (pembro) in KEYNOTE-001. *J. Clin. Oncol.* 36, 9516–9516.

Haniffa, M., Shin, A., Bigley, V., McGovern, N., Teo, P., See, P., Wasan, P.S., Wang, X.-N., Malinarich, F., Malleret, B., et al. (2012). Human Tissues Contain CD141hi Cross-Presenting Dendritic Cells with Functional Homology to Mouse CD103+ Nonlymphoid Dendritic Cells. *Immunity* 37, 60–73.

Helft, J., Ginhoux, F., Bogunovic, M., and Merad, M. (2010). Origin and functional heterogeneity of non-lymphoid tissue dendritic cells in mice. *Immunol. Rev.* 234, 55–75.

Hildner, K., Edelson, B.T., Purtha, W.E., Diamond, M., Matsushita, H., Kohyama, M., Calderon, B., Schraml, B.U., Unanue, E.R., Diamond, M.S., et al. (2008). *Batf3* deficiency reveals a critical role for CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science* 322, 1097–1100.

Hilf, N., Kuttruff-Coqui, S., Frenzel, K., Bukur, V., Stevanović, S., Gouttefangeas, C., Platten, M., Tabatabai, G., Dutoit, V., van der Burg, S.H., et al. (2019). Actively personalized vaccination trial for newly diagnosed glioblastoma. *Nature* 565, 240–245.

Hodi, F.S., O'Day, S.J., McDermott, D.F., Weber, R.W., Sosman, J.A., Haanen, J.B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J.C., et al. (2010). Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* 363, 711–723.

Hodi, F.S., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., Grob, J.-J., Rutkowski, P., Cowey, C.L., Lao, C.D., Schadendorf, D., Wagstaff, J., Dummer, R., et al. (2018). Nivolumab plus ipilimumab or nivolumab alone versus ipilimumab alone in advanced melanoma (CheckMate 067): 4-year outcomes of a multicentre, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 19, 1480–1492.

Huang, J., Wang, Q.J., Yang, S., Li, Y.F., El-Gamil, M., Rosenberg, S.A., and Robbins, P.F. (2011). Irradiation enhances human T-cell function by upregulating CD70 expression on antigen-presenting cells in vitro. *J. Immunother. Hagerstown Md* 1997 34, 327–335.

Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K., and Honjo, T. (1992). Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.* 11, 3887–3895.

Iwai, Y., Ishida, M., Tanaka, Y., Okazaki, T., Honjo, T., and Minato, N. (2002). Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 12293–12297.

Kale, S., Raja, R., Thorat, D., Soundararajan, G., Patil, T.V., and Kundu, G.C. (2014). Osteopontin signaling upregulates cyclooxygenase-2 expression in tumor-associated macrophages leading to enhanced angiogenesis and melanoma growth via  $\alpha$ 9 $\beta$ 1 integrin. *Oncogene* 33, 2295–2306.

Kandalaft, L.E., Powell, D.J., Chiang, C.L., Tanyi, J., Kim, S., Bosch, M., Montone, K., Mick, R., Levine, B.L., Torigian, D.A., et al. (2013). Autologous lysate-pulsed dendritic cell vaccination followed by adoptive transfer of vaccine-primed ex vivo co-stimulated T cells in recurrent ovarian cancer. *Oncoimmunology* 2, e22664.

Kantoff, P.W., Higano, C.S., Shore, N.D., Berger, E.R., Small, E.J., Penson, D.F., Redfern, C.H., Ferrari, A.C., Dreicer, R., Sims, R.B., et al. (2010). Sipuleucel-T

immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* **363**, 411–422.

Kawakami, Y., Eliyahu, S., Delgado, C.H., Robbins, P.F., Sakaguchi, K., Appella, E., Yannelli, J.R., Adema, G.J., Miki, T., and Rosenberg, S.A. (1994). Identification of a human melanoma antigen recognized by tumor-infiltrating lymphocytes associated with in vivo tumor rejection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 6458–6462.

Kim, J.E., Patel, M.A., Mangraviti, A., Kim, E.S., Theodoros, D., Velarde, E., Liu, A., Sankey, E.W., Tam, A., Xu, H., et al. (2017). Combination Therapy with Anti-PD-1, Anti-TIM-3, and Focal Radiation Results in Regression of Murine Gliomas. *Clin. Cancer Res.* **23**, 124–136.

Kioi, M., Vogel, H., Schultz, G., Hoffman, R.M., Harsh, G.R., and Brown, J.M. (2010). Inhibition of vasculogenesis, but not angiogenesis, prevents the recurrence of glioblastoma after irradiation in mice. *J. Clin. Invest.* **120**, 694–705.

Klug, F., Prakash, H., Huber, P.E., Seibel, T., Bender, N., Halama, N., Pfirschke, C., Voss, R.H., Timke, C., Umansky, L., et al. (2013). Low-dose irradiation programs macrophage differentiation to an iNOS<sup>+</sup>/M1 phenotype that orchestrates effective T cell immunotherapy. *Cancer Cell* **24**, 589–602.

Ko, E.C., Benjamin, K.T., and Formenti, S.C. (2018). Generating antitumor immunity by targeted radiation therapy: Role of dose and fractionation. *Adv. Radiat. Oncol.* **3**, 486–493.

Kochenderfer, J.N., Wilson, W.H., Janik, J.E., Dudley, M.E., Stetler-Stevenson, M., Feldman, S.A., Maric, I., Raffeld, M., Nathan, D.-A.N., Lanier, B.J., et al. (2010). Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19. *Blood* **116**, 4099–4102.

Kreiter, S., Vormehr, M., van de Roemer, N., Diken, M., Löwer, M., Diekmann, J., Boegel, S., Schrörs, B., Vascotto, F., Castle, J.C., et al. (2015). Mutant MHC class II epitopes drive therapeutic immune responses to cancer. *Nature* **520**, 692–696.

Kroemer, G., Galluzzi, L., Kepp, O., and Zitvogel, L. (2013). Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annu. Rev. Immunol.* **31**, 51–72.

Lai, J.-Z., Zhu, Y.-Y., Ruan, M., Chen, L., and Zhang, Q.-Y. (2019). Local Irradiation Sensitized Tumors to Adoptive T Cell Therapy via Enhancing the Cross-Priming, Homing, and Cytotoxicity of Antigen-Specific CD8 T Cells. *Front. Immunol.* **10**, 2857.

Larkin, J., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., Grob, J.J., Cowey, C.L., Lao, C.D., Schadendorf, D., Dummer, R., Smylie, M., Rutkowski, P., et al. (2015). Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **373**, 23–34.

Leach, D.R., Krummel, M.F., and Allison, J.P. (1996). Enhancement of Antitumor Immunity by CTLA-4 Blockade. *Science* **271**, 1734–1736.

Lee, J.B., Ha, S.-J., and Kim, H.R. (2021). Clinical Insights Into Novel Immune Checkpoint Inhibitors. *Front. Pharmacol.* *12*, 1074.

Leonhartsberger, N., Ramoner, R., Falkensammer, C., Rahm, A., Gander, H., Höttl, L., and Thurnher, M. (2012). Quality of life during dendritic cell vaccination against metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Immunol. Immunother. CII* *61*, 1407–1413.

Liang, H., Deng, L., Hou, Y., Meng, X., Huang, X., Rao, E., Zheng, W., Mauceri, H., Mack, M., Xu, M., et al. (2017). Host STING-dependent MDSC mobilization drives extrinsic radiation resistance. *Nat. Commun.* *8*, 1736.

Lim, M., Xia, Y., Bettegowda, C., and Weller, M. (2018). Current state of immunotherapy for glioblastoma. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *15*, 422–442.

Lou, Y., Wang, G., Lizée, G., Kim, G.J., Finkelstein, S.E., Feng, C., Restifo, N.P., and Hwu, P. (2004). Dendritic cells strongly boost the antitumor activity of adoptively transferred T cells in vivo. *Cancer Res.* *64*, 6783–6790.

Louis, D.N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W.K., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Kleihues, P., and Ellison, D.W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *131*, 803–820.

Louis, D.N., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D.J., Cree, I.A., Figarella-Branger, D., Hawkins, C., Ng, H.K., Pfister, S.M., Reifenberger, G., et al. (2021). The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro-Oncol.* *23*, 1231–1251.

Lugade, A.A., Sorensen, E.W., Gerber, S.A., Moran, J.P., Frelinger, J.G., and Lord, E.M. (2008). Radiation-induced IFN-gamma production within the tumor microenvironment influences antitumor immunity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *180*, 3132–3139.

Maher, J., Brentjens, R.J., Gunset, G., Rivière, I., and Sadelain, M. (2002). Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCRzeta /CD28 receptor. *Nat. Biotechnol.* *20*, 70–75.

Maio, M., Grob, J.-J., Aamdal, S., Bondarenko, I., Robert, C., Thomas, L., Garbe, C., Chiarion-Sileni, V., Testori, A., Chen, T.-T., et al. (2015). Five-year survival rates for treatment-naïve patients with advanced melanoma who received ipilimumab plus dacarbazine in a phase III trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *33*, 1191–1196.

Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., and Sica, A. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* *23*, 549–555.

Mayordomo, J.I., Zorina, T., Storkus, W.J., Zitvogel, L., Celluzzi, C., Falo, L.D., Melief, C.J., Ildstad, S.T., Kast, W.M., and Deleo, A.B. (1995). Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity. *Nat. Med.* *1*, 1297–1302.

Mellman, I., and Steinman, R.M. (2001). Dendritic Cells: Specialized and Regulated Antigen Processing Machines. *Cell* 106, 255–258.

Mellman, I., Coukos, G., and Dranoff, G. (2011). Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* 480, 480–489.

Mempel, T.R., Henrickson, S.E., and Von Andrian, U.H. (2004). T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* 427, 154–159.

Mende, A.L., Schulte, J.D., Okada, H., and Clarke, J.L. (2021). Current Advances in Immunotherapy for Glioblastoma. *Curr. Oncol. Rep.* 23, 21.

Meng, Y., Efimova, E.V., Hamzeh, K.W., Darga, T.E., Mauceri, H.J., Fu, Y.-X., Kron, S.J., and Weichselbaum, R.R. (2012). Radiation-inducible immunotherapy for cancer: senescent tumor cells as a cancer vaccine. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 20, 1046–1055.

Morgan, R.A., Chinnasamy, N., Abate-Daga, D., Gros, A., Robbins, P.F., Zheng, Z., Dudley, M.E., Feldman, S.A., Yang, J.C., Sherry, R.M., et al. (2013). Cancer regression and neurological toxicity following anti-MAGE-A3 TCR gene therapy. *J. Immunother. Hagerstown Md 1997* 36, 133–151.

Motz, G.T., and Coukos, G. (2013). Deciphering and reversing tumor immune suppression. *Immunity* 39, 61–73.

Motz, G.T., Santoro, S.P., Wang, L.-P., Garrabrant, T., Lastra, R.R., Hagemann, I.S., Lal, P., Feldman, M.D., Benencia, F., and Coukos, G. (2014). Tumor endothelium FasL establishes a selective immune barrier promoting tolerance in tumors. *Nat. Med.* 20, 607–615.

Nduom, E.K., Weller, M., and Heimberger, A.B. (2015). Immunosuppressive mechanisms in glioblastoma. *Neuro-Oncol.* 17, vii9–vii14.

Nestle, F.O., Aljagic, S., Gilliet, M., Sun, Y., Grabbe, S., Dummer, R., Burg, G., and Schadendorf, D. (1998). Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat. Med.* 4, 328–332.

Newcomb, E.W., Demaria, S., Lukyanov, Y., Shao, Y., Schnee, T., Kawashima, N., Lan, L., Dewyngaert, J.K., Zagzag, D., McBride, W.H., et al. (2006). The combination of ionizing radiation and peripheral vaccination produces long-term survival of mice bearing established invasive GL261 gliomas. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 12, 4730–4737.

Nguyen-Pham, T.-N., Lim, M.-S., Nguyen, T.A.T., Lee, Y.-K., Jin, C.-J., Lee, H.J., Hong, C.Y., Ahn, J.-S., Yang, D.-H., Kim, Y.-K., et al. (2011). Type I and II interferons enhance dendritic cell maturation and migration capacity by regulating CD38 and CD74 that have synergistic effects with TLR agonists. *Cell. Mol. Immunol.* 8, 341–347.

Niesel, K., Schulz, M., Anthes, J., Alekseeva, T., Macas, J., Salamero-Boix, A., Möckl, A., Oberwahrenbrock, T., Lohies, M., Stein, S., et al. (2021). The immune suppressive

microenvironment affects efficacy of radio-immunotherapy in brain metastasis. *EMBO Mol. Med.* *n/a*, e13412.

Ochs, K., Ott, M., Bunse, T., Sahm, F., Bunse, L., Deumelandt, K., Sonner, J.K., Keil, M., von Deimling, A., Wick, W., et al. (2017). K27M-mutant histone-3 as a novel target for glioma immunotherapy. *Oncoimmunology* *6*.

Okada, H., Kalinski, P., Ueda, R., Hoji, A., Kohanbash, G., Donegan, T.E., Mintz, A.H., Engh, J.A., Bartlett, D.L., Brown, C.K., et al. (2011). Induction of CD8<sup>+</sup> T-cell responses against novel glioma-associated antigen peptides and clinical activity by vaccinations with  $\alpha$ -type 1 polarized dendritic cells and polyinosinic-polycytidylic acid stabilized by lysine and carboxymethylcellulose in patients with recurrent malignant glioma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *29*, 330–336.

Okada, N., Mori, N., Koretomo, R., Okada, Y., Nakayama, T., Yoshie, O., Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Nakagawa, S., Mayumi, T., et al. (2005). Augmentation of the migratory ability of DC-based vaccine into regional lymph nodes by efficient CCR7 gene transduction. *Gene Ther.* *12*, 129–139.

O'Rourke, D.M., Nasrallah, M.P., Desai, A., Melenhorst, J.J., Mansfield, K., Morrisette, J.J.D., Martinez-Lage, M., Brem, S., Maloney, E., Shen, A., et al. (2017). A single dose of peripherally infused EGFRvIII-directed CAR T cells mediates antigen loss and induces adaptive resistance in patients with recurrent glioblastoma. *Sci. Transl. Med.* *9*.

Overwijk, W.W., and Restifo, N.P. (2000). B16 as a Mouse Model for Human Melanoma. *Curr. Protoc. Immunol.* *39*, 20.1.1-20.1.29.

Overwijk, W.W., Tsung, A., Irvine, K.R., Parkhurst, M.R., Goletz, T.J., Tsung, K., Carroll, M.W., Liu, C., Moss, B., Rosenberg, S.A., et al. (1998). gp100/pmel 17 Is a Murine Tumor Rejection Antigen: Induction of "Self"-reactive, Tumoricidal T Cells Using High-affinity, Altered Peptide Ligand. *J. Exp. Med.* *188*, 277–286.

Overwijk, W.W., Theoret, M.R., Finkelstein, S.E., Surman, D.R., de Jong, L.A., Vyth-Dreese, F.A., DelleMijn, T.A., Antony, P.A., Spiess, P.J., Palmer, D.C., et al. (2003). Tumor Regression and Autoimmunity after Reversal of a Functionally Tolerant State of Self-reactive CD8<sup>+</sup> T Cells. *J. Exp. Med.* *198*, 569–580.

Palucka, A.K., Ueno, H., Connolly, J., Kerneis-Norvell, F., Blanck, J.-P., Johnston, D.A., Fay, J., and Banchereau, J. (2006). Dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells can induce objective clinical responses and MART-1 specific CD8<sup>+</sup> T-cell immunity. *J. Immunother. Hagerstown Md* *1997* *29*, 545–557.

Papadopoulos, K.P., Johnson, M.L., Lockhart, A.C., Moore, K., Falchook, G.S., Formenti, S.C., Naing, A., Carvajal, R.D., Rosen, L.S., Weiss, G.J., et al. (2020). First-In-Human Study of Cemiplimab Alone or In Combination with Radiotherapy and/or Low-dose Cyclophosphamide in Patients with Advanced Malignancies. *Clin. Cancer Res.* *26*, 1025–1033.

Pasquali, S., Hadjinicolaou, A.V., Sileni, V.C., Rossi, C.R., and Mocellin, S. (2018). Systemic treatments for metastatic cutaneous melanoma. *Cochrane Database Syst. Rev.*

Perez, C.R., and De Palma, M. (2019). Engineering dendritic cell vaccines to improve cancer immunotherapy. *Nat. Commun.* 10, 5408.

Pires-Afonso, Y., Niclou, S.P., and Michelucci, A. (2020). Revealing and Harnessing Tumour-Associated Microglia/Macrophage Heterogeneity in Glioblastoma. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 689.

Plath, N., Ohana, O., Dammermann, B., Errington, M.L., Schmitz, D., Gross, C., Mao, X., Engelsberg, A., Mahlke, C., Welzl, H., et al. (2006). Arc/Arg3.1 is essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories. *Neuron* 52, 437–444.

Platten, M., Bunse, L., Wick, A., Bunse, T., Le Cornet, L., Harting, I., Sahm, F., Sanghvi, K., Tan, C.L., Poschke, I., et al. (2021). A vaccine targeting mutant IDH1 in newly diagnosed glioma. *Nature* 592, 463–468.

Porter, D.L., Levine, B.L., Kalos, M., Bagg, A., and June, C.H. (2011). Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 365, 725–733.

Poschke, I., Lövgren, T., Adamson, L., Nyström, M., Andersson, E., Hansson, J., Tell, R., Masucci, G.V., and Kiessling, R. (2014). A phase I clinical trial combining dendritic cell vaccination with adoptive T cell transfer in patients with stage IV melanoma. *Cancer Immunol. Immunother.* 63, 1061–1071.

Prakash, H., Klug, F., Nadella, V., Mazumdar, V., Schmitz-Winnenthal, H., and Umansky, L. (2016). Low doses of gamma irradiation potentially modifies immunosuppressive tumor microenvironment by retuning tumor-associated macrophages: lesson from insulinoma. *Carcinogenesis* 37, 301–313.

Prins, R.M., Odesa, S.K., and Liao, L.M. (2003). Immunotherapeutic targeting of shared melanoma-associated antigens in a murine glioma model. *Cancer Res.* 63, 8487–8491.

Prins, R.M., Shu, C.J., Radu, C.G., Vo, D.D., Khan-Farooqi, H., Soto, H., Yang, M.-Y., Lin, M.-S., Shelly, S., Witte, O.N., et al. (2008). Anti-tumor activity and trafficking of self, tumor-specific T cells against tumors located in the brain. *Cancer Immunol. Immunother.* CII 57, 1279–1289.

Raskov, H., Orhan, A., Christensen, J.P., and Gögenur, I. (2021). Cytotoxic CD8+ T cells in cancer and cancer immunotherapy. *Br. J. Cancer* 124, 359–367.

Reifenberger, G., Wirsching, H.-G., Knobbe-Thomsen, C.B., and Weller, M. (2017). Advances in the molecular genetics of gliomas - implications for classification and therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 14, 434–452.

Reits, E.A., Hodge, J.W., Herberts, C.A., Groothuis, T.A., Chakraborty, M., K.Wansley, E., Camphausen, K., Luiten, R.M., de Ru, A.H., Neijssen, J., et al. (2006). Radiation

modulates the peptide repertoire, enhances MHC class I expression, and induces successful antitumor immunotherapy. *J. Exp. Med.* 203, 1259–1271.

Ribas, A., and Wolchok, J.D. (2018). Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science* 359, 1350–1355.

Rini, B.I., Plimack, E.R., Stus, V., Gafanov, R., Hawkins, R., Nosov, D., Pouliot, F., Alekseev, B., Soulières, D., Melichar, B., et al. (2019). Pembrolizumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 380, 1116–1127.

Roberts, E.W., Broz, M.L., Binnewies, M., Headley, M.B., Nelson, A.E., Wolf, D.M., Kaisho, T., Bogunovic, D., Bhardwaj, N., and Krummel, M.F. (2016). Critical Role for CD103(+)/CD141(+) Dendritic Cells Bearing CCR7 for Tumor Antigen Trafficking and Priming of T Cell Immunity in Melanoma. *Cancer Cell* 30, 324–336.

Rosenberg, S.A. (1997). Cancer vaccines based on the identification of genes encoding cancer regression antigens. *Immunol. Today* 18, 175–182.

Rosenberg, S.A., and Restifo, N.P. (2015). Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science* 348, 62–68.

Rosenberg, S.A., Lotze, M.T., Muul, L.M., Leitman, S., Chang, A.E., Ettinghausen, S.E., Matory, Y.L., Skibber, J.M., Shiloni, E., and Vetto, J.T. (1985). Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N. Engl. J. Med.* 313, 1485–1492.

Rosenberg, S.A., Yang, J.C., Schwartzenuber, D.J., Hwu, P., Marincola, F.M., Topalian, S.L., Restifo, N.P., Dudley, M.E., Schwarz, S.L., Spiess, P.J., et al. (1998). Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat. Med.* 4, 321–327.

Sahebjam, S., Sharabi, A., Lim, M., Kesarwani, P., and Chinnaiyan, P. (2017). Immunotherapy and radiation in glioblastoma. *J. Neurooncol.* 134, 531–539.

Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401, 708–712.

Salmon, H., Idoyaga, J., Rahman, A., Leboeuf, M., Remark, R., Jordan, S., Casanova-Acebes, M., Khudoynazarova, M., Agudo, J., Tung, N., et al. (2016). 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.

Sampson, J.H., Heimberger, A.B., Archer, G.E., Aldape, K.D., Friedman, A.H., Friedman, H.S., Gilbert, M.R., Herndon, J.E., McLendon, R.E., Mitchell, D.A., et al. (2010). Immunologic Escape After Prolonged Progression-Free Survival With Epidermal Growth Factor Receptor Variant III Peptide Vaccination in Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma. *J. Clin. Oncol.* 28, 4722–4729.



Sánchez-Paulete, A.R., Teijeira, A., Cueto, F.J., Garasa, S., Pérez-Gracia, J.L., Sánchez-Arráez, A., Sancho, D., and Melero, I. (2017). Antigen cross-presentation and T-cell cross-priming in cancer immunology and immunotherapy. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* *28*, xii44–xii55.

Sauter, B., Albert, M.L., Francisco, L., Larsson, M., Somersan, S., and Bhardwaj, N. (2000). Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J. Exp. Med.* *191*, 423–434.

Schaaf, M.B., Garg, A.D., and Agostinis, P. (2018). Defining the role of the tumor vasculature in antitumor immunity and immunotherapy. *Cell Death Dis.* *9*, 1–14.

Schuler, G., Schuler-Thurner, B., and Steinman, R.M. (2003). The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. *Curr. Opin. Immunol.* *15*, 138–147.

Schumacher, T., Bunse, L., Pusch, S., Sahm, F., Wiestler, B., Quandt, J., Menn, O., Osswald, M., Oezen, I., Ott, M., et al. (2014). A vaccine targeting mutant IDH1 induces antitumour immunity. *Nature* *512*, 324–327.

Schwartzentruber, D.J., Lawson, D.H., Richards, J.M., Conry, R.M., Miller, D.M., Treisman, J., Gailani, F., Riley, L., Conlon, K., Pockaj, B., et al. (2011). gp100 peptide vaccine and interleukin-2 in patients with advanced melanoma. *N. Engl. J. Med.* *364*, 2119–2127.

Seth, R., Messersmith, H., Kaur, V., Kirkwood, J.M., Kudchadkar, R., McQuade, J.L., Provenzano, A., Swami, U., Weber, J., Alluri, K.C., et al. (2020). Systemic Therapy for Melanoma: ASCO Guideline. *J. Clin. Oncol.* *38*, 3947–3970.

Seyfizadeh, N., Muthuswamy, R., Mitchell, D.A., Nierkens, S., and Seyfizadeh, N. (2016). Migration of dendritic cells to the lymph nodes and its enhancement to drive anti-tumor responses. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* *107*, 100–110.

Sharma, A., Bode, B., Wenger, R.H., Lehmann, K., Sartori, A.A., Moch, H., Knuth, A., Boehmer, L. von, and Broek, M. van den (2011).  $\gamma$ -Radiation promotes immunological recognition of cancer cells through increased expression of cancer-testis antigens in vitro and in vivo. *PLoS One* *6*, e28217.

Sharpe, A.H., and Pauken, K.E. (2018). The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nat. Rev. Immunol.* *18*, 153–167.

Shaverdian, N., Lisberg, A.E., Bornazyan, K., Veruttipong, D., Goldman, J.W., Formenti, S.C., Garon, E.B., and Lee, P. (2017). Previous radiotherapy and the clinical activity and toxicity of pembrolizumab in the treatment of non-small-cell lung cancer: a secondary analysis of the KEYNOTE-001 phase 1 trial. *Lancet Oncol.* *18*, 895–903.

Shrimali, R.K., Yu, Z., Theoret, M.R., Chinnasamy, D., Restifo, N.P., and Rosenberg, S.A. (2010). Antiangiogenic agents can increase lymphocyte infiltration into tumor and enhance the effectiveness of adoptive immunotherapy of cancer. *Cancer Res.* *70*, 6171–6180.

Sittig, S.P., Bakdash, G., Weiden, J., Sköld, A.E., Tel, J., Figdor, C.G., de Vries, I.J.M., and Schreiber, G. (2016). A Comparative Study of the T Cell Stimulatory and Polarizing Capacity of Human Primary Blood Dendritic Cell Subsets. *Mediators Inflamm.* 2016.

Spranger, S., Bao, R., and Gajewski, T.F. (2015). Melanoma-intrinsic  $\beta$ -catenin signalling prevents anti-tumour immunity. *Nature* 523, 231–235.

Spranger, S., Dai, D., Horton, B., and Gajewski, T. (2017). Tumor-residing Batf3 dendritic cells are required for effector T cell trafficking and adoptive T cell therapy. *Cancer Cell* 31, 711–723.e4.

Stessin, A.M., Clausi, M.G., Zhao, Z., Lin, H., Hou, W., Jiang, Z., Duong, T.Q., Tsirka, S.E., and Ryu, S. (2020). Repolarized macrophages, induced by intermediate stereotactic dose radiotherapy and immune checkpoint blockade, contribute to long-term survival in glioma-bearing mice. *J. Neurooncol.* 147, 547–555.

Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J.B., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., et al. (2005). Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 352, 987–996.

Szatmári, T., Lumniczky, K., Désaknai, S., Trajceviski, S., Hídvégi, E.J., Hamada, H., and Sáfrány, G. (2006). Detailed characterization of the mouse glioma 261 tumor model for experimental glioblastoma therapy. *Cancer Sci.* 97, 546–553.

Temizoz, B., Kuroda, E., and Ishii, K.J. (2016). Vaccine adjuvants as potential cancer immunotherapeutics. *Int. Immunol.* 28, 329–338.

Theisen, D.J., Davidson, J.T., Briseño, C.G., Gargaro, M., Lauron, E.J., Wang, Q., Desai, P., Durai, V., Bagadia, P., Brickner, J.R., et al. (2018). WDFY4 is required for cross-presentation in response to viral and tumor antigens. *Science* 362, 694–699.

Tintelnot, J., Ufer, F., Engler, J.B., Winkler, H., Lücke, K., Mittrücker, H.-W., and Friese, M.A. (2019). Arc/Arg3.1 defines dendritic cells and Langerhans cells with superior migratory ability independent of phenotype and ontogeny in mice. *Eur. J. Immunol.* 49, 724–736.

Torphy, R.J., Schulick, R.D., and Zhu, Y. (2017). Newly Emerging Immune Checkpoints: Promises for Future Cancer Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 18.

Tran, E., Ahmadzadeh, M., Lu, Y.-C., Gros, A., Turcotte, S., Robbins, P.F., Gartner, J.J., Zheng, Z., Li, Y.F., Ray, S., et al. (2015). Immunogenicity of somatic mutations in human gastrointestinal cancers. *Science* 350, 1387–1390.

Ufer, F., Vargas, P., Engler, J.B., Tintelnot, J., Schattling, B., Winkler, H., Bauer, S., Kursawe, N., Willing, A., Keminer, O., et al. (2016). Arc/Arg3.1 governs inflammatory dendritic cell migration from the skin and thereby controls T cell activation. *Sci. Immunol.* 1, eaaf8665–eaaf8665.

Vanpouille-Box, C., Alard, A., Aryankalayil, M.J., Sarfraz, Y., Diamond, J.M., Schneider, R.J., Inghirami, G., Coleman, C.N., Formenti, S.C., and Demaria, S. (2017). DNA exonuclease Trex1 regulates radiotherapy-induced tumour immunogenicity. *Nat. Commun.* **8**, 15618.

Veglia, F., and Gabrilovich, D.I. (2017). Dendritic cells in cancer: the role revisited. *Curr. Opin. Immunol.* **45**, 43–51.

Verdijk, P., Aarntzen, E.H.J.G., Lesterhuis, W.J., Boullart, A.C.I., Kok, E., van Rossum, M.M., Strijk, S., Eijckeler, F., Bonenkamp, J.J., Jacobs, J.F.M., et al. (2009). Limited amounts of dendritic cells migrate into the T-cell area of lymph nodes but have high immune activating potential in melanoma patients. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **15**, 2531–2540.

Vicetti Miguel, R.D., Cherpes, T.L., Watson, L.J., and McKenna, K.C. (2010). CTL induction of tumoricidal nitric oxide production by intratumoral macrophages is critical for tumor elimination. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **185**, 6706–6718.

Wang, Y., Deng, W., Li, N., Neri, S., Sharma, A., Jiang, W., and Lin, S.H. (2018). Combining Immunotherapy and Radiotherapy for Cancer Treatment: Current Challenges and Future Directions. *Front. Pharmacol.* **9**, 185.

Wculek, S.K., Amores-Iniesta, J., Conde-Garrosa, R., Khouili, S.C., Melero, I., and Sancho, D. (2019). Effective cancer immunotherapy by natural mouse conventional type-1 dendritic cells bearing dead tumor antigen. *J. Immunother. Cancer* **7**, 100.

Weber, J.S., D'Angelo, S.P., Minor, D., Hodi, F.S., Gutzmer, R., Neyns, B., Hoeller, C., Khushalani, N.I., Miller, W.H., Lao, C.D., et al. (2015). Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **16**, 375–384.

Weiss, T., Weller, M., Guckenberger, M., Sentman, C.L., and Roth, P. (2018). NKG2D-Based CAR T Cells and Radiotherapy Exert Synergistic Efficacy in Glioblastoma. *Cancer Res.* **78**, 1031–1043.

Weller, M., Butowski, N., Tran, D.D., Recht, L.D., Lim, M., Hirte, H., Ashby, L., Mechtler, L., Goldlust, S.A., Iwamoto, F., et al. (2017). Rindopepimut with temozolomide for patients with newly diagnosed, EGFRvIII-expressing glioblastoma (ACT IV): a randomised, double-blind, international phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **18**, 1373–1385.

Worbs, T., Hammerschmidt, S.I., and Förster, R. (2017). Dendritic cell migration in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 30–48.

Woroniecka, K., Chongsathidkiet, P., Rhodin, K., Kemeny, H., Dechant, C., Farber, S.H., Elsamadicy, A.A., Cui, X., Koyama, S., Jackson, C., et al. (2018). T-Cell Exhaustion Signatures Vary with Tumor Type and Are Severe in Glioblastoma. *Clin. Cancer Res.* **24**, 4175–4186.

Yanagi, Y., Yoshikai, Y., Leggett, K., Clark, S.P., Aleksander, I., and Mak, T.W. (1984). A human T cell-specific cDNA clone encodes a protein having extensive homology to immunoglobulin chains. *Nature* *308*, 145–149.

Zeng, J., See, A.P., Phallen, J., Jackson, C.M., Belcaid, Z., Ruzevick, J., Durham, N., Meyer, C., Harris, T.J., Albesiano, E., et al. (2013). Anti-PD-1 Blockade and Stereotactic Radiation Produce Long-Term Survival in Mice With Intracranial Gliomas. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* *86*, 343–349.

Zhang, P., Miska, J., Lee-Chang, C., Rashidi, A., Panek, W.K., An, S., Zannikou, M., Lopez-Rosas, A., Han, Y., Xiao, T., et al. (2019). Therapeutic targeting of tumor-associated myeloid cells synergizes with radiation therapy for glioblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *116*, 23714–23723.

Zhang, S., Chopin, M., and Nutt, S.L. (2021). Type 1 conventional dendritic cells: ontogeny, function, and emerging roles in cancer immunotherapy. *Trends Immunol.*

Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2009). Anticancer immunochemotherapy using adjuvants with direct cytotoxic effects. *J. Clin. Invest.* *119*, 2127–2130.

## 7 EIGENE VERÖFFENTLICHUNG

**Zhang, X.-W.**, Huck, K., Jähne, K., Cichon, F., Sonner, J.K., Ufer, F., Bauer, S., Woo, M.S., Green, E., Lu, K., et al. (2021). Activity-regulated cytoskeleton-associated protein/activity-regulated gene 3.1 (Arc/Arg3.1) enhances dendritic cell vaccination in experimental melanoma. *Oncolimmunology* 10, 1920739.

## 8 LEBENS LAUF

### **Xin Wen Zhang**

Geburtsdatum: 24.01.1995  
Geburtsort: Hamburg  
Adresse: Mühlingstr. 1a  
69121 Heidelberg

### **Beruflicher Werdegang**

02/2021 - jetzt **Assistenzärztin am Nationalen Centrum für Tumorerkrankungen, Universitätsklinikum Heidelberg**

### **Praktisches Jahr**

01/2020 – 09/2020 **Universitätsklinikum Heidelberg** | Praktisches Jahr  
• Abteilungen: Medizinische Onkologie, Hämatologie-Onkologie, Kardiologie, Allgemein- und Viszeralchirurgie

11/2019 – 01/2020 **Shanghai East Hospital, Tongji University, Shanghai, China** | Praktisches Jahr  
• Abteilungen: Viszeralchirurgie

### **Akademische Ausbildung**

10/2017 - jetzt **Promotionsarbeit am Deutschen Krebsforschungszentrum, Heidelberg**  
• Klinische Kooperationseinheit Neuroimmunologie und Hirntumorimmunologie, Doktorvater: Prof. Dr. Michael Platten

10/2013 – 12/2020 **Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg**  
• Medizinstudium  
• Staatsexamen, Note: sehr gut (1,33)

08/2010 – 06/2013 **Internatsschule Schloss Hansenberg, Geisenheim**  
• Oberstufengymnasium für hochbegabte Schüler im Bereich Mathematik, Naturwissenschaften und Wirtschaft  
• Abitur, Note: 1,0

## **Lehrtätigkeiten**

---

- 10/2014 – 11/2019 **Tutor der „Heidelberger Vorklinik Repetitorien“ der medizinischen Fakultät der Universität Heidelberg**
- Tutor im Bereich Chemie, Biochemie, Anatomie und Physiologie für Medizinstudierende vom ersten bis zum vierten Semester
- 03/2017 – 07/2017 **Tutor für das klinische Wahlfach „Virtuelle Radiologie“**
- Tutor für radiologische Diagnostik und Therapien für Medizinstudierende des klinischen Studienabschnitts
- 04/2015 – 07/2017 **Tutor am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Heidelberg**
- Tutor im Histologie-Kurs für Medizinstudierende vom zweiten bis zum vierten Semester

## **Stipendien**

---

- 2018 **Aufnahme im Mildred Scheel Doktorandenprogramm der Deutschen Krebshilfe**
- Stipendium für eine experimentelle medizinische Promotion im Bereich der Krebsforschung
- 2016 **Stipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes**
- Ideelle und finanzielle Förderung für besonders begabte Studenten
- 2011 **Ingrid zu Solms Stipendium**
- Stipendium für hochbegabte Frauen im Bereich Naturwissenschaft

## **Teilnahme an Konferenzen**

---

- 10/2018 **13. EANO Konferenz, Stockholm, Schweden**
- Poster: “Low-dose irradiation increases recruitment and effector function of tumor specific T cells in experimental gliomas”
- 09/2018 **MD Fellowship Symposium der Deutschen Krebshilfe, Bonn**
- Vortrag: “Low-dose irradiation increases recruitment and effector function of tumor specific T cells in experimental gliomas”

## 9 DANKSAGUNG

Diese Dissertation wurde ermöglicht durch die Unterstützung vieler Personen. Hiermit möchte ich einigen Personen meinen besonderen Dank aussprechen.

Zunächst danke ich meinem Doktorvater Prof. Michael Platten sowie meiner Betreuerin Dr. Katharina Sahn für die Überlassung des Themas, die Unterstützung in der Projektkonzeption und die konstruktiven Diskussionen während der Erarbeitung.

Für die tatkräftige Unterstützung im Labor sowie die Beantwortung aller meiner Fragen in der täglichen Arbeit bedanke ich mich bei allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Klinische Kooperationseinheit Neuroimmunologie und Hirntumorimmunologie des DKFZ und der UMM, insbesondere bei Kristine Jähne, Jana Sonner und Katrin Huck.

Zusätzlich möchte ich den Einheiten Lichtmikroskopie und Durchflusszytometrie sowie dem Zentrum für Präklinische Forschung des DKFZ für die technische Unterstützung danken.

Ebenfalls ein großes Dankeschön möchte ich an unsere Kollaborationspartner des Instituts für Neuroimmunologie und Multiple Sklerose der Universitätsklinik Hamburg Eppendorf Prof. Manuel Friese und Dr. Friederike Ufer für die Beratung und Zusammenarbeit bei allen Fragen zur Arc/Arg3.1-abhängigen DC-Migration richten.

Zum Schluss möchte ich von ganzem Herzen meinem Freund Hande Gao, meinem Bruder Xinhao Zhang, meiner Mutter Manmei Nie und meinem Vater Suisheng Zhang danken. Ohne die mentale Unterstützung, die motivierenden Worte bei Schwierigkeiten und den stetigen Beistand in allen Phasen dieser Doktorarbeit wäre ein Gelingen dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Ganz besonders möchte ich zum Abschluss nochmals meinem Vater Suisheng Zhang danken, der mich durch diese Doktorarbeit nicht nur als Vater, sondern auch als persönlicher wissenschaftlicher Mentor begleitete.