

Manuel Joachim Piechutta

Dr. med.

Development of a mouse model to characterize the infiltration of lymphocytes into melanoma brain metastases using longitudinal *in vivo* two photon laser scanning microscopy

Fach/Einrichtung: Neurologie/Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)

Doktorvater: Professor Dr. med. Frank Winkler

Wissenschaftlicher Hintergrund

Hirnmetastasen stellen nach wie vor eine verheerende Komplikation von Krebserkrankungen dar, inklusive dem Malignem Melanom. Kürzlich hat sich das Tumor-Mikroenvironment als therapeutisches Ziel herausgestellt, insbesondere durch die klinische Anwendung von Immun-Checkpoint-Inhibitoren. Das aktuelle Wissen über das immunologische Tumor-Mikroenvironment stammt aus *in vitro* und *ex vivo* Experimenten wie der Durchflusszytometrie und der Immunhistochemie. Diese Modelle können jedoch nicht den dynamischen Einstrom der Lymphozyten in den Tumor, sowie deren Interaktion mit Tumorzellen im komplexen Tumor-Mikroenvironment reproduzieren. Insbesondere in Hirnmetastasen, welche in einem "immunprivilegierten" Organ entstehen, ist ein besseres Verständnis des *in vivo* Einwandern und Verhalten von T-Zellen dringend erforderlich, um immuntherapeutische Ansätze zu verbessern. Das Ziel dieser Arbeit war es ein neuartiges Modell mittels longitudinaler *in vivo* Zwei-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskopie (TPLSM) zu entwickeln um die adaptive Immunantwort in Hirnmetastasen besser zu charakterisieren

Methoden

Mäuse wurde ein chronisches Fenster in den Schädel implantiert und fluoreszierende Tumorzellen mittels Herzinjektion oder stereotaktischer Injektion in den Kortex verabreicht. Anschließend erhielten diese Mäuse einen adoptiven Transfer von tumor-spezifischen, fluoreszenz-markierten T-Zellen. Mittels repetitiver TPLSM war es möglich Interaktionen zwischen diesen beiden Zelltypen *in vivo* aufzunehmen. *Ex vivo* konnten die transferierten T Zellen mittels Immunhistochemie und Durchflusszytometrie untersucht werden.

Ergebnisse

In dieser Studie konnte erstmals die Infiltration von T-Zellen in Hirnmetastasen in Echtzeit über mehrere Tage auf Einzelzellebene mithilfe von TPLSM erfasst werden. Die wichtigsten Aspekte im Verlauf der Modellentwicklung waren die Auswahl eines geeigneten Mausmodells, geeigneter Tumorzellen und T-Zellen, die Visualisierung beider Zelltypen und ein wirksames

T-Zell-Stimulationsprotokoll. Schließlich konnte die Tumorinokulation, der Zelltransfer, die T-Zell-Stimulation und Mikroskopiezeitpunkte in einem experimentellen Zeitpunkt kombiniert werden.

Die erfolgreiche Visualisierung übertragener Zellen in BM wurde zunächst in einem immuninkompetenten Mausmodell gezeigt. Mit dem Einsatz von ‚brain-trained‘ tdTomato-exprimierenden Ret CM TyrKO Melanomzellen und tumorantigenspezifischen gp100-zielgerichteten T-Zellen in einem immunkompetenten Mausmodell konnte die Darstellung einer großen Menge von Hirnmetastasen-infiltrierender T-Zellen erreicht werden.

Die T-Zellen überquerten die Blut-Hirn-Schranke innerhalb von 24 Stunden und konnten bis zu 4 Tage nach dem Transfer verfolgt werden. Übertragene T-Zellen wurden in der Tumorumgebung, am Tumorrand und im Inneren des Tumors, jedoch nicht im gesunden Hirngewebe, gefunden. Mittels Kurzvideos über mehrere Minuten, konnten die Lymphozyten verfolgt werden und dadurch einem stationäres oder motilen Phänotyp zugeordnet werden. Der Kontakt mit Tumorzellen führte zu einer verringerten Beweglichkeit, während der Kontakt mit Blutgefäßen die Beweglichkeit der T-Zellen nicht beeinflusste. Die Behandlung mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren zeigte eine Zunahme der Motilitätsparameter von T-Zellen in Hirnmetastasen.

Schlussfolgerungen

Die Kombination aus TPLSM und einem adoptiven T Zelltransfer *in vivo* ermöglicht einzigartige Einblicke in die zugrunde liegenden Mechanismen der adaptiven Immunantwort in Hirnmetastasen. Das Ziel dieser Studie wurde somit erreicht. Das etablierte Modell kann und sollte benutzt werden um immuntherapeutische Ansätze im Hinblick auf die Prävention und Therapie von Hirnmetastasen weiter zu erforschen und zu verbessern.