

Aus dem Institut für Pathologie  
der Medizinischen Fakultät Mannheim  
(Direktor: Prof. Dr. med. Alexander Marx)

Die Gen- und Proteinexpression immunmodulatorischer  
Oberflächenrezeptoren bei Thymomen und Thymuskarzinomen

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

vorgelegt von  
Fabian Friedrich Franz Lang

aus  
Erlangen  
2021

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd  
Referent: Prof. Dr. med. Alexander Marx

# INHALTSVERZEICHNIS

Seite

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	1
-----------------------------	---

<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>2</b>
---------------------------	----------

1.1 Einführung .....	2
----------------------	---

1.2 Struktur und Funktion des Thymus.....	3
---	---

1.3 Thymome .....	5
-------------------	---

1.4 Thymuskarzinome .....	7
---------------------------	---

1.5 Immuncheckpoints und Ihre Rolle bei der Tumorentstehung.....	8
--	---

1.5.1 B7-Familie.....	10
-----------------------	----

1.5.2 Tumor Nekrose Faktor Superfamilie.....	13
--	----

1.5.3 Adhäsionsmoleküle.....	13
------------------------------	----

1.5.4 Galektin 9 und HLA-G.....	14
---------------------------------	----

1.6 Immuntherapeutische Ansätze in der Therapie von Thymusneoplasien .....	15
--	----

1.7 Ziele der Arbeit .....	17
----------------------------	----

<b>2 MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>18</b>
-------------------------------------	-----------

2.1 Mannheimer Thymus Datenbank .....	18
---------------------------------------	----

2.2 The Cancer Genome Atlas (TCGA).....	18
---	----

2.3 Isolierung von RNA aus Fresh Frozen Tissue.....	18
---	----

2.4 cDNA Synthese .....	19
-------------------------	----

2.5 Quantitative real-time-PCR.....	19
-------------------------------------	----

2.5.1 Primer .....	21
--------------------	----

2.5.2 $2^{-\Delta\Delta CT}$ - Methode.....	21
---	----

2.5.3 Exklusionskriterien.....	22
--------------------------------	----

2.5.4 Statistische Auswertung .....	22
-------------------------------------	----

2.6 Immunhistochemie.....	22
---------------------------	----

2.6.1 Antikörper .....	23
------------------------	----

2.6.2 Färbemethode .....	23
--------------------------	----

2.6.3 Auswertung.....	24
-----------------------	----

2.7 Zellkultur .....	24
----------------------	----

2.7.1 Zelllinien.....	24
-----------------------	----

2.7.2 Isolierung peripher Blutlymphozyten (PBL) .....	25
---	----

2.7.3 Kultivierung von humanen T-Zellen.....	26
--	----

2.7.4 Isolierung und Kultivierung von NK-Zellen .....	26
---	----

2.7.5	Kultivierung und Isolierung von CIK .....	27
2.7.6	Zytotoxizitätstest .....	27
2.7.7	Durchflusszytometrie.....	30
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>31</b>
3.1	Klinische Merkmale des Validierungssets .....	31
3.2	Epithelialer Biomarker Keratin 19 .....	32
3.3	Übersicht der Expressionsdaten des untersuchten Patientenkollektivs .....	33
3.4	Co-inhibitorische Oberflächenmoleküle der B7-Familie .....	33
3.5	ICOSL – Co-stimulatorischer Rezeptor der B7-Familie.....	36
3.6	Tumor Nekrose Faktor (TNF) Superfamilie .....	36
3.7	Adhäsionsmoleküle CD54 und CD56 .....	38
3.8	Galektin 9.....	39
3.9	Histokompatibilitätsantigen HLA-G der MHC-Klasse I .....	39
3.10	Charakterisierung der Genexpression der Thymuskarzinome .....	40
3.11	Korrelation einzelner Gene .....	44
3.12	Immunhistochemie.....	44
3.13	Vergleich der RNA- und Proteinexpression.....	48
3.14	Zelllinie 1889c als Modell für Thymuskarzinome.....	51
3.15	Zytotoxizität der T-Zellen, Natürlichen Killerzellen und Zytokin-induzierten Killerzellen ...	53
3.16	Zytotoxischer Effekt von CIK nach Blockierung von CD54 und CD56 .....	54
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>56</b>
4.1	Hintergrund und Ziele der Arbeit .....	56
4.2	PD-L1 Expression als Biomarker in Thymusneoplasien? .....	57
4.3	Immuntherapie der Zukunft .....	58
4.4	Proteinexpression der Immuncheckpoints als Biomarker .....	60
4.5	Schlüsselmoleküle in der Immuntherapie der Thymusneoplasien .....	61
4.6	Unerwünschte Nebenwirkungen als limitierender Faktor .....	61
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>63</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>64</b>
<b>7</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>68</b>
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>69</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A – A-Thymom

AB – AB-Thymom

APC – Antigenpräsentierende Zellen

B1 – B1-Thymom

B2 – B2-Thymome

B3 – B3-Thymom

CA – Thymuskarzinom

CIK – Zytokin-induzierte Killerzellen

CPS – Combined Positive Score

cTEC – Kortikale Thymusepithelzelle

ICS – Immunzellscore

ICI – Immuncheckpoint-Inhibitor

irAE – Immun-assoziierte Nebenwirkungen

MDSC – Myeloide Suppressorzellen

MG – Myasthenia Gravis

MHC – Haupthistokompatibilitätskomplex

mTEC – Medulläre Thymusepithelzelle

NK – Negativkontrolle

NK-Zellen – Natürliche Killerzellen

PCR – Polymerasekettenreaktion

PFA – Paraformaldehyd

qtRT-PCR – Quantitative real-time Polymerasekettenreaktion

TCR – T-Zellrezeptor

TPS – Tumor Proportion Score

Treg – regulatorische T-Zellen

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Einführung

Der Thymus ist ein Organ im vorderen und oberen Mediastinum und zählt zu den primär lymphatischen Organen. Er ist neben dem Knochenmark für die Reifung und Differenzierung der Lymphozyten verantwortlich und spielt dementsprechend eine wichtige Rolle in der Ausbildung des erworbenen Immunsystems (Scorsetti et al., 2016). Tumore des Thymus in Form von Thymomen und Thymuskarzinomen sind sehr selten und komplex in der Diagnosestellung, Behandlung, Nachsorge und erfordern eine multidisziplinäre Behandlung. Oftmals sind sie mit Autoimmunerkrankungen wie der Myasthenia Gravis (MG) assoziiert. Die für MG charakteristische Muskelschwäche wird durch blockierende IgG Antikörper gegen den nikotinischen Acetylcholinrezeptor an der neuromuskulären Endplatte hervorgerufen (Marx et al., 2010).

Je nach Tumortyp und Ausmaß erfolgt eine möglichst vollständige chirurgische Resektion, Bestrahlung und/oder Chemotherapie. Bei vielen nicht-thymischen Tumoren umfassen moderne Behandlungskonzepte zusätzlich den Einsatz von immunmodulatorischen Therapeutika, die mit Hilfe des körpereigenen Immunsystems zur Tumorbekämpfung beitragen. Dabei werden insbesondere Oberflächenmoleküle, die beim Gesunden zur Aufrechterhaltung des Gleichgewichtes (Homöostase) des Immunsystems dienen und überschießende Immunreaktionen verhindern sollen, gezielt blockiert oder aktiviert. Im Falle von Tumorerkrankungen jedoch verhindern immunmodulatorische Mechanismen, zu denen beispielsweise die Interaktion zwischen PD-L1 und PD1 zählen, eine erfolgreiche Tumorbekämpfung und führen zur Stilllegung (Anergie) immunologisch aktiver Zellen. Dies führt somit zum Überleben entarteter Zellen (Ni and Dong, 2017). Der Einsatz sog. Immuncheckpoint-Inhibitoren, die einer Stilllegung des Immunsystems entgegenwirken sollen, gelten bereits heute als vielversprechender Ansatz onkologischer Therapieverfahren und werden beispielweise für die Therapie von Melanomen eingesetzt (Queirolo et al., 2019).

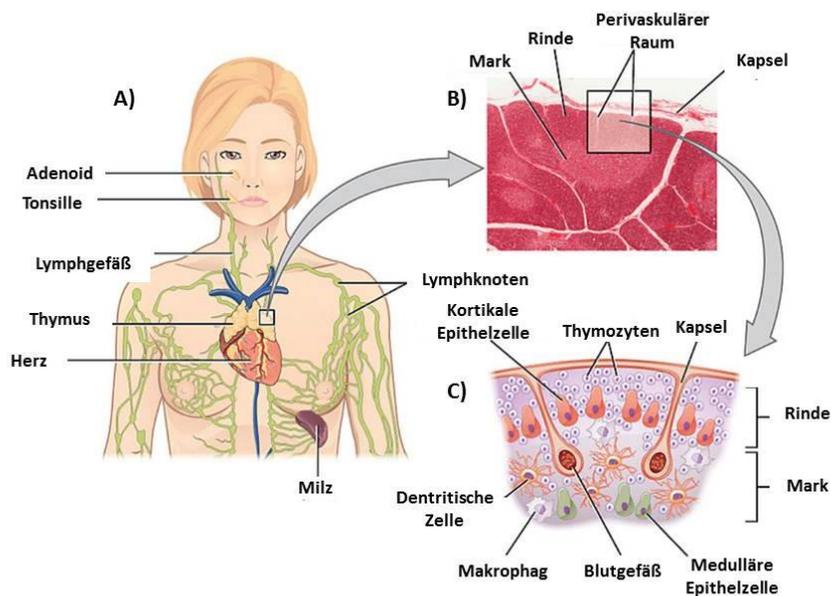
Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung und Charakterisierung solcher immunmodulatorischer Oberflächenrezeptoren bei Thymomen und Thymuskarzinomen. Neben der Anatomie und Histologie des Thymus und der

Charakteristika von Thymomen und Thymuskarzinomen werden im Folgenden die untersuchten Oberflächenmoleküle und der aktuelle wissenschaftliche Erkenntnisstand zum Einsatz von Immuncheckpoints bei Thymomen und Thymuskarzinomen vorgestellt.

## 1.2 Struktur und Funktion des Thymus

Entwicklungsgeschichtlich entstammt der Thymus der dritten und vierten Schlundtasche. Während der Embryonalentwicklung wandert die Thymusanlage nach kaudal und kommt im Thorax hinter dem Brustbein und vor den großen abgehenden Gefäßen des Herzens zum Liegen. Er besteht aus zwei pyramidenförmigen Lappen, die über einen Isthmus miteinander verbunden sind. Umgeben von einer bindegewebigen Kapsel verleihen fibröse Septen dem Thymus eine zusätzliche Läppchenstruktur. Das Parenchym besteht aus einem Netzwerk epithelialer Zellen und gliedert sich in Rinde (Cortex) und Mark (Medulla). Ein drittes Kompartiment, der sog. „perivaskuläre Raum“, wird durch die gefäßreichen Bindegewebssepten gebildet, die sich von der Kapsel ausgehend durch die Rinde bis hin zur Rinden-Mark-Grenze erstrecken (siehe Abb. 1). Als primär lymphatisches Organ ist der Thymus für die Entwicklung und Differenzierung der T-Zellen verantwortlich (Thymopoese), welche mit der Expression verschiedener Oberflächenmerkmale einhergeht. Das gesunde Parenchym liefert hierfür das geeignete Mikromilieu, um immunkompetente aber selbst-tolerante T-Lymphozyten hervorbringen zu können. Vorläuferzellen wandern über das periphere Blut im Bereich der kortiko-medullären Grenze in den Thymus ein, migrieren in die äußere Rinde und bilden auf dem Weg von dort in die Medulla unter Mithilfe zuerst kortikaler (cTECs) und später medullärer Thymusepithelzellen (mTECs) Thymozyten aus, die T-Zellrezeptoren (TCR) an ihrer Oberfläche tragen. Noch in der Rinde werden die TCRs auf ihre Funktionalität überprüft, sodass nur Thymozyten, die die körpereigenen und antigenpräsentierenden MHC-Moleküle erkennen, überleben (positive Selektion). Die sog. negative Selektion findet nachfolgend im Mark statt, indem den positiv selektierten Thymozyten von mTECs und dendritischen Zellen zahlreiche körpereigene Antigene präsentiert werden. Thymozyten, deren TCR eine hohe Affinität zu diesen Auto-Antigenen aufweisen, sterben durch den programmierten Selbsttod (Apoptose). Während der Reifung entwickeln sich die Vorläuferzellen im Kortex über sog. „doppelt-negative“ Thymozyten (d.h. sie

exprimieren weder CD4, CD8 oder TCR an ihrer Oberfläche) zu „doppelt-positiven“ ( $CD4^+ / CD8^+ / TCR^+$ ) und differenzieren sich im Mark entweder zu  $CD4^+ / CD8^-$  T-Zellen oder  $CD4^- / CD8^+$  T-Zellen. Dieser Reifeprozess ist für die Ausbildung einer Immuntoleranz von großer Bedeutung. Darunter versteht man das Ausbleiben bzw. die verminderte Reaktion des Immunsystems gegenüber einem Autoantigen, womit eine autoimmune und damit selbstzerstörende Reaktion verhindert werden kann. Bei veränderter Parenchymarchitektur, wie dies beispielsweise bei epithelialen Thymustumoren der Fall ist, sorgt das veränderte Mikromilieu zur Ausbildung von insuffizienten oder autoreaktiven T-Zellen, wodurch körpereigene Strukturen zerstört werden können. Dies erklärt die zusätzlich zur Tumorerkrankung auftretenden Autoimmunerkrankungen. Ein für die Regulierung autoimmuner Prozesse wichtiger Faktor ist der PD1-Signalweg, der im Kapitel 1.5.1 genauer vorgestellt wird. Wie genau dieser Signalweg die Thymozytenreifung beeinflusst ist noch weitestgehend unbekannt. Ein Fehlen der Signale führt jedoch zu einem Reichtum an doppelt-positiven Thymozyten in der Rinde (Pearse, 2006; Rezzani et al., 2014; Sharpe and Pauken, 2018; Zhao and Rajan, 2019).



**Abbildung 1: Anatomie und Histologie des Thymus: A) Topographie der Lymphatischen Organe. B) Lichtmikroskopische Aufnahme des Thymusgewebes. C) Schematische Darstellung der Binnenstruktur (modifiziert nach Young et al., 2020 (2013))**

### 1.3 Thymome

Thymome sind insgesamt seltene epitheliale Tumore des Thymus, aber unter den Mediastinaltumoren bei Erwachsenen neben Lymphomen häufig. Sie treten überwiegend im Alter von 40 bis 70 Jahren mit einer Inzidenz von ca. 2-4/10<sup>6</sup>/Jahr auf. Beide Geschlechter sind etwa gleichermaßen betroffen. Ursachen der Tumorentstehung sind weitgehend unklar. Charakteristische Genomprofile sowie Mutationen des GTFI2-Gens korrelieren zwar mit dem Tumorsubtyp, allerdings konnten bisher keine prädiktiven Marker auf molekularer Ebene ausgemacht werden (Marx et al., 2016). Symptome treten besonders in fortgeschrittenen Tumorstadien in Form von Brustschmerzen, Husten, Heiserkeit und Luftnot durch das verdrängende Tumorwachstum auf. Als sog. „organotypische“ Neoplasien zeigen Thymome im Gegensatz zu den Karzinomen eine thymusähnliche Differenzierung mit unterschiedlich starker intratumoröser Thymopoese. Wie im vorherigen Kapitel 1.2 erläutert führt eben diese Eigenschaft zur Ausbildung dysfunktionaler Lymphozyten und ist verantwortlich für das Auftreten Thymom-assoziiierter Autoimmunerkrankungen, besonders für MG (Marx et al., 2016). Die Tumorstadien werden nach dem Masaoka-Koga System angegeben, welche durch die International Thymic Malignancy Interest Group (ITMIG) präzisiert in Tabelle 1 dargestellt sind (Detterbeck et al., 2011).

**Tabelle 1: Masaoka-Koga Stadieneinteilung nach ITMIG und 10-Jahresüberlebensraten (nach Detterbeck et al., 2011; Girard et al., 2015)**

<b>Stadium</b>	<b>Kriterien</b>	<b>10-Jahresüberlebensrate</b>
<b>I</b>	Makroskopisch und mikroskopisch komplett abgekapselter Tumor	84%
<b>IIa</b>	Mikroskopische transkapsuläre Invasion	83%
<b>IIb</b>	Makroskopische transkapsuläre Invasion ins mediastinale Fettgewebe oder im Thymus ohne Durchbruch in mediastinale Pleura oder Perikard	
<b>III</b>	Mikroskopisch bestätigte Infiltration der Nachbarorgane (Perikard, Lunge, Pleura, N. phrenicus, N. vagus)	70%
<b>IVa</b>	Pleurale oder perikardiale Metastasierung	42%
<b>IVb</b>	Hämatogene oder lymphogene Metastasierung	53%

Es werden zwei grundlegende Thymomtypen unterschieden: Typ A Thymome mit spindelförmigen oder ovalen Tumorzellen und Typ B Thymome mit dendritischen oder epitheloiden Zellen.

**Typ A Thymome** (kurz A-Thymome genannt) sind epithelzellreiche und lymphozytenarme Tumore mit einer günstigen Prognose und einer 10-Jahresüberlebensrate von 80-100% (Marx et al., 2016), da sich diese gewöhnlich durch niedrige Tumorstadien und geringe Metastasierungsraten auszeichnen (Scorsetti et al., 2016). Das Risiko eines Rezidivs ist entsprechend gering. Generell handelt es sich bei A-Thymomen um einen seltenen Tumor-Subtyp (11,5% aller Thymome). Es werden typische von atypischen A-Thymomen unterschieden. Die atypischen zeigen Zellatypien und ein aggressiveres Wachstum, jedoch wurden für diese Tumorvariante bislang keine Überlebensraten dokumentiert.

Die gemischten **AB-Thymome** sind durch eine Kombination aus thymozytenarmen (wie bei A-Thymomen) und thymozytenreichen (wie bei B1- und B2-Thymomen) Anteilen charakterisiert. AB-Thymome sind mit einem Anteil von 27,5% der häufigste Subtyp (Marx et al., 2016) und weisen ebenso wie A-Thymome und die thymozytenreichen **B1-Thymome** eine gute Prognose (10-Jahres-Überlebensrate > 80 % nach R0-Resektion) mit niedrigen Metastasierungs- und Rezidivwahrscheinlichkeiten (< 3% nach 5 oder 10 Jahren nach R0-Resektion) auf (Travis et al., 2015).

Im Gegensatz zu A-, AB- und B1-Thymomen sind **B2- und B3-Thymome** aggressivere Subtypen mit höheren Rezidivraten (B2 im Stadium III 41% und B3 im Stadium III 20% nach R0-Resektion) und niedrigeren 10-Jahresüberlebensraten (B2: 70-90%; B3: 50-70%). Eine adjuvante Strahlentherapie ist auch bei R0-Resektion für beide Typen prognostisch relevant (Kundel et al., 2007). Während B2-Thymome thymozytenreich sind, sind die epithelreichen B3-Thymome lymphozytenarm. Zudem zeichnen sich B3-Thymome oftmals durch infiltrierendes Wachstum benachbarter Strukturen aus (Marx et al., 2016). Tabelle 2 zeigt eine Zusammenfassung der beschriebenen Thymomsubtypen und ihrer Charakteristika.

**Tabelle 2: Übersicht der histologischen Thymomsubtypen (nach Marx et al., 2016; Travis et al., 2015)**

		<b>Typ A</b>	<b>Typ AB</b>	<b>Typ B1</b>	<b>Typ B2</b>	<b>Typ B3</b>
<b>Häufigkeit (%)</b>		11,5	27,5	17,5	26	16,0
<b>Masaoka-Stadium (%)</b>	I	60	67	50	32	19
	II	31	26	37	29	36
	III	8	6	9	28	27
	IV	1	1	4	8	18
<b>Myasthenia Gravis (%)</b>		17	18	44	54	55
<b>10-Jahresüberleben (%)</b>		80-100	≥ 80	85-100	70-90	50-70

Validierte Prognosefaktoren für das Überleben der Erkrankung sind das Tumorstadium und die radikale chirurgische Resektion. Dementsprechend ist bei allen epithelialen Thymustumoren die vollständige chirurgische Entfernung die entscheidende Therapie. Die Empfehlung einer postoperativen Bestrahlung gilt – unabhängig vom histologischen Subtyp – für die Tumorstadien Masaoka-Koga III und IV sowie nach R1– oder R2-Resektion (Girard et al., 2015).

#### 1.4 Thymuskarzinome

Mit einer Inzidenz von 0,2-0,4/10<sup>6</sup>/Jahr kommen Thymuskarzinome bei Erwachsenen im Vergleich zu Thymomen deutlich seltener, bei Kindern und Jugendlichen jedoch häufiger vor. Von den Thymomen abzugrenzen sind die Thymuskarzinome aufgrund ihrer nicht-organotypischen Histologie, ihres aggressiveren Wachstumsverhaltens und der schwierigeren vollständigen chirurgischen Resektion, so dass Thymuskarzinome insgesamt eine schlechtere Überlebensprognose aufweisen. Solide Fernmetastasen treten in ca. 50% und Lymphknotenmetastasen in 30% der Thymuskarzinome (vgl. 2 % bei Thymomen) auf (Ströbel et al., 2016). Patienten mit einem Thymuskarzinom zeigen deutlich fortgeschrittenere Tumorstadien, die z.T. nur teil-reseziert werden können und unabhängig vom Resektionsstatus (eine) adjuvante Therapie(n) erfordern (Girard et al., 2015). Auch nach totaler Resektion treten häufig Rezidive auf. In Anbetracht der Tumoraggressivität und der schlechten Prognose trotz chirurgischer Intervention wird besonders für fortgeschrittene Stadien eine multidisziplinäre und individualisierte Therapie angestrebt (Scorsetti et al., 2016). Ein Baustein dieser modernen Therapiekonzepte können in Zukunft sog.

Immuntherapeutika sein. Dafür ist die Kenntnis geeigneter Zielstrukturen notwendig, die in den folgenden Abschnitten vorgestellt werden.

### 1.5 Immuncheckpoints und Ihre Rolle bei der Tumorentstehung

Das Immunsystem wird mit Hilfe feinregulierter Mechanismen gesteuert, welche einerseits die Bekämpfung fremder Pathogene fördern und andererseits die Selbsttoleranz gegenüber körpereigenen Antigenen erhalten. Ein hierfür entscheidender Prozess ist die sog. Antigenpräsentation. Speziell ausgebildete Zellen (sog. antigenpräsentierende Zellen APC) wie Dendritische Zellen, Makrophagen oder B-Zellen besitzen die Fähigkeit, körpereigene oder –fremde Antigene zu verarbeiten und über MHC-Moleküle I oder II (Major Histocompatibility Complex) den T-Zellen zu präsentieren. Endogene (also aus dem Inneren der Zelle stammende) Antigene (wie z.B. körpereigene oder auch von Tumorzellen gebildete Selbst-Antigene) werden über MHC-I den CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen angeboten (Cerezo-Wallis and Soengas, 2016). Zur Aktivierung dieser Zell-vermittelten Lyse sind drei Signale der Zellinteraktion nötig (siehe Abb. 2), die folgendermaßen ablaufen:

Die Interaktion der Antigen-präsentierenden Zellen mit dem jeweiligen T-Zell-Rezeptor sorgt für das erste Antigen-spezifische Signal. Das zweite Signal wird entweder über Co-stimulatorische oder Co-inhibitorische Oberflächenezeptoren (sog. Immuncheckpoints; CD40 in Abb. 2) der Zelle vermittelt. Kommt es zur Interaktion mit dem jeweiligen Liganden (CD40L in Abb. 2) wird das entsprechende Signal an die T-Zelle übermittelt. Zusätzlich unterhalten ausgeschüttete Zytokine die Zellinteraktion (Signal 3) (Kambayashi and Laufer, 2014).

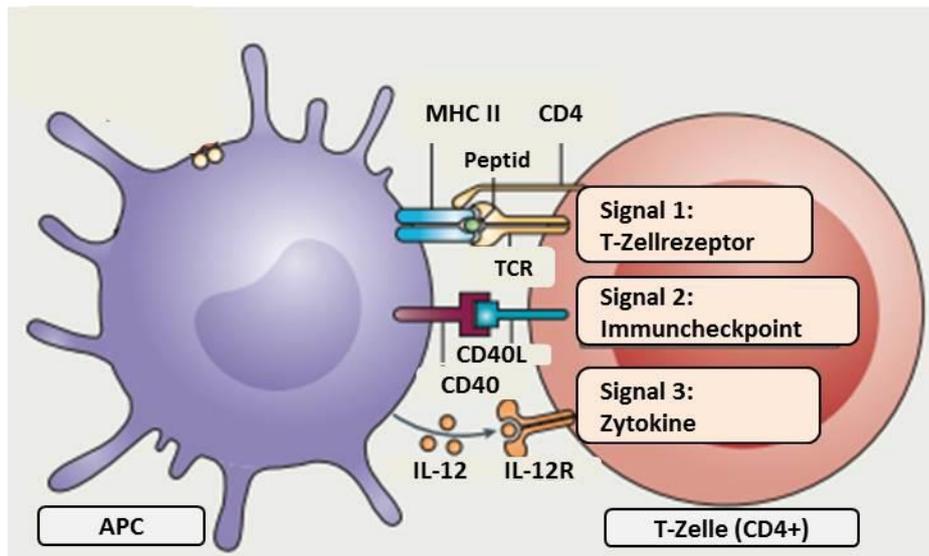


Abbildung 2: Die Signale der Aktivierung der T-Zellen (modifiziert und mit Genehmigung von Kambayashi und Laufer, 2014)

Eine Kerneigenschaft von Tumorzellen besteht insbesondere darin den zytotoxischen Mechanismen zu entgehen und für das Immunsystem unsichtbar zu werden. Dafür haben Sie verschiedene Mechanismen entwickelt, um ein immunsuppressives Milieu herzustellen. 1) durch Sezernierung pro-inflammatorischer Zytokine werden regulatorische T-Zellen (Treg) und Myeloide Supressorzellen (MDSC) in das Tumormilieu rekrutiert, welche die Hemmung der Immunantwort begünstigen. 2) Tumorzellen verlieren ihre Antigenität durch Unterdrückung der MHC-I Expression und Dysregulation antigenpräsentierender Prozesse. 3) die Expression inhibitorischer Immuncheckpoints auf der Zelloberfläche supprimiert die oben geschilderte T-Zell-Aktivierung und verhindert dadurch die T-Zell-vermittelte Zelllyse (Ni and Dong, 2017). Die Blockierung immunsuppressiver Oberflächenmoleküle mittels klinisch erprobter Checkpoint-Inhibitoren kann die oben beschriebene und in Abbildung 3 dargestellte Unterdrückung der T-Zell-Antwort beeinflussen. Dabei erfolgt im Normalfall die T-Zell-Aktivierung über das MHC-Molekül der APC und das stimulierende Signal der CD28-CD80 Interaktion. Die aktive T-Zelle macht sich auf die Suche nach der dieses Antigen exprimierenden Tumorzellen (Abb. 3 A). Die Tumorzelle in B) exprimiert den Liganden PD-L1 des Co-inhibitorischen Immuncheckpoints PD-1 der T-Zelle, wodurch die Zell-vermittelte Lyse der Tumorzelle unterdrückt wird. (C) Mit Hilfe von PD-1 (z.B. Nivolumab) oder PD-L1 (z.B. Pembrolizumab) blockierenden Antikörpern kann die Hemmung aufgehoben und die Tumorzelle für T-Zellen angreifbar gemacht werden (Azevedo et al., 2015).

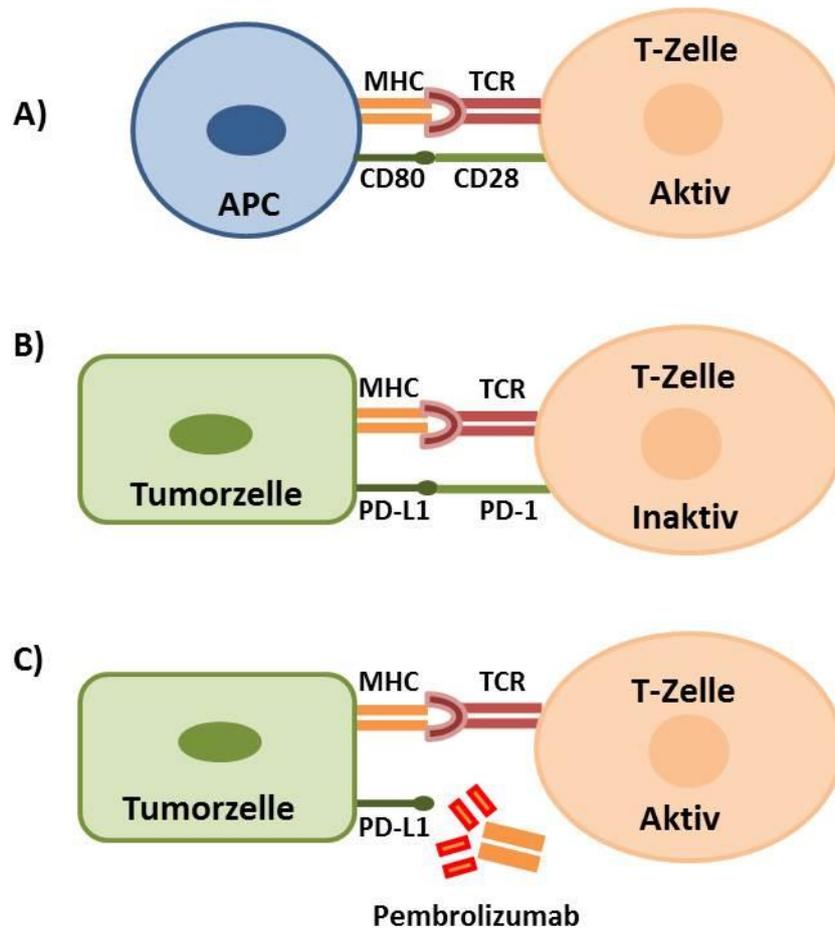


Abbildung 3: Immunologische Checkpoints und Funktionsweise von Checkpoint-Inhibitoren (modifiziert und mit Genehmigung von Azevedo et al., 2015)

### 1.5.1 B7-Familie

PD-L1 gehört zu einer Proteinfamilie immunregulatorischer Oberflächenmoleküle, die T-Zellaktivierung und Toleranzreaktionen vermitteln. Neben PD-L1, gehören der Familie aktuell zehn weitere Mitglieder an: CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), B7DC (PD-L2 bzw. CD273), B7H2 (ICOSL), B7H3 (CD276), B7H4 (B7S1 bzw. VTCN1), B7H5 (VISTA), B7H6 (NCR3LG1) und B7H7 (HLA2).

Abbildung 4 veranschaulicht die im Folgenden beschriebenen stimulatorischen und inhibitorischen Signalwege der B7-Familie und auch anderer Subgruppen.

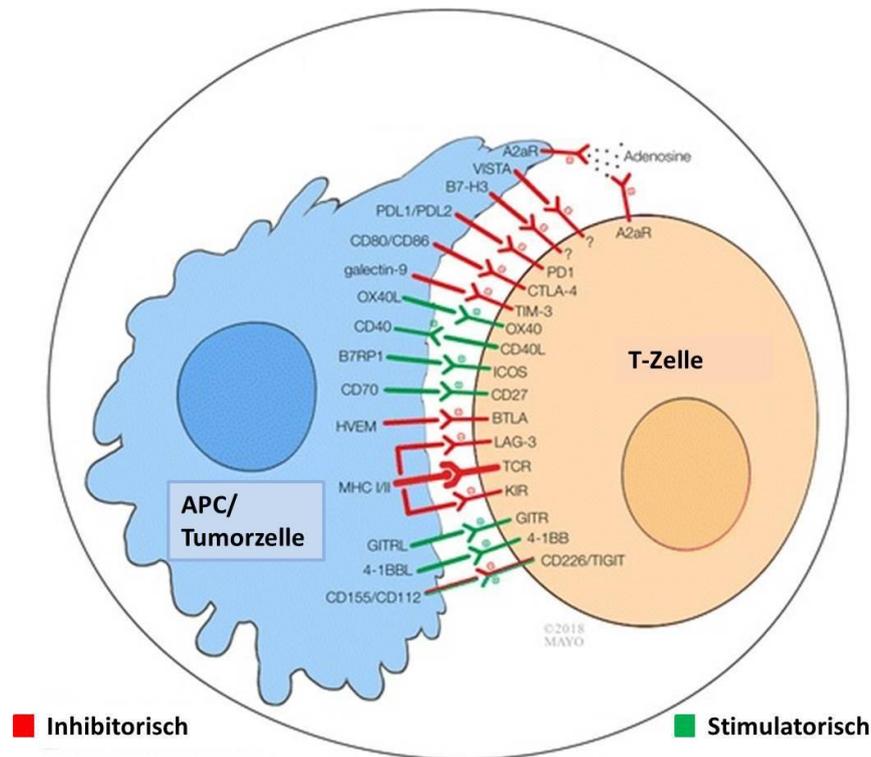


Abbildung 4: In dieser Arbeit untersuchte Signalwege der Interaktion zwischen T-Zellen und Antigen-präsentierenden Zellen (APC) bzw. Tumorzellen (modifiziert nach Marin-Acevedo et al., 2018)

Der 1992 identifizierte Rezeptor namens „Programmed death 1“ **PD-1** (auch CD279) (Ishida et al., 1992) zählt zu den Co-inhibitorischen Immuncheckpoints, welcher auf der Oberfläche von aktivierten T-Zellen, NK-Zellen, B-Zellen und auch APC exprimiert wird. Die PD-1 Expression dient der Eindämmung der Immunreaktion und soll eine überschießende Immunreaktion verhindern. Die Interaktion von PD-1 mit seinen Liganden, **PD-L1 (CD274, B7H1)** und **PD-L2 (CD273, B7DC)** auf beispielsweise APC und auch Tumorzellen (z.B. Nicht-Kleinzelligen Lungenkarzinomen NSCLC oder Nierenzellkarzinomen) verursacht eine Hemmung der T-Zell-Aktivierung (Sun et al., 2018). Dadurch spielt der PD-1-Signalweg eine zentrale Rolle zur Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz, indem er bei der Antigenpräsentation körpereigener Antigene aktivierte T-Zellen inhibiert und gesunde Zellen vor der Selbstzerstörung schützt. So konnte bei Störung dieses Signalweges in Mausmodellen die Ausbildung verschiedener Autoimmunerkrankungen nachgewiesen werden (Sharpe and Pauken, 2018).

Eine PD-L1 Überexpression führt bei Zuständen dauerhafter Antigenpräsentationen wie z.B. bei chronischen Entzündungen oder Tumoren zur sog. „T-Zell-Exhaustion“ (Wherry, 2011). Dieser Zustand – gekennzeichnet durch Erschöpfung und Potenzverlust der T-Effektorzellen sowie durch eine unaufhaltsame Expression

hemmender Rezeptoren wie PD1 – wurde erstmals vor über zwei Jahrzehnten bei chronisch viralen Entzündungen bei Mäusen beschrieben (Gallimore et al., 1998; Zajac et al., 1998) und kann über eine Blockade der PD1-PD-L1 Interaktion aufgehoben werden. Daher liegt nahe, dass eine Inhibierung dieser Achse das Immunsystem aktivieren und somit zur Tumorbekämpfung beitragen kann.

PD-L1 und CTLA-4 gelten als die prominentesten Vertreter der bisher bekannten Immuncheckpoints, für deren Entdeckung und Erforschung den Wissenschaftlern Tasuko Honjo und James Allison 2018 der Medizin-Nobelpreis verliehen worden ist.

Weitere in dieser Arbeit untersuchte Mitglieder der B7-Familie sind das B7 Homolog 3 **B7H3** (auch CD276), **B7H4** (auch B7S1, B7x, VTCN) und **VISTA** (V Domain-Containing Ig Supressor of T-Cell Aktivation, B7H5, PD-1H) die mit Ausnahme von B7H3 ausschließlich inhibierende Signale auslösen und auf Immunzellen (B7H3), hämatopoetischen Zellen (VISTA) oder nach Stimulation und Ausschüttung von Interleukin 10 durch regulatorische T-Zellen auf APC (B7H4) exprimiert werden. Je nach Tumorentität und Immunstatus wird für den durch B7H3 ausgelösten Signalweg zusätzlich auch eine aktivierende Wirkung beschrieben (Ni and Dong, 2017). Gemeinsam ist diesen Rezeptoren, dass ihre Expressionen in anderen Tumorentitäten meistens als negative Prognosefaktoren identifiziert worden sind. Dies gilt für die B7H3-Expression einerseits bei NSCLC oder Brustdrüsenkarzinomen, andererseits konnten bei Magenkarzinomen und Pankreaskarzinomen die B7H3-Expression positiv mit der Überlebensdauer der Patienten in Verbindung gebracht werden. Für B7H4 konnte gezeigt werden, dass Patienten mit B7H4 exprimierenden Nierenzellkarzinomen dreimal wahrscheinlicher starben als Patienten mit Tumoren ohne B7H4 Expression. Als negative Immunmodulatoren und in Verbindung mit der ungünstigeren Prognose bei Expression auf Tumorzellen kristallisierten sich die oben genannten Moleküle als vielversprechende Zielstrukturen in der Etablierung einer onkologischen Immuntherapie heraus (Ni and Dong, 2017).

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen immuninhibitorischen Molekülen, zeichnet sich **ICOSL** (auch B7h, B7-H2, B7RP-1, LICOS, GL50 und CD275) durch seine Co-stimulierende Funktion als Ligand des „inducible Costimulator“ ICOS aus. Die Ligandenbindung führt zur Proliferation und Zytokinproduktion ICOS exprimierender Zellen (B-Zellen, Dendritische Zellen und Makrophagen). Zahlreiche Untersuchungen der ICOS-ICOSL Interaktion erwiesen sich in der Vergangenheit hinsichtlich der

Entwicklung einer Immuntherapie als nicht erfolgversprechend. Als Monotherapie scheint der Signalweg - im Vergleich zu anderen - weniger potente Auswirkungen zu vermitteln. Allerdings sind synergistische Effekte in der Kombination mit CTLA-4-Antikörpern berichtet worden (Marin-Acevedo et al., 2018).

### 1.5.2 Tumor Nekrose Faktor Superfamilie

Über die B7-Familie hinaus werden auch Immuncheckpoints der Tumor Nekrose Superfamilie (TNFS) für den Einsatz in der onkologischen Therapie untersucht. Diese Arbeit beschäftigt sich mit den Mitgliedern CD40, CD70 und HVEM. **CD40** wird physiologisch sowohl auf Antigen-präsentierenden Zellen wie beispielsweise Dendritischen Zellen, Monozyten und Makrophagen als auch B-Zellen exprimiert. Während eine Aktivierung des CD40-CD154 Signalweges die Zytokinsekretion von B-Zellen mit anschließender T-Zellaktivierung und Tumorzelltod fördert, sind für **CD70** und **HVEM** das Immunsystem hemmende Eigenschaften bekannt (Marin-Acevedo et al., 2018). So führt eine **CD70** Überexpression auf Tumorzellen zu einer Erhöhung der Anzahl hemmender T-Zellen, zur Induktion der T-Zell Apoptose und zur Erschöpfung von T-Zellen in ihrer Funktion aufgrund anhaltender Antigenpräsentation (Jacobs et al., 2015). Der Ligand Herpes Virus Entry Mediator **HVEM** bindet den Rezeptor BTLA (kurz für B and T cell lymphocyte attenuator), welcher strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten zu den inhibitorischen Oberflächenmerkmalen CTLA-4 und PD-1 besitzt und auf Lymphozyten exprimiert wird. Aufgrund der Komplexität dieses Rezeptor-Liganden-Systems scheint die Etablierung einer effektiven Immuntherapie problematisch zu sein (Marin-Acevedo et al., 2018). Für alle genannten Mitglieder der TNFS wird jedoch der therapeutische Nutzen einer Antikörpertherapie aktuell wissenschaftlich untersucht, sodass auch in dieser Arbeit deren Expression bei Thymomen und Thymuskarzinomen untersucht wurde.

### 1.5.3 Adhäsionsmoleküle

Kontrovers wird die Rolle der Expression der beiden Adhäsionsmoleküle **CD54 (ICAM-1)** und **CD56 (NCAM-1)** in der Entwicklung einer Immuntoleranz von Tumorgewebe diskutiert. NCAM-1 wird auf Zellen der Hämatopoese wie z.B. NK-Zellen, aktivierten CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und Dendritischen Zellen exprimiert und hat beispielsweise bei Expression auf Tumorzellen immun-aktivierende als auch -

suppressiv. Die durch Zytokine induzierte Expression von ICAM-1 auf Endothelzellen und Leukozyten begünstigt eigentlich die Immunantwort durch Förderung der Leukozytenmigration und Antigenpräsentation, scheint jedoch bei manchen Tumoren gegenteilige Effekte zu bewirken. So werden einerseits ICAM-1 exprimierende kolorektale Tumore mit einer besseren Prognose assoziiert, andererseits korreliert die Expression bei Mammakarzinomen positiv mit deren invasivem Wachstum und in Magenkarzinomen mit dem Metastasierungsverhalten (Reina and Espel, 2017).

#### 1.5.4 Galektin 9 und HLA-G

Zur Tumorimmunität und Tumorprogression verschiedener Neoplasien (z.B. von Melanomen und Lungenkarzinomen) trägt der Ligand **Galektin 9** (GALS9) entscheidend bei, indem er das T-Zell Immunoglobulin 3 (TIM-3) bindet. Über TIM-3 werden die Einwanderung myeloider Supressorzellen (MDSC) und die in 1.5 beschriebenen Zustände der T-Zell Erschöpfung induziert. Tumorzellen, die GALS9 an ihrer Oberfläche exprimieren, können auf diese Weise einer Immunantwort entgehen. Aus diesem Grund erscheint eine Blockade dieser Rezeptor-Ligandenbindung als attraktiver Therapieansatz, da dies die immunmodulierende Wirkung der Tumorzellen umkehren würde und eigene Immunzellen den Tumor bekämpfen könnten (Marin-Acevedo et al., 2018).

Ebenso an der Immunsuppression von Tumorzellen ist aus der Familie der nicht-klassischen humanen Leukozytenantigenen Klasse 1 das Protein **HLA-G** beteiligt. Nach Bindung des Rezeptors Immunglobulin-like Transcript 2 (ILT-2) führt dies z.B. zur Hemmung der T-Zell-Proliferation oder Zytotoxizität von NK-Zellen. Nachdem der Nachweis von HLA-G erstmals bei Melanomen gelang, konnte es seitdem auf über 30 soliden und hämatologischen Tumorzellen gefunden werden. Die Expression korreliert dabei mit fortgeschrittenen Tumorstadien, Metastasierung und schlechter Prognose und unterstützt die These, dass HLA-G an der immunsuppressiven Wirkung von Tumorzellen beteiligt ist (Lin and Yan, 2015).

## 1.6 Immuntherapeutische Ansätze in der Therapie von Thymusneoplasien

Immunmodulatorische und Antikörper-basierte Therapien mit sog. Checkpoint-Inhibitoren unterscheiden sich von den bisherigen Standardtherapien im Wesentlichen durch die Aktivierung des körpereigenen Immunsystems und das Erkennen und Eliminieren von Tumorzellen. Der Nutzen einer solchen Immuntherapie ist bereits für viele Tumore wissenschaftlich belegt, jedoch unterscheiden sich die Erfolgsraten stark. Auf immunmodulatorische Therapiekonzepte wie die Entwicklung von Krebsimpfstoffen oder adoptive T-Zell-Therapien wird im Rahmen dieser Arbeit nicht näher eingegangen. Der Fokus liegt aufgrund der besseren klinischen Erfahrung auf dem Einsatz der Immuncheckpoint-Inhibitoren. Der Einsatz immunmodulatorischer Therapeutika bei Thymustumoren konzentrierte sich bislang v.a. auf die Zielstrukturen des PD1-PD-L1 Signalweges. Bis dato wurden in drei klinischen Studien die Antikörper Pembrolizumab (anti-PD-1) und Avelumab (anti-PD-L1) besonders hinsichtlich ihrer Antwort- und Überlebensraten untersucht (siehe Tab. 3) (Zhao and Rajan, 2019).

**Tabelle 3: Klinische Studien eingesetzter Immuncheckpoint-Inhibitoren bei Thymustumoren (mit Genehmigung von Zhao and Rajan, 2019)**

	<b>Giaccone et al.</b>	<b>Cho et al.</b>		<b>Rajan et al.</b>
<b>Antikörper (Studie)</b>	Pembrolizumab (NCT02364076)	Pembrolizumab (NCT02607631)		Avelumab (NCT01772004)
<b>Tumor</b>	Thymuskarzinom	Thymom	Thymuskarzinom	Thymom
<b>Anzahl</b>	40	7	26	7
<b>Antwortrate (%)</b>	22,5	28,6	19,2	28,5
<b>Progressionsfreies Überleben (Monate)</b>	4,2	6,1	6,1	-
<b>Gesamtüberleben (Monate)</b>	24,9	-	14,5	-

Antwortrate aller Patienten nach 24 Monaten. Progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben dargestellt am Median der Monate.

Diese abgeschlossenen Studien offenbaren zwei grundlegende Schwächen der bisher eingesetzten Antikörper bei Neoplasien des Thymus:

1) Die Antwort- und Überlebensraten sind trotz des vielversprechenden Ansatzes der Immuntherapeutika sehr gering, da nur etwa jeder vierte oder fünfte Patient überhaupt von der Therapie zu profitieren scheint.

2) Die durch die Antikörper resultierende Aktivierung des Immunsystems birgt auch insbesondere bei Thymomen die Gefahr der immun-assoziierten Nebenwirkungen (irAE), wie z.B. Myokarditiden oder Hepatitiden. 15 – 62,5% der Patienten entwickelten eine irAE im Verlauf der Therapie. Diese Häufigkeit ist im Vergleich zu anderen Tumorentitäten extrem, was auf die bereits beschriebene intratumoröse Thymopoese und die Assoziation mit paraneoplastischen Autoimmunerkrankungen besonders bei Thymomen (aber auch Thymuskarzinomen) zurückzuführen sein dürfte (Zhao and Rajan, 2019).

Auf diesen Erkenntnissen aufbauend laufen aktuell sechs Phase I oder II Studien mit den Endpunkten der Antwortrate, Toxizität oder progressionsfreiem Überleben (siehe Tabelle 4).

**Tabelle 4: Übersicht über die aktuellen Phase I und II Studien bzgl. Immuntherapien bei Thymusneoplasien (mit Genehmigung von Zhao and Rajan, 2019)**

<b>Antikörper</b>	<b>Studie</b>	<b>Phase</b>	<b>Endpunkte</b>
<b>Avelumab*</b> (MSB0010718C)	NCT03076554	II	Sicherheit und Antwortrate
<b>Nivolumab**</b>	NCT03134118 (NIVOTHYM)	II	Progressionsfreie Überlebensrate nach 6 Monaten
+ Vorolanib***	NCT03583086	I/II	Sicherheit und Erfolgsrate
<b>Pembrolizumab**</b>	NCT03295227	I	Dosis-limitierende Toxizität und Erfolgsrate
+ Sunitinib****	NCT03463460	II	Antwortrate
+ Epacadostat*****	NCT02364076	II	Antwortrate

\* Anti-PD-L1 Antikörper. \*\* Anti-PD1 Antikörper. \*\*\* VEGFR/PDGFR-Inhibitor. \*\*\*\* Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitor. \*\*\*\*\* IDO1-Inhibitor

Die beschriebene anatomische und physiologische Komplexität des Thymusparenchyms und deren Neoplasien sowie die als primär lymphatisches Organ wichtige immunologische Rolle des Thymus erschweren die Untersuchungen zum Einsatz der neuartigen Immuntherapeutika bei Thymomen und Thymuskarzinomen. Bislang gestalten sich insbesondere die geringe Antwortraten und die hohe Toxizität der Therapeutika problematisch, sodass bis zu einer effizienten und zugelassenen Antikörpertherapie noch viele breit angelegte Beobachtungen der Grundlagenforschung und klinische Studien benötigt werden. Hieran setzt diese Arbeit mit den im Folgenden formulierten Zielen an.

## 1.7 Ziele der Arbeit

Vor dem Hintergrund der bislang unzureichend beantworteten Frage, welche bei Thymomen und Thymuskarzinomen quantitativ wichtige Immuncheckpoints sind, die mit Hilfe einer Immuntherapie potentiell zu adressierenden Zielstrukturen sein könnten, verfolgt die vorliegende Arbeit die folgenden zwei Ziele:

- 1) Zu klären, welche immunregulatorischen Oberflächenrezeptoren bei Thymomen und Thymuskarzinomen im Vergleich zum Normalthymus auf transkriptomischer Ebene exprimiert werden.
- 2) Zu klären, ob die auf RNA-Ebene indentifizierten Oberflächenmoleküle auch auf Proteinebene mittels Immunhistochemie in situ nachweisbar sind.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Mannheimer Thymus Datenbank

Die für die Arbeit untersuchten Gewebe stammen aus der selbstverwalteten Mannheimer Thymus Datenbank des Pathologischen Instituts der Universitätsmedizin Mannheim.

### 2.2 The Cancer Genome Atlas (TCGA)

Die öffentlich zugänglichen Daten des TCGA wurden auf dem Portal cBio for Cancer Genomics ([www.cbioportal.org](http://www.cbioportal.org)) aufgerufen und heruntergeladen. Der PanCancer Atlas beinhaltet eine Gesamtzahl von 123 Fällen von Thymusneoplasien. Für die Analysen wurden der z-Score der mRNA - Expression abhängig vom jeweiligen histologischen Subtyp ausgewertet. Der z-Score einer Probe ist ein Parameter der die Anzahl an Standardabweichung, welche die Probe von dem Mittelwert der Referenz abweicht, anzeigt. Referenz waren im vorliegenden Fall die Tumore, die für das untersuchte Gen einen doppelten (also diploiden) Chromosomensatz aufwiesen. Der z-Score berechnet sich nach folgender Formel (Gao et al., 2013):

$$z - Score = \frac{\text{Expression des Tumors} - \text{Mittelwert der Expression der Referenz}}{\text{Standardabweichung der Expression der Referenz}}$$

### 2.3 Isolierung von RNA aus Fresh Frozen Tissue

Die Gewebeproben der Patientinnen und Patienten lagen als sog. „Fresh Frozen Tissue“ vor. Dabei wurde das Gewebe unmittelbar nach der Resektion mittels flüssigem Stickstoff gefroren. Die RNA wurde mithilfe des RNeasy Mini Kits der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) laut Herstellerangaben isoliert. Abschließend wurde die isolierte RNA entweder bei -80° Celsius aufbewahrt oder unmittelbar zu cDNA weiterverarbeitet.

## 2.4 cDNA Synthese

Zur Analyse des Expressionsstatus wurde die isolierte RNA in cDNA umgeschrieben. Für die reverse Transkription wurde das Revert Aid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit der Firma Thermo Scientific (Waltham, USA) verwendet. Da der Expressionsstatus der mRNA für die vorliegende Arbeit relevant war, wurden die im Kit vorhandenen Oligo-(dT)-Primer gemäß den Herstellerangaben verwendet. Das Reaktionsvolumen betrug insgesamt 20 µl. Pro Reaktion wurden 500 ng RNA umgeschrieben. Das Produkt der Erststrang-cDNA-Synthese wurde als 1:10-Verdünnung (2,5 ng/µl) für quantitative Analysen in der real-time PCR verwendet.

## 2.5 Quantitative real-time-PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine in vitro Technik zur gezielten Vervielfältigung von DNA-Fragmenten. Auf diesem Prinzip beruht die quantitative real-time PCR (qtRT-PCR), welche zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung der Amplifikationsprodukte in Echtzeit bietet. Der verwendete Farbstoff SYBR Green ermöglicht den kontinuierlichen Nachweis neugebildeter Produkte. Unter Zuhilfenahme des SYBR® Premix Ex Taq™ II-Kit (Tli RNaseH Plus) der Firma Takara Clontech (Kusatsu, Japan) wurden die Messungen durchgeführt. Tabelle 5 gibt den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Reaktionsansatz wieder.

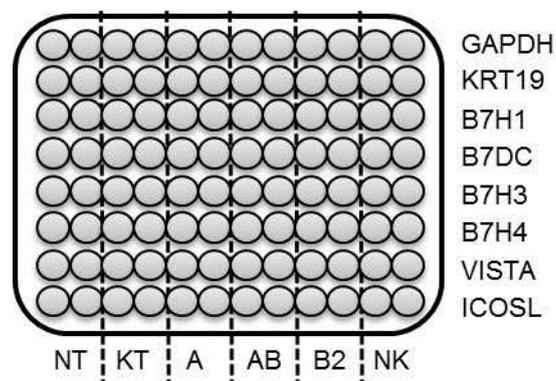
**Tabelle 5: Reaktionsansatz der qtRT-PCR**

	Volumina
SYBR Green	5 µl
Primer fwd (10 pM)	1 µl
Primer rev (10 pM)	1 µl
H <sub>2</sub> O	1 µl
cDNA (2,5 µg/µl)	2 µl
<b>Gesamt</b>	<b>10 µl</b>

Übersteigt das fluoreszierende Signal, welches proportional zur Menge des amplifizierten Gens ansteigt, einen festgelegten Schwellenwert wird dies als Threshold-Zyklus (CT-Wert) bezeichnet. Eine Messung dauert 40 Zyklen an und unterteilt sich in 3 Phasen (thermische Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation).

Zur qualitativen Kontrolle wurde im Anschluss an die PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Anhand dieser kann beispielsweise die Bildung von Nebenprodukten (z.B. durch Primerdimere) ausgeschlossen werden. Über einen Zeitraum von 40 min und einer kontinuierlichen Zunahme der Schmelztemperatur  $T_m$  um  $0,3^\circ\text{C}$  wurde hierbei das Dissoziationsverhalten der Doppelstrang-DNA (dsDNA) aufgezeichnet. Die Temperatur, bei der sich der Doppelstrang trennt, wird durch ein abnehmendes Fluroszenzsignal detektiert. Dabei zeigen Moleküle mit unterschiedlicher Basenlänge oder Basenbesetzung eine unterschiedliche  $T_m$ .

Die Messungen wurden mithilfe des SteponePlus™ Real-Time PCR Systems von Applied Biosystems (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) durchgeführt. Gemessen wurde in 96-well real-time PCR-Platten und in technischen Duplikaten. Um die Reagenzien im Reaktionsansatz zu prüfen, wurden je Gen zwei Negativkontrollen (NK) ohne Zugabe von cDNA mitgeführt. Bei jeder Messung fungierte GAPDH als Housekeeping Gen und Keratin19 als epithelialer Marker. Ein schematischen Aufbau einer 96-well Platte veranschaulicht Abbildung 5. Eine Standardmessung dauert ca. 2 Stunden.



**Abbildung 5: Schematischer Aufbau einer 96-well Platte zur qtRT-PCR-basierten Quantifizierung der Transkripte immunregulatorischer Gene (B7H1, B7DC, B7H3, B7H4, VISTA, ICOSL) in Normalthymi (NT), Kinderthymi (KT), A- (A), AB- (AB), B2-Thymomen (B2). GAPDH = Referenzgen. KRT19 = Keratin19. NK = Negativkontrolle**

### 2.5.1 Primer

Insgesamt wurden 15 Gene untersucht. Folgende Primer mit entsprechender Basensequenz wurden für die real-time PCR verwendet (siehe Tab. 6).

Tabelle 6: qtRT-PCR Primer

Gen	Basensequenz Primer-fwd	Basensequenz Primer-rev
GAPDH	TGCACCACCAACTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATGAG
KRT19	CGCGACTACAGCCACTACTA	AGAGCCTGTTCCGTCTCAA
B7H1	AGTGGTAAGACCACCACCACCA	TGGAGGATGTGCCAGAGGTAGTTC
B7DC	CCAACTTGGCTGCTTCACAT	AGCACTGTTCACTTCCCTCT
B7H3	GTGGGGCTGTCTGTCTGTCT	CTCAGCTCCTGCATTCTCCT
B7H4	TTGACCAGGGAGCCAACTTC	TCCGCCTTTTGATCTCCGAT
VISTA	CACCATCCAAGTGTGGTG	TTGCTTGTAGACCAGGAGCA
ICOSL	CATTGGCTGCTGCATAGAGA	TTTTCTCGCCGGTACTGACT
GALS9	CAGTGCTCAGAGGTTCCACA	GGAGTTGTGATCTGGGTGT
HVEM	GAAAGCCAAGGGGTGATGTA	ATGACTGTGGCCTCACCTTC
HLA-G	GGAAGAGGAGACACGGAACA	ACTGGAGGGTGTGAGAACTG
CD40	ATACTGCGACCCCAACCTAG	TACAGTGCCAGCCTTCTTCA
CD70	CAGCGTCACCTGGATGTGTA	ACACAGGACCTCAGCAGGAC
CD54	AGGCCACCCAGAGGACAAC	CCCATTATGACTGCGGCTGCTA
CD56	ATGACTGTGGCCTCACCTTC	GATGACATCTCGGCCTTTGT

Fwd = forward; rev = reverse; KRT19 = Keratin 19

### 2.5.2 $2^{-\Delta\Delta CT}$ - Methode

Zur Quantifizierung der gemessenen Daten wurde die  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode angewandt. Die Berechnung erfolgte anhand folgender Formel (Holzapfel and Wickert, 2007):

$$\Delta CT = CT \text{ Zielgen} - CT \text{ Referenzgen}_{(GAPDH)}$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ Patient} - \Delta CT \text{ Normalthymus}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Graphisch dargestellt wurden jeweils die ermittelten Mittelwerte und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM).

### 2.5.3 Exklusionskriterien

Für ein aussagekräftiges Ergebnis wurden folgende Exklusionskriterien definiert (siehe Tabelle 7):

**Tabelle 7: Exklusionskriterien**

---

$CT_{GAPDH} > 24$
Nicht eindeutig der Probe zuordenbare Amplifikationssignale (z.B. aufgrund von Primerdimeren)
Hohe Standardabweichung innerhalb der Dubletten

---

### 2.5.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Expressionsdaten erfolgte mittels des nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Test. Für die Korrelationsanalysen der einzelnen Gene wurde der nicht-parametrische Korrelationskoeffizient  $r$  nach Spearman angewandt. Aufgrund der geringen Fallzahl wurden  $p$ -Werte  $< 0,1$  als hinweisend und  $p$ -Werte  $< 0,05$  als statistisch signifikant angenommen. Es werden im Folgenden ausschließlich Korrelationen mit einem  $P$ -Wert  $< 0,1$  dargestellt. Die gezeigten Abbildungen wurden mit der Software GraphPad Prism 8 angefertigt.

## 2.6 Immunhistochemie

Das Funktionsprinzip der Immunhistochemie basiert auf der Affinität von Antikörpern zu bestimmten Proteinen bzw. Antigenen. Eine erfolgreiche Antigen-Antikörper-Reaktion kann mit Hilfe von Enzymen sichtbar gemacht werden, die an Primär- oder Sekundärantikörper gebunden sind, unlösliche Farbstoffe aus einer Färbelösung umschrieben präzipitieren und so einzelne Zellbestandteile identifizieren. In der vorliegenden Arbeit wurden ausgewählte PFA fixierte Proben auf die Proteinexpression der auf RNA Ebene identifizierten Moleküle hin analysiert.

### 2.6.1 Antikörper

Für die Färbung wurden folgende monoklonale Antikörper der Firma Cell Signaling Technology® (Danvers, USA) verwendet:

Tabelle 8: Antikörper der Immunhistochemie

Zielstruktur	Bezeichnung	Isotyp	Verdünnung
<b>B7H3</b>	B7H3 (D9M2L) XP® Rabbit mAb #14058	Rabbit IgG	1:400
<b>B7H4</b>	B7H4 (D1M81) XP® Rabbit mAb #14572	Rabbit IgG	1:400
<b>B7H1</b>	PD-L1 (E1L3N) XP® Rabbit mAb #13684	Rabbit IgG	1:40
<b>IDO</b>	IDO (D5J4E™) Rabbit mAb #86630	Rabbit IgG	1:200
<b>B7H5</b>	VISTA (D1L2G) XP® Rabbit mAb #64953	Rabbit IgG	1:400
<b>GALS 9</b>	GALS9 (D9R4A) YP® Rabbit mAb #54330	Rabbit IgG	1:200

### 2.6.2 Färbemethode

Die Entparaffinierung erfolgt mittels Lösung in Xylol für 3x5 min und anschließender Rehydrierung mit Ethanol in abnehmender Konzentration (100%, 96%, 80%) bis hin zu destilliertem Wasser für jeweils 2 min. Nach dem Auswaschen mit TBS-Puffer (Tris-buffered saline) für 2x2 min erfolgt die sog. Antigendemaskierung mit Hilfe der „Novocastra Epitope Retrieval solution“ (Leica®, Buffalo Grove, USA) mit einem pH-Wert von 6 für 40 min oder einem pH-Wert von 9 für 17 min. Bei Raumtemperatur erfolgt eine Abkühlung für 30 min. Wichtig ist hierbei auf feuchte Bedingungen zu achten, um eine Austrocknung des Gewebes zu verhindern. Nach der Kühlung folgt ein weiterer Waschvorgang mit destilliertem Wasser (2 min) und mit TBS-Puffer (2 min). Um unspezifische Antigen-Antikörperbindungen zu verhindern wird der Objektträger mit einer Blockierlösung 7 min lang inkubiert. Nach erneutem Waschvorgang folgt eine 60 minütige Inkubation mit dem verdünnten, primären Antikörper. Im Anschluss werden die ungebundenen Antikörper mit TBS-Puffer für 3x5 min abgewaschen. Die 30 minütige Inkubation mit dem sekundären Antikörper basiert auf dem DAKO Real™ EnVision™ Detection System Kit (Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse; Agilent, Santa Clara, USA). Die Visualisierung stattgefundenener Reaktionen gelingt durch die Zugabe eines Chromogens (DAB + Chromogen

Lösung) für 10 min. Es folgen dreimalige Waschvorgänge mit TBS-Puffer und die Gegenfärbung mit Hilfe der Mayers Hämalaunlösung (5 min). Zuletzt werden die Schnitte 5 min lang mit Leitungswasser gewaschen und die Objektträger jeweils 2 min mit Ethanol (80%, 96% und 100%) und Xylol inkubiert.

Zu jeder Färbung wurde simultan eine Positivkontrolle angefertigt.

### 2.6.3 Auswertung

Von jeder Patientenprobe wurden zwei unterschiedliche Tumorgewebe analysiert und verglichen. Die Tumore wurden für das untersuchte Merkmal nur dann als positiv gewertet, wenn der Anteil der das Merkmal tragende Tumorzellen >5 % aller vitalen Tumorzellen ausmachte. Der sog. Tumor Proportional Score (TPS) betrug demnach >5%. Zur besseren quantitativen Einschätzung wurden die Mittelwerte der beiden Proben gebildet. Für die Quantifizierung der PD-L1 Proteinexpression wurden folgende Scoringsysteme angewandt (siehe Tab. 9)

**Tabelle 9: Scoringsysteme zur Quantifizierung der PD-L1 Proteinexpression (nach Schildhaus, 2018)**

	<b>Score</b>	<b>Bestimmung</b>
<b>TPS</b>	Tumor Proportion Score	$TPS = \frac{\text{gefärbte TC}}{TC}$
<b>ICS</b>	Immuncellscore	$ICS = \frac{\text{gefärbte IC}}{\text{Tumorfläche}}$
<b>CPS</b>	Combined Positivity Score	$CPS = \frac{\text{gefärbte TC} + \text{gefärbte IC}}{TC}$

## 2.7 Zellkultur

Im Verlauf der Arbeit wurden zudem funktionelle Tests mit Zellen zweier Zelllinien durchgeführt, periphere Blutlymphozyten isoliert, Populationen von T-Zellen, Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und Zytokin-induzierte Killerzellen (cytokin induced Killercells CIK) kultiviert und Zytotoxische Tests mit blockierenden Antikörpern durchgeführt.

### 2.7.1 Zelllinien

Die Zelllinien wurden in 10 cm Zellkulturschalen ausgesät und im Brutschrank bei 37°C kultiviert. Mediumwechsel fand regelmäßig alle 2-3 Tage statt.

Tabelle 10: Zelllinien und Medien

Bezeichnung	Gewebe	Kultivierung
1889c	Thymuskarzinom	RPMI 1640 + 10% FBS
TE671	Embryonales Rhabdomyosarkom	DMEM + 10% FBS

RPMI = Rosewell Park Memorial Institute; FBS = Fetales Bovines Serum; DMEM = Dulbecco's Modified Eagle's Medium.

### 2.7.2 Isolierung peripher Blutlymphozyten (PBL)

Periphere Blutlymphozyten wurden aus dem Blut gesunder humaner Spender gewonnen. Aus diesen können  $CD3^+/CD56^-$  T-Zellen,  $CD3^-/CD56^+/CD16^+$  NK-Zellen und  $CD3^+/CD56^+/CD16^+$  CIK differenziert werden. Die Isolierung der Lymphozyten erfolgte nach der Methode der Dichtegradientenzentrifugation. Dazu wurde das Blut 1:2 mit PBS verdünnt. In einem 50 ml Gefäß wurden 20 ml Ficoll'sche Lösung (Dichte 1,077g/ml, Biochrom AG) vor- und 30 ml verdünntes Blut vorsichtig hinzugegeben, sodass die beiden Flüssigkeiten übereinander geschichtet vorliegen. Die Dichtegradientenzentrifugation erfolgte für 30 min bei Raumtemperatur bei 800 g und ohne Bremse. Von oben nach unten werden nun 4 Schichten sichtbar (siehe Abb. 6). Das Blutplasma (gelblich), der sog. Buffy coat als weißer Ring, die transparente Ficoll-Lösung und die roten Blutkörperchen. Der weiße Ring enthält die Lymphozyten, welche sorgfältig in ein neues 15 ml Gefäß überführt und dreimal mit PBS für 5 min bei 300 g gewaschen wurden.

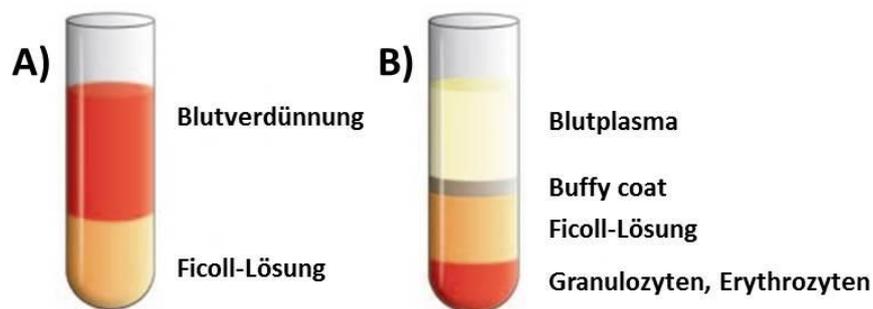


Abbildung 6: Dichtegradientenzentrifugation: Reagenzglas vor (A) und nach (B) Zentrifugation (nach GEHealthcareBio-SciencesAB, 2010)

Die Kultivierung erfolgte abhängig von den Kultivierungsbedingungen für die jeweilige Subpopulation und ist im Folgenden beschrieben.

### 2.7.3 Kultivierung von humanen T-Zellen

Aus den frisch isolierten PBL können humane T-Zellen selektioniert werden. Die Bedingungen veranschaulicht Tabelle 11. Die verwendeten Interleukine (kurz IL) stammen von BioLegend (San Diego, USA)

**Tabelle 11: Bedingungen zur Kultivierung von T-Zellen**

<b>Zellpopulation</b>	<b>CD3<sup>+</sup>/CD56<sup>-</sup> T-Zellen</b>
Kultivierung Tag 0	50 ng/ml OKT3, RPMI 1640 + 10% FBS, Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml)
Mediumwechsel (alle 2-3 Tage)	RPMI 1640 + 10% FBS + IL-2 (800 U/ml)

RPMI = Rosewell Park Memorial Institute; FBS = Fetales Bovines Serum; OKT3 = CD3-Rezeptor-Antikörper.

### 2.7.4 Isolierung und Kultivierung von NK-Zellen

Für die Separation der NK-Zellen wurde das NK Cell Isolation Kit der Firma MACS Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland) verwendet. Eine Pufferlösung aus 1:20 MACS BSA Stock Solution und autoMACS Rinsing Solution wurde zur weiteren Verwendung hergestellt. Die NK-Zellen wurden aus den PBLs nach Herstellerprotokoll separiert. Für eine effiziente Isolierung empfiehlt sich zügig zu arbeiten und Puffer sowie Zellen kühl (2-8°C) zu halten. Die magnetische Trennung der Zellpopulationen erfolgte mithilfe des MACS-Separator und der zugehörigen LS-Säulen.

**Tabelle 12: Bedingung zur Kultivierung von NK-Zellen**

<b>Zellpopulation</b>	<b>CD3<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup> NK-Zellen</b>
Kultivierung Tag 0	RPMI 1640 + 10% FBS + IL-12 (10 ng/ml), IL15 (20 ng/ml) und IL18 (100 ng/ml)
Mediumwechsel (alle 2-3 Tage)	RPMI 1640 + 10% FBS + IL-2 (100 U/ml)

RPMI = Rosewell Park Memorial Institute; FBS = Fetales Bovines Serum.

### 2.7.5 Kultivierung und Isolierung von CIK

Die Kultivierung der CIK erfolgt wie in Tabelle 13 veranschaulicht.

**Tabelle 13: Bedingungen zur Kultivierung von CIK**

Zellpopulation	CD3 <sup>+</sup> /CD56 <sup>+</sup> /CD16 <sup>+</sup> CIK
Kultivierung Tag 0	RPMI 1640 + 10% FBS + INF $\gamma$ (200 ng/ml)
Kultivierung Tag 1	Zugabe von OKT3 (50 ng/ml) + IL-2 (400 U/ml)
Mediumwechsel (alle 2-3 Tage)	RPMI 1640 + 10% FBS + IL-2 (100 U/ml)

RPMI = Rosewell Park Memorial Institute; FBS = Fetales Bovines Serum; OKT3 = CD3-Rezeptor-Antikörper.

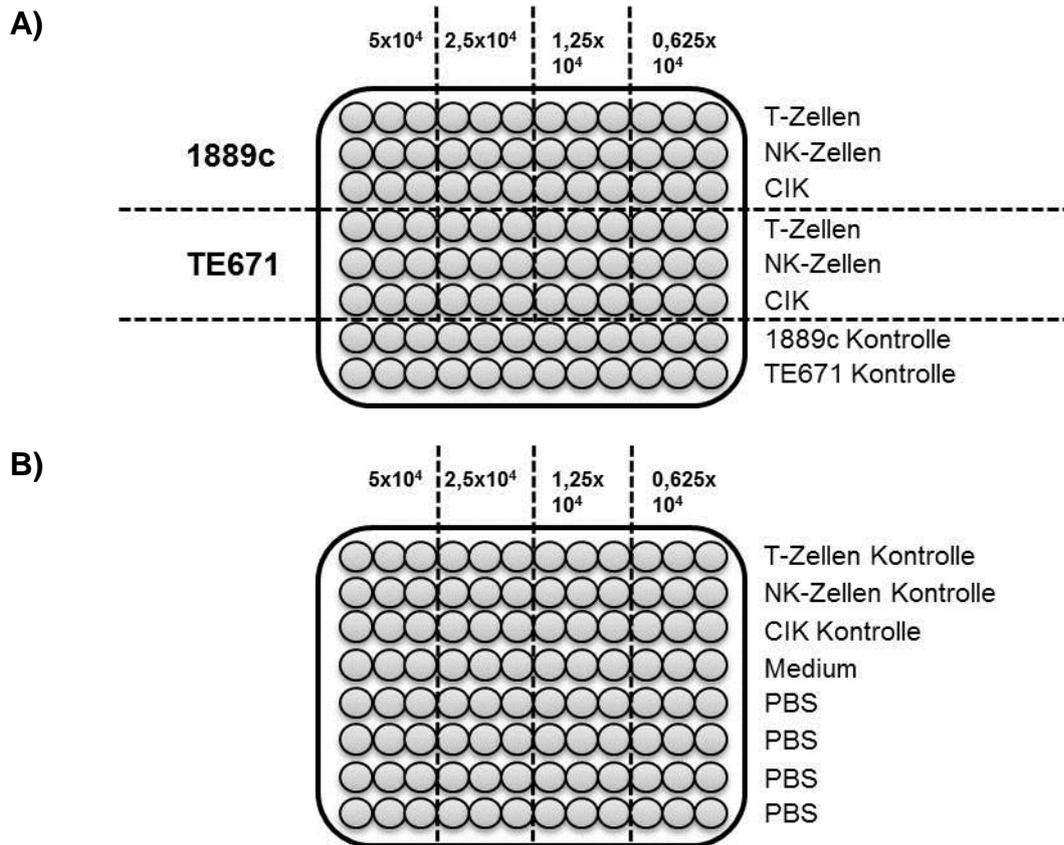
Nach ca. 14-tägiger Kultivierung und ausreichender Zellzahl wurde das CD56 MicroBeads Kit der Firma MACS Miltenyi Biotec benutzt um die CD56<sup>+</sup> CIK-Zellen von den CD56<sup>-</sup> T-Zellen zu separieren. Das Protokoll wurde nach Herstellerangaben befolgt und die LS-Säulen zur magnetischen Trennung genutzt. Die CD56<sup>+</sup> Zellen bleiben hierbei in der Säule haften und können im Anschluss ausgespült werden. Es resultierte somit eine CD3<sup>+</sup>/CD56<sup>-</sup> T-Zell- und eine CD3<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> Zytokin-induzierte Killerzellpopulation.

### 2.7.6 Zytotoxizitätstest

Um die spezifische Zellzytotoxizität der oben beschriebenen Zellpopulationen zu prüfen wurden die Zelllinie 1889c und TE671 mit entsprechenden Immunzellen kokultiviert und mithilfe des MTT-Tests überlebende Zellen quantifiziert. In einem ersten Reaktionsansatz wurden die beiden Zelllinien in einer Konzentration von  $5 \times 10^3$  Zellen pro 100  $\mu$ l Volumen je well ausgesät. Benutzt wurde eine 96-well Rundbodenplatte. Für 4h erfolgte eine Inkubation bei 37°C, um den Zellen ausreichend Zeit zu gewähren auf der Platte zu haften. Währenddessen wurde eine 1:2 Verdünnungsreihe der Effektorzellen ausgehend von einer Konzentration von  $5 \times 10^4$  Zellen/well bis zu einer Konzentration von  $0,625 \times 10^4$  Zellen/well vorbereitet, sodass die Tumorzellen mit vier unterschiedlichen Konzentrationen der Effektorzellen kokultiviert werden können. Die Zugabe von 100  $\mu$ l Effektorzellsuspension erfolgte nach dem vollständigen Absetzen der Tumorzellen auf dem Plattenboden. Die Kultivierung der Tumortargetzellen mit jeder Effektorzellkonzentration erfolgt in Triplikaten. Zusätzlich wurden Effektor- (Immunzellen) und Targetzellen jeweils unabhängig in Triplikaten kultiviert und dienten als Kontrollen. Die

Hintergrundgeräusche des Mediums wurden durch das Mitführen einer Medienkontrolle erfasst. Einen schematischen Versuchsaufbau der 96-well-Platten veranschaulicht Abbildung 7. Das Gesamtvolumen betrug 200 µl/well. Nach 48h Inkubation wurden je well 20 µl MTT-Farbstoff (5mg/ml) hinzugegeben und für weitere 3h inkubiert. Der Farbstoff ist ein gelbes und zellgängiges Tetrazoliumsalz, welches von vitalen Zellen intrazellulär mithilfe der Reduktionsäquivalente NADH und NADPH in blau-violettes, wasserunlösliches Formazan umwandelt wird und einen Indikator für Zellvitalität darstellt. Nach 3-stündiger Inkubation wurden die Zellen mittels 200 µl DMSO lysiert, welches zudem die Formazan-Kristalle in Lösung bringt, sodass abhängig von der Zellviabilität unterschiedliche starke Farbschattierungen resultieren. Die Quantifizierung erfolgte mittels Absorptionmessung bei 565 nm und einer Referenzwellenlänge bei 665 nm. Die Zellvitalität wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{OD\text{ Kokultivierung Tumor und Effektor} - OD\text{ Effektorkontrolle}}{OD\text{ Tumorzellkontrolle} - OD\text{ Medium}} \times 100$$



**Abbildung 7 A und B: Schematischer Aufbau der 96-well Platten des ersten Reaktionsansatzes.** Von links nach rechts befinden sich in jeweils Tripletten T-Zellen, Natürliche Killerzellen (NK) und Cytokin-induzierte Killerzellen (CIK) in absteigender Konzentration ( $5 \times 10^4$ /well bis  $0,625 \times 10^4$ /well). 1889c = Thymuskarzinom. TE671 = embryonales Rhabdomyosarkom. PBS = Phosphate buffered saline).

Der zweite Reaktionsansatz unterscheidet sich von ersterem durch die zusätzliche Inkubation der Tumorzellen mit blockierenden Antikörpern, welche die Rezeptor-spezifischen Bindungsstellen der Tumorzellen blockieren und dadurch mögliche Interaktionen mit den Effektorzellen verhindern oder begünstigen. Dazu wurden die Tumorzellen nach der Aussaat und Inkubation zusätzlich für eine Stunde mit dem jeweiligen Antikörper ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) inkubiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen, um nicht an Tumorzellen gebundene Antikörper vollständig zu entfernen. Es wurde mit der Zugabe der Effektorzellen in oben genannten Konzentrationen fortgefahren und nach 48-stündiger Inkubation der oben beschriebene MTT-Test durchgeführt.

### 2.7.7 Durchflusszytometrie

Die Reinheit der kultivierten T-Zell, NK-Zell und CIK-Zellpopulationen wurde durchflusszytometrisch bestimmt und die charakteristischen Oberflächenproteine wurden verifiziert. Zudem wurden die Zelllinien 1889c und TE671 auf die Expression der Proteine CD54 und CD56 überprüft, um diese als geeignete Modelle für die funktionellen Experimente zu validieren.

Je Färbung wurden  $2 \times 10^5$  Zellen angefärbt. Diese wurden zuerst in zwei Waschvorgängen mit 500  $\mu$ l HBSS von Rückständen des Mediums befreit. Im Anschluss erfolgte die Färbung und 15-minütige Inkubation auf Eis und unter Lichtausschluss mit den in Tabelle 15 dargestellten Antikörpern. Daraufhin wurden ungebundene Antikörper durch zweimaliges Waschen mit 500  $\mu$ l HBSS entfernt. Zum Abschluss wurden die Zellen in 200  $\mu$ l HBSS aufgenommen und durchflusszytometrisch analysiert. Die Durchflusszytometrie erfolgte mit dem BD FACSLyric Research System (BD, Franklin Lakes, USA) und der Analysesoftware BD FACSSuite. Zum Ausschluss apoptotischer Zellen wurden kurz vor der Messung 0.5  $\mu$ l Sytox Blue dazu gegeben (Thermo Fisher, Waltham, USA).

**Tabelle 14: Antikörper der Durchflusszytometrie**

<b>Antigen</b>	<b>Isotyp</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Volumen</b>
<b>CD3</b>	Mouse anti-human Ig G <sub>1</sub> K (PE-Cy™7)	BD Biosciences (USA)	0,5 $\mu$ l
<b>CD16</b>	Mouse anti-human Ig G <sub>1</sub> K (FITC)	BD Biosciences (USA)	10 $\mu$ l
<b>CD54</b>	Mouse anti-human Ig G <sub>1</sub> K (APC)	BD Biosciences (USA)	5 $\mu$ l
<b>CD56</b>	Mouse anti-human Ig G <sub>1</sub> K (FITC)	BD Biosciences (USA)	1 $\mu$ l

Volumen für  $2 \times 10^5$  Zellen. Zur Kontrolle wurden entsprechende Isotyp Kontrollen mitgeführt.

### 3 ERGEBNISSE

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Expressionsanalyse immunologisch relevanter Oberflächenmoleküle bei Thymomen und Thymuskarzinomen. Die klinischen Merkmale des untersuchten Patientenkollektivs der Mannheimer Thymomdatenbank sind unter Abschnitt 3.1 dargestellt. In den folgenden Abschnitten werden die Expressionsanalysen des TCGA Datensets für Thymome mit dem unabhängigen Validierungsset des untersuchten Patientenkollektivs der Mannheimer Thymomdatenbank validiert. Dabei werden die Gen- und Proteinexpression ausgewählter Gene dargestellt. Auf Grundlage der Expressionsdaten wurden ebenfalls Untersuchungen zum Einsatz funktioneller Antikörper in Zellkulturexperimenten durchgeführt.

#### 3.1 Klinische Merkmale des Validierungssets

Insgesamt standen von 60 Patienten isolierte RNA aus „Fresh Frozen Tissue“ für die Expressionsanalysen zur Verfügung. Das untersuchte Kollektiv teilt sich in zehn Normalthymi (NT), fünf Kinderthymi (KT), acht A-Thymome (A), neun AB-Thymome (AB), elf B2-Thymome (B2), acht B3-Thymome (B3) und neun Thymuskarzinome (CA) mit der in Tabelle 15 dargestellten Altersverteilung bei Diagnosestellung. Die Geschlechter verteilen sich auf 26 weibliche und 30 männliche Patienten, wobei das Geschlecht von vier anonymen Kinderthymi unbekannt ist. Die Patienten mit der Diagnose eines Thymoms sind mit 56,6 Jahren insgesamt jünger als die Patienten mit der Diagnose eines Thymuskarzinoms (68,4 Jahre).

Tabelle 15: Klinische Merkmale des untersuchten Patientenkollektivs

		NT	KT	A	AB	B2	B3	CA
<b>Anzahl</b>	♂	9	u	3	2	7	2	3
	♀	1	1	5	7	4	6	6
	$\Sigma$	<b>10</b>	<b>5</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>11</b>	<b>8</b>	<b>9</b>
<b>Alter bei</b>	♂	38	u	73	70	44	66	71,6
<b>Diagnose</b>		$\pm 15,4$	u	$\pm 11,9$	$\pm 1,0$	$\pm 13,0$	$\pm 14,0$	$\pm 1,7$
	♀	42	u	63,8	58,8	52,3	41	66,8
		$\pm 0$	u	$\pm 10,6$	$\pm 8,5$	$\pm 8,3$	$\pm 13,5$	$\pm 10,5$
	<b>M</b>	<b>38,4</b>	<b>u</b>	<b>67,3</b>	<b>61,4</b>	<b>47</b>	<b>47,3</b>	<b>68,5</b>
		$\pm 14,7$	u	$\pm 12,0$	$\pm 8,4$	$\pm 12,2$	$\pm 17,4$	$\pm 8,9$
<b>MG positiv</b>		5	u	1	2	1	1	u

M = Mittelwert beider Geschlechter; u = unbekannt; Mittelwerte und Standardabweichung.

### 3.2 Epithelialer Biomarker Keratin 19

Keratin 19 (KRT19) dient als Biomarker für epitheliale Gewebe und damit der Identifizierung für epitheliale Tumorzellen in Genexpressionsanalysen durch die qRT-PCR. Durch die intratumoröse Thymozytenreifung befinden sich neben epithelialen Zellen viele Thymozyten bei der Gewebeaufreinigung im Zellextrakt. Die Analyse von KRT19 diente im ersten Schritt zur Qualitätssicherung des untersuchten Patientenkollektivs mit den in Abbildung 8 dargestellten Daten. Eine verstärkte KRT19 Expression kann bei den besonders epithelreichen Tumortypen A- und B3-Thymomen sowie den Karzinomen beobachtet werden.

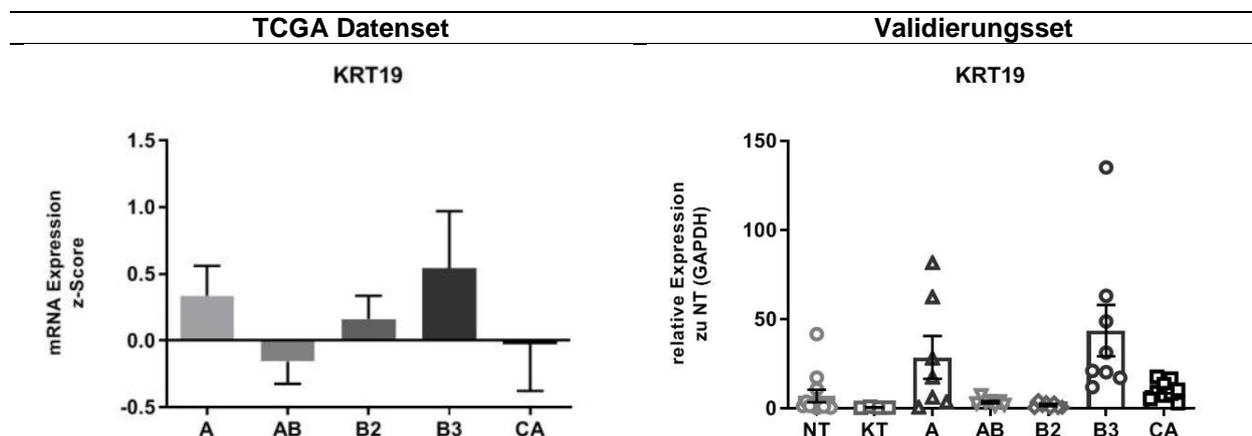


Abbildung 8: Links sind die relativen Expressionswerte (z-Score) der TCGA Datenbank und rechts die Daten des Validierungsset dargestellt (Mittelwerte und SEM). Die relativen Expressionsdaten des Validierungsset wurden auf GAPDH normalisiert und auf einen NT bezogen. Diesem Referenz-NT wurde der Wert 1 zugeordnet.

### 3.3 Übersicht der Expressionsdaten des untersuchten Patientenkollektivs

Insgesamt wurde die Expression von 13 ausgewählten Oberflächenrezeptoren untersucht, um einen Überblick über die Genexpression bekannter Oberflächenrezeptoren bei Thymomen und Thymuskarzinomen zu erhalten. Die gesammelten Ergebnisse werden zur Übersicht tabellarisch dargestellt (siehe Tab. 16). Dabei sind besonders die Mitglieder der B7-Familie (PD-L1, B7H3, B7H4, B7H5 und ICOSL) bei den aggressiveren Subtypen (B3-Thymom und Thymuskarzinom) verstärkt exprimiert. Ebenso erweist sich die Expression von CD70, CD56 und GALS9 bei den Thymuskarzinomen mittelstark bzw. stark hochreguliert. Es wird deutlich, dass B3-Thymome und Karzinome im Vergleich zu den weniger aggressiven Subtypen (A, AB, B2) sowohl eine höhere Anzahl verschiedener Immunmodulatoren als auch verstärkte Expressionslevel der untersuchten Moleküle aufweisen. In den folgenden Kapiteln werden diese Beobachtungen graphisch dargestellt.

**Tabelle 16: Zusammenfassung der Genexpression der verschiedenen histologischen Subtypen gemessen via qtRT-PCR.**

Oberflächenrezeptor	NT n=10	KT n=5	A n=8	AB n=9	B2 n=11	B3 n=8	CA n=9
PD-L1	-	-	+	-	-	++	+
PD-L2	-	-	-	-	-	+	-
B7H3	-	-	-	-	++	++	++
B7H4	++	-	++	-	-	-	+++
B7H5	+	-	+	-	++	++	++
ICOSL	-	-	-	-	-	-	+
CD40	-	-	-	+	-	+	+
CD70	-	-	-	-	-	-	+++
HVEM	-	-	-	+	-	-	-
CD54	-	-	-	-	+	-	-
CD56	-	++	-	-	+	-	++
GALS9	-	-	-	-	-	-	++
HLA-G	+	++	+	-	-	++	-

- kein Unterschied; + schwach hochregulierte Expression (Faktor 5-10); ++ mittelstark hochregulierte Expression (Faktor 10-100); +++ stark hochregulierte Expression (Faktor >100). Einschätzung im Vergleich zu Referenz-NT und Referenzgen GAPDH. NT = Normathymi, KT = Kinderthymi, A = A-Thymome, AB = AB-Thymome, B2 = B2-Thymome, B3 = B3-Thymome, CA = Thymuskarzinome

### 3.4 Co-inhibitorische Oberflächenmoleküle der B7-Familie

Mit Ausnahme von ICOSL (siehe 3.5) weisen die untersuchten Mitglieder der B7-Familie vorrangig hemmende Wirkungen auf die Effektorzellen des Immunsystems

auf. Untersucht wurden PD-L1 (B7H1), PD-L2 (B7DC), B7H3, B7H4 und B7H5 (VISTA). Die Ergebnisse, die in der klinischen Forschung von Immuntherapien häufigen Zielstrukturen PD-L1 und PD-L2 werden in Abbildung 9 dargestellt. Die stärkste PD-L1 Expression zeigen in beiden Datensätzen A- und B3-Thymome. Innerhalb der Validierungskohorte wird bei den Thymuskarzinomen auch PD-L1 vermehrt exprimiert. Für das Validierungsset stellt sich die erhöhte Expression für B3 vs. NT (p-Wert = 0,0059), B3 vs. KT (p-Wert = 0,0119) und B3 vs. AB (p-Wert = 0,0169) statistisch signifikant dar. Für PD-L2 zeigen B2- und B3-Thymome die stärkste Expression.

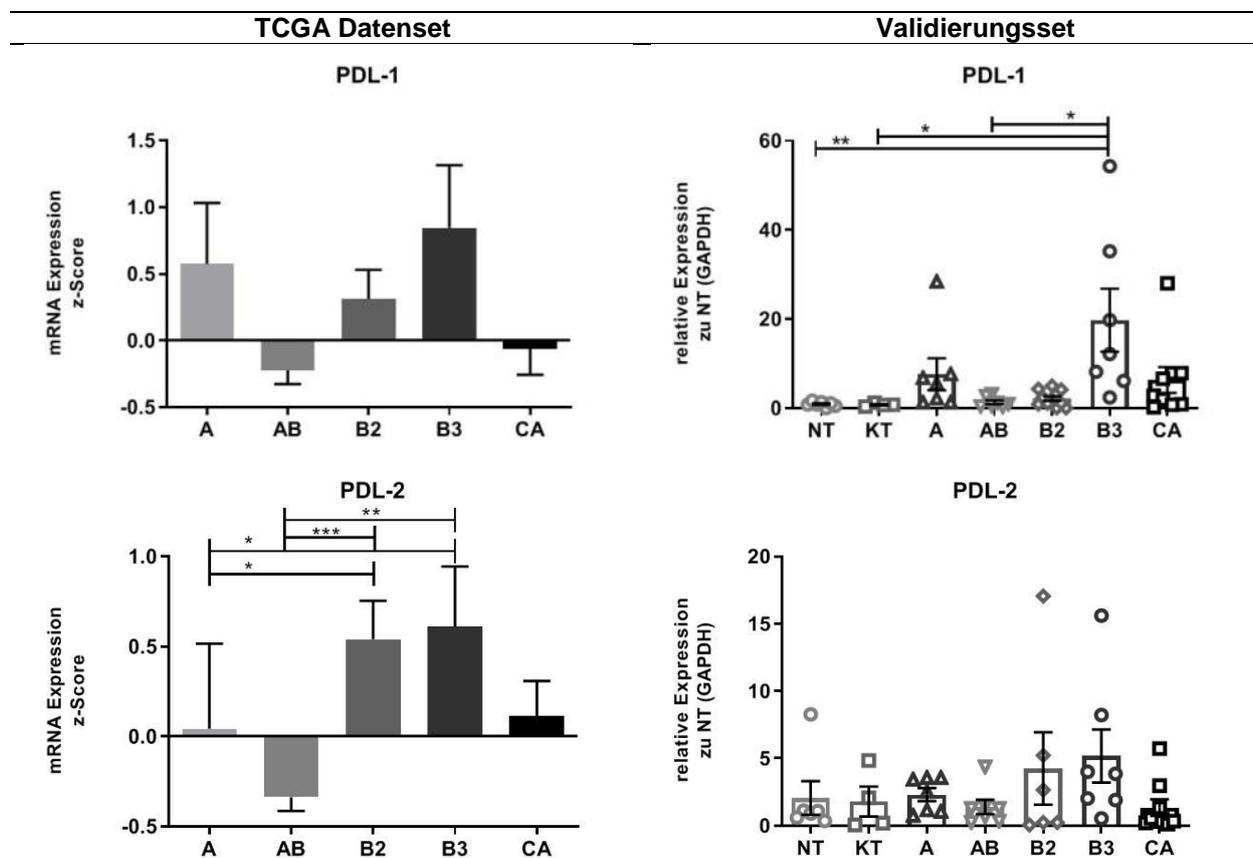


Abbildung 9: Links sind die relativen Expressionswerte (z-Score) der TCGA Datenbank und rechts die Daten des Validierungsset dargestellt (Mittelwerte und SEM). Die relativen Expressionsdaten des Validierungssets wurden auf GAPDH normalisiert und auf einen NT bezogen. Diesem Referenz-NT wurde der Wert 1 zugeordnet.

Für die Expression der Oberflächenrezeptoren B7H3, B7H4 und B7H5 konnten innerhalb der untersuchten Thymuskarzinome jeweils zwei Subpopulationen ausfindig gemacht werden (siehe Validierungsset in Abb. 10). Diese werden als „High-Expressors“ und „Low-Expressors“ klassifiziert. Besonders auffallend sind die „B7H3-High“- und „B7H4-High“-Karzinome mit einer im Vergleich zum Referenz-NT >100-fachen bzw. >1000-fachen Genexpression. Die B7H3 Expression ist in beiden

Datensätzen übereinstimmend für die Karzinome und B3-Thymome am höchsten. Für B7H4 bestätigt das Validierungsset die in den TCGA Daten zu beobachtende verstärkte Expression bei den Thymuskarzinomen. Zudem erweist sich innerhalb des Validierungsset die Expression der Karzinome im Vergleich zu den ebenfalls aggressiven B3-Thymomen statistisch signifikant (p-Wert = 0,0472) höher. Für B7H5 kann im Validierungsset allerdings kein signifikanter Unterschied zu den mitgeführten NT und KT nachgewiesen werden.

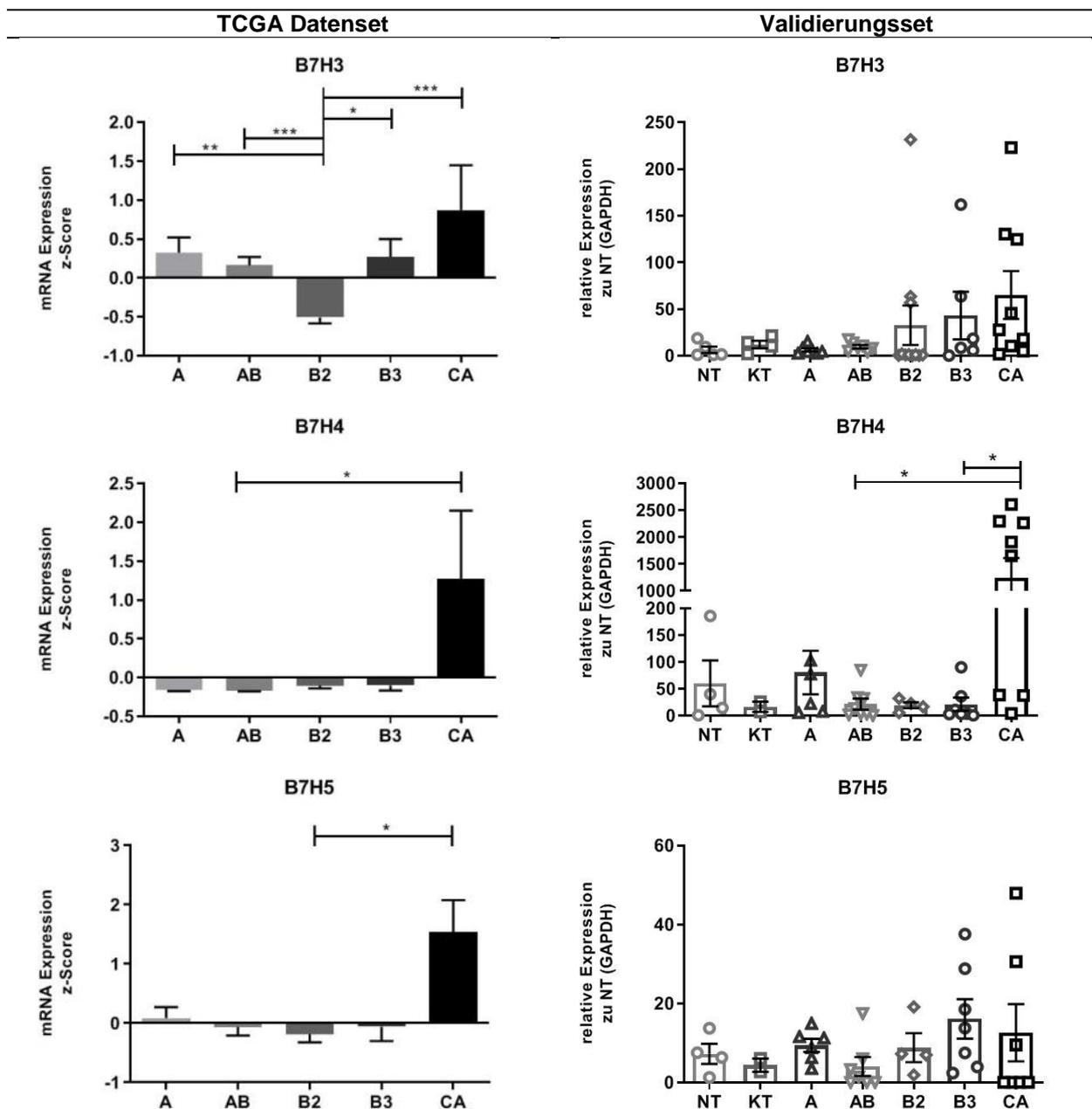


Abbildung 10: Links sind die relativen Expressionswerte (z-Score) der TCGA Datenbank und rechts die Daten des Validierungsset dargestellt (Mittelwerte und SEM). Die relativen Expressionsdaten des Validierungsset wurden auf GAPDH normalisiert und auf einen NT bezogen. Diesem Referenz-NT wurde der Wert 1 zugeordnet.

### 3.5 ICOSL – Co-stimulatorischer Rezeptor der B7-Familie

Als Costimulatorischer Faktor der B7 Familie wurde zudem die Expression des „Inducible T Cell Costimulatory Ligand“ ICOSL untersucht (siehe Abb. 11). Die beiden aggressivsten Neoplasien B3-Thymome und Karzinome zeigen in beiden Datensätzen übereinstimmend erhöhte Expressionswerte (Karzinom > B3). Dabei grenzen sie sich statistisch signifikant (CA vs. B2, p-Wert = 0,0002; B3 vs. B2, p-Wert = 0,0180) gegenüber den meistens indolenten A-, AB- und auch aggressiveren B2-Thymomen ab. Die Expression der A-Thymome ist dabei statistisch signifikant höher als bei B2-Thymomen (p-Wert = 0,0011).

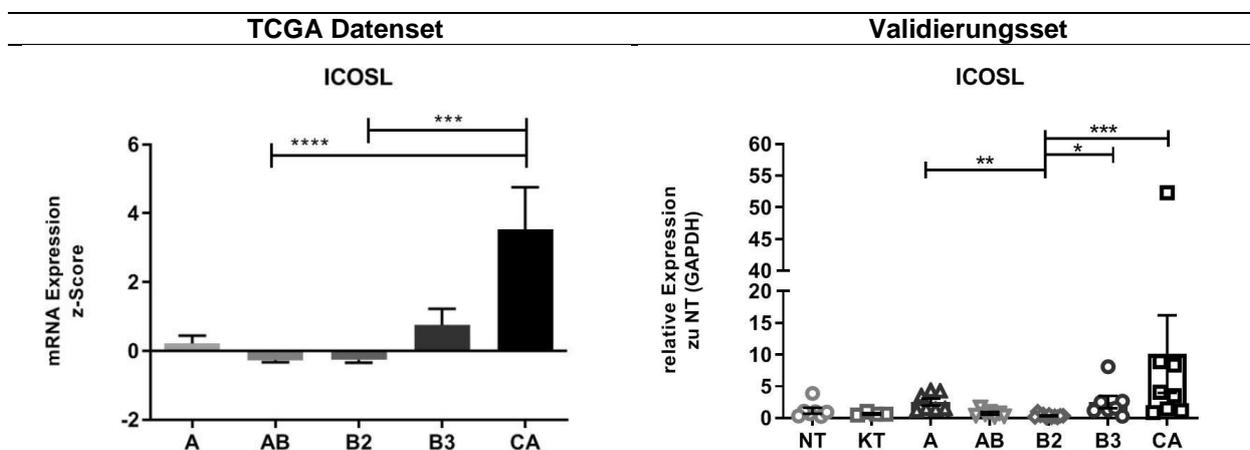


Abbildung 11: Links sind die relativen Expressionswerte (z-Score) der TCGA Datenbank und rechts die Daten Validierungsset dargestellt (Mittelwerte und SEM). Die relativen Expressionsdaten des Validierungssets wurden auf GAPDH normalisiert und auf einen NT bezogen. Diesem Referenz-NT wurde der Wert 1 zugeordnet.

### 3.6 Tumor Nekrose Faktor (TNF) Superfamilie

Zu den immunmodulierenden Oberflächenmolekülen der TNF Familie zählen CD40 und CD70. Eine besonders hohe CD70 Expression zeigen die Thymuskarzinome. Die CD40 Expression ist eher heterogen und neben den Karzinomen auch bei A-, AB- und B3-Thymomen nachweisbar (siehe Abb. 12).

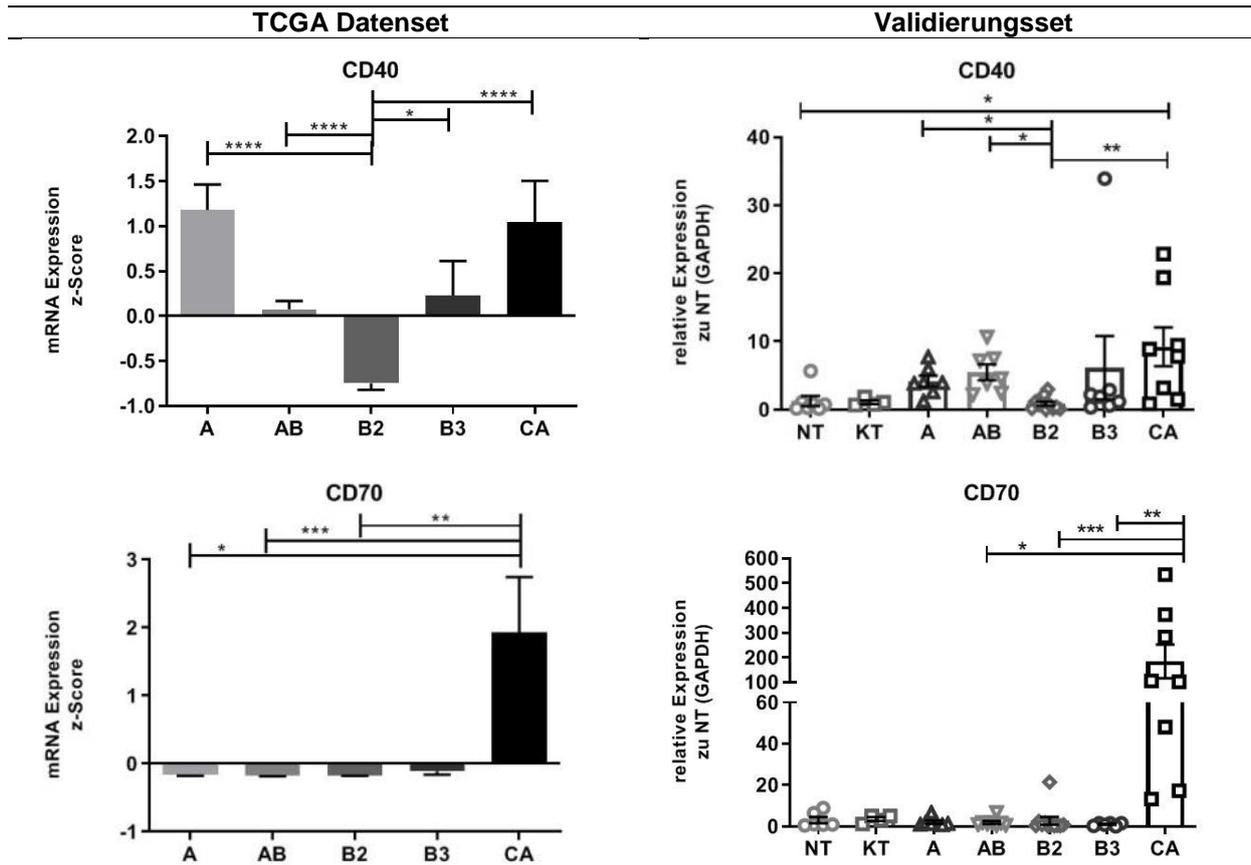


Abbildung 12: Links sind die relativen Expressionswerte (z-Score) der TCGA Datenbank und rechts die Daten des Validierungsset dargestellt (Mittelwerte und SEM). Die relativen Expressionsdaten des Validierungssets wurden auf GAPDH normalisiert und auf einen NT bezogen. Diesem Referenz-NT wurde der Wert 1 zugeordnet.

Die Analyse von HVEM zeigt ebenfalls eine heterogene Expression. Im Gegensatz zu dem TCGA Datensatz, bei dem vorrangig B3-Thymome und Thymuskarzinome eine verstärkte HVEM Expression aufweisen, konnte im Validierungsset zudem eine starke Expression bei AB-Thymomen nachgewiesen werden (siehe Abb. 13).

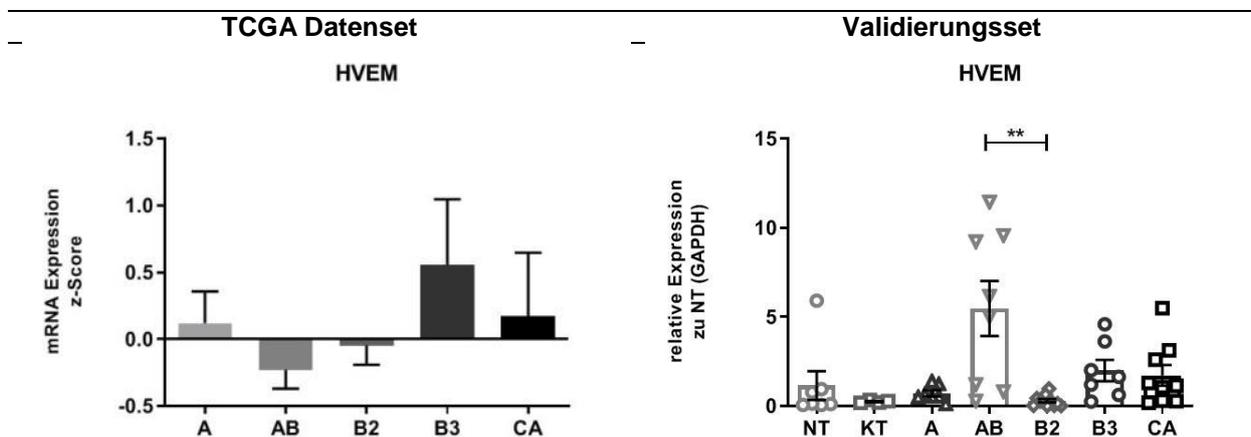


Abbildung 13: Links sind die relativen Expressionswerte (z-Score) der TCGA Datenbank und rechts die Daten des Validierungsset dargestellt (Mittelwerte und SEM). Die relativen Expressionsdaten des Validierungssets wurden auf GAPDH normalisiert und auf einen NT bezogen. Diesem Referenz-NT wurde der Wert 1 zugeordnet.

## 3.7 Adhäsionsmoleküle CD54 und CD56

Als nächstes wurden die Adhäsionsmoleküle CD54 (ICAM-1) und CD56 (NCAM-1) untersucht (siehe Abb. 14). Für CD54 ergeben sich unterschiedliche Expressionslevel, jedoch exprimieren B3-Thymome und Thymuskarzinome das Adhäsionsmolekül in beiden Datensätzen übereinstimmend. Zusätzlich zeigen die im Validierungsset untersuchten B2-Thymome eine verstärkte Genexpression. Die stärkste Expression von CD56 konnte für die Thymuskarzinome detektiert werden. Im Validierungsset auffallend erscheinen die KT mit starker CD56-Expression.

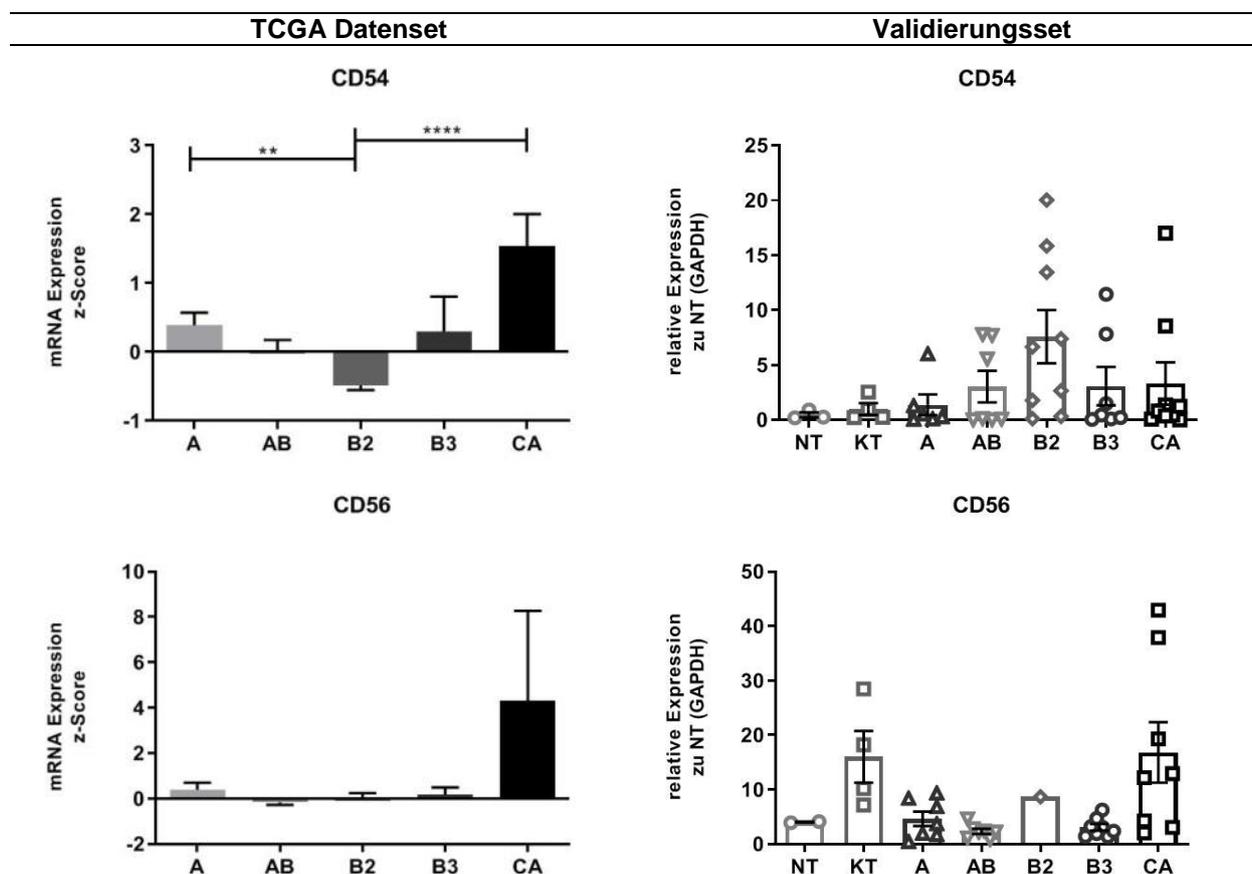


Abbildung 14: Links sind die relativen Expressionswerte (z-Score) der TCGA Datenbank und rechts die Daten des Validierungsset dargestellt (Mittelwerte und SEM). Die relativen Expressionsdaten des Validierungsset wurden auf GAPDH normalisiert und auf einen NT bezogen. Diesem Referenz-NT wurde der Wert 1 zugeordnet.

### 3.8 Galektin 9

Galektin 9 wird insbesondere von den Thymuskarzinomen exprimiert. Dies zeigt sich in den Daten des TCGA und wird durch das Validierungsset bestätigt (siehe Abb. 15). Auch hier ist eine Gruppenbildung in GALS9 stark exprimierende („GALS9-High“) und weniger stark exprimierende („GALS9-Low“) Karzinome erkennbar.

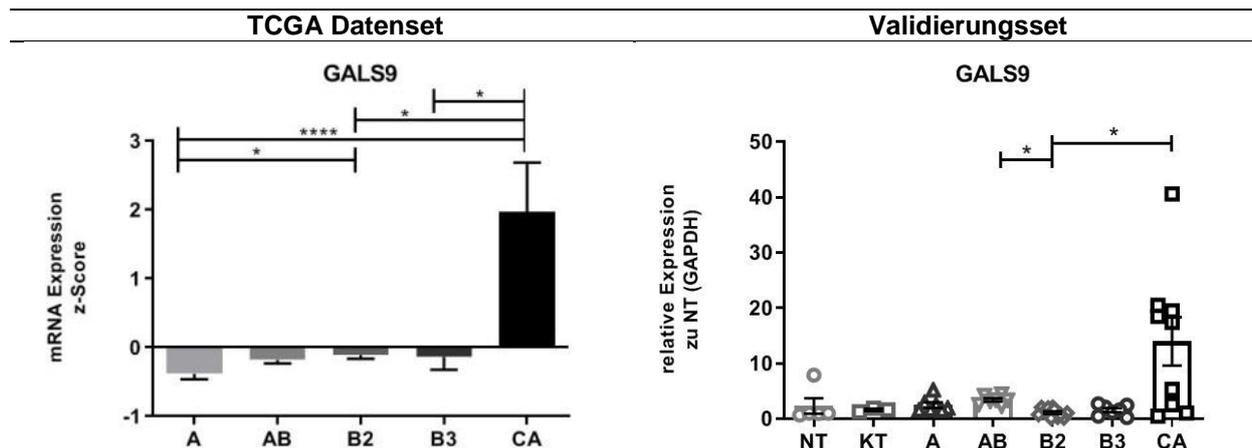


Abbildung 15: Links sind die relativen Expressionswerte (z-Score) der TCGA Datenbank und rechts die Daten des Validierungsset dargestellt (Mittelwerte und SEM). Die relativen Expressionsdaten des Validierungsset wurden auf GAPDH normalisiert und auf einen NT bezogen. Diesem Referenz-NT wurde der Wert 1 zugeordnet.

### 3.9 Histokompatibilitätsantigen HLA-G der MHC-Klasse I

Das abschließend untersuchte Histokompatibilitätsantigen HLA-G, welches ebenfalls immunsupprimierende Wirkungen aufweist, zeigt im Patientenkollektiv ein vielfältiges Expressionsmuster (siehe Abb. 16). Interessanterweise wird das Gen bei den Karzinomen im Vergleich zum NT schwächer exprimiert. Demgegenüber wird im Datensatz des TCGA HLA-G am stärksten bei den Karzinomen gefolgt von den B3-Thymomen exprimiert. Hier liegt also eine Diskrepanz zwischen den TCGA und Validierungskohorten vor.

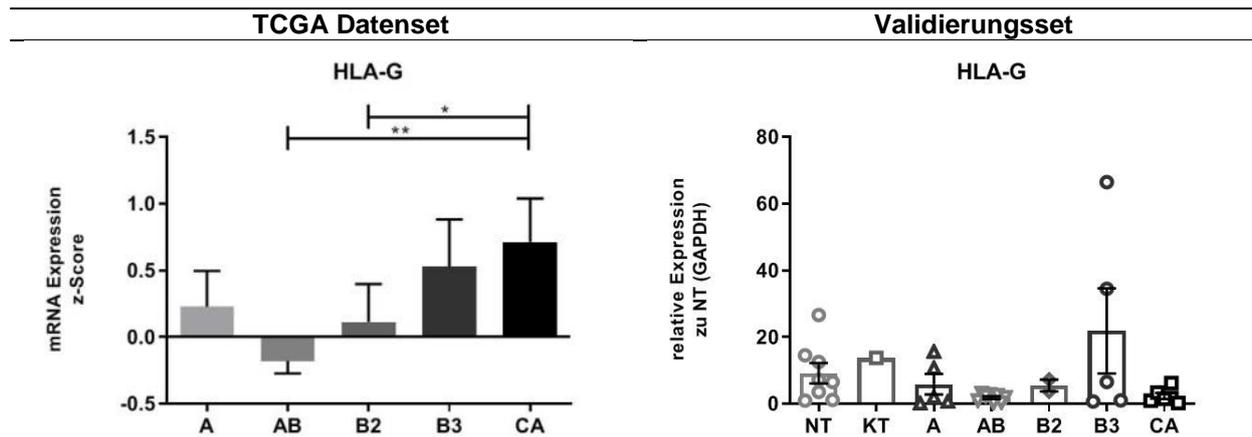


Abbildung 16: Links sind die relativen Expressionswerte (z-Score) der TCGA Datenbank und rechts die Daten des Validierungsset dargestellt (Mittelwerte und SEM). Die relativen Expressionsdaten des Validierungsset wurden auf GAPDH normalisiert und auf einen NT bezogen. Diesem Referenz-NT wurde der Wert 1 zugeordnet.

### 3.10 Charakterisierung der Genexpression der Thymuskarzinome

Nach der Validierung des TCGA Datensatzes durch das untersuchte Kollektiv der Mannheimer Thymomdatenbank stellte sich die Frage inwieweit Coexpressionsmuster der immunsuppressiven Oberflächenmoleküle vorliegen. Zur Orientierung wurden zunächst Expressionsprofile der untersuchten Karzinome des Patientenkollektivs erstellt. Eingeschlossen wurden die B7-Familienmitglieder PD-L1, B7H3, B7H4 und B7H5 sowie zusätzlich GALS9, da bei diesen einerseits eine verstärkte Expression bei Thymuskarzinomen zu beobachten ist und zum anderen Subpopulationen (mit Ausnahme von PD-L1) in „High“- und „Low“-Expressoren bereits zu erkennen waren. In Abbildung 17 ist die relative Expression der untersuchten Gene in Referenz zu einem Normalthymus dargestellt (sog. „Fold change“- Expressionsanalyse).

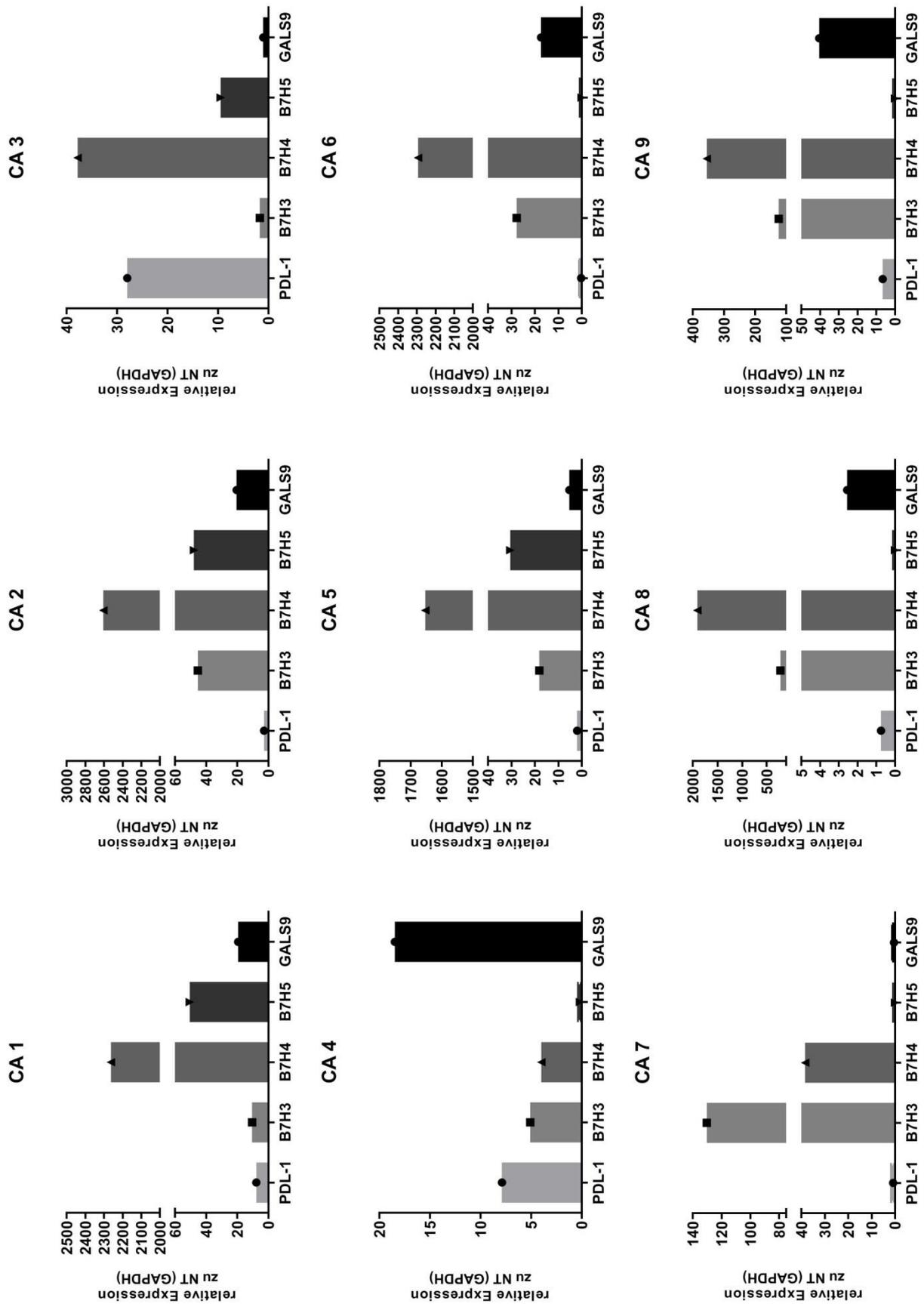


Abbildung 17: Expressionsprofile der neun untersuchten Thymuskarzinome mit ausgewählten Genen. Daten wurden auf GAPDH normalisiert und zeigen die relative Expression in Bezug zu NT. Diesem Referenz-NT wurde der Wert 1 zugeordnet.

Gruppierungen und Coexpressionsmuster sind zunächst nicht eindeutig differenzierbar, jedoch soll mit Hilfe der tabellarischen Übersicht (siehe Tab. 17) der Fokus auf die große Heterogenität und Diversität der stark exprimierten Oberflächenmerkmale der Tumorzellen gelegt werden. Es gibt ein als PD-L1-High klassifiziertes Thymuskarzinom (CA 3). Auffälliger erscheint die B7H4-High Subpopulation, der sieben von neun untersuchten Karzinomen (CA 1, CA 2, CA 3, CA 5, CA 6, CA 7, CA 8, CA 9) angehören (siehe Tab. 17). Vier von diesen exprimieren zusätzlich B7H5 stark, jedoch kann außerdem keine weitere Coexpression in diesen Profilen erkannt werden.

**Tabelle 17: Charakterisierung der jeweiligen Subpopulationen des Validierungsset. CA 1-9 stammen aus dem untersuchten Patientenkollektiv**

<b>Kennzeichen</b>	<b>PD-L1 High</b>	<b>B7H3 High</b>	<b>B7H4 High</b>	<b>B7H5 High</b>	<b>GALS9 High</b>
CA 1			✓	✓	✓
CA 2			✓	✓	✓
CA 3	✓		✓	✓	
CA 5			✓	✓	
CA 8		✓	✓		
CA 9		✓	✓		✓
CA 6			✓		✓
CA 4					✓
CA 7		✓			

B7H3-High und B7H4-High > Faktor 100; B7H5-High > Faktor 30; PD-L1-High und GALS9-High > Faktor 15 im Vgl. zu NT.

Um das quantitativ wichtigste intratumoröse Molekül herauszufinden, wurden in der nächsten Abbildung (Abb. 18) die CT-Werte der untersuchten Gene im Vergleich zum CT-Wert des Haushaltsgens GAPDH (sog.  $\Delta$ CT-Wert) dargestellt. Hierbei rückt insbesondere GALS9 in den Fokus, da dieses bei fünf von neun Thymuskarzinomen (CA1, CA2, CA4, CA6, CA9) nach der GAPDH am stärksten exprimiert wird. PD-L1 wird in dem in Tab. 17 als „PD-L1-High“ eingestuftem Thymuskarzinom (CA3) von allen dargestellten Molekülen am stärksten exprimiert.

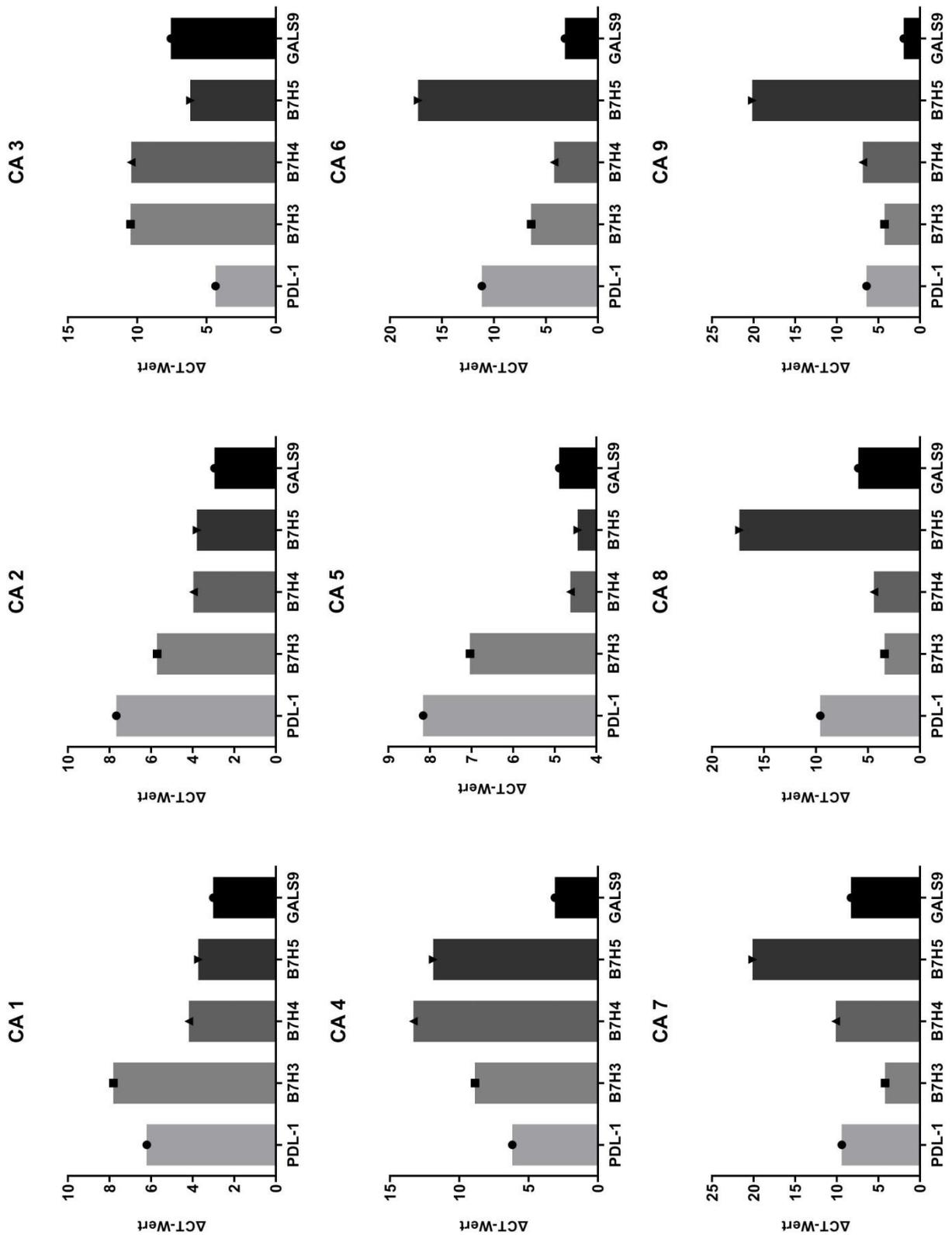


Abbildung 18: Expressionsprofile der neun untersuchten Thymuskarzinome mit ausgewählten Genen. Dargestellt ist der Mittelwert der  $\Delta CT$ -Werte der einzelnen Gene in Referenz zur GAPDH.  $\Delta CT = CT_{Gen} - CT_{GAPDH}$ .

### 3.11 Korrelation einzelner Gene

Mit Hilfe von Korrelationsanalysen wurden die untersuchten Oberflächenrezeptoren auf mögliche Co-Regulationen untereinander untersucht. Die Zusammenhänge zwischen der Expression von B7H3 und PD-L1 ( $p = 0,0968$ ) und B7H3 und B7H5 ( $p = 0,0968$ ) werden jeweils als statistisch hinweisend angenommen. Je stärker ein Thymuskarzinom B7H3 exprimiert, desto höher ist auch die PD-L1 Expression ( $r = 0,6$ ). Negativ korreliert B7H3 jedoch mit B7H5 ( $r = -0,6$ ) (siehe Abb. 19). Die Daten des TCGA können diese Beobachtungen nicht bestätigen und weitere mögliche Korrelationen erwiesen sich als statistisch nicht relevant, so dass auf die Abbildung in dieser Arbeit verzichtet wurde.

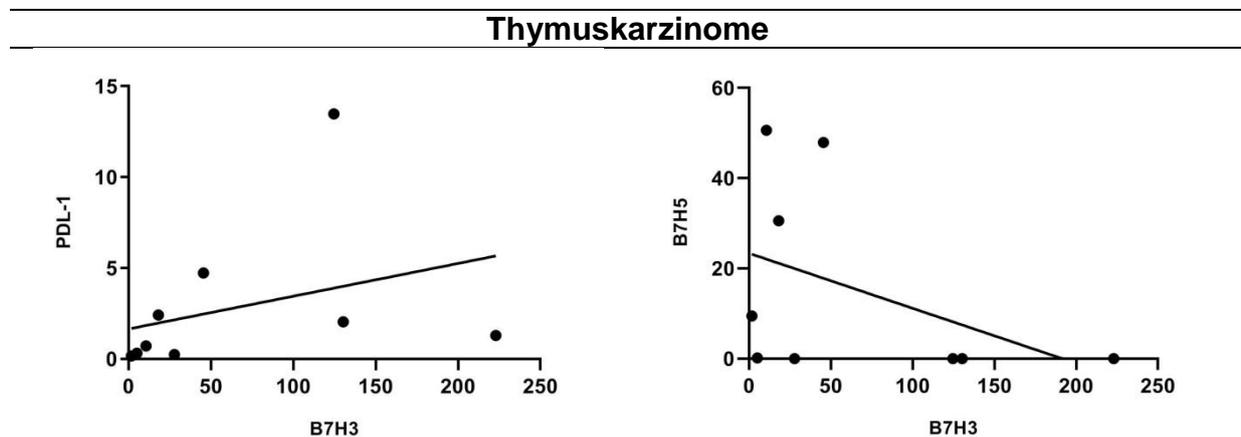


Abbildung 19: Links) Lineare Regression der Expression (RNA) der Gene B7H3 und B7H1 ( $p$ -Wert =  $0,0968$ ) bzw. rechts der Gene B7H3 und B7H5 ( $p$ -Wert =  $0,0968$ ) der Thymuskarzinome des Mannheimer Patientenkollektivs.

### 3.12 Immunhistochemie

Die Expression der immunsuppressiven Oberflächenmoleküle wurde im zweiten Teil der Arbeit zudem auf Proteinebene untersucht. Die immunhistochemischen Färbungen liefern Informationen nicht nur über das funktionell wichtige Ausmaß der Proteinexpression, sondern auch über die Zellen (Tumorzellen, Immunzellen, etc.), welche das untersuchte Merkmal exprimieren. In Abbildung 20 werden exemplarisch Färbungen von PD-L1, B7H3, B7H4, B7H5 und GAL9 bei Thymuskarzinomen des untersuchten Patientenkollektivs präsentiert. Die Expression des Proteins PD-L1 fällt zwischen den untersuchten Thymuskarzinomen heterogen aus und es können sowohl Tumore mit geringer als auch mit hoher Proteinexpression identifiziert werden (siehe Abb. 20, A1 und A2). Eine vergleichbare intertumoröse Heterogenität konnte

auch für die Proteine B7H3 (B1 und B2 in Abb. 20), B7H4 (C1 in Abb. 20) und GAL9 (E1 und E2 in Abb. 20) unter Mitbegutachtung eines erfahrenen Pathologen bestätigt werden. In einem unabhängigen Datensatz von in Paraffin fixierten Thymomen und Thymuskarzinomen konnte gezeigt werden, dass sich die Oberflächenmoleküle der Zellmembran randständig und PD-L1, B7H3, B7H4, GAL9 auf der Zelloberfläche der Tumorzellen exprimiert werden. Gegenzugliches wurde für B7H5 beobachtet, da dieses Protein vornehmlich den Tumor infiltrierenden Immunzellen zugeordnet werden konnte. Während B7H3 und B7H4 auf allen Thymomtypen und Thymuskarzinomen in unterschiedlichem Ausmaß exprimiert wird, kann man für PD-L1 und GAL9 feststellen, dass diese stärker bei den Thymuskarzinomen exprimiert werden (siehe Tab. 18).

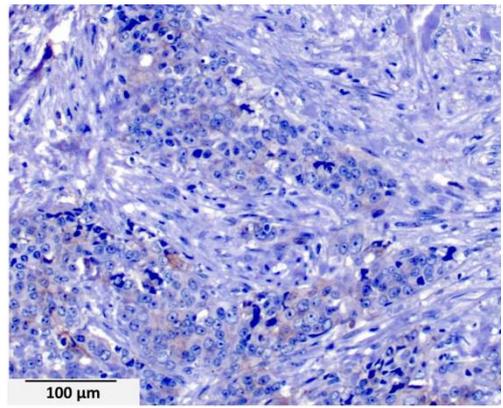
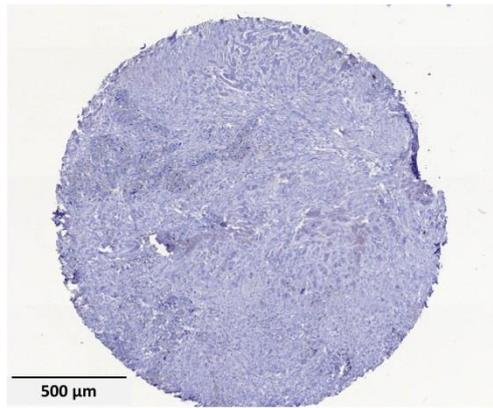
**Tabelle 18: Proteinexpression der Tumorzellen von unabhängig gefärbten Thymomen und Thymuskarzinomen.**

	<b>PD-L1</b>	<b>B7H3</b>	<b>B7H4</b>	<b>B7H5</b>	<b>GAL9</b>
<b>A</b>	0%	80% (4)	80% (4)	0%	0%
<b>AB</b>	18% (3)	35% (6)	35%(6)	0%	6% (1)
<b>B1</b>	0%	0%	25% (1)	0%	0%
<b>B2</b>	46% (5)	18% (2)	27% (3)	0%	0%
<b>B3</b>	27% (3)	27% (3)	36% (4)	0%	18% (2)
<b>CA</b>	60% (12)	35% (7)	45% (9)	0%	70% (14)

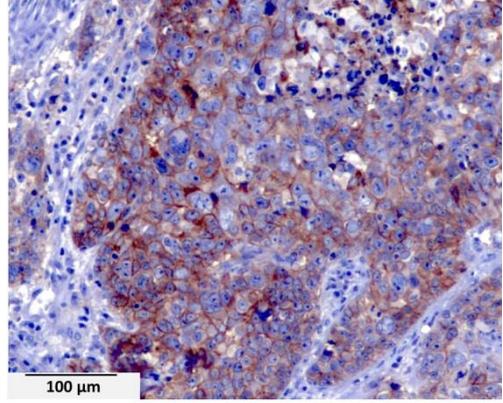
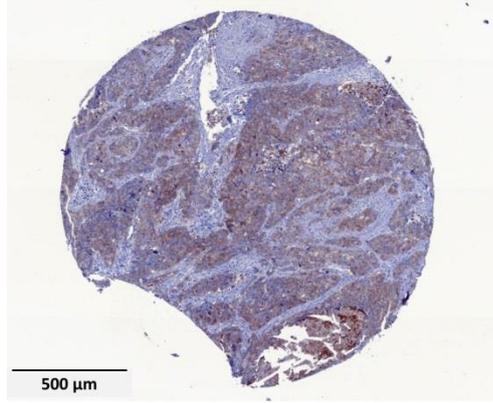
A (n=5); AB (n=17); B1 (n=4); B2 (n=11); B3 (n=8); CA (n=20). Anzahl der positiven Fälle in %. In Klammern die absolute Anzahl. Als positiv wurden ausschließlich Tumore mit >5% positiver Tumorzellen gewertet (Tumor Proportional Score >5%).

**Thymuskarzinome**

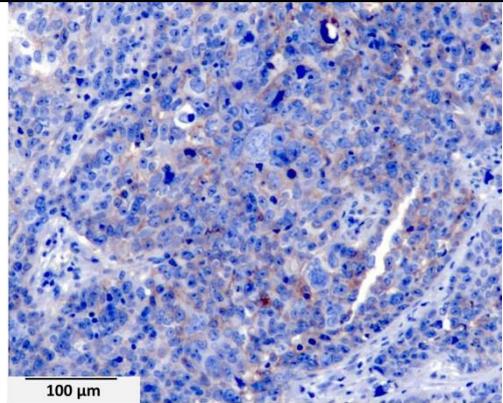
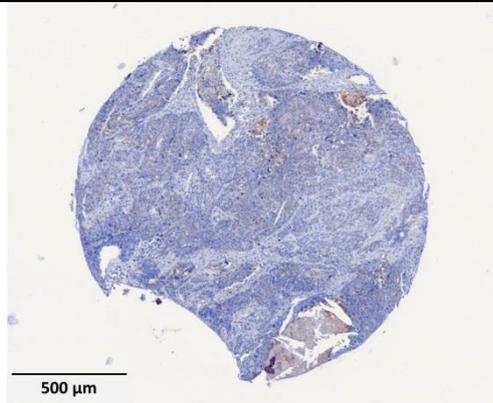
**A1)  
PD-L1  
Low**



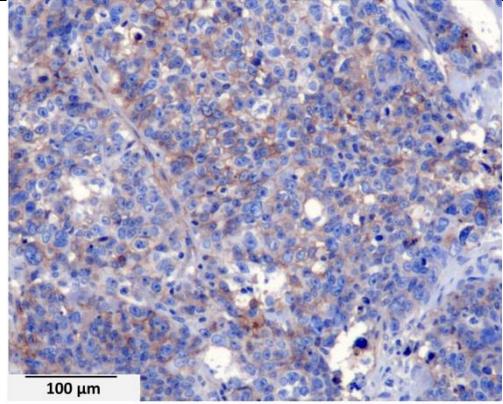
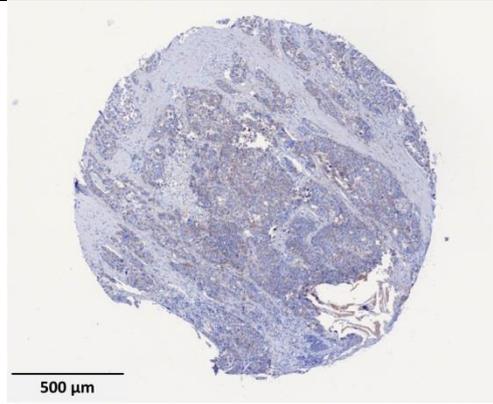
**A2)  
PD-L1  
High**



**B1)  
B7H3  
Low**



**B2)  
B7H3  
High**



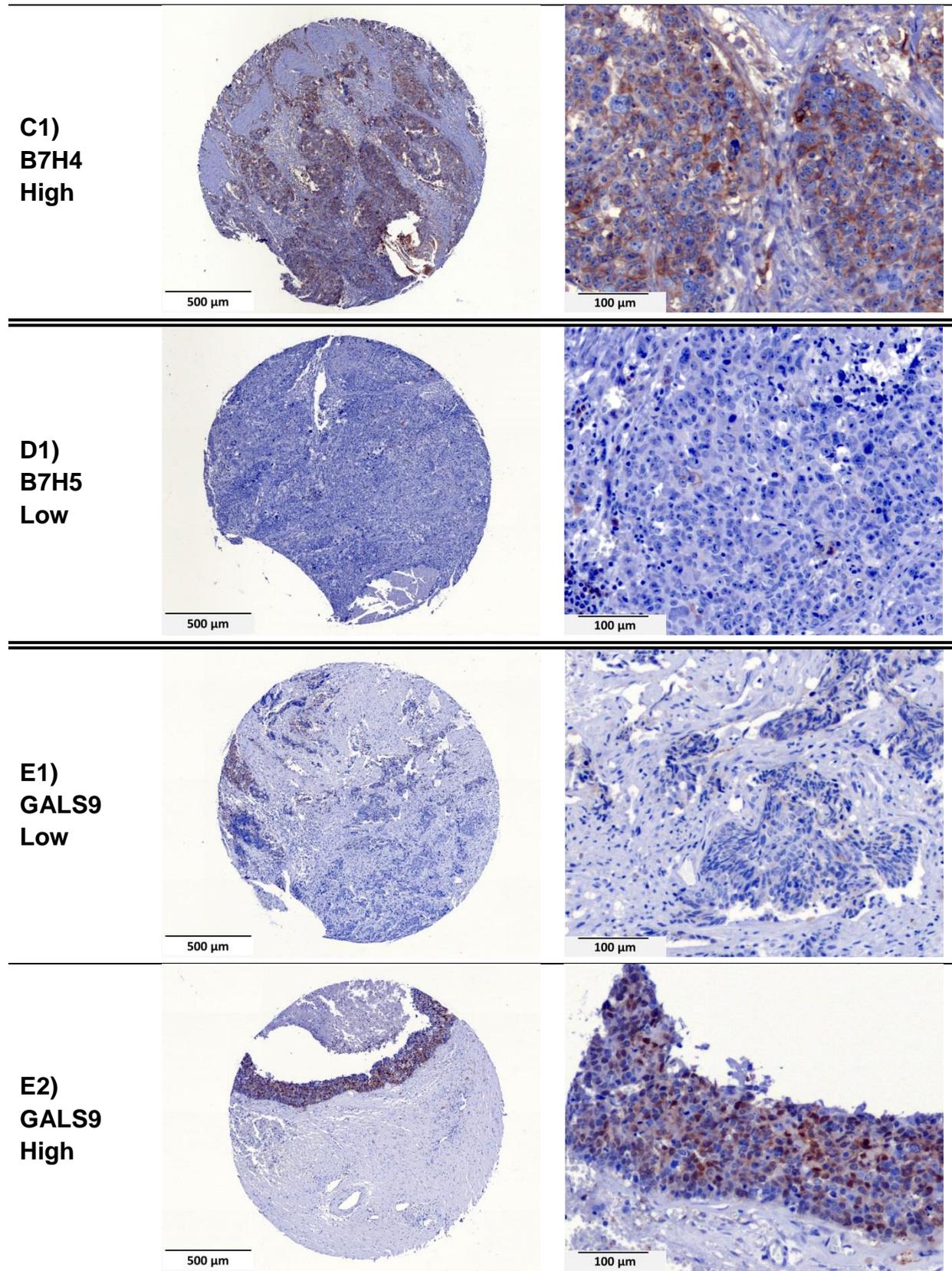
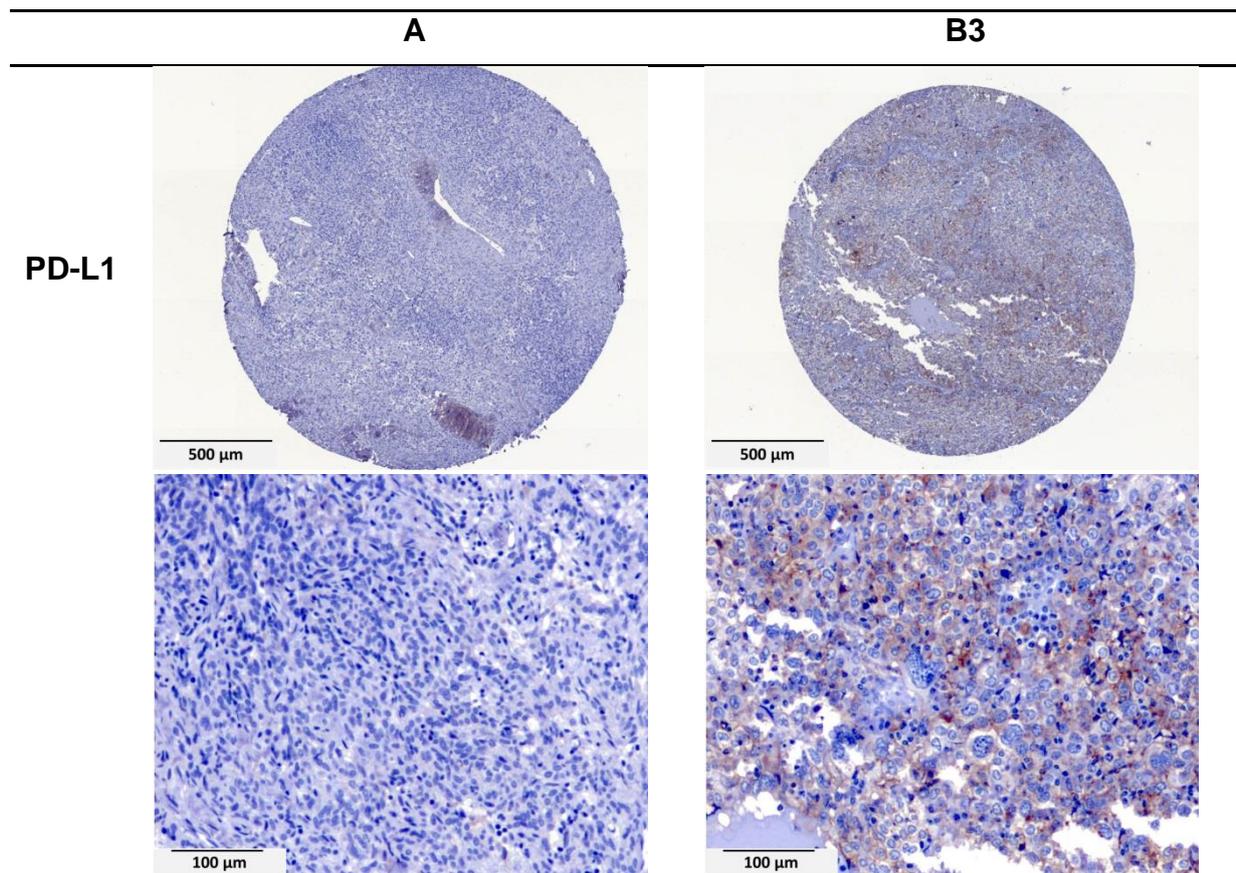


Abbildung 20: Immunhistochemische Darstellung der Proteine PD-L1, B7H3, B7H4, B7H5 und GALS9 in Tumorzellen unterschiedlicher Thymuskarzinome (A1-E2).

Es wurden nicht nur Thymuskarzinome, sondern auch Thymome der einzelnen Subtypen immunhistochemisch gefärbt. Exemplarisch werden in Abbildung 21 die PD-L1 Expression eines A-Thymoms als Vertreter der niedrigmalignen Subtypen und eines hochmalignen B3-Thymom gezeigt. Von besonderem Interesse ist die sichtbare PD-L1 Expression der B3-Thymome, die bereits quantitativ in der qRT-PCR nachgewiesen wurde. Wie erwartet sind bei den niedrig malignen Thymomtypen A, AB und B2 keine bis wenige Proteine der B7-Familie und Galektin 9 nachweisbar, daher wird auf die entsprechende Darstellung im Folgenden verzichtet.



**Abbildung 21: Immunhistochemischer Nachweis von PD-L1 eines A- und eines B3-Thymoms (von links nach rechts).**

### 3.13 Vergleich der RNA- und Proteinexpression

Vier Thymuskarzinome (CA 2, CA 5, CA 7 und CA 9) wurden sowohl auf RNA-Ebene (mittels qtRT-PCR) als auch auf Proteinebene (mittels Immunhistochemie) hinsichtlich der Expression der Immuncheckpoints PD-L1, B7H3, B7H4, B7H5 und GALS9 untersucht (siehe Abbildung 22.1 und 22.2). Hierbei sind drei Beobachtungen auffällig: 1) Für zwei Karzinome (CA 2 und CA 9) wird bei gleichzeitig starker Genexpression die Proteinexpression von GALS9 vermehrt auf den Tumorzellen als

auf den Nicht-Tumorzellen sichtbar. Dies gilt ebenso für das Karzinom CA 7 und das Molekül B7H4. 2) Andererseits gibt es Karzinome, deren Genexpression eine Hochregulation eines Moleküls anzeigen, jedoch wird das Protein ausschließlich auf den Immunzellen (Nicht-Tumorzellen) und nicht auf den Tumorzellen exprimiert (z.B. die Moleküle B7H4, B7H5 und GALS9 in CA 5). 3) In dem Karzinom CA 7 sind zwar die Gene B7H5 und GALS9 stark exprimiert, jedoch die zugehörigen Proteine in der Immunhistochemie nicht anfärbbar.

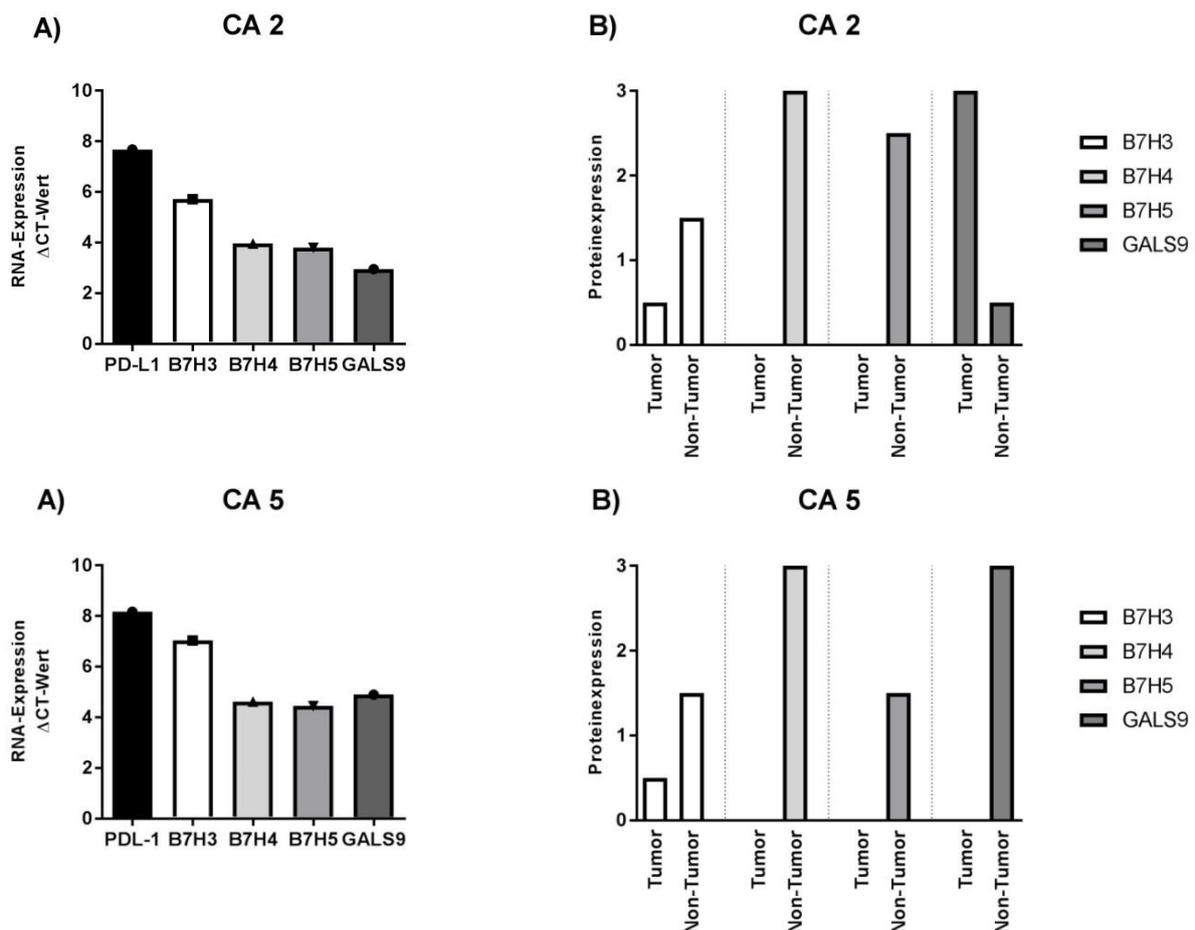
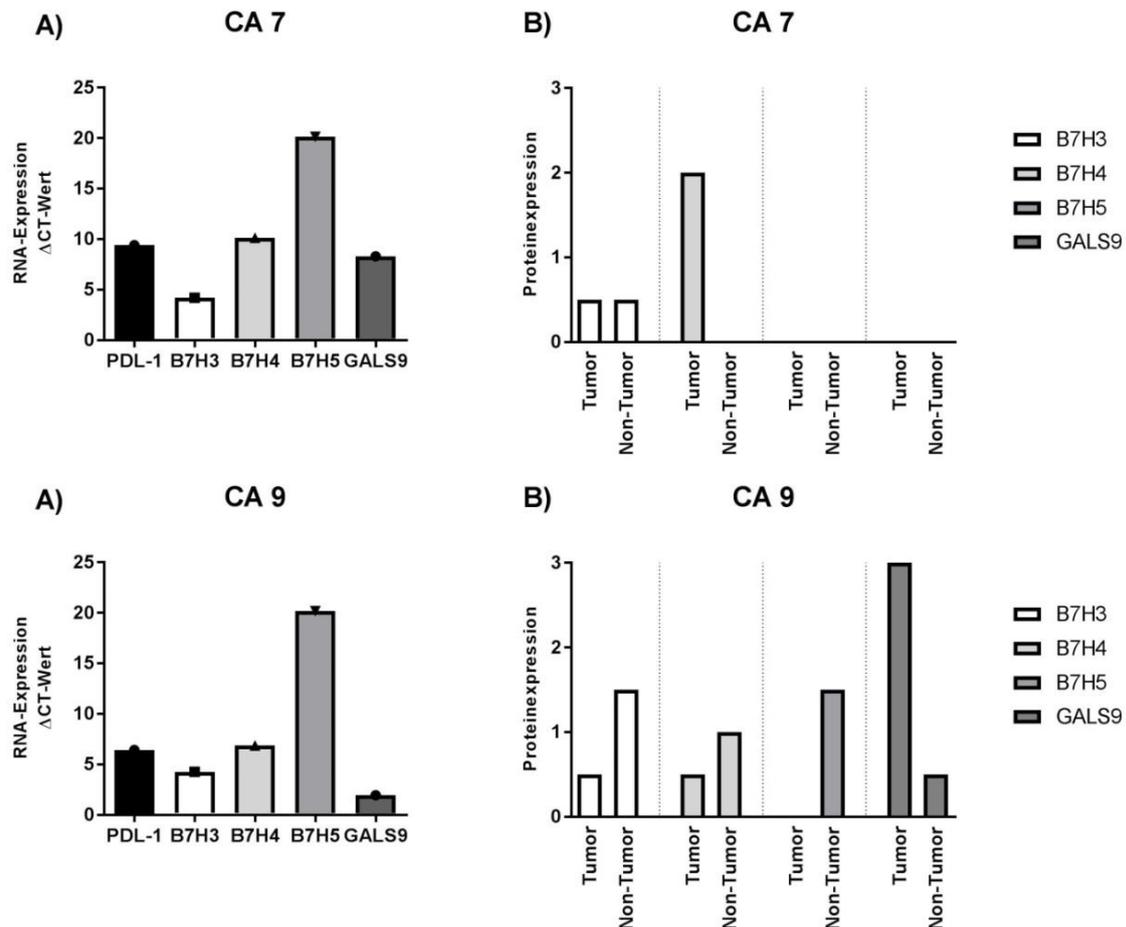


Abbildung 22.1: A) Die RNA-Expressionswerte der Oberflächenrezeptoren PD-L1, B7H3, B7H4, B7H5 und GALS9 der Thymuskarzinomen CA 2 und CA 5 sind mit Hilfe der  $\Delta\text{CT}$ -Werte dargestellt. B) zeigt die Proteinexpression der Oberflächenrezeptoren B7H3, B7H4, B7H5 und GALS9 derselben Thymuskarzinome. Die Expressionsstärke wurde mit Hilfe eines erfahrenen Pathologen nach folgendem Bewertungsschema beurteilt: keine Expression = 0, leichte Expression = 1, mittelstarke Expression = 2, starke Expression = 3. Tumor = Tumorzellen. Non-Tumor = Immunzellen und Stromazellen.



**Abbildung 22.2:** A) Die RNA-Expressionswerte der Oberflächenrezeptoren PD-L1, B7H3, B7H4, B7H5 und GALS9 von vier Thymuskarzinomen CA 7 und CA 9 sind mit Hilfe der  $\Delta$ CT- Werte dargestellt. B) zeigt die Proteinexpression der Oberflächenrezeptoren B7H3, B7H4, B7H5 und GALS9 derselben Thymuskarzinome. Die Expressionsstärke wurde mit Hilfe eines erfahrenen Pathologen nach folgenden Bewertungsschema beurteilt: keine Expression = 0, leichte Expression = 1, mittelstarke Expression = 2, starke Expression = 3. Tumor = Tumorzellen. Non-Tumor = Immunzellen und Stromazellen.

Die Proteinexpression von PD-L1 wurde mittels der in der Diagnostik gängigen Scoringmethoden TPS (Tumor Proportion Score), ICS (Immunzellscore) und CPS (Combined Positivity Score) analysiert. Die Scores sind für die Thymuskarzinome CA 2, CA 5, CA 7 und CA 9 in Tab. 19 aufgelistet.

Tabelle 19: Quantifizierung der PD-L1 Proteinexpression mittels der Scoringssysteme TPS, ICS und CPS

	TPS	ICS	CPS
<b>CA 2</b>	10%	2%	12%
<b>CA 5</b>	95%	0%	95%
<b>CA 7</b>	<1%	0	<1%
<b>CA 9</b>	2%	<1%	2%

TPS – Tumor Proportion Score, ICS – Immuncellscore, CPS – Combined Positivity Score

### 3.14 Zelllinie 1889c als Modell für Thymuskarzinome

Im dritten Teil der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwieweit die etablierte Thymuskarzinomzelllinie 1889c als Modellsystem für die Erprobung blockierender Antikörper bei immunsuppressiven Oberflächenmolekülen dienen könnte. Untersucht wurden zunächst die von Thymuskarzinomen exprimierte Adhäsionsmoleküle CD54 und CD56. Aus Vorarbeiten an anderen Zelllinien am Institut für Pathologie waren bereits Daten zu den eingesetzten Antikörpern vorhanden, was die Etablierung an der Thymuskarzinomzelllinie vereinfachte. Als Marker für epitheliale Zellen wurde das epitheliale Zelladhäsionsmolekül (EPCAM) bestimmt. Als mesenchymale Kontrollzelllinie diente die Rhabdomyosarkomzelllinie TE671. Wie in Abbildung 23 gezeigt, exprimiert die Thymuskarzinomzelllinie sowohl CD54 als auch CD56 an ihrer Zelloberfläche, sodass die Thymuskarzinomzelllinie 1889c für die nachfolgenden und CD54- und CD56- bezogenen funktionellen Experimente als geeignetes Modell angenommen wurde.

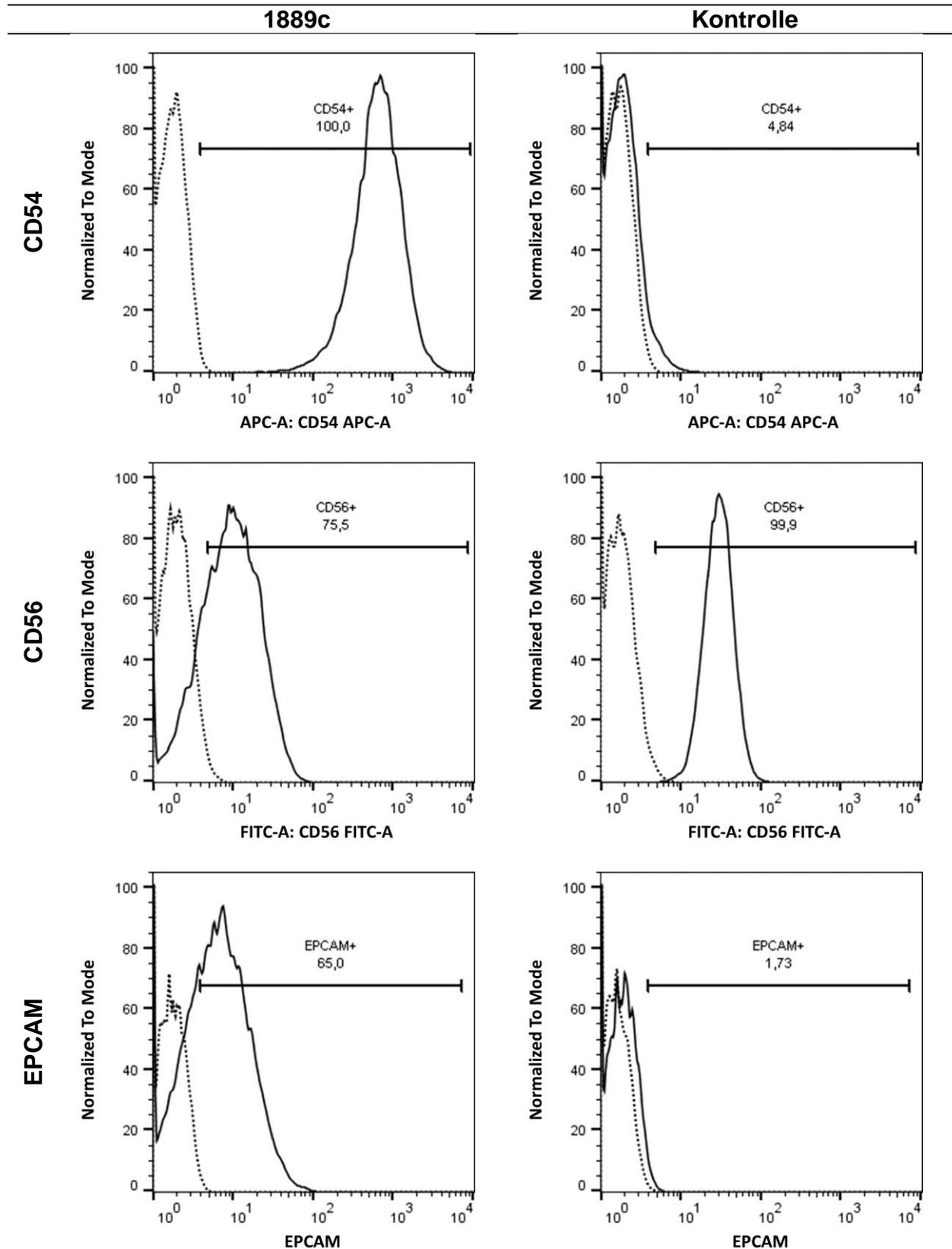


Abbildung 23: Durchflusszytometrie der Merkmale CD54, CD56 und EPCAM. Die durchgezogene repräsentiert jeweils die untersuchte Probe und die gestrichelte Linie die jeweilige Isotypkontrolle. 1889c = Zelllinie eines Thymuskarzinoms. Kontrolle = Zelllinie eines embryonalen Rhabdomyosarkoms.

### 3.15 Zytotoxizität der T-Zellen, Natürlichen Killerzellen und Zytokin-induzierten Killerzellen

Im nächsten Schritt wurden die Tumorzellen mit zytotoxischen T-Zellen, Natürlichen Killerzellen (NK) und Zytokin-induzierte Killerzellen (CIK) coinkubiert. In der folgenden Abbildung 24 sind die zytotoxischen Eigenschaften der jeweiligen Zelltypen dargestellt. Die Zytokin-induzierte Killerzellen greifen die Tumorzellen der Thymuskarzinome dosisabhängig, aber mit geringer Effizienz an. Über die Hälfte der Tumorzellen überleben nach Inkubation mit  $5 \times 10^4$  Killerzellen (was einer Tumorzell/Immunzell Ratio von 1:10 entspricht). Die Natürlichen Killerzellen sind zwar in ihren zellschädigenden Eigenschaften potenter, aber auch sie zeigen inkomplette zytotoxische Effekte, während die Zellen der Kontrollzelllinie TE671 fast vollständig eliminiert werden.

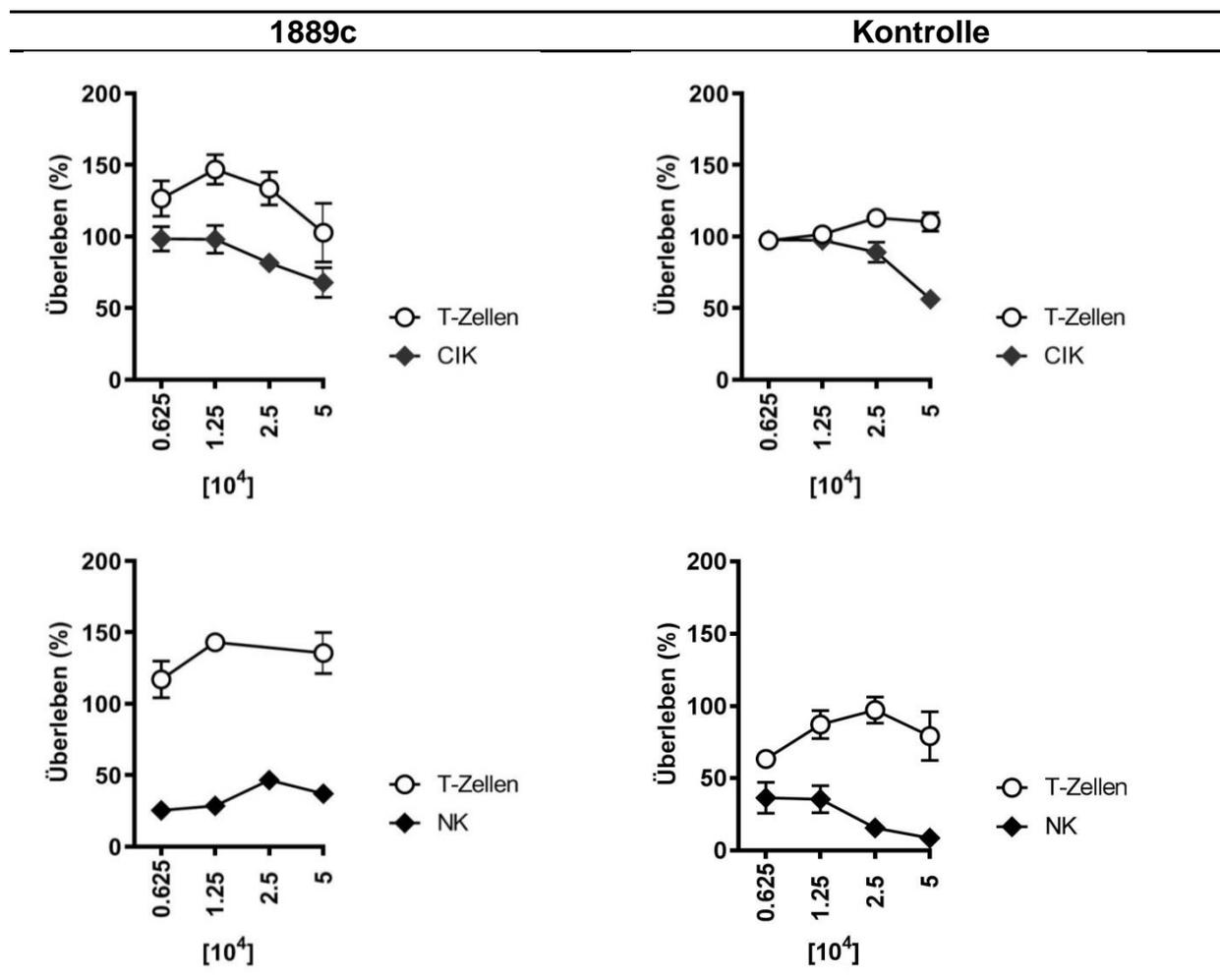


Abbildung 24: Zytotoxische Eigenschaften der untersuchten T-Zellen, Cytokin-induzierten Killerzellen (CIK) und Natürlichen Killerzellen (NK). 1889c = Zelllinie eines Thymuskarzinom. Kontrolle = Zelllinie eines embryonalen Rhabdomyosarkom. Auf der x-Achse ist die jeweilige Verdünnungsreihe der Immunzellen in den angegebenen Konzentrationen und in Triplikaten gemessen dargestellt. Dargestellt sind der Mittelwert und Standardfehler (SEM) zweier unabhängig voneinander untersuchten Probanden.

### 3.16 Zytotoxischer Effekt von CIK nach Blockierung von CD54 und CD56

Um herauszufinden inwiefern die Blockierung der immunmodulatorischen Oberflächenrezeptoren CD54 und CD56 die zytotoxischen Eigenschaften der CIK und T-Zellen beeinflusst, wurde obiges Experiment unter dem zusätzlichem Einsatz monoklonaler blockierender Antikörper wiederholt. Bei einer Effektorzellzahl von  $1,25 \times 10^4$  (was einer Tumorzell/Immunzell Ratio von 1:4 entspricht) zeigen sich beim Einsatz eines CD54 blockierenden Antikörpers verminderte Zelllyseraten bei den Thymuskarzinomzelllinien nach Inkubation mit CIK Zellen (siehe Abb. 25 A). Für die Kontrollzelllinie TE671, die keine CD54 Expression aufweist, kann kein Unterschied nachgewiesen werden. Nach Inkubation der Tumorzellen mit einem CD56-blockierenden Antikörper ist ein stark verbesserter zytotoxischer Effekt der T-Zellen zuerkennen (siehe Abb. 25 A). Bei höheren Effektorzellkonzentrationen von  $2,5 \times 10^4$  (Tumorzell/Immunzell Ratio von 1:2) zeigt die Thymuskarzinomzelllinie nach Inkubation mit blockierenden CD54 Antikörpern ein signifikant schlechteres Ansprechen und schlechtere Zelllyseraten für die CIK (siehe Abb. 25 B) und die Inkubation mit CD56-blockierenden Antikörpern verursacht keine signifikanten Änderungen der Zytotoxizitätsraten der T- und CIK Zellen (siehe Abb. 25 B).

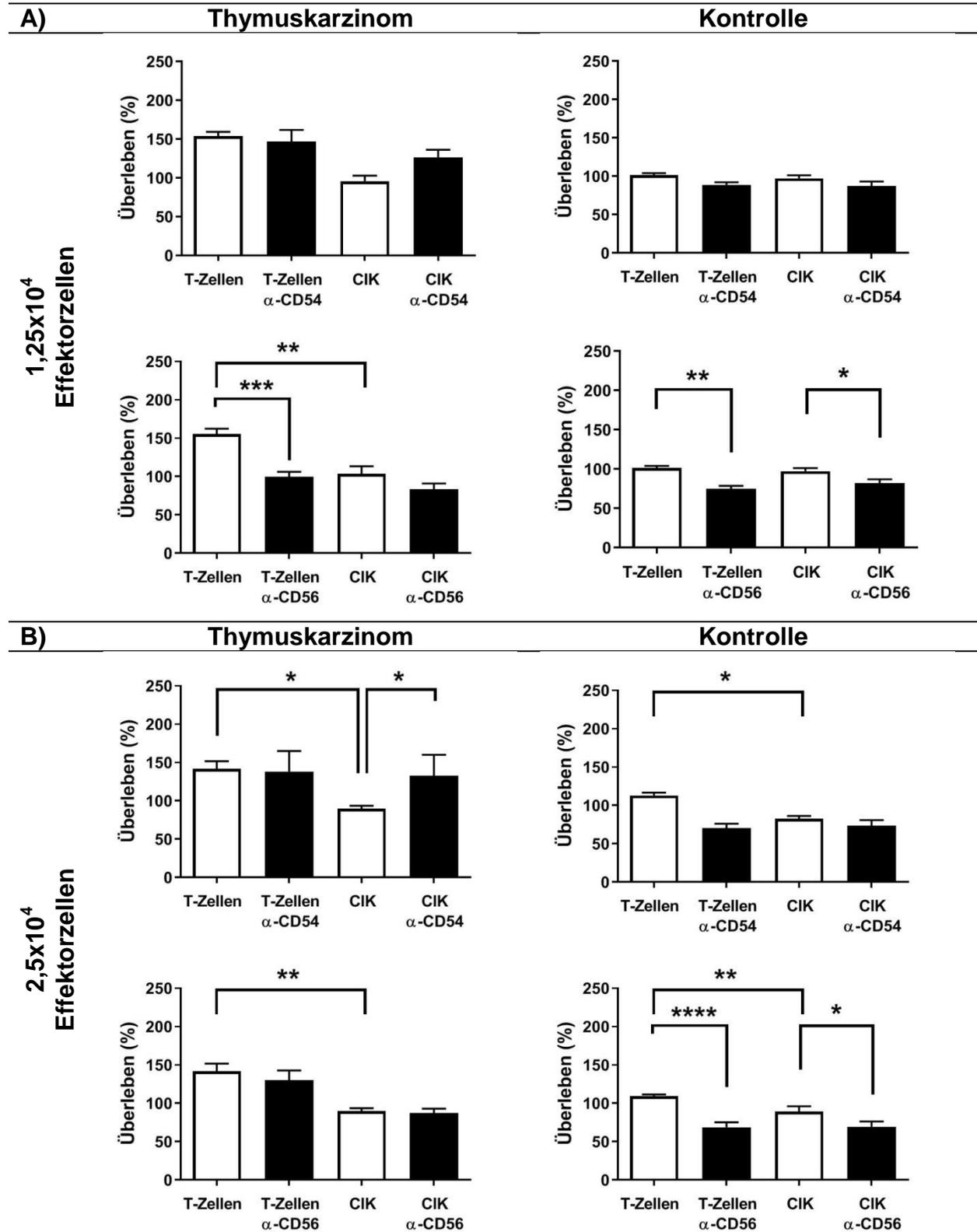


Abbildung 25: Zytotoxische Eigenschaften der T- Zellen und Zytokin-induzierten Killerzellen (CIK) nach Inkubation mit CD54 und CD56 blockierender Antikörper. Untersucht wurden die Effektorzellen zweier gesunder Probanden in 2 verschiedenen Konzentrationen. Linke Spalte) Zellreihe der Thymuskarzinome 1889c. Rechte Spalte) mesenchymalen Kontrollgruppe.

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Hintergrund und Ziele der Arbeit

Immuntherapeutische Verfahren sind für Wissenschaftler, Ärzte und Patienten ein aufkommender Hoffnungsschimmer in der Therapie resistenter, fortgeschrittener oder wiederkehrender Tumorerkrankungen. Besonders dann, wenn konventionelle Methoden nicht die gewünschte Remission oder Linderung der Erkrankung erbringen können. Trotz moderner und innovativer Behandlungsmethoden ist weiterhin die vollständige chirurgische R0-Resektion das Schlüsselkriterium hinsichtlich der Prognose und Kuration in der Therapie der hochaggressiven Thymome und Thymuskarzinome, da adjuvante Therapieverfahren bislang nur unzureichende Erfolgsquoten aufweisen können. Sofern die komplette Resektion bei fortgeschrittenen, inoperablen oder wiederkehrenden Tumoren nicht erfolgsversprechend ist, benötigt es ein multimodales und auf den Patienten individuell abgestimmtes Behandlungskonzept. Trotzdem werden oftmals in der gesamten Onkologie Therapieversuche mit nur niedrigen Antwortraten und unter Inkaufnahme starker Nebenwirkungen für den Patienten angewandt (Conforti et al., 2020). Für die Zukunft und den gezielten immuntherapeutischen Einsatz von Antikörpern wird es umso wichtiger sein i) die Biologie der Tumorgewebe besser zu verstehen ii) die „Escape“-Mechanismen der Tumorzellen vor dem eigenen Immunsystem vollständig aufzudecken und iii) geeignete Biomarker vor dem Einsatz der neuen Immuntherapeutika zu identifizieren. Dadurch könne die Effizienz der Therapie und damit auch die Antwort- und Überlebensraten der Patienten bei gleichzeitigen moderaten Nebenwirkungen erhöht werden (Conforti et al., 2020) (Omar and Tolba, 2019).

Mit dieser Arbeit ist es gelungen, Grundlagenkenntnisse über die Genexpression bekannter immunmodulatorischer Oberflächenrezeptoren bei Thymomen und Thymuskarzinomen im Vergleich zum Normalthymus zu gewinnen. So exprimieren die hochmalignen B3-Thymome und Thymuskarzinome eine höhere Anzahl dieser Moleküle und in stärkerem Ausmaß als die niedrigmalignen Tumore (A-, AB- und B2-Thymome). Zudem wurden bei den untersuchten Thymuskarzinomen Subpopulationen mit geringer oder starker Expression der Gene identifiziert, die für B7H3, B7H4 und GALS9 kodieren. Diese konnten auch auf Proteinebene mittels immunhistochemischer Färbungen nachgewiesen werden. Aus diesen Erkenntnissen

lässt sich bereits ableiten, dass für eine wirksame Immuntherapie bei Thymuskarzinomen eine individuelle Charakterisierung des Tumors notwendig ist. Hierfür sind aber insbesondere bzgl. der oben genannten Moleküle weitere grundlegende Beobachtungen hinsichtlich der Tumorbiologie zu erheben.

#### 4.2 PD-L1 Expression als Biomarker in Thymusneoplasien?

Ein Problem bei der Beurteilung der in der Literatur mitgeteilten Prävalenzen der PD-L1 Expression bei Thymustumoren sind i) nicht standardisierte Nachweismethoden und ii) ein fehlender Konsens über Grenzwerte, bei deren Überschreiten ein Tumor als PD-L1 positiv bewertet wird. Daher schwanken die Angaben zur PD-L1 Expression bei Thymomen zwischen 68% und 94% und bei Thymuskarzinomen zwischen 34% und 88% (Conforti et al., 2020). Andere Arbeiten berichten über große intratumoröse Schwankungsbreiten der PD-L1 Expression von 23% bis 92% PD-L1 positiven Thymomzellen und 36% bis 100% PD-L1 positiven Zellen von Thymuskarzinomen (Zhao and Rajan, 2019). Im Rahmen dieser Arbeit hat eine prozentuale Quantifizierung der Genexpressionswerte des untersuchten Patientenkollektivs nicht stattgefunden. Die immunhistochemisch untersuchten Proben wurden ab einem Tumor Proportion Score > 5% als positiv bewertet, sodass in dieser Arbeit 60% der Thymuskarzinome und 24% der Thymome (siehe Tab. 17) als PD-L1-positiv definiert wurden. Allein diese Zahlen lassen vermuten, dass aufgrund der verschiedenen starken Expression nur ein Teil der Patienten von einer  $\alpha$ -PD-L1 Therapie profitieren würde. Die in 1.6 vorgestellten klinischen Studien unterstützen diese Hypothese, indem eine hohe PD-L1 Proteinexpression mit einem längeren Überleben oder höheren Antwortraten der eingesetzten Antikörper in Verbindung gebracht werden (Cho et al., 2017) (Giaccone et al., 2017) (Rajan et al., 2019). Allerdings ist einschränkend zu sagen, dass Erfahrungen aus dem Einsatz  $\alpha$ -PD-L1 Antikörper bei malignen Melanomen oder Urothelkarzinomen den Schluss zulassen, dass die PD-L1 Expression als alleiniger prädiktiver Biomarker für den Erfolg einer Immuntherapie nicht auszureichen scheint, da auch Patienten mit Tumoren mit niedriger PD-L1 Expression von einer Antikörpertherapie profitieren können (Mandalà et al., 2016) (Yi et al., 2018). Obwohl die vorliegende Arbeit gezeigt hat, dass auch bei Thymomen und Thymuskarzinomen PD-L1 zu den am stärksten exprimierten Co-inhibitorischen Molekülen zählt, lässt die neu entdeckte, sehr heterogene Expression auch andere Co-Inhibitoren vermuten, die letztlich die

Erfassung eines Spektrums immunmodulatorischer Oberflächenrezeptoren für die Etablierung einer zielgerichteten und erfolgreichen Immuntherapie bei Thymomen und Thymuskarzinomen erfordern.

#### 4.3 Immuntherapie der Zukunft

Es wird angenommen, dass u.a. die sog. Tumormutationslast (TMB; Tumor Mutation Burden) ein Prädiktor für den Erfolg einer Immuntherapie sei. Unter der TMB versteht man die Gesamtzahl erworbener Variationen einzelner Basenpaare des komplementären DNA-Doppelstrangs, die Fremdantigene auf den Tumorzellen erzeugen und somit über die antigenpräsentierenden Mechanismen eine Immunantwort hervorrufen und den Effekt von Immuncheckpoint-Inhibitoren begünstigen können. Je höher also die TMB eines Tumors ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit eines erfolgreichen Ansprechens einer immunmodulatorischen Therapie (Samstein et al., 2019). Die Suche nach einer erfolgsversprechenden Immuntherapie bei epithelialen Tumoren des Thymus wird u.a. dadurch limitiert, dass Thymome und Thymuskarzinome unter allen Malignomen des Erwachsenen die geringste TMB aufweisen (Zhao and Rajan, 2019). Grundsätzlich ist man sich jedoch einig, dass mit der Aktivierung der körpereigenen Immunität gegen Tumore ein riesiger Fortschritt in der Onkologie erzielt werden kann. Trotz oder gerade wegen der geringen TMB bei Thymusneoplasien ist es wichtig ein Portfolio der Immuncheckpoints zu erheben und die Spezifikationen der Tumorgewebe zu kennen. Diese Arbeit liefert hierfür Ihren Beitrag, indem Immuncheckpoints in Ihrer Expression breit angelegt untersucht wurden und die Charakterisierung der Thymome und Thymuskarzinome vorangetrieben wurde. Wegweisend für die Zukunft sind insbesondere folgende Erkenntnisse:

- 1) Die Breite an Oberflächenrezeptoren, die auf den Tumorzellen im Vergleich zu Normalthymusgewebe mittel bis stark hochreguliert exprimiert werden, erlaubt die Annahme, dass eine einzelne Zielstruktur im Rahmen einer Immuntherapie nicht ausreichen wird, um bessere als die bisher erzielten Antwortraten erzielen zu können. Außerdem haben sich in dieser Arbeit keine signifikanten Korrelationen zwischen unterschiedlichen Co-inhibitorischen Molekülen finden lassen, so dass es in diagnostischer Hinsicht nicht möglich erscheint, durch Bestimmung eines „Mastermarkers“ das gesamte Spektrum inhibitorischer Moleküle abschätzen zu können. Insgesamt lässt sich aber feststellen, dass aufgrund der Vielfalt an

verschiedenen und für das Immunsystem hemmenden Signalen die Tumorzellen somit trotz Ausfall eines dieser Signale ausreichend Mechanismen besitzen, um der körpereigenen Immunantwort trotzdem zu entkommen. Zur Bestätigung und Verständnis dieser Abhängigkeiten sind weitere Untersuchungen mit höheren Fallzahlen notwendig.

2) Angesicht dieser Befunde müssen zukünftige Studien zeigen, i) ob die hier entdeckte Heterogenität exprimierter Co-inhibitorischer Proteine auf Thymomen und Thymuskarzinomen mit dem Ansprechen auf und/oder den Nebenwirkungsraten von ICI-Therapien assoziiert sind (solche Studien könnten in einem ersten Schritt auch retrospektiver Natur sein, da die Expression – wie hier gezeigt – relativ problemlos an „historischem“ Paraffinmaterial erhoben werden kann); ii) ob es sinnvoll ist, beim Nachweis der Expression multipler Co-inhibitorischer Moleküle ICI-Monotherapien wegen absehbarer Unwirksamkeit zu unterlassen (und so das Risiko von Nebenwirkungen zu minimieren); oder iii) ob sich auf der Basis der genauen Kenntnis heterogener Expressionsprofile Co-inhibitorischer Proteine individualisierte Kombinationstherapien mit mehreren ICIs konzipieren und in klinischen Studien auf ihre Wirksamkeit hin überprüfen lassen.

3) Für die Oberflächenrezeptoren B7H3, B7H4 und GALS9 konnten jeweils 2 verschiedene Subpopulationen – eine mit starker und eine mit ganz schwacher Expression – nachgewiesen werden. Ob die „Low-Expressors“ von einer spezifischen Blockierung der jeweiligen Immuncheckpoints ebenfalls profitieren können, muss in kontrollierten klinischen Studien untersucht werden.

4) Bevor ICIs im Rahmen einer Immuntherapie zugelassen und einem Patienten appliziert werden dürfen, bedarf es zahlreichen und fundierten Erkenntnissen der Grundlagen- und klinischen Forschung. Ein experimenteller Ansatz zur Untersuchung der monoklonalen Antikörper wurde für die Merkmale CD54 und CD56 im dritten Teil dieser Arbeit demonstriert. Die Ergebnisse unterstreichen die eminent wichtige Grundlagenforschung und Prüfung der Zulassung dieser modernen und innovativen Therapeutika, da diese nicht nur schwerwiegende Nebenwirkungen verursachen können, sondern auch verminderte Zellyseraten der Tumorzellen begünstigen können (siehe CD54-blockierender Antikörper in Abb. 25 in Kapitel 3.16).

#### 4.4 Proteinexpression der Immuncheckpoints als Biomarker

Hinsichtlich der Therapieeffizienz der Immuncheckpoint-Inhibitoren wird eine Vielzahl an Biomarkern untersucht und für die einzelnen Tumorentitäten diskutiert. Neben der bereits erwähnten TMB scheint der immunhistochemische Nachweis der Immuncheckpoints eine wichtige Rolle einzunehmen, obwohl – wie bereits erwähnt – auch Patienten mit niedriger Proteinexpression eines Moleküls von einer Antikörpertherapie profitieren können. Dass eine erhöhte Expression eines Markers auf mRNA-Ebene nicht gleichbedeutend mit einer ebenfalls erhöhten Proteinexpression auf den Tumorzellen einhergeht, war in dieser Arbeit für den Immuncheckpoint B7H5 zu beobachten (siehe Kapitel 3.13 Abbildung 22.1 und 22.2). Erklärbar ist diese Beobachtung durch entweder post-transkriptionelle Regulationsmechanismen oder „Verunreinigung“ der Tumor-mRNA mit mRNA der Tumor-infiltrierenden Immunzellen. Der Vorteil der Immunhistochemie liegt in der Differenzierung der das Molekül tragenden Zelltypen. Somit kann die Proteinexpression entweder den Tumor- oder Immunzellen zugeordnet werden. Die untersuchten Thymuskarzinome CA 2 und CA 5 wurden aufgrund Ihrer Genexpression als „B7H5-High Expressors“ eingestuft (siehe Kapitel 3.10 Abbildung 17 und Tabelle 17). In der Immunhistochemie konnte das Protein jedoch nicht auf den Tumorzellen, sondern auf den Tumor infiltrierenden Immunzellen nachgewiesen werden. Die hohe Genexpression dieser Tumorproben ist daher am wahrscheinlichsten auf infiltrierende Immunzellen zurückzuführen. Bekanntermaßen hemmt B7H5 die T-Zell Funktion und wird stark auf regulatorischen Zellen wie z.B. Monozyten, Granulozyten und Makrophagen exprimiert (Lines et al., 2014). Innerhalb eines Tumormilieus hat die B7H5-Expression auf CD8<sup>+</sup> zytotoxischen Zellen einen ambivalenten Effekt: Für das hepatozelluläre- und das Ösophaguskarzinom wird die Expression mit einer günstigeren Prognose assoziiert (Zhang et al., 2018) (Loeser et al., 2019), wohingegen die B7H5-Expression auf Tumorerinfiltrierenden Immunzellen bei kolorektalen Karzinomen und Melanomen mit einem schlechteren Outcome in Verbindung gebracht wird (Deng et al., 2019) (Kuklinski et al., 2018). Inwiefern sich die B7H5-Expression der Tumorerinfiltrierenden Immunzellen auf Thymome und Thymuskarzinome auswirkt ist bislang nicht bekannt und benötigt weitere Untersuchungen.

#### 4.5 Schlüsselmoleküle in der Immuntherapie der Thymusneoplasien

In Zusammenschau der Ergebnisse dieser Arbeit und der Literaturrecherche der untersuchten Immuncheckpoints wurde neben PD-L1 v.a. **B7H3** und **B7H4** als neue, vielversprechende Zielmoleküle für die Immuntherapie der Thymusneoplasien ausgemacht. B7H3 gilt nicht nur wie in 1.5.1 beschrieben als inhibitorischer Immuncheckpoint, sondern wird auch als Stimulator des aggressiven Wachstums von Tumoren angesehen (Ni and Dong, 2017). Daher wird ein gezieltes Blockieren theoretisch nicht nur zu einem stimulatorischen Effekt auf das eigene Immunsystem führen, sondern möglicherweise auch direkt auf das Wachstumsverhalten des Tumors einwirken. Synergistische Effekte einer Kombination aus Immun- und Chemotherapie konnten bereits beobachtet werden, sodass verschiedene Kombinationstherapien aktuell klinisch untersucht werden (Marin-Acevedo et al., 2018). Diese Erkenntnisse sollten in Zusammenschau der in dieser Arbeit verstärkten B7H3-Expression bei Thymuskarzinomen für den Einsatz bei Malignomen des Thymus berücksichtigt und in Zukunft evaluiert werden. Ähnliches gilt für das Immuncheckpoint-Protein B7H4, welches mittels Immunhistochemie besonders bei Thymuskarzinomen stark exprimiert wird. Dies passt zu einer Beobachtung bei aggressiven Nierenzellkarzinomen, bei denen die B7H4-Expression einen negativen prognostischen Faktor darstellt und zumindest im Tiermodell gezeigt werden konnte, dass ein gegen B7H4 gerichteter monoklonaler Antikörper das Tumorstadium bremsen konnte (Dangaj et al., 2013; Jeon et al., 2014). Hieraus lässt sich vermuten, dass durch adressieren dieser potentiellen Zielstruktur im Rahmen einer ICI-Therapie ebenfalls ein anti-onkogener Effekt bei aggressiv fortschreitenden Thymustumoren erzielt werden könnte.

#### 4.6 Unerwünschte Nebenwirkungen als limitierender Faktor

Für eine Risiko-Nutzen-Analyse einer Immuntherapie sind in Zukunft nicht nur Biomarker für das vermutliche Ansprechen auf eine Immuntherapie, sondern auch für das Vorhersagen unerwünschter Nebenwirkungen (irAEs) nötig. Mit der Aktivierung des körpereigenen Immunsystems steigt nämlich auch die Gefahr autoimmune, also selbst-zerstörende Prozesse zu stimulieren und somit den eigentlich gesunden Geweben Schaden zuzufügen. Wie unter 1.6 bereits erwähnt, sind diese irAEs eine große Schwäche der bislang durchgeführten Therapiestudien. Manchmal können Nebenwirkungen durch Gabe oraler Glucocorticoide oder einer verzögerten

Applikation der folgenden Antikörperdosis kontrolliert werden, manchmal gelingt dies aber nicht und es können gerade bei der Therapie von Thymustumoren lebensgefährliche und fatal verlaufende Komplikationen auftreten, für die es bisher aber keine validen, prospektiven Biomarker gibt (Zhao and Rajan, 2019). Ob extratumoröse Faktoren, beispielsweise genetische Polymorphismen wie der HLA-Status oder auch die Darmflora das Auftreten der irAEs beeinflussen ist aktuell Gegenstand der Forschung (Postow et al., 2018). Unter diesem Aspekt legt die vorliegende Arbeit nahe, dass als neue intratumoröse Faktoren die sehr heterogenen Profile Co-inhibitorischer (und Co-stimulatorischer) Proteine nicht nur bezüglich der Therapieresistenz, sondern auch bezüglich des Nebenwirkungsrisikos in klinischen Studien prospektiv evaluiert werden sollten, um letztendlich im Rahmen einer personalisierten/individualisierten ICI-Therapie einer möglichst großen Anzahl von Patienten mit refraktären Thymustumoren eine möglichst effektive und gleichzeitig sichere Immuntherapie anbieten zu können.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Therapie fortgeschrittener, rezidivierender und inkomplett resezierbarer Thymome und Thymuskarzinome erfordert multimodale Behandlungskonzepte, die aber bislang nur selten Langzeiterfolge gezeigt haben. Auch Immuntherapien sind durch relativ geringe Ansprechraten und oft schwere autoimmune Nebenwirkungen gekennzeichnet. Vor diesem Hintergrund zeigt die vorliegende Arbeit, dass Thymome und Thymuskarzinome auf RNA und Proteinebene sehr heterogene Profile inhibitorischer Immunchekpoints aufweisen, welche die Therapieresistenzen gegenüber PD1- oder PD-L1-gerichteten Monotherapien mit Immunchekpoint-Inhibitoren erklären könnten. Diese Heterogenität, die keine Systematik erkennen ließ und nur durch konsequente Bestimmung der Expression jedes einzelnen Co-inhibitorischen Moleküls erfassbar war, betraf besonders die in der adjuvanten Situation besonders häufig therapiebedürftigen B3-Thymome und Thymuskarzinome. Bei diesen beiden Tumortypen waren insbesondere für B7H3, B7H4 und GALS9 jeweils zwei Untergruppen mit diametral unterschiedlichen (schwachem bzw. starkem) Expressionsniveau auffällig. Funktionelle Experimente mit blockierenden Antikörpern gegen Rezeptor/Liganden-Paare der Interaktion zwischen Zellen der 1889c Thymuskarzinom-Zelllinie und verschiedenen zytotoxischen Immunzellen (u.a. T-Zellen und NK-Zellen) zeigen einen Weg für zukünftige, prätherapeutische in-vitro Untersuchungen individueller Thymustumore auf. Neben der bislang geringen Antwortraten etablierter ICIs im klinischen Einsatz, bedürfen die durch Immuntherapeutika verursachten, schweren autoimmunen Nebenwirkungen besonderer Beachtung. Die hier identifizierten, heterogenen Profile Co-inhibitorischer Proteine in Thymomen und Thymuskarzinomen erscheinen als vielversprechende Gewebe- bzw. Tumor-basierte Biomarker-Kandidaten, deren prädiktives Potential sowohl in Bezug auf die Vorhersage einer Therapieresistenz gegenüber ICIs, als auch bezüglich der Prädiktion schwerer, ICI-bedingter autoimmuner Nebenwirkungen in klinischen Studien prospektiv überprüft werden sollten.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

Azevedo, R., Ferreira, J.A., Peixoto, A., Neves, M., Sousa, N., Lima, A., and Santos, L.L. (2015). Emerging antibody-based therapeutic strategies for bladder cancer: A systematic review. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 214, 40-61.

Cerezo-Wallis, D., and Soengas, M.S. (2016). Understanding Tumor-Antigen Presentation in the New Era of Cancer Immunotherapy. *Current pharmaceutical design* 22, 6234-6250.

Cho, J., Ahn, M.-J., Yoo, K.H., Lee, H., Kim, H.K., Heo, M.H., Hong, J.H., Sun, J.-M., Lee, S.-H., Ahn, J.S., *et al.* (2017). A phase II study of pembrolizumab for patients with previously treated advanced thymic epithelial tumor. 35, 8521-8521.

Conforti, F., Pala, L., Giaccone, G., and De Pas, T. (2020). Thymic epithelial tumors: From biology to treatment. *Cancer treatment reviews* 86, 102014.

Dangaj, D., Lanitis, E., Zhao, A., Joshi, S., Cheng, Y., Sandaltzopoulos, R., Ra, H.J., Danet-Desnoyers, G., Powell, D.J., Jr., and Scholler, N. (2013). Novel recombinant human b7-h4 antibodies overcome tumoral immune escape to potentiate T-cell antitumor responses. *Cancer research* 73, 4820-4829.

Deng, J., Li, J., Sarde, A., Lines, J.L., Lee, Y.C., Qian, D.C., Pechenick, D.A., Manivanh, R., Le Mercier, I., Lowrey, C.H., *et al.* (2019). Hypoxia-Induced VISTA Promotes the Suppressive Function of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment. *Cancer immunology research* 7, 1079-1090.

Detterbeck, F.C., Nicholson, A.G., Kondo, K., Van Schil, P., and Moran, C. (2011). The Masaoka-Koga stage classification for thymic malignancies: clarification and definition of terms. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 6, S1710-1716.

Gallimore, A., Glithero, A., Godkin, A., Tissot, A.C., Pluckthun, A., Elliott, T., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. (1998). Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complexes. *The Journal of experimental medicine* 187, 1383-1393.

Gao, J., Aksoy, B.A., Dogrusoz, U., Dresdner, G., Gross, B., Sumer, S.O., Sun, Y., Jacobsen, A., Sinha, R., Larsson, E., *et al.* (2013). Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Science signaling* 6, pl1.

GEHealthcareBio-SciencesAB (2010): Isolation of Mononuclear cells  
Methodology and applications. Online:  
[https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/General\\_Information/1/ge-isolation-of-mononuclear-cells.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/General_Information/1/ge-isolation-of-mononuclear-cells.pdf), Stand:  
17.09.2020.

Giaccone, G., Thompson, J., McGuire, C., Manning, M., Kallakury, B., Chahine, J.J., Subramaniam, D.S., Liu, S.V., Gibney, G.T., Kim, C., *et al.* (2017). Pembrolizumab in patients with recurrent thymic carcinoma: Results of a phase II study. *35*, 8573-8573.

Girard, N., Ruffini, E., Marx, A., Faivre-Finn, C., and Peters, S. (2015). Thymic epithelial tumours: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology 26 Suppl 5*, v40-55.

Holzapfel, B., and Wickert, L. (2007). Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). *Methoden und Anwendungsgebiete. 37*, 120-126.

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. *The EMBO journal 11*, 3887-3895.

Jacobs, J., Deschoolmeester, V., Zwaenepoel, K., Rolfo, C., Silence, K., Rottey, S., Lardon, F., Smits, E., and Pauwels, P. (2015). CD70: An emerging target in cancer immunotherapy. *Pharmacology & therapeutics 155*, 1-10.

Jeon, H., Vigdorovich, V., Garrett-Thomson, S.C., Janakiram, M., Ramagopal, U.A., Abadi, Y.M., Lee, J.S., Scandiuizzi, L., Ohaegbulam, K.C., Chinai, J.M., *et al.* (2014). Structure and cancer immunotherapy of the B7 family member B7x. *Cell reports 9*, 1089-1098.

Kambayashi, T., and Laufer, T.M. (2014). Atypical MHC class II-expressing antigen-presenting cells: can anything replace a dendritic cell? *Nature Reviews Immunology 14*, 719-730.

Kuklinski, L.F., Yan, S., Li, Z., Fisher, J.L., Cheng, C., Noelle, R.J., Angeles, C.V., Turk, M.J., and Ernstoff, M.S. (2018). VISTA expression on tumor-infiltrating inflammatory cells in primary cutaneous melanoma correlates with poor disease-specific survival. *Cancer immunology, immunotherapy : CII 67*, 1113-1121.

Kundel, Y., Yellin, A., Popovtzer, A., Pfeffer, R., Symon, Z., Simansky, D.A., Oberman, B., Sadezki, S., Brenner, B., Catane, R., *et al.* (2007). Adjuvant radiotherapy for thymic epithelial tumor: treatment results and prognostic factors. *American journal of clinical oncology 30*, 389-394.

Lin, A., and Yan, W.H. (2015). Human Leukocyte Antigen-G (HLA-G) Expression in Cancers: Roles in Immune Evasion, Metastasis and Target for Therapy. *Molecular medicine (Cambridge, Mass) 21*, 782-791.

Lines, J.L., Pantazi, E., Mak, J., Sempere, L.F., Wang, L., O'Connell, S., Ceeraz, S., Suriawinata, A.A., Yan, S., Ernstoff, M.S., *et al.* (2014). VISTA is an immune checkpoint molecule for human T cells. *Cancer research 74*, 1924-1932.

Loeser, H., Kraemer, M., Gebauer, F., Bruns, C., Schröder, W., Zander, T., Persa, O.D., Alakus, H., Hoelscher, A., Buettner, R., *et al.* (2019). The expression of the immune checkpoint regulator VISTA correlates with improved overall survival in pT1/2 tumor stages in esophageal adenocarcinoma. *Oncoimmunology 8*, e1581546.

Mandalà, M., Merelli, B., and Massi, D. (2016). PD-L1 in melanoma: facts and myths. *Melanoma management* 3, 187-194.

Marin-Acevedo, J.A., Dholaria, B., Soyano, A.E., Knutson, K.L., Chumsri, S., and Lou, Y. (2018). Next generation of immune checkpoint therapy in cancer: new developments and challenges. *Journal of hematology & oncology* 11, 39.

Marx, A., Weis, C.A., and Strobel, P. (2016). Thymome. *Der Pathologe* 37, 412-424.

Marx, A., Willcox, N., Leite, M.I., Chuang, W.Y., Schalke, B., Nix, W., and Strobel, P. (2010). Thymoma and paraneoplastic myasthenia gravis. *Autoimmunity* 43, 413-427.

Ni, L., and Dong, C. (2017). New checkpoints in cancer immunotherapy. *Immunological reviews* 276, 52-65.

Omar, H.A., and Tolba, M.F. (2019). Tackling molecular targets beyond PD-1/PD-L1: Novel approaches to boost patients' response to cancer immunotherapy. *Critical reviews in oncology/hematology* 135, 21-29.

Pearse, G. (2006). Normal structure, function and histology of the thymus. *Toxicol Pathol* 34, 504-514.

Postow, M.A., Sidlow, R., and Hellmann, M.D. (2018). Immune-Related Adverse Events Associated with Immune Checkpoint Blockade. *The New England journal of medicine* 378, 158-168.

Queirolo, P., Boutros, A., Tanda, E., Spagnolo, F., and Quaglino, P. (2019). Immune-checkpoint inhibitors for the treatment of metastatic melanoma: a model of cancer immunotherapy. *Seminars in cancer biology* 59, 290-297.

Rajan, A., Heery, C.R., Thomas, A., Mammen, A.L., Perry, S., O'Sullivan Coyne, G., Guha, U., Berman, A., Szabo, E., Madan, R.A., *et al.* (2019). Efficacy and tolerability of anti-programmed death-ligand 1 (PD-L1) antibody (Avelumab) treatment in advanced thymoma. *J Immunother Cancer* 7, 269.

Reina, M., and Espel, E. (2017). Role of LFA-1 and ICAM-1 in Cancer. *Cancers* 9.

Rezzani, R., Nardo, L., Favero, G., Peroni, M., and Rodella, L.F. (2014). Thymus and aging: morphological, radiological, and functional overview. *Age (Dordrecht, Netherlands)* 36, 313-351.

Samstein, R.M., Lee, C.H., Shoushtari, A.N., Hellmann, M.D., Shen, R., Janjigian, Y.Y., Barron, D.A., Zehir, A., Jordan, E.J., Omuro, A., *et al.* (2019). Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types. *Med. Dissertation. Medizinische Fakultät Mannheim, Universität Heidelberg.*

Schildhaus, H.U. (2018). Der prädiktive Wert der PD-L1-Diagnostik. *Der Pathologe* 39, 498-519.

Scorsetti, M., Leo, F., Trama, A., D'Angelillo, R., Serpico, D., Macerelli, M., Zucali, P., Gatta, G., and Garassino, M.C. (2016). Thymoma and thymic carcinomas. *Critical reviews in oncology/hematology* 99, 332-350.

Sharpe, A.H., and Pauken, K.E. (2018). The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nature reviews Immunology* 18, 153-167.

Ströbel, P., Weis, C.A., and Marx, A. (2016). Thymuskarzinome. *Der Pathologe* 37, 425-433.

Sun, C., Mezzadra, R., and Schumacher, T.N. (2018). Regulation and Function of the PD-L1 Checkpoint. *Immunity* 48, 434-452.

Travis, W.D., Brambilla, E., Burke, A.P., Marx, A., and Nicholson, A.G. (2015). WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart, 4th edn (Geneva, Switzerland: World Health Organization).

Wherry, E.J. (2011). T cell exhaustion. *Nature immunology* 12, 492-499.

Yi, M., Jiao, D., Xu, H., Liu, Q., Zhao, W., Han, X., and Wu, K. (2018). Biomarkers for predicting efficacy of PD-1/PD-L1 inhibitors. *Molecular cancer* 17, 129.

Young, K.A., Wise, J.A., DeSaix, P., Kruse, D.H., Poe, B., Johnson, E., Johnson, J.E., Korol, O., Betts, J.G., and Womble, M. (2020 (2013)): *Anatomy and Physiology*. Online: <https://openstax.org/details/books/anatomy-and-physiology>, CC-BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>), Stand: 17.09.2020.

Zajac, A.J., Blattman, J.N., Murali-Krishna, K., Sourdive, D.J., Suresh, M., Altman, J.D., and Ahmed, R. (1998). Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *The Journal of experimental medicine* 188, 2205-2213.

Zhang, M., Pang, H.J., Zhao, W., Li, Y.F., Yan, L.X., Dong, Z.Y., and He, X.F. (2018). VISTA expression associated with CD8 confers a favorable immune microenvironment and better overall survival in hepatocellular carcinoma. *BMC cancer* 18, 511.

Zhao, C., and Rajan, A. (2019). Immune checkpoint inhibitors for treatment of thymic epithelial tumors: how to maximize benefit and optimize risk? *Mediastinum (Hong Kong, China)* 3.

## 7 LEBENS LAUF

### Fabian Friedrich Franz Lang

---

Geburtsdatum: 20.07.1992  
Geburtsort: Erlangen  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schulbildung

---

09/2002 – 05/2011 **Emil-von-Behring Gymnasium Spardorf**  
Abitur am 02.05.2011: Durchschnittsnote 2,0

09/1998 – 07/2002 **Grundschule**  
Adalbert-Stifter-Schule, Erlangen

### Studium

---

10/2015 – 05/2020 **Medizinische Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg**  
11.10.18: 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
11.05.20: 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

09/2014 – 10/2015 **Asklepios Campus Hamburg der Semmelweis Universität Budapest**

09/2012 – 08/2014 **Semmelweis Universität Budapest, Ungarn**  
24.06.14: 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### Beruflicher Werdegang

---

10/2020 – jetzt **Theresienkrankenhaus Mannheim Allgemein- und Viszeralchirurgie**  
Assistenzarzt (Chefarzt: Prof. Dr. med. Peter Kienle)

## 8 DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. Alexander Marx danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, die Supervision meines Forschungsprojektes, die Unterstützung und Begeisterung für die Forschung, die er mir stets entgegenbracht hat und die Möglichkeit Teile meiner Forschungsarbeit auf der Jahrestagung der „International Thymic Malignancy Group (ITMIG)“ in Turin 2017 vorzustellen.

Besonderen Dank schulde ich Frau Dr. Katja Simon-Keller, die mich als Betreuerin meiner Arbeit zu jeder Zeit mit Rat und Tat unterstützt hat, mir das Einmaleins des wissenschaftlichen Arbeitens beigebracht hat und mich mit Ihrer Freude an der Wissenschaft während dieses spannenden Projektes begleitet hat.

Mein herzlicher Dank geht an meine Freundin Marcela Ibáñez, die mich Tag und Nacht unterstützt, mit ihrer akademischen Erfahrung immer ein Ohr für meine Ideen und Sorgen hatte und mir auch in schwierigen Phasen immer Mut und Stärke zugesprochen hat.

Ebenso herzlicher Dank gebührt meinen Eltern, die mir mein Medizinstudium überhaupt erst ermöglicht haben und mich auf allen Wegen immer unterstützt haben.