

**Evaluation des Therapieeffekts einer kombinierten
Viro-Immuntherapie auf die Tumormikroumgebung
und das lymphatische System mittels multimodaler
in vivo PET/MRT- und Biolumineszenz-basierter
Bildgebung**

Dissertation

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

vorgelegt von
Dimitri Stowbur
aus Jaschalta / Russische Föderation

Tübingen
2023

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

Tag der mündlichen Qualifikation:

24.11.2023

Dekan:

Prof. Dr. Thilo Stehle

1. Berichterstatter:

PD Dr. Manfred Kneilling

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	XII
Abkürzungsverzeichnis	XIII
Widmung	XVI
Dankeswort	XVII
Vorwort	XXI
1. Einleitung	1
1.1 Das Immunsystem	1
1.1.1 Das angeborene „innate“ Immunsystem	1
1.1.2 Das erworbene „adaptive“ Immunsystem	5
1.2 Immuncheckpoints	11
1.3 Maligne Tumorerkrankungen – Entstehung und Progression	12
1.4 Neuwertige Immuntherapien	15
1.4.1 Adoptiver T-Zelltransfer	16
1.4.2 Immuncheckpoint-Inhibitoren	17
1.4.3 Onkolytische Virustherapie	20
1.5 Experimentelle Tumormausmodelle	21
1.5.1 Endogenes RIP1-Tag2 Inselzellkarzinommodell	21
1.5.2 Subkutanes Ovalbumin (OVA)-exprimierendes B16 Melanom und MC38 Kolon Adenokarzinom-Tumormodell	24
1.6 Bildgebende Verfahren	25
1.6.1 Positronen-Emissions-Tomographie (PET)	26
1.6.2 Magnetresonanztomographie (MRT)	33
1.6.3 Optische Bildgebung	35

2.	Zentrale Fragestellung	38
3.	Material und Methoden	40
3.1	Zellkultur	40
3.1.1	Isolation und Kultivierung der Tag- T_{H1} / OVA- T_{H1} Zellen	40
3.1.2	Isolation und Kultivierung der Inselzellkarzinome	45
3.1.3	Kultivierung der (OVA)-B16 Melanom- und (OVA)-MC38 Kolon Adenokarzinom Zelllinien	47
3.1.4	Inokulation der (OVA)-B16 Melanom- und (OVA)-MC38 Kolon Adenokarzinomzellen.....	48
3.2	Versuchstiere	48
3.2.1	Zucht- und Haltungsbedingungen	48
3.2.2	Transgene Mauslinien.....	49
3.3	Kombinierte Viro-Immuntherapie	50
3.3.1	Depletion der endogenen Immunzellen mittels Niedrigdosis-Ganzkörperbestrahlung.....	51
3.3.2	Depletion der endogenen Immunzellen mittels der Gabe von Cyclophosphamid.....	51
3.3.3	<i>In vivo</i> Depletion der CD8 ⁺ T-Zellen.....	51
3.3.4	Intraperitoneale (<i>i.p.</i>) Applikation der Tag- T_{H1} Zellen	51
3.3.5	<i>I.p.</i> Applikation der Checkpoint-inhibierenden AK	52
3.3.6	<i>I.p.</i> Applikation der onkolytischen Viren	52
3.4	Therapie Monitoring.....	52
3.4.1	RIP1-Tag2 Versuchstiere.....	52
3.4.2	OVA-B16 und OVA-MC38 tragende Versuchstiere.....	55
3.5	<i>Ex vivo</i> Analysen	56
3.5.1	Retrobulbäre Blutentnahme bei RIP1-Tag2 Versuchsmäusen.....	57
3.5.2	Organisolation.....	57

3.5.3	Histologie	58
3.5.4	Immunfluoreszenzmikroskopie.....	59
3.5.5	Durchflusszytometrie	60
3.6	Präklinische Bildgebung	64
3.6.1	<i>In vitro</i> cell uptake assay.....	64
3.6.2	Allgemeine Vorbereitungen der Versuchstiere für die ¹⁸ F-FHBG-PET/MRT Untersuchung.....	65
3.6.3	Optische Bildgebung	67
3.7	Statistische Analyse.....	68
4.	Resultate.....	71
4.1	Der Einfluss von CD8 ⁺ T-Zellen auf die Therapieeffizienz einer kombinierten Immuntherapie im fortgeschrittenen murinen Inselzellkarzinommodell	72
4.1.1	Validierung der CD8 ⁺ T-Zell Depletion	72
4.1.2	Einfluss der CD8 ⁺ T-Zellen auf die Therapieeffizienz der kombinierten Immuntherapie mit einer initialen 2 Gy Niedrigdosis-Ganzkörperbestrahlung....	75
4.1.3	Einfluss der CD8 ⁺ T-Zellen auf die Therapieeffizienz der kombinierten Immuntherapie mit einer initialen Cyclophosphamid Behandlung	79
4.2	Einfluss der onkolytischen Viren OncoVEX auf die Therapieeffizienz der kombinierten Immuntherapie (kombinierte Viro-Immuntherapie)	83
4.2.1	Analyse der Therapieeffizienz der kombinierten Viro-Immuntherapie mittels Blutglukosewertmessung bei RIP1-Tag2 Versuchsmäusen	84
4.2.2	Monitoring der Therapieeffizienz der kombinierten Viro-Immuntherapie (ohne Tag-T _H 1 Zellen) bei RIP1-Tag2 Versuchsmäusen im fortgeschrittenen Tumorstadium mittels Blutglukosespiegel	95
4.2.3	Analyse der Therapieeffizienz der kombinierten Viro-Immuntherapie mittels Blutglukosewertmessung bei RIP1-Tag2 Versuchsmäusen ohne ICB-Gabe	107
4.2.4	<i>In vitro</i> Replikationsvermögen von OncoVEX in RIP1-Tag2 Zellen.....	117

4.3	Theranostischer Ansatz	119
4.3.1	<i>In vitro</i> Quantifizierung von OncoVEX infizierten Tumoren mittels γ -Counter	119
4.3.2	<i>In vivo</i> Visualisierung OncoVEX-infizierter Tumorzellen mittels kombiniertem ^{18}F -FHBG-PET/MRT.....	121
4.3.3	Bestimmung der Viruslast im Pankreas zu verschiedenen Zeitpunkten nach OncoVEX Administration.....	127
4.3.4	Analyse der Immunzellinfiltration in den Pankreata mittels kombinierter Viro-Immuntherapie behandelten RIP1-Tag2 Versuchsmäusen zum Zeitpunkt des höchsten rBGWs.....	129
4.4	Aufklärung der Wirkmechanismen unserer kombinierten $\text{T}_{\text{H}1}$ -Zell-basierten Immuntherapie mit Fokus auf die NF κ B-Aktivierung.....	132
4.4.1	Evaluierung des Tumolvolumens zur Evaluation des Therapieansprechens	134
4.4.2	Longitudinale Auswertung des NF κ B Signals mittels optischer Bildgebung	135
4.4.3	Histologische (H&E) und immunhistochemische (CD3 und B220) Evaluation der OVA-B16 und OVA-MC38 Tumore.....	139
4.4.4	Untersuchung der T- und B-Zellpopulationen und deren Aktivierung mittels Durchflusszytometrie	142
5.	Diskussion.....	148
5.1	Wirkmechanismus der Th1-basierten kombinierten Immuntherapie unter der Depletion von CD8 $^{+}$ T-Zellen im fortgeschrittenen murinen Inselzellkarzinommodell....	148
5.2	Einfluss von OncoVEX auf die Therapieeffizienz der kombinierten Immuntherapie.....	155
5.3	Einfluss der Tag- $\text{T}_{\text{H}1}$ Zellen und ICB-Gabe auf die Therapieeffizienz der kombinierten Viro-Immuntherapie.....	159

5.4	<i>In vivo</i> Visualisierung OncoVEX-infizierter Tumorzellen mittels kombiniertem ¹⁸ F-FHBG-PET/MRT.....	168
5.5	Aufklärung der Wirkmechanismen einer kombinierten Immuntherapie in der ^{NFKB} Luc-Reportermaus.....	173
6.	Zusammenfassung.....	181
7.	Deklaration.....	184
7.1	Deklaration zum Eigenanteil	184
8.	Publikationsverzeichnis.....	186
8.1	Publikationen in Wissenschaftlichen Journalen	186
8.2	Beteiligung an wissenschaftlichen Treffen	187
8.2.1	Mündliche Präsentationen auf Wissenschaftskonferenzen	187
8.2.2	Poster Präsentationen auf Wissenschaftskonferenzen.....	188
9.	Literaturverzeichnis	190

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Illustration des alternativen und klassischen NFκB Signalwegs.	5
Abbildung 2: Schematische Illustration der Initiierung der erworbenen „adaptiven“ Immunantwort.	10
Abbildung 3: Schematische Illustration der Charakteristika der Entstehung und Progression von malignen Tumoren nach D. Hanahan und R. Weinberg.	15
Abbildung 4: Schematische Illustration der Herstellung von T-Zellen für den adoptiven T-Zelltransfer.	17
Abbildung 5: Funktionsmechanismus der anti-CTLA-4, anti-PD-1 und anti-PD-L1 AK.	19
Abbildung 6: Maligne Transformation im RIP1-Tag2 Tumormodell	22
Abbildung 7: Magnetresonanztomographische (MRT) Aufnahme einer RIP1-Tag2 Maus in der 12. Lebenswoche	23
Abbildung 8: Schematische Darstellung verschiedener bildgebenden Verfahren repräsentiert als Wasserfahrzeug	26
Abbildung 9: Vereinfachte Darstellung des Verarbeitungsschemas der PET zeigt die Erfassung der Gammastrahlung bis hin zur vollständigen Rekonstruktion der Aufnahme	27
Abbildung 10: Schematische Illustration von drei Eventtypen registriert von PET Detektoren.	29
Abbildung 11: Schematische Illustration der Generierung von PET-Reportermäusen zur Detektion von spezifischen Zellen mittels ¹⁸ F-FHBG-PET	32
Abbildung 12: Illustration biosynthetischen Mechanismus des Luciferin im Glühwürmchen.	36

Abbildung 13: Schematische Illustration des Prinzips der Fluoreszenz.....	37
Abbildung 14: Illustration der Anatomie der Lymphknoten und sekundär lymphatischen Organe.....	42
Abbildung 15: Schematische Illustration des <i>in vitro</i> ¹⁸ F-FHBG Aufnahme Assays ...	65
Abbildung 16: Visualisierung der Positionierung der Versuchstiere in der Dunkelkammer zur Erfassung der NFκB Aktivierung im Tumor als auch im Knochenmark ventral (links).....	68
Abbildung 17: Versuchsschema zur Validierung der CD8 ⁺ T-Zell Depletion.....	72
Abbildung 18: Monitoring der Depletion von CD8 ⁺ T-Zellen mittels Durchflusszytometrie	75
Abbildung 19: Versuchsschema der kombinierten Immuntherapie mit initialer 2 Gy Niedrigdosis-Ganzkörperbestrahlung und Depletion der CD8 ⁺ T-Zellen	76
Abbildung 20: Einfluss der Depletion der CD8 ⁺ T-Zellen auf die rBGWs und das Überleben von 10-11 Wochen alten RIP1-Tag2 Versuchsmäusen.....	78
Abbildung 21: Versuchsschema der kombinierten Immuntherapie mit initialer Cyclophosphamid Behandlung (250 µg/g Körpergewicht) und Depletion der CD8 ⁺ T-Zellen.....	80
Abbildung 22: Verlauf der rBGW in 10-11 Wochen alten RIP1-Tag2 Versuchsmäusen mit initialer Cyclophosphamid-Behandlung und kombinierter Immuntherapie mit/ohne Depletion der CD8 ⁺ T-Zellen...	82
Abbildung 23: Versuchsschema der kombinierten Viro-Immuntherapie	84
Abbildung 24: rBGW der RIP1-Tag2 Versuchsmäusen im Verlauf der kombinierten Viro-Immuntherapie (zum Zeitpunkt 0).....	86
Abbildung 25: Quantitative PCR zum Nachweis viraler DNA im Verlauf der vier- wöchigen kombinierten Viro-Immuntherapie.....	88

Abbildung 26: Histopathologische (H&E) und immunhistochemische (CD3) Analyse des Pankreas von RIP1-Tag2 Mäusen nach vier-wöchiger Behandlung mit der kombinierten Viro-Immuntherapie	91
Abbildung 27: Histologische (H&E) und immunhistochemische (CD3) Analyse der Milz von RIP1-Tag2 Versuchsmäusen nach vier-wöchiger Behandlung mit der kombinierten Viro-Immuntherapie	93
Abbildung 28: Analyse der CD4 ⁺ , CD8 ⁺ T-Zellen und Tag-T _H 1 Zellen in den Milzen von RIP1-Tag2 Mäusen nach vier-wöchiger Therapie	94
Abbildung 29: Versuchsschema der kombinierten Viro-Immuntherapie ohne Tag-T _H 1 Zell-Gabe	96
Abbildung 30: Monitoring des Blutglukosewertes in RIP1-Tag2 Versuchsmäusen unter der bimodalen- oder Mono-Therapie mit OncoVEX und ICB	99
Abbildung 31: Quantitative PCR Analyse des Vollbluts der RIP1-Tag2 Mäuse zum Nachweis der Virus-DNA	100
Abbildung 32: Histopathologische (H&E) und immunhistochemische (CD3) Analyse des Pankreasgewebes von RIP1-Tag2 Versuchsmäusen nach vier-wöchiger Behandlung mit der kombinierten Viro-Immuntherapie ohne Gabe von therapeutischen Tag-T _H 1 Zellen	102
Abbildung 33: Histopathologische (H&E) Analyse der Milz der RIP1-Tag2 Versuchstiere nach vier-wöchiger Behandlung mit der kombinierten Viro-Immuntherapie ohne die Gabe von Tag-T _H 1 Zellen	103
Abbildung 34: Analyse der Immunzellen der Milz von RIP1-Tag2 Versuchsmäusen nach vier-wöchiger Behandlung mit der kombinierten Viro-Immuntherapie ohne die Gabe der Tag-T _H 1 Zellen mittels Durchflusszytometrie.	105
Abbildung 35: Analyse der membranären PD-1 Expression von CD4 ⁺ -, CD8 ⁺ T-Zellen	

in der Milz von RIP1-Tag2 Versuchsmäusen nach vier-wöchiger Behandlung mit der kombinierten Viro-Immuntherapie ohne die Gabe der Tag-T _H 1 Zellen mittels Durchflusszytometrie	106
Abbildung 36: Evaluierung des Blutglukosewertes in RIP1-Tag2 Versuchsmäusen unter der kombinierten Viro-Immuntherapie mit und ohne ICB Gabe	109
Abbildung 37: Fotografie des Pankreas der hyperglykämischen RIP1-Tag2 Versuchsmaus nach vier-wöchiger kombinierter Viro-Immuntherapie (OncoVEX + Tag-T _H 1 + ICB)	110
Abbildung 38: Fotografie des Pankreas der hyperglykämischen RIP1-Tag2 Versuchsmaus nach vier-wöchiger kombinierter Viro-Immuntherapie (OncoVEX + Tag-T _H 1 + ICB)	111
Abbildung 39: Histopathologische (H&E) Untersuchung der Milz der RIP1-Tag2 Versuchstiere nach vier-wöchiger Behandlung mit der kombinierten Viro-Immuntherapie mit und ohne die Gabe von ICB	112
Abbildung 40: Analyse der Lymphozyten (CD45.2 ⁺ Zellen) in den lymphatischen Organen von RIP1-Tag2 Versuchsmäusen nach vier-wöchiger Behandlung mit der kombinierten Viro-Immuntherapie mittels Durchflusszytometrie	116
Abbildung 41: <i>In vitro</i> Virusreplikation und GM-CSF ELISA von OncoVEX infizierten RIP1-Tag2 Tumorzellen.....	118
Abbildung 42: <i>In vitro</i> Untersuchung der ¹⁸ F-FHBG Aufnahme von OncoVEX- oder Mock-infizierten Tumorzellen	121
Abbildung 43: Versuchsschema der <i>in vivo</i> ¹⁸ F-FHBG-PET/MRT Untersuchung zur Visualisierung OncoVEX-infizierter RIP1-Tag2 Tumorzellen	123

Abbildung 44: <i>In vivo</i> ^{18}F -FHBG-PET/MRT zur Überprüfung der Anreicherung von ^{18}F -FHBG in OncoVEX-infizierten RIP1-Tag2 Versuchsmäusen	124
Abbildung 45: <i>Ex vivo</i> Autoradiographie von ^{18}F -FHBG-injizierten RIP1-Tag2 Versuchsmäusen mit und ohne OncoVEX-Administration	125
Abbildung 46: Histopathologische (H&E) und immunhistochemische (CD3, HSV-1) Analyse des Pankreas von RIP1-Tag2 Mäusen nach 2 Gy Niedrigdosis-Ganzkörperbestrahlung und einmaliger <i>i.p.</i> Verabreichung von OncoVEX oder PBS.....	126
Abbildung 47: Versuchsschema zur Bestimmung der Viruslast.....	128
Abbildung 48: <i>In vivo</i> Viruslast und GM-CSF Konzentration von OncoVEX infizierten und lysierten RIP1-Tag2 Tumorzellen	129
Abbildung 49: Evaluierung des relativen Blutglukosewertes in RIP1-Tag2 Versuchsmäusen unter der Gabe von OncoVEX und ICB.....	130
Abbildung 50: Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse der Inselzellkarzinome von 10 – 11 Wochen alten RIP1-Tag2 Versuchstiere nach einmaliger kombinierter Viro-Immuntherapie bzw. Isotyp AK-Behandlung.....	131
Abbildung 51: Versuchsschema zur Evaluation der NF κ B Aktivierungsorte in OVA-B16 und OVA-MC38 tumortragenden NF κ BLuc-Reportermäusen mit kombinierter T _H 1-Zell-basierter Immuntherapie.	135
Abbildung 52: Relatives OVA-B16 und OVA-MC38 Tumorvolumen von NF κ BLuc-Reportermäusen mit kombinierter Immuntherapie	135
Abbildung 53: Monitoring der relativen S.I. in NF κ BLuc-Reportermäusen unter der kombinierten Immuntherapie (OVA-T _H 1 + ICB) oder Isotyp AK Kontrollbehandlung.....	137

Abbildung 54: Repräsentative Biolumineszenz-Aufnahmen von OVA-B16 und OVA-MC38 tragenden ^{NFκB} Luc-Reportertermäusen mit kombinierter Immuntherapie oder Isotyp AK Kontrollbehandlung.....	138
Abbildung 55: Histopathologische (H&E) und immunhistochemische (B220 + CD3) Analyse der OVA-B16 und OVA-MC38 Tumore der ^{NFκB} Luc-Reportertermäuse 10 Tage nach Tumorinokulation und der Behandlung mit der kombinierten Immuntherapie (OVA-T _H 1) bzw. PBS.	141
Abbildung 56: Analyse der prozentualen Anzahl von T und B Zellen in OVA-B16 Tumoren und den primär und sekundär lymphatischen Organen von mittels kombinierter Immuntherapie oder mit Isotyp AK behandelten ^{NFκB} Luc-Reportertermäusen	144
Abbildung 57: Analyse der prozentualen Anzahl von T und B Zellen in OVA-MC38 Tumoren und den primär und sekundär lymphatischen Organen von mittels kombinierter Immuntherapie oder mit Isotyp AK behandelten ^{NFκB} Luc-Reportertermäusen	147

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung verschiedener Radionuklide und deren mögliche Radiopharmaka (Tracer) für die PET	30
---	----

Abkürzungsverzeichnis

¹⁸ F-FDG	2-[(18)F]fluoro-2-deoxy-D-glucose
¹⁸ F-FHBG	9-[4-[(18)F]fluoro-3-(hydroxymethyl)butyl]guanine
APC	<i>antigen presenting cell</i>
BAFF-R	<i>B-cell-activating factor receptor</i>
BZR	B-Zellrezeptor
cIAP	<i>cellular inhibitor of apoptosis</i>
CTL	<i>cytotoxic T cell</i>
CTLA-4	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4</i>
DAMPs	<i>damage-associated molecular patterns</i>
DC	<i>dendritic cell</i>
dLK	drainierender Lymphknoten
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxide
dsRNA	doppelsträngige RNA
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	<i>Fluorescent activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FID	<i>free induction decay</i>
FITC	Fluoreszin isothiozyanat
fMRT	funktionelle Magnetresonanztomographie
FSC	<i>forward scatter</i>
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-
HSV-1	Herpes-Simplex-Virus-1
HSV-1-tk	Herpes-Simplex-Virus-1 Thymidin-Kinase
i.t.	intratumoral
i.v.	intravenös
IACUC	<i>Institutional Animal Care and Use Committee</i>

IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunoglobulin
IKK	I κ B Kinasen Komplex
IKK β	I κ B Kinase
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin-1 Rezeptor
IVC	<i>Individually Ventilated Cages</i>
IVIS [®]	<i>in vivo imaging system</i>
kLK	kontralateraler Lymphknoten
LAG-3	<i>lymphocyte activation gene-3</i>
LOR	<i>line of response</i>
LPS	Lipopolysaccharide
mAbs	<i>monoclonal antibodies</i>
MACS	<i>Magnetic Activated Cell Sorting</i>
MDSCs	myeloid-derived suppressor cells
MEKK3	MAP/ERK Kinase Kinase 3
MEM	Minimales Essentielles Medium
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
Mz	Nettomagnetisierungsvektor
NF κ B	<i>nuclear factor-kappa B</i>
NIK	<i>NFκB inducing kinase</i>
ORR	<i>objective response rate</i>
OVA	Ovalbumin
PAMPs	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PD-1	<i>programmed cell death protein 1</i>
PD-L1	<i>programmed death-ligand 1</i>
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PFU	<i>plaque forming units)</i>
pLK	pankreatischer Lymphknoten
PMTs	<i>Photomultiplier Tubes</i>

PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
Rb Protein (TP53)	Retinoblastom-Protein
Rb	Retinoblastom
ROIs	<i>regions of interest</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
S.I.	Signalintensität
S1P1	sphingosine-1 phospat 1
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i>
SSC	<i>side scatter</i>
SV40	Simian-Virus 40
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
Tag	<i>Large T-Antigen</i>
TAP	Antigenpeptid-Transporter
TE	<i>echo time</i>
T _{FH}	T-follikuläre Helferzelle
Th	T-Helferzelle
TIR	<i>Toll/IL-1 receptor</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TME	<i>tumor microenvironment</i>
TNB	Trippel-negativer Brustkrebs
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNFR	Tumor Nekrose Faktor Rezeptor
TR	<i>repetition time</i>
TRAF3	TNFR-assoziiertes Faktor 3
T _{Regs}	<i>T-regulatory cell</i>
T-VEC	Talimogen Laherparepvec
TZR	T Zell-Rezeptor

Widmung

Diese Dissertation widme ich meinen Eltern Larissa und Alexander Stowbur

„Ich habe keine besondere Begabung, sondern bin nur leidenschaftlich neugierig.“

Albert Einstein (1879 – 1955)

Dankeswort

Mit den folgenden Worten möchte ich allen Personen, die mich bei der Erstellung meiner Dissertationsschrift unterstützt haben, meinen herzlichen Dank aussprechen.

An erster Stelle gilt mein außerordentlicher Dank meinem Doktorvater und dem Erstgutachter dieser Dissertationsschrift, PD Dr. med. Manfred Kneilling. Er hatte stets ein offenes Ohr für meine Fragen, übte konstruktive Kritik bei der Versuchsplanung und begeisterte mich mit seiner unermesslichen Leidenschaft für die biomedizinische Forschung. Sobald er einen Raum betrat, erhellte er den Raum mit seiner positiven Aura. Sein Enthusiasmus hat mein Interesse an wissenschaftlichen Arbeiten immens geprägt. Ich möchte mich bei ihm für die freundliche und kompetente Betreuung sowie für die Geduld und Zeit bedanken, die er in die hervorragende Betreuung meiner Promotion investiert hat. Zudem möchte ich mich bei ihm bedanken für die Möglichkeit meine Forschungsergebnisse vor internationalem Publikum präsentieren zu dürfen. Darüber hinaus hat er mir einen immensen wissenschaftlichen Freiraum geboten, so dass ich mich als biomedizinischer Wissenschaftler völlig frei entfalten konnte.

In weiterer Folge möchte ich mich bei dem Leiter der Präklinischen Bildgebung und Radiopharmazie und Dekan der Medizinischen Fakultät, Prof. Dr. Bernd Pichler, für die Möglichkeit bedanken, meine Dissertation an diesem exzellenten Institut durchführen zu können. Es ermöglichte mir, meinen beruflichen Schwerpunkt auf die biomedizinische Forschung mit translationaler Perspektive zu legen. Die Arbeit in den Labors der Präklinischen Bildgebung hat mir einen enormen Einblick in verschiedene Disziplinen und Methoden gegeben, die meinen Werdegang maßgeblich prägen werden. Darüber hinaus möchte ich mich für seine äußerst sympathische Art bedanken, die enorm zu einem positiven Arbeitsklima im Werner Siemens Imaging Center beigetragen hat.

Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee für die Möglichkeit bedanken, meine Dissertation als Zweitgutachter zu begutachten. Mit der Begutachtung meiner Dissertationsschrift durch Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee erfährt diese Arbeit eine Begutachtung durch einen herausragenden Immunologen, der 2022 als Mitglied in die Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina aufgenommen wurde.

Darüber hinaus möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Dr. Barbara Schörg bedanken, die mir während der gesamten Promotionszeit bei wissenschaftlichen Fragen und der Versuchsplanung zur Seite stand. Sie hat mich in meiner Anfangszeit als Doktorand mit ihrer empathischen Art mit den Routinemethoden im Labor vertraut gemacht und mich bei der Versuchsplanung und -durchführung betreut.

Ich möchte mich bedanken bei Roman Mehling, Dr. Andreas Schmid, Dr. Fabian Schmid und Dr. Barbara Schörg für das fachspezifische Korrekturlesen meiner Dissertationsschrift.

Weiterhin danke ich meinen Kooperationspartnern Prof. Dr. Ulrich Lauer, Dr. Susanne Berchtold, Dr. Julia Beil und Irina Smirnow für die sehr erfolgreiche und fruchtbare Zusammenarbeit im Rahmen der kombinierten Viro-Immuntherapie. Durch sie konnte ich sehr viel über die Thematik der onkolytischen Viro-Immuntherapie lernen.

Mein Dank gilt meinen Kooperationspartnern Prof. Dr. med. Letitia Quintanilla-Martinez de Fend, Dr. Irene Gonzalez Menendez und ihren Mitarbeitern am Institut für Pathologie für ihre kompetente Unterstützung. Mein Dank gilt auch Dr. Carsten Calaminus und Dr. Susanne Gerold die mich bei den Tierversuchsanträgen unterstützt haben.

Mein herzlicher Dank gilt auch Prof. Dr. med. Martin Röcken und seinen Mitarbeitern an der Hautklinik des Universitätsklinikums Tübingen, insbesondere Prof. Dr. med. Lukas Flatz, Prof. Dr. med. Martin Schaller, Birgit Fehrenbacher, Renate Nordin und allen anderen Mitarbeitern, die durch ihre fachliche Unterstützung zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Darüber hinaus gilt mein Dank allen Mitarbeitern der Radiopharmazie für die qualitativ hochwertige Herstellung von ^{18}F -FHBG, die eine wichtige Fragestellung einer Studie im Rahmen dieser Dissertation beantwortete.

Weiterhin möchte ich mich bei den technischen Mitarbeitern des Werner Siemens Imaging Centers, Funda Cay, Maren Harant, Linda Schramm, Dennis Haupt, Natalie Hermann und Miriam Owczorz für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung meiner Experimente bedanken. Außerdem danke ich den Tierpflegern, insbesondere Isabel Sehnke und Maximilian Kubiak, für ihre großartige Unterstützung bei der Betreuung und Pflege der Versuchstiere.

Mein besonderer Dank gilt meinen Kollegen Dr. med. Dominik Sonanini, Dr. med. Johannes Schwenck und Dr. med. Salvador Guillermo Castaneda Vega für die anregenden fachlichen Diskussionen, aber auch für die sehr persönliche, hilfsbereite und inspirierende Arbeitsatmosphäre.

Ein großer Dank gilt auch allen Mitarbeitern des Werner Siemens Imaging Centers, die stets zu einer angenehmen und freundlichen Arbeitsatmosphäre beigetragen haben. Besonders hervorheben möchte ich Roman Mehling, Dr. Fabian Schmidt, Tudor Ionescu, Dr. Barbara Schörg, Dr. Francisco José Reche Pérez, Vaibhav Agrawal und Adrian Mannel die während der Mittagspausen, bei sportlichen Aktivitäten, privaten Treffen, nationalen und internationalen Konferenzen, aber auch zwischendurch zu einer freundschaftlichen und persönlichen Arbeitsatmosphäre beigetragen haben.

Ein herzliches Dankeschön möchte ich meiner Partnerin Isabelle Marie-Charlotte Müller aussprechen, die mich während meiner Promotionszeit moralisch und liebevoll unterstützt hat. Auch für das kritische Korrekturlesen und die Hilfe beim Layout möchte ich mich herzlich bedanken.

Last but not least ist es mein besonderes Anliegen meinen Eltern, Larissa und Alexander Stowbur herzlich zu danken. Meine Eltern haben mich während meiner Schul- und Studienzeit stets liebevoll und großzügig in allen Lebenslagen unterstützt und damit einen besonderen Beitrag zu meinem Werdegang geleistet. Sie waren zu jederzeit für meine Sorgen und Anliegen für mich da. Hierfür möchte ich mich herzlich bedanken. Mein herzlicher Dank gilt auch meiner Schwester Jasmin Sauciuc, meinem Neffen Jayden Constantin Sauciuc und meiner gesamten Familie, die mich in allen Lebenslagen unterstützt haben.

Vorwort

karkínos (καρκίνος) – zu Deutsch: Krebs bzw. Krabbe leitet sich aus dem Altgriechischem her und tauchte erstmals in den hippokratischen Schriften (*Corpus Hippocraticum*) im 2. Jahrhundert n. Chr. als Bezeichnung für Geschwüre auf. Die geschwollenen Adern eines Tumors sichtbar auf dem Thorax eines an Brustkrebs erkrankten Menschen waren die Reminiszenz an die Gebeine eines Krestieres und somit Namensgeber der Krankheit, die die Menschheit bis ins 21. Jahrhundert verfolgt und heutzutage nach den kardiovaskulären Erkrankungen die häufigste Todesursache in der westlichen Welt darstellt [1]. Trotz des immensen Fortschritts der Wissenschaft im 20. Jahrhundert unter anderem mit der Eindämmung verschiedener Infektionskrankheiten durch die Entdeckung von antimikrobiellen Substanzen, der vollständigen Eradikation der Pockenkrankheit durch die Einführung des Pockenimpfstoffs oder der Entwicklung von bildgebenden Verfahren zur präzisen Diagnostik, ist die Therapieeffizienz moderner Behandlungsmethoden zur Bekämpfung unterschiedlicher Krebserkrankungen stark limitiert.

Nichtsdestotrotz wurden besonders in der letzten Dekade (Stand: 2023) verschiedene neuartige Therapieansätze basierend auf der Verstärkung der anti-tumoralen Immunantwort eruiert, publiziert und zur klinischen Anwendung adaptiert.

Somit erlangte ein genetisch modifiziertes Herpes-Simplex-Virus Typ 1 (HSV-1) mit dem Trivialnamen *Talimogen laherparepvec* (T-VEC), besser bekannt unter Imlygic, von der US-Behörde für Lebens- und Arzneimittel (engl.: *U.S. Food and Drug Administration*, FDA) sowie von der Europäischen Arzneimittelbehörde (engl.: *European Medicines Agency*; EMA) im Jahr 2015 als erste onkolytische virusbasierte Immuntherapie die Zulassung zur Behandlung des metastasierenden Melanoms. Überdies kürte das Nobelpreiskomitee des Karolinska Instituts James P. Allison und Tasuko Honjo im Jahr 2018 mit dem Nobelpreis für Medizin für die Entwicklung der Immuncheckpoint-Inhibitoren.

Sowohl die onkolytische virusbasierte Immuntherapie als auch die Immuncheckpoint-Inhibitor-Therapie haben Limitationen, welche mittels Kombinationstherapien eingeschränkt werden sollen. Derzeit werden zahlreiche klinische Studien durchgeführt in denen Kombinationstherapien bestehend aus den vorher beschriebenen Komponenten zum Einsatz kommen. Hierdurch soll die

Therapieeffizienz und somit das Langzeitüberleben von Tumorpatienten verbessert werden.

Dieses Werk soll mit Hilfe von präklinischen Studien in zwei exogenen Tumormausmodellen und einem endogenen Tumormausmodell die Effizienz einer anti-tumoralen Immuntherapie mittels der Kombination verschiedener Immuntherapiekomponenten verbessern.

Die Analyse der Auswirkung der kombinierten Immuntherapie auf das TME und die primär und sekundär lymphatischen Organe sollen zur Aufklärung der Mechanismen des Tumor-Immunescares und folglich zur Verbesserung der Therapieeffizienz beitragen.

1. Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Seit Jahrtausenden bietet unsere Umwelt nicht nur uns Homo sapiens sapiens ein Habitat zum evolutionären Fortschritt, sondern ebenso evolvieren sich die verschiedensten Pathogene und Mikroben in Koexistenz mit den Tieren und Pflanzen. Diese Koevolution hat unter dem Selektionsdruck zur Abwehr gegen die „Eindringlinge“ ein ausgeklügeltes und nahezu perfekt aufeinander abgestimmtes System hervorgebracht, dessen Komponenten und Dynamik von der Wissenschaft vermehrt entschlüsselt werden konnten. Die Bedeutsamkeit unseres Immunsystems ist besonders zu den jüngst pandemischen Ereignissen (Stand 2023) ins Bewusstsein der Gesellschaft gedrungen [2]. Ist die physikalische (Haut), chemische (Schweiß und Talg) und biologische (Bakterien auf der Haut) Barriere erst einmal durch ein Pathogen durchdrungen, so sorgen persistente Immunzellen der Haut (dendritische Zellen; engl.: *dendritic cell*, DC) zur Aktivierung einer Immunkaskade. Diese Kaskade kann eine systemische Inflammation auslösen, die der Eliminierung des Pathogens und der Entwicklung von Gedächtniszellen zur schnellen Rekrutierung von Immunzellen bei einem wiederholten Angriff des gleichen Pathogens, dient. Somit stellt das Immunsystem ebenso ein permanentes Lernzentrum dar, das sich fortlaufend selbst verbessert [3].

Jedoch ist dieses nicht nur sehr effizient in der Bekämpfung von äußeren Stimuli, sondern attackiert und lysiert selektiv nicht mehr funktionelle, körpereigene Zellen und „räumt“ anschließend den überschüssigen Zelldebris ab.

Hierfür ist eine Maschinerie verschiedener Immunzellen verantwortlich, die grob zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem unterschieden werden können [4].

1.1.1 Das angeborene „innate“ Immunsystem

Wie der Name bereits vermuten lässt, ist das angeborene Immunsystem bereits bei der Geburt vorhanden und schützt somit den Säugling vor Pathogenen oder pathologischen Stimuli [5]. Charakteristisch für das auch sogenannte „innate“ Immunsystem ist die rapide, innerhalb von wenigen Minuten nach der Pathogen

Exposition einsetzende protektive (pro)-inflammatorische Antwort auf den pathogenen Reiz. Dieser wird durch die patrouillierenden Immunzellen wie z.B. NK Zellen, Makrophagen und Granulozyten (Neutrophile, Eosinophile und Basophile) und die Aktivierung ihrer spezifischen Rezeptoren „*pattern recognition receptors*“ (PRRs) initiiert. Diese erkennen entweder nicht vom Pathogen abstammende „*damage-associated molecular patterns*“ (DAMPs), die beispielsweise im Rahmen von Zellschäden freigesetzt werden oder direkt vom Pathogen abstammende „*pathogen-associated molecular patterns*“ (PAMPs) welche entweder von den Pathogenen ausgeschieden werden oder an deren Oberfläche haften [6].

PRRs können eingeteilt werden in oberflächliche, lösliche und intrazelluläre Rezeptoren. Oberflächliche PRRs umfassen Scavenger Rezeptoren, C-Typ Lektin Rezeptoren und Toll-like Rezeptoren (TLRs). Die TLRs zum Beispiel können in 13 verschiedene Unterarten aufgliedert werden, die jeweils PAMPs aus verschiedenen mikrobiellen Pathogenen detektieren, wie zum Beispiel von Viren, Bakterien, Protozoa oder Pilzen [7]. Diese mikrobiellen Strukturen beinhalten beispielsweise Lipopolysaccharide (LPS, Ligand für TLR4), Lipoproteine (Ligand für TLR2), bakterielle CpG DNA (Ligand für TLR9) oder virale doppelsträngige RNA (dsRNA; Ligand für TLR3). Die TLRs werden auf verschiedenen Immunzellen (Makrophagen, B-Zellen, DCs, Neutrophilen etc.) und Immun-assoziierten Zellen exprimiert (Fibroblasten, Epithelzellen, Keratinozyten etc.). Nach Aktivierung der TLRs werden Adapterproteine mit Toll/IL-1 Rezeptor (TIR) Domänen rekrutiert, die wiederum die Downstream Signal Kaskade wie beispielsweise den Transkriptionsfaktor nuclear factor-kappa B (NFκB) aktivieren. Dieser kontrolliert eine Reihe von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, die für die T-Zell Aktivierung unentbehrlich sind [8].

1.1.1.1 NFκB Signalweg

NFκB präsentiert eine Familie induzierbarer Transkriptionsfaktoren, die in der Immunantwort eine grundlegende Rolle spielen. Diese Familie besteht aus fünf strukturell verwandten Mitgliedern NFκB1 (p50), NFκB2 (p52), RelA (p65), RelB und c-Rel, die als verschiedene Hetero- oder Homodimere an ein spezifisches DNA-Element – den *κB Enhancer* – binden und wiederum die Transkription eines spezifischen Gens auslösen [9]. Der NFκB Signalweg ist an zahlreichen Prozessen

beteiligt, beispielsweise induziert er die Proteinbiosynthese und die Produktion funktioneller Proteine und moduliert die Proliferation, Differenzierung und das Überleben von Immunzellen [10]. Man unterscheidet hierbei zwei NFκB-Signalwege, den klassischen (kanonischer) und den alternativen (nicht-kanonischer).

Bei der Aktivierung des klassischen Signalwegs spielen RelA und p50 die tragende Rolle. Im *steady-state* Status werden RelA und p50 im Zytoplasma durch IκB Proteine inhibiert. Diese IκB Proteine bestehen aus 3 Gruppen (IκBα, IκBβ, IκBε) den Precursor Proteinen (p100 und p105) und den IκB Proteinen (IκBζ, BCL-3 and IκBNS) [11]. Zur Aktivierung des klassischen NFκB Signalwegs kommt es durch die Stimulation von transmembranären Rezeptoren u.a. Tumor Nekrose Faktor Rezeptor (TNFR), Interleukin-1 Rezeptor (IL-1R), T-Zellrezeptor (TZR), B-Zellrezeptor (BZR) oder TLR. Diese führt zur Aktivierung des IκB Kinasen Komplexes (IKK) und schließlich zur Polyubiquitinierung der IκB Proteine und anschließend zu deren Degradierung durch das 26S Proteasom. Somit wird das RelA/p50 Heterodimer vom inhibierenden IκB getrennt, transloziert in den Nukleus und initiiert dort die Transkription an den jeweiligen regulatorischen Abschnitten der DNA [10, 12, 13] (**Abbildung 1**). Die Aktivierung des klassischen NFκB Signalwegs geschieht sehr schnell und induziert zugleich die Expression negativer Regulatoren wie IκBα, A20 und p105, die ein negatives Feedback generieren. Der klassische NFκB Signalweg ist vor allem assoziiert mit dem „innate“ Immunsystem [14]. Dieser wird nämlich durch die Bindung von mikrobiellen PAMPs an den PRRs, die auf den „innate“ Immunzellen, beispielsweise Monozyten, Neutrophilen und DCs exprimiert werden, aktiviert. Daraufhin werden pro-inflammatorische Zytokine wie TNF, IL-1 oder IL-6 von der Zelle sezerniert [15]. Somit ist der klassische Signalweg besonders mit der Abwehr von bakteriellen Infekten assoziiert [16, 17]. Nichtsdestotrotz konnte gezeigt werden, dass der klassische NFκB Signalweg erheblich an der Initiierung und Progression von Autoimmunerkrankungen wie z.B. die rheumatoide Arthritis durch die Produktion von Matrixmetalloproteinasen beteiligt ist [18-20].

Im Vergleich zum klassischen NFκB Signalweg kann der alternative NFκB Signalweg von einer deutlich geringfügigeren Anzahl von Rezeptoren wie u.a. CD40L, Lymphotoxin Rezeptor oder *B-cell-activating factor receptor* (BAFF-R) aktiviert

werden. Dies impliziert, dass die biologischen Funktionen dieses Signalwegs spezifischer sind als die des klassischen. Die *NFκB inducing kinase* (NIK) ist das Schlüsselenzym des alternativen NFκB Signalwegs. Im *steady-state* Status wird NIK von dem TNFR-assoziierten Faktor 3 (TRAF3) ubiquitiniert und infolgedessen degradiert. Die Stimulation eines der oben genannten Rezeptors, der die Aktivierung des alternativen Signalwegs einleitet, aktiviert die E3 Ubiquitin Ligase *cellular inhibitor of apoptosis* (cIAP). cIAP ubiquitiniert TRAF3, welches anschließend im Proteasom degradiert. Dies erzeugt die Akkumulation von NIK [21, 22]. Infolgedessen phosphoryliert NIK zusammen mit IKKα das Protein p100, welches ubiquitiniert und im Proteasom zu p52 degradiert wird [23]. Die Degradierung von p100 induziert die Bildung von RelB/p52 Heterodimeren, die in den Nucleus translozieren und dort an die jeweiligen regulatorischen Abschnitten der DNA binden [24-26] (**Abbildung 1**). Die Aktivierung des alternativen NFκB Signalwegs ist aufgrund der proteasomalen Degradierung von p100 und der anschließenden Entstehung des RelB/p52 Heterodimers zeitintensiver und somit langsamer als die Aktivierung des klassischen Signalwegs. Die Aktivierung des alternativen NFκB Signalwegs assoziiert man mit dem adaptiven Immunsystem. Beispielsweise reguliert der klassische NFκB Signalweg die Entwicklung und Maturation der B-Zellen [27] und induziert die Entwicklung der T-Zellen im Thymus als auch die Maturation in Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen [28]. Zudem konnten Doyle *et al.* in p52-Knockoutmäusen zeigen, dass das Fehlen von p52 zu einer erhöhten viralen Genexpression führt und somit schlussfolgern, dass der alternative Signalweg eine wichtige Rolle im Rahmen der adaptiven, T-Zell-medierten, anti-viralen Immunantwort spielt [29]. Zusammenfassend können sowohl pro- als auch anti-apoptotische Effekte, sowie Proliferations- und *Senescence*-Merkmale auf beide NFκB Signalwege zurückgeführt werden [30, 31].

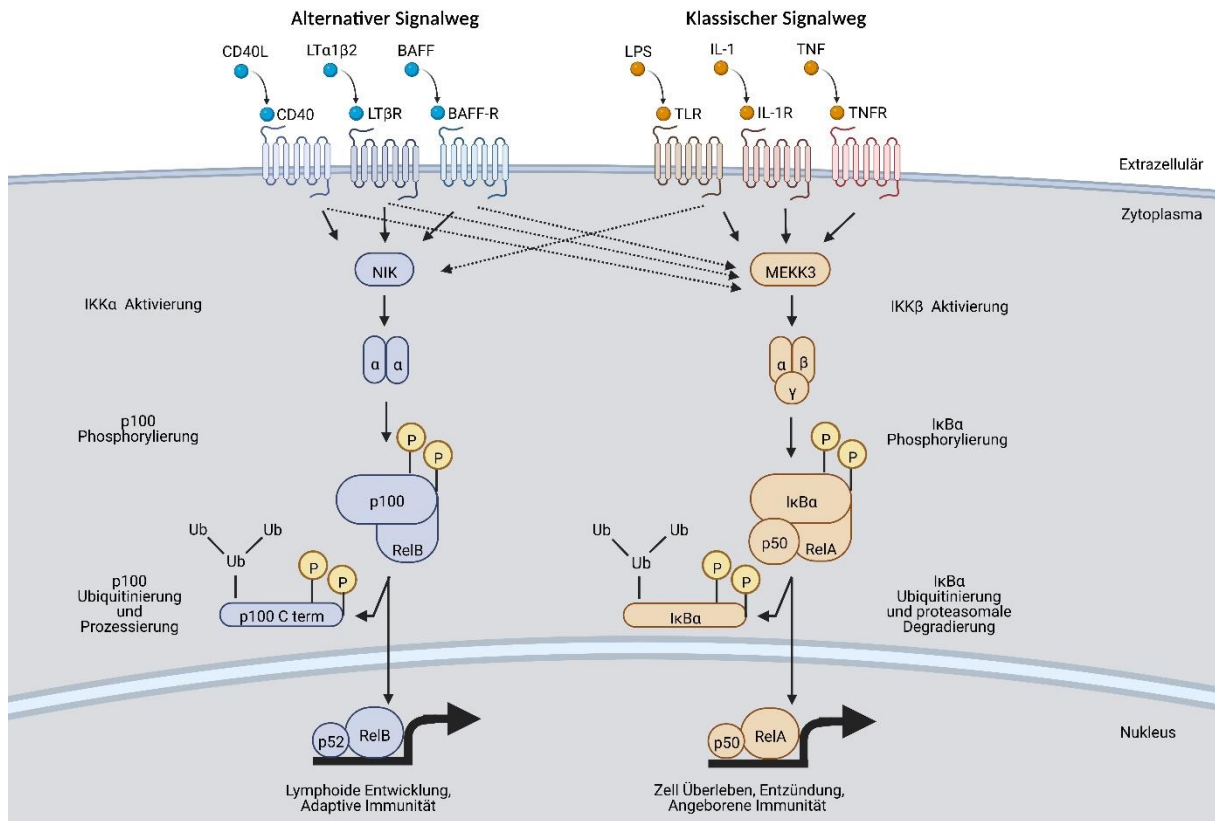


Abbildung 1: Schematische Illustration des alternativen und klassischen NFκB Signalwegs.

Der klassische Signalweg wird durch pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 und TNF, aber auch durch LPS an den jeweiligen Rezeptoren initiiert. Die klassische Signalkaskade führt zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren p50 und RelA, die die Entzündung und die angeborene Immunität stimulieren und für das Überleben der Zelle eine wichtige Rolle spielen. Der alternative Signalweg wird typischerweise durch CD40L, LTα1β2 oder BAFF initiiert, welche eine Signalkaskade aktivieren, die wiederum zur Folge hat, dass die Transkriptionsfaktoren RelB und p52 in den Nucleus migrieren und die lymphoide Entwicklung und adaptive Immunität stimulieren. Modifiziert nach Nishikori *et al.* [10].

1.1.2 Das erworbene „adaptive“ Immunsystem

Wie zuvor bereits erläutert, ermöglicht das angeborene „innate“ Immunsystem (1.1.1 **Das angeborene „innate“ Immunsystem**) eine rapide Immunantwort auf einen pathologischen Reiz. Im Gegensatz hierzu hat das erworbene „adaptive“ Immunsystem im Laufe der Evolution ein sehr sensibles und breites Antigen-Erkennungsortchester bestehend aus Immunzellen wie den antigenpräsentierenden Zellen (engl.: *antigen presenting cell*; APC), DCs, B-Zellen und T-Zellen entwickelt, die zur Pathogen-Eradikation permanent miteinander kommunizieren [32]. Hierbei absolvieren die B- und T-Zellen während ihrer Maturation verschiedene Schritte, die

u.a. zur späteren Unterscheidung zwischen Eigen- und Fremd-Antigenen dienen – die positive und negative Selektion. Die vollständige Maturation der B-Zelle von einer pluripotenten Stammzelle bis hin zur reifen B-Zelle mit individuellen BZR auf deren Zelloberfläche findet im Knochenmark statt [33]. Die T-Zell Maturation beginnt im Knochenmark, worauf T-Progenitor-Zellen in den Thymus migrieren und dort die Reifung des individuellen TZR initiieren. Die T-Zellen, die die positive und negative Selektion überleben und somit nicht autoreaktiv sind, bekommen das membranäre Differenzierungskluster (*cluster of differentiation; CD*) CD4⁺ oder CD8⁺ [34, 35]. Diese CD's reflektieren die verschiedenen Differenzierungsstadien bzw. Aktivierungszustände, mit denen sich die Zelltypen voneinander (z.B. mittels **3.5.5 Durchflusszytometrie**) unterscheiden lassen [36]. Beide T-Zell-Subtypen tragen zusätzlich das membranäre CD3-Antigen und bilden mit dem TZR und der Zetta-Kette (ζ -Kette) den T-Zellreptor-Komplex [37]. Kommt es nun zur Exposition mit einem pathogenen Antigen bzw. PAMP, dann wird dieses von einer APC z.B. einer DC mittels PRR (z.B. TLR4) erkannt. Dies hat die Aktivierung des TLR4/NF κ B Signalwegs zur Folge und initiiert die Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen wie z.B. Interleukin-1 (IL)-1, Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) oder IL-6, die eine pro-inflammatorische Mikroumgebung und die Aktivierung naiver Immunzellen induzieren. Infolgedessen wird das Pathogen von der APC phagozytiert [38-41]. Daraufhin wird die Expression des kostimulierenden Moleküls CCR7 auf der Zelloberfläche der APC und des Haupthistokompatibilitätskomplexes II (engl.: *major histocompatibility complex; MHC-II*) stark hochreguliert [42]. Die NF κ B -Signalweg-vermittelte Expression von CCR7 dirigiert die DCs zu den Lymphknoten und initiiert die adaptive Immunabwehr durch die Präsentation des Antigens auf dem MHC-II an naive CD4⁺ T-Zellen [43, 44]. Zum einen kommt es zur Interaktion zwischen MHC-II-Antigen-Komplex der APC und dem TZR der T-Zelle und zum anderen zur Interaktion von B7.1 (CD80) bzw. B7.2 (CD86) auf der APC mit CD28 auf der T-Zelle.

Beide Zell-Zell-Interaktionen, MHC-II-Antigen-Komplex: TZR und CD80/CD86:CD28 sind für eine erfolgreiche Aktivierung der naiven CD4⁺ T-Zelle essentiell [45, 46]. Je nach vorliegendem lokalem Zytokinprofil differenziert die naive CD4⁺ T-Zelle in einen der in Abbildung 2 illustrierten Phänotypen der T-Helferzelle (Th), die wiederum eine eher pro- oder anti-inflammatorische Zytokinsekretion induziert. Zum Beispiel

differenzieren CD4⁺ T-Zellen in einem von IFN- γ /IL-12 dominierten Zytokin-Milieu zu pro-entzündlichen IFN- γ -sezernierenden Th1 Zellen [47, 48]. Im Gegensatz hierzu differenzieren CD4⁺ T-Zellen in einem von IL-4 dominierten Zytokin-Milieu zu anti-entzündlichen IL-4-sezernierenden Th2 Zellen [49].

Dies hat zur Folge, dass zwei verschiedene Immunantworten im Rahmen der adaptiven Immunantwort ausgelöst werden können:

Die humorale Immunantwort wird durch B-Zellen vermittelt, welche durch die Zytokinsekretion von aktivierten Th-Zellen, aber auch PRR-vermittelt aktiviert werden können [50, 51]. Die PRR-vermittelte humorale Immunantwort ist Th unabhängig und ist definiert durch den Kontakt zwischen einem PRR auf der Membranoberfläche der B-Zellen und einem Antigen, beispielsweise einem PAMP. Dieser Kontakt resultiert in der Differenzierung der B-Zellen zu Plasmazellen, die AK mit einer geringen Affinität sezernieren und das Antigen opsonisieren [52].

Die Th-abhängige humorale Immunantwort benötigt die Mithilfe der Th Zellen. Hierbei wandern aktivierte DCs in den Lymphknoten und präsentieren den CD4⁺ T-Zellen das Antigen, worauf antigenspezifische CD4⁺ T-Zellen zu Th Zellen differenzieren. Die Th Zellen migrieren in den interfollikulären Raum der Lymphknoten und differenzieren dort zu T-follikulären Helferzellen (T_{FH}) u.a. durch die Expression von CXCR5 [53]. Follikuläre B-Zellen, die nun ebenfalls einen Antigenkontakt mit ihrem BZR hatten, migrieren aus den Lymphfollikeln in den interfollikulären Raum und treffen dort auf die T_{FH}. Die aktivierten B-Zellen präsentieren über deren MHC-II das prozessierte Antigen (MHC-II-Antigen-Komplex) den T_{FH} [54]. Dies führt zur Aktivierung der follikulären B-Zellen und zur Differenzierung in Plasmazellen, die in die Peripherie migrieren und dort die erste Verteidigungslinie darstellen u.a. mittels der Ausschüttung von pathogen-spezifischen AK geringer Affinität. Ein anderer Teil der aktivierten follikulären B-Zellen migriert in das Keimzentrum des Lymphknotens und initiiert somit die Keimzentrumsreaktion. Hierbei entsteht die sogenannte dunkle Zone, in der die klonale Expansion der aktivierten B-Zellen stattfindet, mit dem Ziel durch konstante Mutationen der Gene der variablen Regionen der leichten und schweren Ketten der Immunglobuline (Ig) die Affinität der BZR zum Antigen deutlich zu erhöhen [55, 56]. Bei diesem Prozess werden ebenso Plasmazellen, aber auch Gedächtniszellen

generiert, die bei erneuter Antigen-Exposition sofort und sehr spezifisch aktiviert werden können [57].

Die zelluläre Immunantwort ist auch bekannt als T-Zell-vermittelte Immunantwort und wird u.a. durch die Präsentation eines Antigens über den MHC-II-Komplex auf in den Lymphknoten migrierten APCs (B Zellen, DZs, Makrophagen) oder den MHC-I-Komplex von Körperzellen (Tumorzellen etc.) initiiert. Intrazelluläre Antigene werden nach proteasomalem Abbau über den MHC-I-Komplex im drainierenden Lymphknoten präsentiert. Extrazelluläre Antigene werden hingegen über den MHC-II-Komplex an CD4⁺ T-Zellen im drainierenden Lymphknoten präsentiert [58]. CD4⁺ T-Zellen erkennen hierbei das präsentierte Antigen über den MHC-II-Komplex und CD8⁺ T-Zellen hingegen über den MHC-I-Komplex: **Signal 1** [59-61]. Die Aktivierung und Proliferation von antigenspezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen benötigen neben der Antigenpräsentation auf dem MHC-Komplex noch 2 weitere Signale. APCs exprimieren die kostimulierenden Moleküle B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86), welche mit dem transmembranären Protein CD28 auf CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen interagieren und die T Zell-Aktivierung fördern: **Signal 2**. Des Weiteren folgt die Sezernierung verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine wie z.B. IL-12 und IFN- γ , die die antigenspezifische CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zelle in eine Effektorzelle differenzieren: **Signal 3** [62, 63]. Alle 3 Signale müssen in kurzem Abstand zueinander auftreten um die Differenzierung der naiven T-Zelle und somit die klonale Expansion einzuleiten. Die antigenspezifische CD4⁺ T-Zelle differenziert somit in eine Th und je nach vorliegendem Zytokinprofil in eine proinflammatorische Th1, in eine anti-inflammatorische Th2 oder gar in eine T_{FH} etc. (Abbildung 2). Die antigenspezifische CD8⁺ T-Zelle differenziert in eine zytotoxische CD8⁺ T-Zelle (engl.: *Cytotoxic T cell*; CTL) [64]. Zudem kann die Ausschüttung von IFN- γ durch die Th1 die Differenzierung (Signal 3) einer antigenspezifische CD8⁺ T-Zelle in eine CTL fördern [65]. Die CTL erkennt nun selektiv über ihren TZR die Zielzelle durch die Bildung des MHC-I-Antigen-Komplexes und lysiert diese mittels Perforin und Granzym [66]. Ein Teil der aktivierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen entwickelt sich zu persistenten Gedächtniszellen und zirkuliert im System [67] (Abbildung 2). Nach der vollständigen Pathogen-Eradikation sorgen diverse Mechanismen für die Umpolarisierung der pro-inflammatorischen zu einer anti-inflammatorischen Mikroumgebung [68]. Zudem garantieren spezifische

Prozesse, die im Folgenden besprochen werden, die Regulation der Selbsttoleranz. Zum Erhalt des homöostatischen Gleichgewichts sorgen sogenannte regulatorische T-Zellen (engl.: *T-regulatory cells*; T_{Regs}), die ca. 10 % der peripheren CD4⁺ T-Zellen ausmachen [69], [70]. Diese exprimieren neben CD4, CD25 und FOXP₃. DCs sezernieren die Zytokine IL-10 und TGF-β und initiieren die Aktivierung und Differenzierung der T_{Regs} [71]. So wurde beispielsweise von Kühn *et al.* ermittelt, dass IL-10-defizitäre Versuchsmäuse eine chronische Enterokolitis durch eine unkontrollierte Immunreaktion bedingt durch die fehlende Immunregulation der T_{Regs} entwickeln [72]. Zudem konnten Kang *et al.* darlegen, dass die Fähigkeit eines Organismus zwischen Eigen- und Fremdgewebe zu unterscheiden (engl.: *allorecognition*) maßgeblich darüber entscheidet, ob sich die naive CD4⁺ T-Zelle in eine T_{Reg} oder eine Th differenziert. Eine schwache Zell-Zell-Interaktion und somit eine schwache Allostimulation zwischen APC und naiver CD4⁺ T-Zelle resultiert in der T_{Reg} Induktion und einem „toleranten“ Mikroenvironment. Eine starke Allostimulation induziert hingegen die Th Differenzierung [73]. Somit herrscht ein permanenter Balanceakt zwischen optimaler Immunantwort und der Regulation der Selbsttoleranz. Neben den T_{Regs} sorgen ebenso spezifische Rezeptoren auf der Membran von T-Zellen – die sogenannten **Imm checkpoints** – für die Immunregulation [74].

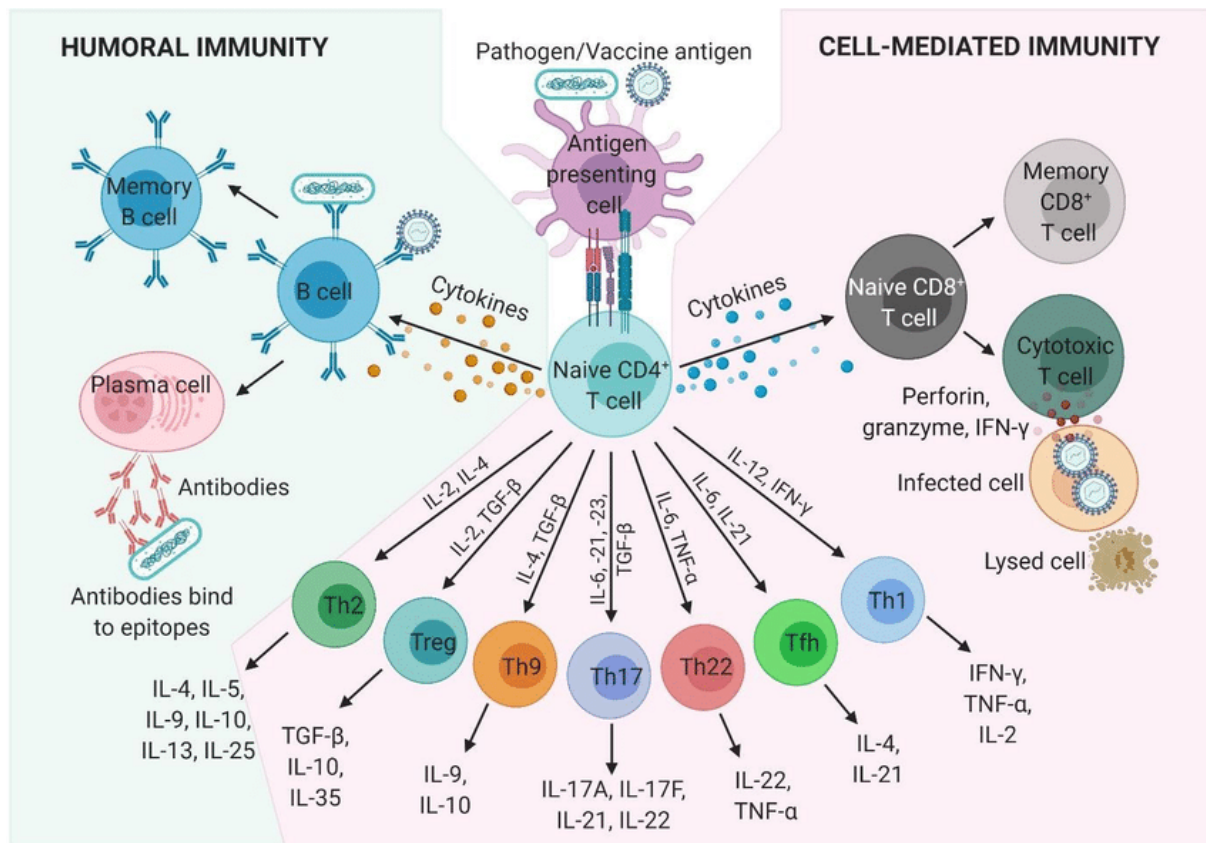


Abbildung 2: Schematische Illustration der Initiierung der erworbenen „adaptiven“ Immunantwort. Ein Pathogen bzw. ein Antigen wird von der APC erkannt und phagozytiert. Die Antigene werden nun prozessiert und mittels MHC-II an die naive CD4⁺ T-Zelle präsentiert. Diese wiederum differenziert je nach vorhandenem Zytokinstimulus in eine pro-inflammatorische, anti-inflammatorische oder folliculäre T-helferzelle (Th) etc., die wiederum weitere Zytokine zur Verstärkung oder zur Limitierung der Entzündung sezernieren. Mittels der Aktivierung der CD4⁺ T-Zelle wird u.a. auch die humorale oder zelluläre Immunantwort initiiert. Im Rahmen der humoralen Immunantwort kann die B-Zelle mittels CD4⁺ T-Zellen oder auch durch ein pathogenes Antigen selbst aktiviert werden und zu funktionellen Plasmazellen differenzieren. Die Plasmazellen produzieren und sezernieren pathogenspezifische AK, welche an das Epitop des Pathogens binden und die Phagozytose und folglich dessen Eliminierung initiieren. Des Weiteren kommt es zu Bildung von B-Zell-Gedächtniszellen (engl.: *memory B cells*), die für einen langen Zeitraum im System patrouillieren und in der Lage sind eine sofortige Immunantwort zu initiieren, sobald das Pathogen erspät wird. Die zelluläre Immunantwort wird u.a. durch pro- bzw. anti-inflammatorische Zytokine initiiert. Diese Zytokine garantieren die Differenzierung der antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen zur CTL, die durch die Sekretion von Perforin und Granzym das Pathogen oder infizierte Zellen (mit intrazellulärem Pathogen) neutralisieren. Zudem kommt es ebenfalls zur Bildung von Gedächtniszellen, die im System zirkulieren und beim Auftreffen des spezifischen Pathogens sofort reaktiviert werden können und eine CD8⁺ T-Zell-medierte Immunantwort imitieren können. Ebenfalls bilden Th-Zellen Gedächtniszellen, die sehr lange im Blut zirkulieren und im Falle eines erneuten Antigenkontakts unmittelbar aktiv werden. Modifiziert nach Schijns *et al.* [75].

1.2 Immuncheckpoints

Immuncheckpoints sind Rezeptoren, die durch Bindung an ihren Liganden das homöostatische Gleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischer Immunantwort und somit die Selbst-Toleranz essentiell regulieren [76]. Zum Beispiel sorgt ein inhibitorischer Immuncheckpoint, bekannt als *programmed death-ligand 1* (PD-L1), der u.a. auf DCs exprimiert ist, für die Regulierung der T_{Regs} [77]. Wang *et al.* konnten *ex vivo* zeigen, dass DCs aus Versuchsmäusen, die eine genetische Deletion im PD-L1 Gen aufwiesen (PD-L1^{-/-} DCs), selbst in Anwesenheit von TGF- β nicht in der Lage waren, die Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Zellen in FOXP₃-exprimierende T_{Regs} zu induzieren. Des Weiteren konnte von der Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die *in vivo*-Blockade von PD-L1 ebenso die T_{Regs} Differenzierung verhindert [78]. Zudem führt die Bindung des *programmed cell death protein 1* (PD-1), welches membranär von T-Zellen exprimiert wird, an den PD-L1 Rezeptor zur gravierenden Inhibition der Immunantwort. Denn die PD-1/PD-L1 Signalgebung führt zur Aktivierung der Phosphatase SHP-2, die sich nahe des TZR und des kostimulierenden CD28 Moleküls befindet. Dies resultiert wiederum in der Dephosphorylierung von CD3, ZAP70 und der Protein Kinase C θ , dass die Inhibition der T-Zell Aktivierung, Proliferation und Zytokinproduktion, – APOPTOSE – von CTLs und eventuell sogar aktivierten T-Zellen einleitet [79, 80]. Ein weiterer Immuncheckpoint, der auf der Membranoberfläche aktivierter CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen exprimiert wird, ist *lymphocyte activation gene-3* (LAG-3). Dieser bindet an MHC-II in etwa viermal stärker als CD4 und initiiert die „*Exhaustion*“ der T-Zelle [81-83]. Dies ist ein Status der T-Zelle, der aus einer dauerhaften Antigenpräsentation, beispielsweise wie im Rahmen einer chronischen Infektion resultiert [84]. T-Zell-„*Exhaustion*“ ist assoziiert mit der fehlenden Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie z.B. IFN- γ , TNF und IL-2, der deutlichen Einschränkung des Proliferationspotenzials und einer erhöhten Expression von Immuncheckpoints auf der Membranoberfläche [85].

1.3 Maligne Tumorerkrankungen – Entstehung und Progression

Während des 19. Jahrhunderts wurde die Reproduktion einer Zelle durch das Phänomen der Zellteilung nachgewiesen, wodurch die Zelltheorie begründet wurde [86]. Infolgedessen wurde die mitotische Zellteilung und die „zytoskelettale Nanomaschinerie“ in den folgenden Dekaden gründlich erforscht [87]. Heutzutage sind viele der Regulationsmechanismen des Zellzyklus wie zum Beispiel Onkogene und Tumorsuppressorgene, die essentiell zur Zellteilung, -regulation und -differenzierung beitragen, erforscht [88, 89]. Nichtsdestotrotz können Genmutationen beispielsweise durch Radiation, Chemikalien, Virusinduktion oder oxidativer Stress zu einer Fehlregulation des Zellzyklus führen und somit zur Entstehung eines unkontrollierten Zellwachstums (Tumor) beitragen [90-93]. Zwei gut erforschte Beispiele für Tumorsuppressoren sind p53 und Retinoblastom (Rb), die bei Aktivierung und anschließender Proteinbiosynthese zur Produktion der Proteine (genauer: Transkriptionsfaktoren) **p53 und Rb**, führen [94-96]. In intakten, gesunden Zellen sind diese kaum messbar. Kommt es jedoch in der Zelle zu einer Fehlfunktion des Zellzyklus z.B. durch einen DNA Schaden (Mutation), einer Hypoxie oder einer Onkogen-Aktivierung, wird nun p53 in größerer Menge produziert und aktiviert somit indirekt Rb. Je nach Dauer und Intensität der Akkumulation von p53 resultiert dies in der Aktivierung von DNA Reparaturmechanismen, dem Stopp des Zellzyklus oder der Apoptose der Zelle [97, 98]. Somit dienen diese zum Schutz des unkontrollierten Wachstums. Sind nun zudem diese Proteine selbst von einer Mutation betroffen und können deshalb ihre Funktion als Initiator von Präventionsmaßnahmen nicht durchführen, so kann die Zelle in einen Zustand des unkontrollierten Wachstums, das sogenannte Tumorstadium, gelangen. Zunächst ist dieser Zustand benigne (gutartig), kann allerdings unter Umständen in einen bösartigen (malignen) Status übergehen. Zur Definition dieses Zustands haben D. Hanahan und R.A. Weinberg bereits im Jahre 2000 die 6 Charakteristika von Krebs (engl.: *six hallmarks of cancer*) postuliert und in den darauffolgenden Jahren 2011 und 2022 präzisiert und dem aktuellen Forschungsstand angepasst [99-101]. Die originalen sechs Charakteristika von Krebs aus dem Jahr 2000, die die Komplexität der **mehrstufigen Karzinogenese** beschreiben, sind:

- 1) Endogene Aufrechterhaltung der Zellproliferation

- 2) Unempfindlichkeit gegenüber Inhibitoren des Wachstums
- 3) Umgehung des programmierten Zelltods (Apoptose)
- 4) Potenzial der unendlichen Replikation
- 5) Induktion einer persistenten Angiogenese
- 6) Metastasierung

Der komplexe Pfad von multiplen Mutationen endet folglich in der Aneignung dieser sechs Charakteristika und klassifiziert somit eine Krebszelle [99].

Im Jahr 2011 wurden die sechs „Basis“-Charakteristika von Krebs jeweils um 2 weitere ergänzt. Diese umfassen:

- 7) Dysregulation der zellulären Energiekontrolle

Während intakte Zellen Sauerstoff zur Glukoseprozessierung und Energiegewinnung nutzen (aerobe Glykolyse), können maligne Zellen zur anaeroben Glykolyse wechseln (**Warburg Effekt**).

- 8) Immune-„Escape“

Da Immunzellen eine essentielle Rolle in der Bekämpfung von malignen Zellen spielen, versuchen diese der Immunabwehr zu entgehen [100]. Dies geschieht unter anderem durch die Ausprägung von Immuncheckpoints auf der Oberflächenmembran von Tumorzellen. Wie oben beschrieben (**1.2 Immuncheckpoints**), induziert die membranäre Expression von PD-L1 auf den Tumorzellen und die anschließende Bindung an den PD-1 Rezeptor auf T-Zellen die Apoptose der T-Zelle [102, 103].

In etwa eine Dekade später fügten Hanahan und Weinberg zwei weitere Charakteristika für das maligne Wachstum hinzu:

- 9) Tumorwachstum-stimulierende Entzündung

Chronische Entzündungen können bedingt durch die Anwesenheit von Entzündungsmarkern wie z.B. Reaktive Sauerstoffspezies (engl.: *reactive oxygen species*; ROS) zusätzlich Mutationen begünstigen [104]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass T_{Regs} unter lang-anhaltender Entzündung ihre Fähigkeit verlieren IL-10 zu produzieren und somit nicht mehr in der Lage sind, die Entzündung zu kontrollieren [105].

10) Genominstabilität und Mutation

Zudem führt die Instabilität des Genoms zu einer erhöhten Frequenz von Mutationen und begünstigt somit das maligne Wachstum. Ein erhöhtes Vorkommen an DNA Schäden sind die Ursache für diese Instabilität des Genoms [100] (**Abbildung 3A**).

Im Jahr 2022 wurden von Hanahan und Weinberg vier weitere Charakteristika einer Tumorzelle postuliert (**Abbildung 3B**):

- 11) Phänotypische Plastizität
- 12) Nicht-mutagene epigenetische Umprogrammierung
- 13) Polymorphes Mikrobiom
- 14) Tumorseneszenz [106]

Die **zelluläre Seneszenz** ist zunächst in humanen Fibroblasten beschrieben worden. Diese verfügten nur über ein geringes Replikationspotenzial und fielen infolgedessen in einen irreversiblen Zellarrest [107]. Infolgedessen konnte Seneszenz als Antwort auf zellulären Stress infolge der Aktivierung von Onkogenen nachgewiesen werden [108]. In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass sich zelluläre Seneszenz durch einen stabilen Zellzyklus-Arrest als Antwort auf verschiedene Stressreaktionen, welche durch Einflussfaktoren des *tumor microenvironments* (TME) (z.B. DNA Schaden, Nährstoffmangel) induziert, äußert [109]. Somit zeigen viele Publikationen den protektiven Effekt einer seneszenten Zelle und dessen inhibierende Wirkung auf die Tumorprogression auf, insbesondere die Therapie-induzierte Seneszenz [110-113]. Nichtsdestotrotz, gibt es kontroverse Studien, die zeigen, dass Therapie-induzierte seneszente Zellen das Tumorwachstum auch fördern kann [114, 115]. Baker *et. al.* konnte in transgenen Versuchsmäusen darlegen, dass das Fehlen von p16^{Ink4a}-positiven Zellen, welches als typischer Marker seneszenten Zellen gilt, in eine verspätete Tumorgenese und altersbedingte Funktionseinschränkung verschiedener Organe resultiert [116].

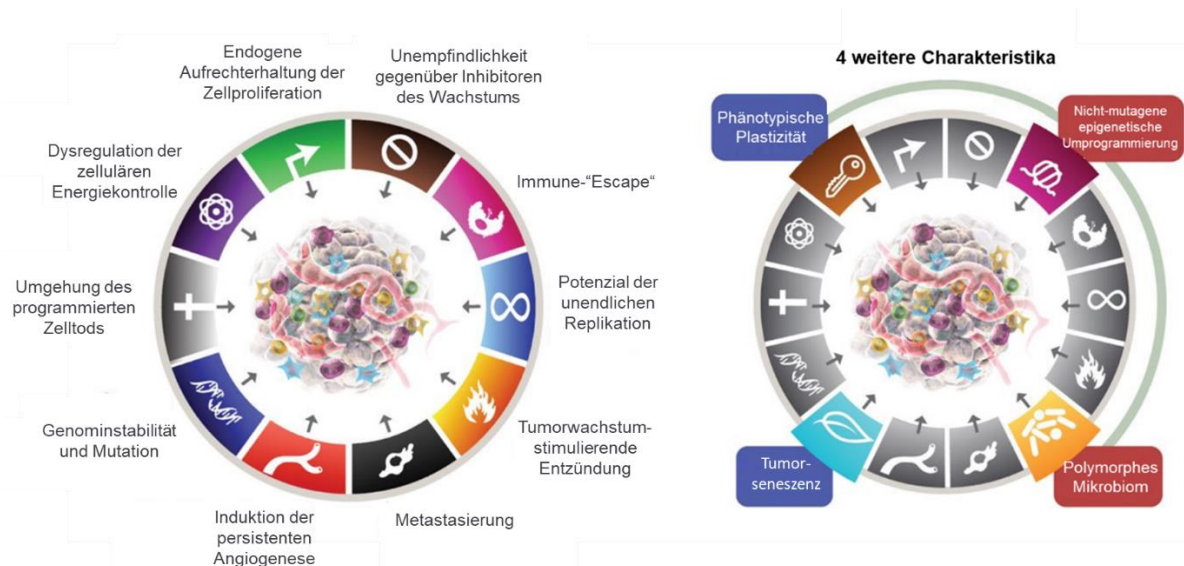


Abbildung 3: Schematische Illustration der Charakteristika der Entstehung und Progression von malignen Tumoren nach D. Hanahan und R. Weinberg. Die sechs Charakteristika Endogene Aufrechterhaltung der Zellproliferation, Unempfindlichkeit gegenüber Inhibitoren des Wachstums, *Immune-„Escape“*, Potenzial der unendlichen Replikation, Induktion der persistenten Angiogenese wurden im Jahr 2000 in der Zeitschrift *“Cell“* als *“The Hallmarks of Cancer“* introduziert [99]. 2011 folgten vier weitere Charakteristika: Tumorwachstum-stimulierende Entzündung, Genominstabilität und Mutation, Umgehung des programmierten Zelltods und die Dysregulation der zellulären Energiekontrolle, die wiederum in *“Cell“* als *“Hallmarks of Cancer: The Next Generation“* vorgestellt wurden. 2022 wurden 4 weitere Charakteristika vorgestellt (phänotypische Plastizität, nicht-mutagene epigenetische Umprogrammierung, Tumorseneszenz und polymorphes Mikrobiom), die insbesondere die Komplexität der Krebsprogression auf einer phänotypischen Ebene erklären [100]. Diese wurden im *“Cancer Discovery“* als *“Hallmarks of Cancer: New Dimensions“* vorgestellt [101]. Modifiziert nach Hanahan *et al.* [101]

1.4 Neuwertige Immuntherapien

Auf Basis der zuvor eruierten Mechanismen, die Tumorzellen für ihr Wachstum zu Nutze ziehen, wurden ebenso individuelle Therapien erforscht und begründet, die bereits klinisch zugelassen sind und nun in verschiedenen Studien als Kombinationstherapie zum Zwecke der Erhöhung der Therapieeffizienz geprüft werden. Diese werden im Folgenden genauer erörtert.

1.4.1 Adoptiver T-Zelltransfer

Das Prinzip des adoptiven T-Zelltransfers erschloss sich primär aus der Beobachtung, dass Tumor-infiltrierende Lymphozyten aus malignen Melanomen (Primärtumor) von Patienten isoliert und mit autologen Melanom-Zellen des Patienten kokultiviert wurden und es hierbei zur Melanomzelllyse durch die Tumor-infiltrierenden Lymphozyten kam [117, 118]. Bruggen *et al.* gelangen 1991 erstmals die Klonierung des Antigens MZ2-E aus einer humanen Melanom-Zelllinie. MZ2-E wird auf den MHC-I von Melanom-Zelllinien präsentiert und wird von spezifischen CTLs erkannt [119]. In den darauffolgenden Jahren wurden immer wieder neue Antigene aus Primärtumoren von Patienten isoliert und kloniert [120, 121]. Diese Methodik konnte als Basis für die anschließende Klonierung von T-Zellen, isoliert aus dem Tumorgewebe oder aus peripherem Blut, verwendet werden. Nach der Isolation der Tumor-infiltrierenden T-Zellen werden diese hierbei *in vitro* kloniert, vermehrt und wieder in denselben Patienten injiziert (**Abbildung 4A**). In metastasierten Melanompatienten konnte in einer Phase I/II Studie die Effizienz dieses Therapieansatzes belegt werden. Drei von 25 Patienten mit metastasiertem Melanom zeigten eine vollständige Tumorregression und sieben ein partielles Ansprechen auf die Therapie (engl.: *objective response rate*¹: ORR 42 %) [122]. Die ORR gibt die Proportion von Patienten mit einer Tumorgrößenreduktion einer vordefinierten Größe innerhalb eines vordefinierten Zeitraums an [123]. In anderen Studien mit ähnlichem Therapieansatz konnte eine ähnliche ORR bestätigt werden (ORR: 42 – 55 %; n = 20 - 43) [124-127]. T-Zellen, die aus peripherem Blut gewonnen werden, können auch genetisch modifiziert werden, sodass der TZR spezifisch ein Antigen auf der Tumoroberfläche (Tumor-assoziiertes Antigen; TAA) erkennt und somit selektiv eine Immunantwort gegen die Tumorzelle ausbildet (**Abbildung 4B**). In einer klinischen Studie wurden genetisch modifizierte T-Zellen mit einem TAA-spezifischen TZR den Patienten mittels intravenöser Infusion verabreicht. Die ORR von klinischen Studien bei Patienten mit metastasiertem malignem Melanom oder Synovialsarkom lag unter der Behandlung mittels TAA-spezifischen T-Zellen bei 13 – 90 %; (n = 15 – 20) [128-131].

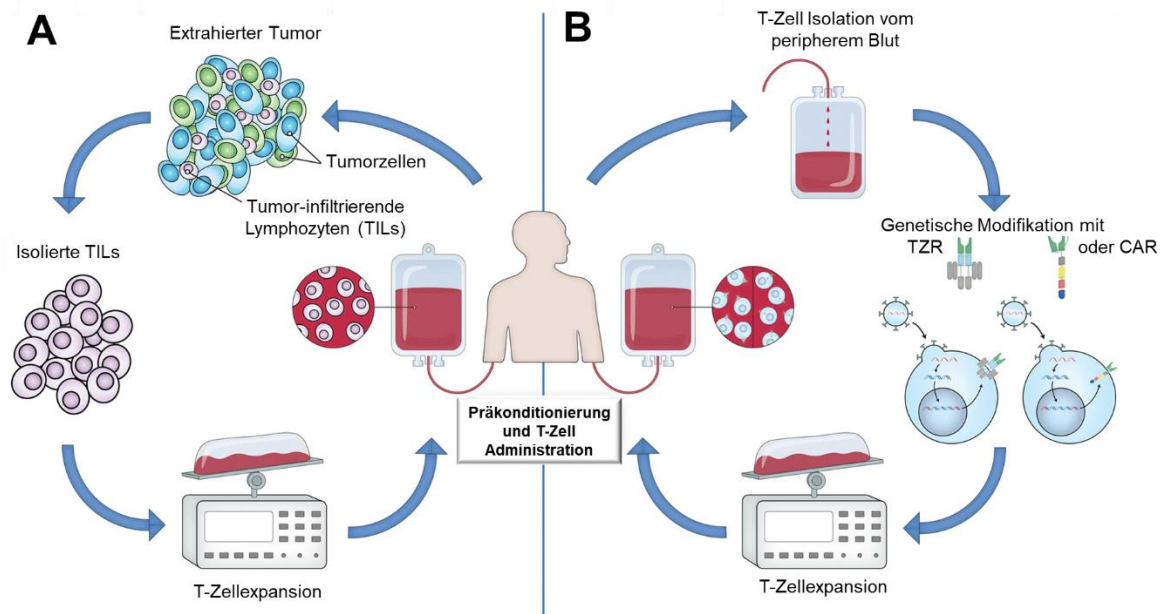


Abbildung 4: Schematische Illustration der Herstellung von T-Zellen für den adoptiven T-Zelltransfer. (A) Aus dem Primärtumor des Patienten werden die sich darin befindlichen Tumorinfiltrierenden T-Zellen (TILs) extrahiert und isoliert. Mittels *in vitro* T-Zellkulturansatz werden die TILs expandiert, sodass dem präkonditionierten Patienten (im Rahmen einer vorangehenden Cyclophosphamid oder Fludarabine Behandlung) genügend TAA-spezifische T-Zellen verabreicht werden können. **(B)** Eine andere Methode ist die Isolation der T-Zellen aus dem peripheren Blut des Patienten und die anschließende genetische Modifikation des T-Zell-Rezeptors der T-Zellen oder das Hinzufügen eines chimären Antigenrezeptors (*chimeric antigen receptor: CAR T-cell*). Wiederum werden die TAA-spezifischen T-Zellen *in vitro* kultiviert und expandiert und letztendlich in die präkonditionierten Patienten injiziert. Modifiziert nach Met *et al.* [132].

1.4.2 Immuncheckpoint-Inhibitoren

Im Jahr 2018 wurden die Wissenschaftler James Allison und Tasuku Honjo mit dem Nobelpreis für Physiologie oder Medizin für ihre Entdeckung der Immuncheckpoints gekürt. Honjo *et al.* konnten 1992 nachweisen, dass die Expression von PD-1 eine immunsupprimierende Wirkung induziert [133]. Auf dieser Basis konnte Allison *et al.* in einem transgenen Mausmodell, in dem die Versuchsmäuse in einem Alter von 8 – 12 Wochen invasive und metastasierende Adenokarzinome entwickeln, zeigen, dass monoklonale AK (AK), die den Immuncheckpoint *cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4* (CTLA-4) blockieren (anti-CTLA-4 AK), in der Lage sind eine signifikante Tumolvolumenreduktion zu induzieren; dies war letztendlich die Geburtsstunde der

Immuncheckpoint-Inhibitoren [134]. CTLA-4 ist auf T-Zellen exprimiert und konkurriert mit CD28 um die Liganden CD80 und CD86 (**Signal 2**). Im Rahmen der CTLA-4:CD80/CD86 Bindung wird somit die Kostimulation, die zur T-Zellaktivierung benötigt wird, blockiert und es kommt nicht zur Aktivierung und Proliferation der T-Zelle [135, 136]. Mittels anti-CTLA-4 AK kann die Bindung CTLA-4:CD80/CD86 aufgehoben werden und somit die T-Zellaktivierung durch die CTLA-4:CD80/CD86 Bindung ermöglichen (**Abbildung 5**). Somit wurden 2011 die anti-CTLA-4 AK mit dem Namen Ipilimumab von der FDA zur Behandlung des metastasierenden Melanoms genehmigt [137]. Des Weiteren wurden andere Immuncheckpoint-Inhibitoren präklinisch und klinisch evaluiert. Nach langanhaltender T-Zellaktivierung exprimiert die antigenspezifische T-Zelle auf der Membranoberfläche PD-1, das mit PD-L1 (auf der Membranoberfläche von beispielsweise Tumorzellen) bindet und ein inhibierendes Signal in der T-Zelle auslöst. Eine dauerhafte PD-1:PD-L1 Interaktion führt zur T-Zell-„Exhaustion“. Die Blockade von PD-L1, wie dem in **1.2 Immuncheckpoints** beschriebenen Mechanismus zu entnehmen ist, verhindert die PD-1:PD-L1 Interaktion und somit auch den dauerhaften Zustand der T-Zell-Ermüdung, in dem diese die T-Zell-Effektor-Funktionen wiederherstellen und deren Reaktivität deutlich steigern (**Abbildung 5**). Dies konnte durch die metabolische Reprogrammierung und epigenetischen Veränderungen der ermüdeten T-Zelle nach Therapie bewerkstelligt werden [138, 139]. Auf dieser Basis konnten die PD-L1 Immuncheckpoint-inhibitorischen AK bereits in die Klinik zugelassen werden: Unter dem Handelsnamen Atezolizumab, zur Behandlung vom Nicht-kleinzelligem-Lungenkrebs wurde im Vergleich zum bereits etablierten Arzneimittel Docetaxel eine erhöhte Überlebensrate von 4,2 Monaten erwiesen [140]. Eine weitere klinische Studie mit 451 Trippel-negativen Brustkrebs (TNB) Patienten ergab, dass das mediane Überleben unter Medikation von Atezolizumab und Paclitaxel (einem zugelassenen Arzneimittel zur Behandlung von TNB) 25,0 Monate betrug und somit im Vergleich zum Placebo und Paclitaxel (15,5 Monate) signifikant gesteigert werden konnte. Dies war jedoch nur in Patienten mit PD-L1-positiven Tumoren der Fall und in der Gesamtgruppe geringer. Somit spielt die basale PD-L1 Expression des Tumors eine wichtige Rolle bei der Therapieeffizienz von PD-L1 AK [141].

Ein weiteres zugelassenes Arzneimittel, das auf PD-L1 AK basiert, ist Durvalumab. Durvalumab wird in der Klinik zur Behandlung von Lungenkrebs. Besonders empfohlen wurde es dem Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen für Personen mit fortgeschrittenem kleinzelligem Lungenkrebs mit der Mutation PD-L1 und für Personen mit lokal fortgeschrittenem nicht kleinzelligem Lungenkrebs [142]. Avelumab, das dritte PD-L1 AK Anti-Krebs-Arzneimittel, wurde im Januar 2021 zur Behandlung eines metastasierten Urotheltumors zugelassen [143]. Da LAG-3 u.a. die CD4⁺ T-Zell-Aktivierung inhibiert und die CD8⁺ T-Zell-Effektorfunktion dämpft, sorgt der Immuncheckpoint-Inhibitor gegen LAG-3 für eine Verstärkung der T-Zell-vermittelten Immunantwort [144-146]. Zurzeit wird die Therapieeffizienz von Relatlimab (LAG-3 AK) in verschiedenen malignen soliden Tumorerkrankungen (z.B. Melanom, Kleinzelliges Lungenkarzinom) in Phase 2 Studien überprüft [147, 148].

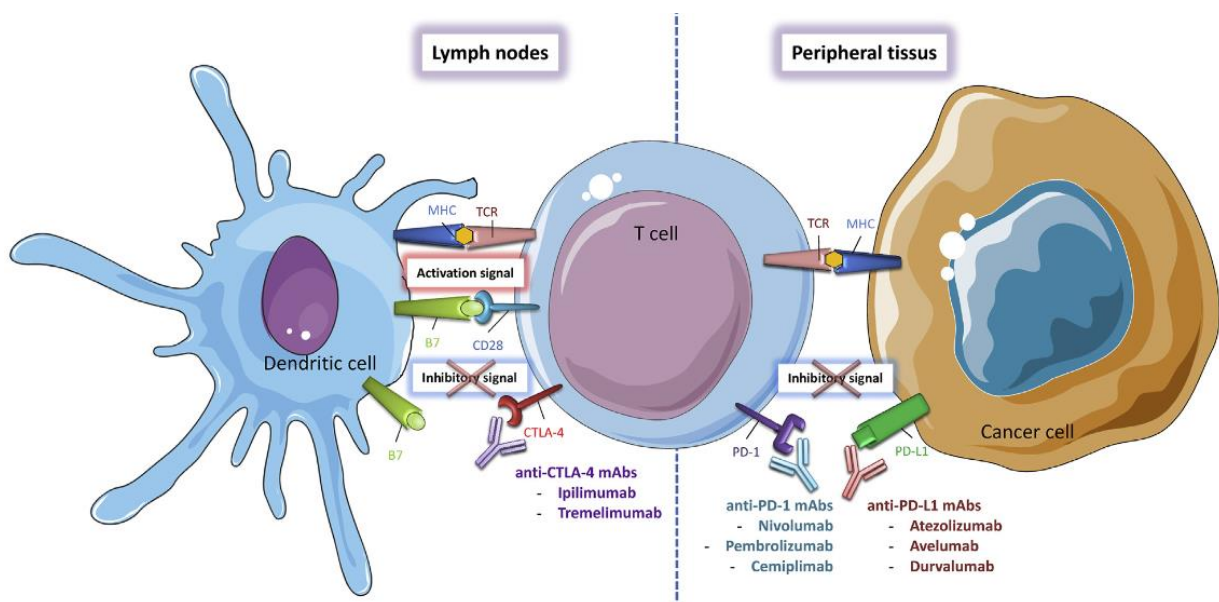


Abbildung 5: Funktionsmechanismus der anti-CTLA-4, anti-PD-1 und anti-PD-L1 AK. Zunächst erkennt die antigenspezifische T-Zelle über ihren TZR das tumorspezifische Antigen, das über den MHC auf den APC (beispielsweise DC oder Tumorzelle) präsentiert wird (Signal 1). Daraufhin führt die Expression des kostimulatorischen Moleküls B7-1 (CD80) oder B7-2 (CD86) und deren Bindung an CD28 zur Aktivierung der T-Zelle (Signal 2). Infolgedessen wird CTLA-4 auf der Membranoberfläche der T-Zelle exprimiert. Da die Affinität von CTLA-4 zu B7-1 oder B7-2 höher als CD28 ist, wird diese Bindung (Signal 2) priorisiert und vermittelt der T-Zelle ein inhibitorisches Signal. Anti-CTLA-4 AK hemmen dieses inhibitorische Signal durch die Bindung mit CTLA-4. Unter einer anhaltenden T-Zell-Aktivierung exprimiert die aktivierte T-Zelle auf dessen Membranoberfläche PD-1, das an PD-L1 (u.a.

membranär exprimiert von Tumorzelle) bindet. Diese Bindung induziert ein inhibierendes Signal in der T-Zelle und endet in der T-Zell-Apoptose. Anti-PD-1 und anti-PD-L1 AK blockieren diese Bindung und induzieren somit die Reaktivierung antigenspezifischer T-Zellen. Modifiziert nach Desnoyer *et al.* [149].

1.4.3 Onkolytische Virustherapie

Eine relativ neue Strategie der Tumorthherapie basiert auf onkolytischen Viren, die selektiv Tumorzellen infizieren, sich in diesen replizieren und die Tumorzellen lysieren und folglich neue Tumorzellen befallen. Das genetisch modifizierte Herpes Simplex Virus Typ 1 (HSV-1) Talimogen laherparepvec (T-VEC), produziert von dem US-Unternehmen Amgen (Thousand Oaks, Kalifornien, Vereinigte Staaten), wurde im Jahr 2015 als erste und bisher einzige onkolytische Virustherapie von der FDA und EMA zur klinischen Therapie des metastasierenden malignen Melanoms zugelassen. Die Viren wurden mithilfe gentechnischer Verfahren so modifiziert, dass sie selektiv Tumorzellen infizieren und eine spezifische adaptive Immunantwort hervorrufen können [150, 151]. Diese wird mittels zweier genetischer Deletionen ermöglicht:

A) Infected cell protein 34.5 (ICP34.5)-Gen

B) Infected cell protein 47 (ICP47)-Gen

Das Fehlen vom ICP34.5-Gen zerstört die Neurovirulenz und virale Abwehrmechanismen des HSV-1, wodurch die exponentielle Replikation des Virus in normalen Zellen ausbleibt. Tumorzellen dagegen verlieren meist die Fähigkeit sich gegen die Vermehrung des Virus zu wehren (engl.: *Interferon-induced PKR-mediated block*) und das Virus infiziert, repliziert und lysiert die Tumorzelle selektiv. Das ICP47 Protein induziert eine Inhibition des Antigenpeptid-Transporters (TAP), das für die Translokation von Peptiden durch das Endoplasmatische Retikulum (ER) sorgt und somit zur Herabregulation des MHC-I führt. Wird das (ICP47)-Gen durch gentechnische Verfahren deletiert, erhöht sich die MHC-I Expression und somit auch die anti-tumorale CTLs-vermittelte Immunabwehr. Somit wird die selektive Abwehr gegen virus-infizierte Krebszellen initiiert, während normale Zellen unberührt bleiben [152]. Diese Mechanismen gewährleisten eine selektive Infektion von Krebszellen mit dem T-VEC und zeigten sich in den Phase-I und Phase-II-Studien als sehr sicher [153]. Des Weiteren verfügt T-VEC über eine genetische Insertion – beide Kopien des Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden

Faktor (engl.: *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF)-Gens wurden in das virale Erbgut eingefügt – wodurch die Aktivierung und Proliferation von DCs stimuliert und somit die Immunabwehr selektiv gegen Tumorzellen gesteigert wird. Hierbei wird bei der humanen Version des Virus (T-VEC) das humane GM-CSF und bei der murinen Version (OncoVEX) die murine Variante des Gens eingesetzt. Zurzeit laufen mehrere Studien, die unter anderem die Therapieeffizienz von einer kombinierten Viro-Immuntherapie mit T-VEC und ICI evaluieren. Eine bereits abgeschlossene Phase-2-Studie bei der Patienten mit metastasierendem Sarkom mit der Kombination aus Pembrolizumab (i.v.; 200 mg) und T-VEC (intratumoralen (i.t.); 10^6 plaque forming units (PFU)) behandelt wurden, zeigte in der histologischen Auswertung eine erhöhte anti-tumorale Immunantwort [154].

1.5 Experimentelle Tumormausmodelle

Im folgenden Abschnitt werden die experimentellen Tumormausmodelle aufgeführt, die im Rahmen dieser Dissertationsarbeit aufgeführten Studien verwendet wurden.

1.5.1 Endogenes RIP1-Tag2 Inselzellkarzinommodell

Das RIP1-Tag2 Inselzellkarzinommodell wurde 1985 von Douglas Hanahan charakterisiert [155]. In diesem Tumormodell kontrolliert der Ratten-Insulin-Promotor (RIP1) ein Onkogen des Simian-Virus 40 (SV40) wodurch das „*Large T-Antigen*“ (Tag) in allen β -Zellen des Pankreas exprimiert wird [156]. Dieser Mechanismus führt zur Inhibition der Tumorsuppressor-Proteine p53 und Rb und letztendlich zur malignen Transformation und mehrstufigen Karzinogenese der Inselzellen (Synonym: Langerhans'sche Inseln; illustriert in **Abbildung 6**). Ab der 5. Lebenswoche kommt es in den Pankreata der RIP1-Tag2 Mäuse zur Entwicklung von hyperplastischen Inseln und ab der achten Lebenswoche zum „*angiogenic switch*“ und infolgedessen zur vermehrten Angiogenese und Nährstoffversorgung der hyperplastischen Inseln. Ab der 10. Lebenswoche entwickeln sich kleine solide Tumore und spätestens ab der Lebenswoche 12-14 invasive Inselzellkarzinomen, welche auch lymphogen in die naheliegenden Organe metastasieren können [157-159]. Aufgrund der Vermehrung der insulinproduzierenden β -Zellen kommt es konsequenterweise zur erhöhten

Insulinproduktion und infolgedessen zur Verringerung der Blutglukosewerte. Spätestens im Alter von 14-15 Wochen versterben die RIP1-Tag2 Mäuse an Hypoglykämie. Demzufolge ist der Blutglukosewert ein indirekter Parameter für das Tumorumfolumen. Umso niedriger der Blutglukosewert umso größer das Tumorumfolumen [160] (**Abbildung 6**).

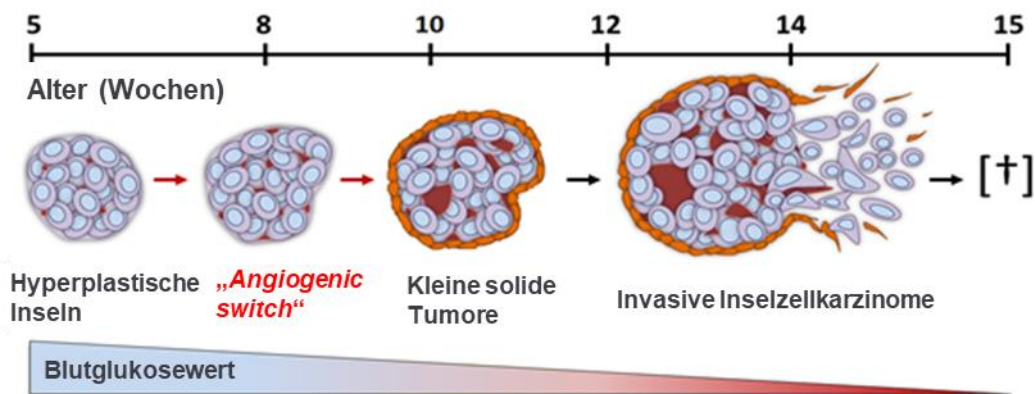


Abbildung 6: Maligne Transformation im RIP1-Tag2 Tumormodell. Ab der 5. Lebenswoche entwickeln RIP1-Tag2 Mäuse in deren Pankreata hyperplastische Inselzellen. Infolge des „*angiogenic switch*“ in der 8. Lebenswoche kommt es zur Induktion der Angiogenese und ab der 10. Lebenswoche zur Entwicklung kleiner solider Tumore und im weiteren Verlauf zu invasiven Inselzellkarzinomen. Durch die deutliche Zunahme der β -Zellen erhöht sich die Insulinproduktion und Insulinfreisetzung, sodass die RIP1-Tag2 Mäuse mit einem Alter von 14-15 Lebenswochen an Hypoglykämie sterben. Adaptiert von Bergers *et al.* 1999 [161] und modifiziert von Schörg, 2021, S. 48.

Anhand ihrer Größe lassen sich die Inselzellkarzinome sehr gut mittels Magnetresonanztomographie (MRT) darstellen (**Abbildung 7**).

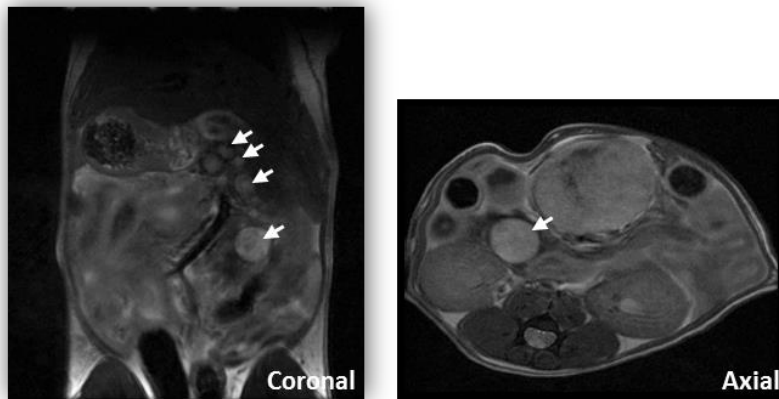


Abbildung 7: Magnetresonanztomographische (MRT) Aufnahme einer RIP1-Tag2 Maus in der 12. Lebenswoche. Koronale (links) und axiale (rechts) MRT Darstellung des unteren Corpus mit markierten (weiße Pfeile) RIP1-Tag2 Inselzellkarzinomen. MRT Aufnahme wurde eigens am 7 Tesla MRT Scanner erworben.

RIP1-Tag2 Versuchsmäuse werden aufgrund der Homologie ihrer Tumorentwicklung und der Ähnlichkeit zur Tumorprogression im Menschen oftmals zu Therapiestudien mit translationalen Charakter eingesetzt.

Zum Beispiel wurde von der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Röcken (Universitätshautklinik Tübingen) gezeigt, dass die mehrmalige Applikation von 10^7 IFN- γ produzierenden Tumorantigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen (Tag-T_H1) nach initialer Depletion der Immunzellen mittels 2 Gy Ganzkörperbestrahlung das Überleben von RIP1-Tag2 Versuchsmäusen signifikant von 14 auf 30 Lebenswochen verlängern lässt [162]. Es konnte hierbei gezeigt werden, dass von aktivierten Tag-T_H1 Zellen sezernierten Zytokinen IFN- γ und TNF eine zentrale Bedeutung durch die Induktion der Tumorseneszenz zukommt. TNF-Rezeptor-1-defiziente RIP1-Tag2 Versuchsmäuse, die mit der Tag-T_H1-basierten Therapie behandelt wurden, zeigten sogar unter zusätzlicher Applikation von anti-IFN- γ AK eine Zunahme des Tumorwachstums [162, 163].

1.5.2 Subkutanes Ovalbumin (OVA)-exprimierendes B16 Melanom und MC38 Kolon Adenokarzinom-Tumormodell

Eiklar besteht zu 54 % aus Ovalbumin (OVA) [164]. Trotz der fehlenden Protease-Inhibitor-Aktivität gehört OVA zur Serpin Familie [165]. Mittlerweile hat sich OVA als artifizielles TAA in verschiedenen experimentellen Tumormodellen bewährt, wie zum Beispiel im B16 Melanom (OVA-B16), MC38 Kolon Adenokarzinom (OVA-MC38) oder auch im PyMT Brustkrebs (OVA-PyMT), die u.a. in präklinischen Studien zur Evaluation der Therapieeffizienz zu Nutzen gezogen werden [166-168]. Hierbei werden transgene CD8⁺ T-Zellen aus OT-I Spendermäusen *in vitro* OVA-spezifisch polarisiert und kultiviert. Unter der Gabe von IL-2, CPG Oligonukleotid ODN 1668 (ein TLR9 Agonist), anti-IL-4 AK und dem OVA-Peptid (Ova 257-264, SIINFEKL) differenzieren naive OT-I Zellen zu CTLs (**Tc1 Zellen**). Wie unter 1.1.2 bereits erwähnt, zeichnet sich die CTL durch einen pro-inflammatorischen Phänotypen mit der Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine, Perforine und Granzyme aus. Werden die OT-I Tc1 Zellen in eine Versuchsmaus mit OVA-exprimierenden Tumorzellen appliziert, so erkennen diese Zellen das OVA Peptid, das auf der Membranoberfläche des Tumors mittels MHC-I präsentiert wird [169]. Daraufhin werden die OT-I Tc1 Zellen aktiviert und sezernieren Perforine und Granzyme aus, wodurch die OVA-exprimierende Tumorzelle lysiert wird [170].

Es können auch transgene OVA-spezifische CD4⁺ Th1 Zellen (OVA-T_{H1}) aus OT-II Spendermäusen *in vitro* kultiviert werden. Auch hier wird durch die Gabe von IL-2, CPG Oligonukleotid ODN 1668, anti-IL-4 AK und dem OVA-Peptid 323-339 eine Differenzierung in einen pro-inflammatorischen Phänotypen, genauer in eine Th1 Zelle erreicht. Die OVA-T_{H1} Zellen können nun in eine Versuchsmaus mit OVA-exprimierenden Tumorzellen appliziert werden. Durch phagozytierende Zellen (z.B. APCs) wird das OVA Peptid aus OVA-exprimierenden Tumorzellen aufgenommen, anschließend lysosomal degradiert und mittels MHC-II präsentiert [171, 172]. Die applizierten OVA-T_{H1} Zellen erkennen das MHC-II präsentierte OVA-Peptid selektiv. Nach der Bildung des OVA- TZR/OVA-Peptid MHC-II Komplexes kommt es zur T-Zell-(Re-)Aktivierung und in dessen Folge zur Sezernierung von pro-inflammatorischen Zytokinen (IFN- γ und TNF) durch die OVA-T_{H1} Zellen. Diese Zytokine beeinträchtigen

die Differenzierung der Makrophagen und tragen zur Differenzierung endogener naiver antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen bei (Signal 3) [173].

Eine lokale Bestrahlungstherapie (1x 15 Gy oder 5x 3 Gy) von OVA-B16 tumortragenden Versuchsmäusen resultierte in einer erhöhten Anzahl von spezifischen IFN- γ -produzierenden T-Zellen im Vergleich zu den nicht-bestrahlten Kontrollmäusen [174]. Nichtsdestotrotz, konnte in diesem Mausmodell keine signifikante Tumorreduktion mittels OT-II Th1 Zellen erreicht werden [175, 176]. Ciraolo *et al.* konnten allerdings zeigen, dass die Applikation von OT-I CD8⁺ T-Zellen in PD-1- und LAG-3-defiziente OVA-B16 tumortragende Mäuse deren Überleben signifikant steigert [177].

Das (OVA-) MC38 Kolon Adenokarzinom-Modell ist als Immuncheckpoint-Inhibitor Therapie (PD-L1 AK)-sensitives Tumormodell bekannt. Die Therapie mit PD-L1 AK führt hierbei oftmals zur Reduktion des Tumorwachstums („*partial responder*“) [178, 179]. Aufgrund dessen wird dieses zur Erforschung der Immunreaktion im Rahmen einer Immuntherapie eingesetzt. So hat z.B. die Blockade von PD-L1 oder PD-1 mittels PD-L1 oder PD-1 AK das Tumolvolumen von MC38 tumortragenden Versuchsmäusen bis zum Versuchsende zur nahezu vollständigen Tumorregression geführt [180].

1.6 Bildgebende Verfahren

In der modernen Medizin wie auch in der präklinischen und klinischen Forschung werden eine Reihe von bildgebenden Verfahren zur Diagnostik und zur zwei- oder dreidimensionalen Visualisierung von Organen und Strukturen eingesetzt. Bildgebende Verfahren liefern nicht-invasive *in vivo* Informationen zur Morphologie, Anatomie und teils auch zur Funktionalität des Körpers und unterscheiden sich in der Sensitivität und Spezifität. Die Bildgebungsmodalitäten, die im Rahmen dieser Dissertation eingesetzt wurden, werden im Folgenden eingeleitet.

Am 8. November 1895 entdeckte der deutsche Physiker Wilhelm Conrad Röntgen die nach ihm benannten Röntgen-Strahlen, wofür er 1901 mit dem ersten Nobelpreis für Physik gekürt wurde und somit den Grundstein für bildgebende Verfahren legte [181]. Seitdem wurden viele innovative Methoden zur Visualisierung der Anatomie und Pathophysiologie auf makroskopischer wie auch mikroskopischer Ebene entwickelt. Hierzu gehören unter anderem die MRT, die Positronen-Emissions-Tomographie

(PET) oder die Biolumineszenz-basierte Bildgebung. Jede dieser Bildgebungsmethoden basiert auf verschiedenen zugrunde liegenden Mechanismen mit individuellen Vor- und Nachteilen wie z.B. Penetrationstiefe oder Sensitivität. In **Abbildung 8** sind einige dieser unterschiedlichen Bildgebungsmethoden bezüglich Sensitivität und Penetrationstiefe illustrativ veranschaulicht. Das MRT zeichnet sich durch die große Eindringtiefe und niedrige Sensitivität aus, wohingegen die Biolumineszenz eine niedrigere Eindringtiefe und eine hohe Sensitivität hat. Somit werden je nach Fragestellung bestimmte Bildgebungsmethoden präferiert.

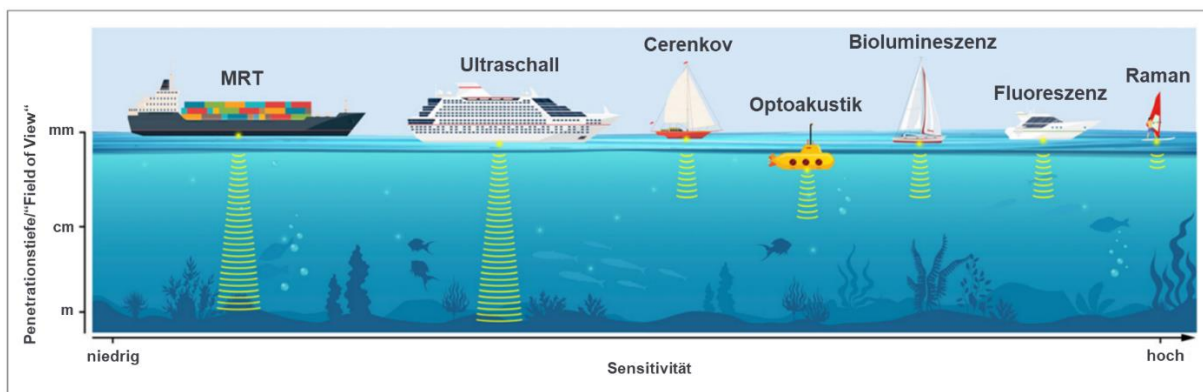
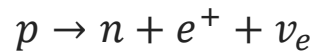


Abbildung 8: Schematische Darstellung verschiedener bildgebender Verfahren, repräsentiert als Wasserfahrzeug. Angegeben sind jeweils die Penetrationstiefe (Y-Achse) sowie die Sensitivität (X-Achse). Entnommen aus Pirovano *et. al.* (2020) [182].

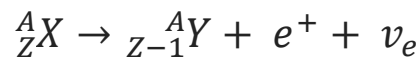
1.6.1 Positronen-Emissions-Tomographie (PET)

In dem Artikel „Die Quantum Theorie des Elektrons“ (1928) hat P. Dirac zum ersten Mal das Positron beschrieben. Dieses ist das Antiteilchen des Elektrons und weist im Gegensatz zu diesem eine positive elektrische Ladung auf [183]. Das Positron konnte 1933 auch von C. D. Anderson experimentell im Rahmen der Erforschung der kosmischen Strahlung nachgewiesen werden [184]. Die wohl bekannteste Anwendung dieser Entdeckung findet man heutzutage in der Nuklearmedizin als nicht-invasives bildgebendes Verfahren: Positronen-Emissions-Tomographie (PET). Die PET basiert auf dem Prinzip, dass bestimmte Isotope (Radionuklide) bei ihrem radioaktiven Zerfall ein Positron aussenden (β^+ -Zerfall). Das Radionuklid kann nun an ein funktionelles Molekül, beispielsweise an einen *minibody* gebunden werden. Diese Verbindung ist der sogenannte Tracer [185]. Die β^+ - Zerfallsgleichung [186]:



Beim β^+ -Zerfall wird das Proton (p) in ein Neutron (n), ein Positron (e^+) und ein Neutrino (ν_e) umgewandelt.

Somit lautet die Gleichung des β^+ -Zerfalls am Beispiel des Moleküls A_ZX [187]:



Der β^+ -Zerfall reduziert die Atomnummer Z des Moleküls A_ZX um eins und somit entsteht ein neues Molekül: ${}^A_{Z-1}Y$. [187]. Bei diesem Prozess gelangt das Positron ins umliegende Gewebe und sobald es auf ein Elektron trifft, führt dies dazu, dass sich beide Teilchen vereinen und sogenannte Vernichtungsstrahlung (Annihilationsstrahlung) in Form von zwei Gammaquanten von je 511 keV (in einem Winkel von nahezu 180° zueinander) freigesetzt wird. Diese Gammaquanten bewegen sich mit Lichtgeschwindigkeit durch das Gewebe und werden von speziellen PET Detektoren im PET-Scanner detektiert [188] (**Abbildung 9 I.**).

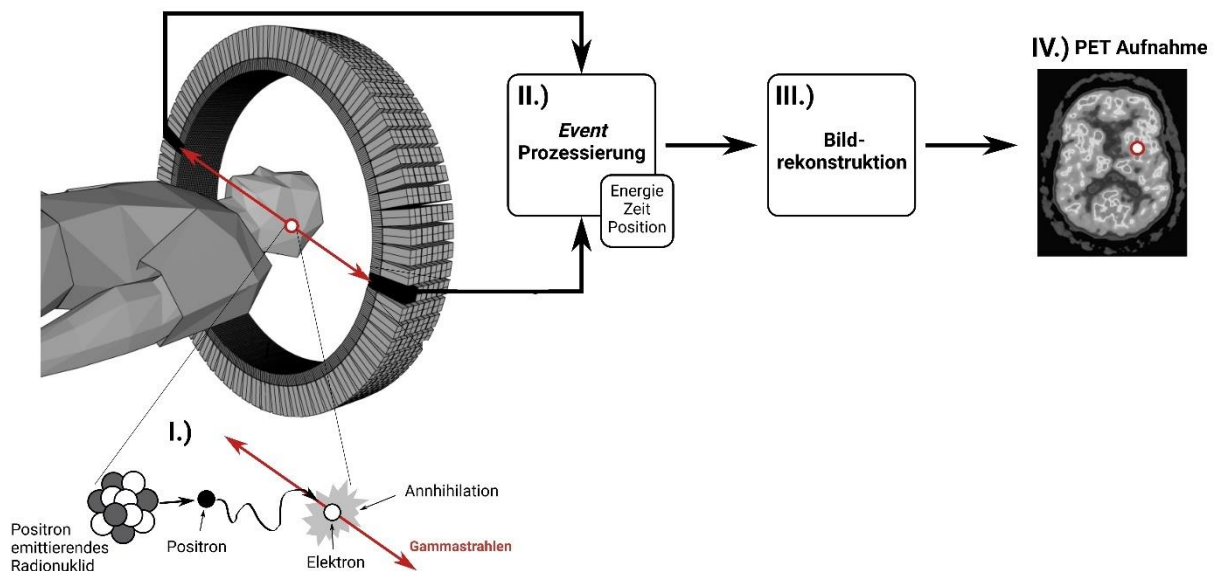


Abbildung 9: Vereinfachte Darstellung des Verarbeitungsschemas der PET zeigt die Erfassung der Gammastrahlung bis hin zur vollständigen Rekonstruktion der Aufnahme. Adaptiert von [189-191]

Diese PET Detektoren sind aus mehreren Szintillationskristallen aufgebaut. Sie bestehen aus dichtem Material wie Lutetiumoxyorthosilikat mit einer hohen Protonenanzahl, die eine hohe Interaktionswahrscheinlichkeit mit den emittierten Gammaquanten bieten [192]. Die Gammaquanten werden von den Szintillationskristallen gestoppt, wodurch die Kristalle angeregt werden. Die Detektion eines Gammaquantums wird auch als „*event*“ bezeichnet. Diese Anregung führt zur Freisetzung mehrerer Szintillationsphotonen mit einer niedrigeren Energie als der des ursprünglichen Gammaquants, die mittels spezieller Sensoren detektiert werden können. Beispiele für diese Sensoren sind „*Photomultiplier Tubes* (PMTs)“ oder auf Silizium basierende *Avalanche Photodiodes* oder *Silicium Photomultipliers*. Diese Sensoren wandeln die Photonen in ein elektrisches Signal um und verstärken dieses. Dieses Signal kann durch nachgeschaltete Verstärkerstufen weiter verstärkt und mittels integrierter Messelektronik gemessen werden [193].

Bei der Event-Prozessierung werden die Detektionszeitpunkte einzelner *events* auf Koinzidenzen analysiert. De facto wird überprüft, ob die einfallenden Gammaquanten innerhalb eines bestimmten Zeitfensters registriert werden (**Abbildung 9 II.**). So werden aus den singulären *events* koinzidente „Eventpaare“ gebildet, die mit einer hohen Wahrscheinlichkeit von ein und derselben Annihilation stammen. Diesen Prozess nennt man elektronische Kollimierung. Folgen zwei *events* innerhalb eines sehr engen Zeitfensters (z.B. 4 ns) aufeinander, werden diese als Eventpaar registriert [194]. Diesem Eventpaar kann eine „*line of response*“ (LOR) zugeordnet werden (Verbindungsline zwischen zwei Detektoren) (**Abbildung 9 I.**). Wie oben bereits erwähnt, treffen die bei der Annihilationsstrahlung freigesetzten Photonen in einem Winkel von nahezu 180° zueinander auf die PET Detektoren und werden von den beiden Detektoren, die entlang der zugehörigen LOR liegen, detektiert. Hierbei spricht man von der echten „*True*“ Koinzidenz (**Abbildung 10**). Es werden mehrere LORs und dementsprechend mehrere *events* benötigt um die Verteilung des Tracers zu bestimmen. Die LORs eines kompletten PET Scans werden in ein Sinogramm einsortiert, welches herangezogen wird, um mithilfe mathematischer Algorithmen ein tomographisches Bild zu rekonstruieren [192].

Bei der Event-Prozessierung ist es wichtig echte Koinzidenzen von anderen, beispielsweise einer „*Scatter*“ Koinzidenz oder einer „*Random*“ Koinzidenz zu

unterscheiden. Interagiert ein Photon mittels des Compton-Effekts mit einem Elektron, so wird das Photon von seiner ursprünglichen Flugbahn abgelenkt. Dieser als "Scatter" bezeichnete Prozess führt dazu, dass fälschlicherweise eine LOR angenommen wird, welche nicht den Ursprung der realen Annihilation abbildet. Dieser Messfehler muss in der Event-Prozessierung berücksichtigt werden. Da durch die Ablenkung des Photons das Photon an Energie verliert, trifft es mit einer geringeren Energie (< 511 keV) auf den Detektor im Vergleich zu einem Photon, das nicht abgelenkt wurde. Somit ist es möglich gestreute Events anhand ihrer gemessenen Energie zu identifizieren und sofern diese unterhalb eines Energiegrenzwerts sind, zu verwerfen [195].

Ein weiterer Messfehler passiert, wenn zwei Photonen mit einer Energie von 511 keV unabhängig voneinander, d.h. nicht von der gleichen Annihilation stammend, innerhalb des Koinzidenzzeitfensters auf die PET Detektoren treffen und somit als Eventpaar registriert werden („Random“ Koinzidenz, **Abbildung 10**). Dies kann geschehen, wenn eines der Photonen des ursprünglichen Photonenpaares (von der gleichen Annihilation) innerhalb des zu untersuchenden Objekts gestreut (*Compton Scatter*) oder gestoppt (Photoelektrischer Effekt, d.h. absorbiert bei vollständiger Übergabe seine Energie an ein Elektron) wurde.

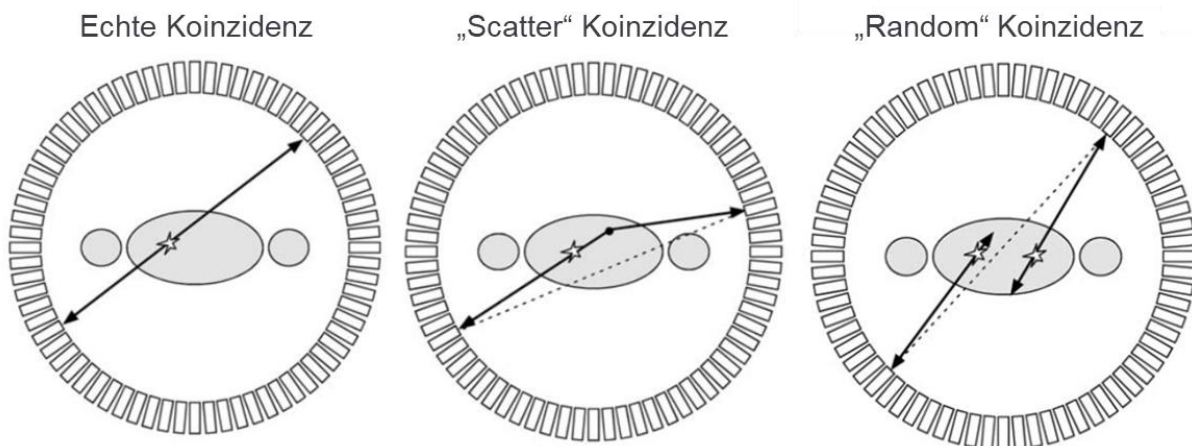


Abbildung 10: Schematische Illustration von drei Eventtypen, registriert von PET Detektoren. Adaptiert aus [190].

PET zeichnet sich aus durch eine sehr hohe Sensitivität, eine Quantifizierbarkeit und erlaubt longitudinale Messungen zur Bestimmung der Biodistribution des radioaktiven Tracers. Der Tracer ist das funktionelle Molekül, das am Radionuklid gebunden ist und

am Stoffwechsel im Körper teilnimmt und hierdurch funktionelle Informationen liefert [196]. Bei der Wahl des Radionuklids spielen Faktoren wie Halbwertszeit und Kinetik eine zentrale Rolle. Die Kinetik bestimmt die Dauer, die benötigt wird, bis die spezifische Bindung erreicht ist. Zudem haben verschiedene Radionuklide unterschiedliche Positronen-Reichweiten. Es gilt, je höher die Reichweiten, umso unpräziser die Lokalisierung des Annihilationsortes. Dies resultiert in einer verschlechterten örtlichen Auflösung. Somit werden je nach funktionellem Molekül Isotope mit verschiedenen Halbwertszeiten verwendet:

Radionuklid	Halbwertszeit	Tracer (Bsp.)	Anwendung	Mittlere β^+ -Reichweite in Wasser (mm)	Ref.
^{11}C	20,4 min	^{11}C -raclopride	Neurologie: Metabolismus	0,85	[197]
^{15}O	122,3 s	^{15}O -H ₂ O	Kardiologie: Perfusion	1,80	[198]
^{18}F	109,8 min	^{18}F -FDG*	Onkologie: Diagnostik	0,46	[199]
^{64}Cu	12,7 h	^{64}Cu -CD4-Nb1	Humaner CD4 ⁺ Nanobody	0,60	[200]

Tabelle 1: Auflistung verschiedener Radionuklide und deren mögliche Radiopharmaka (Tracer) für die PET. Je nach Halbwertszeit werden die Tracer in verschiedenen Anwendungsbereichen zur präklinischen sowie klinischen Forschung genutzt. *Abkürzung: 2-[(18)F]fluoro-2-deoxy-D-glucose, ^{18}F -Fluorodeoxyglucose (^{18}F -FDG). Mittlere Weglänge adaptiert aus [201, 202]

Der wohl am häufigsten verwendete Tracer in der onkologischen Diagnostik ist 2-[(18)F]fluoro-2-deoxy-D-glucose (^{18}F -FDG) [203, 204]. Die Glukose-Homöostase spielt eine zentrale Rolle im Metabolismus und dessen Dysregulation ist assoziiert mit verschiedenen Pathologien wie zum Beispiel dem Tumorwachstum. Ein fortgeschrittenes Tumorwachstum resultiert häufig in einer Metastasierung in umliegendes Gewebe (**1.3 Maligne Tumorerkrankungen – Entstehung und Progression**). Das Tumorwachstum erfordert viel Energie, die die Tumorzellen u.a. in Form von Glukose aufnehmen [205]. ^{18}F -FDG wird im menschlichen Körper besonders in den Orten mit einem hohen Glukoseverbrauch angesammelt und ist somit in der PET darstellbar [206]. Aus diesem Grund wird ^{18}F -FDG auch zur Untersuchung von pathologischen Veränderungen im Gehirn Metabolismus wie z.B. zur Erforschung der Alzheimer Erkrankung verwendet [207].

Zudem gibt es Tracer, die selektiv einen spezifischen Zelltypen darstellen können. Ein Beispiel hierfür ist 9-[4-[(18)F]fluoro-3-(hydroxymethyl)butyl]guanine (^{18}F -FHBG). ^{18}F -FHBG wird verwendet, um das HSV-1 Thymidin-Kinase (HSV-1-tk) Reportergen im lebenden Organismus darzustellen [208]. Mithilfe der Cre-induzierbaren Expression eines spezifischen Thymidin-Kinase Reportergens (sr39tk) in der Zielzelle konnten beliebige Zelltypen in der „PET-Reportermaus“ visualisiert werden [209]. Hierzu wurden vorerst R26 Knock-in Versuchsmäuse, die ein Transgen für Cre-induzierbare sr39tk (sr39tk Linie) Expression trugen, mit Versuchsmäusen verpaart, die Cre unter der Kontrolle eines spezifischen Promotors z.B. Pf4, CD4 oder Myh6 exprimierten „Cre Linie“. In den Nachkommen wird nun die sr39tk selektiv und ausschließlich in den Zielzellen (Pf4, CD4 oder Myh6) exprimiert (**Abbildung 11A**). Gelangt nun ^{18}F -FHBG in die Blutbahn, so wird dieses ebenfalls von den Zielzellen aufgenommen und durch die sr39tk phosphoryliert, wodurch es die Zielzelle nicht mehr verlassen kann und gefangen ist (**Abbildung 11B**). Somit können die Blutplättchen, CD4⁺ T-Zellen oder Kardiomyozyten mittels ^{18}F -FHBG-PET visualisiert werden [209].

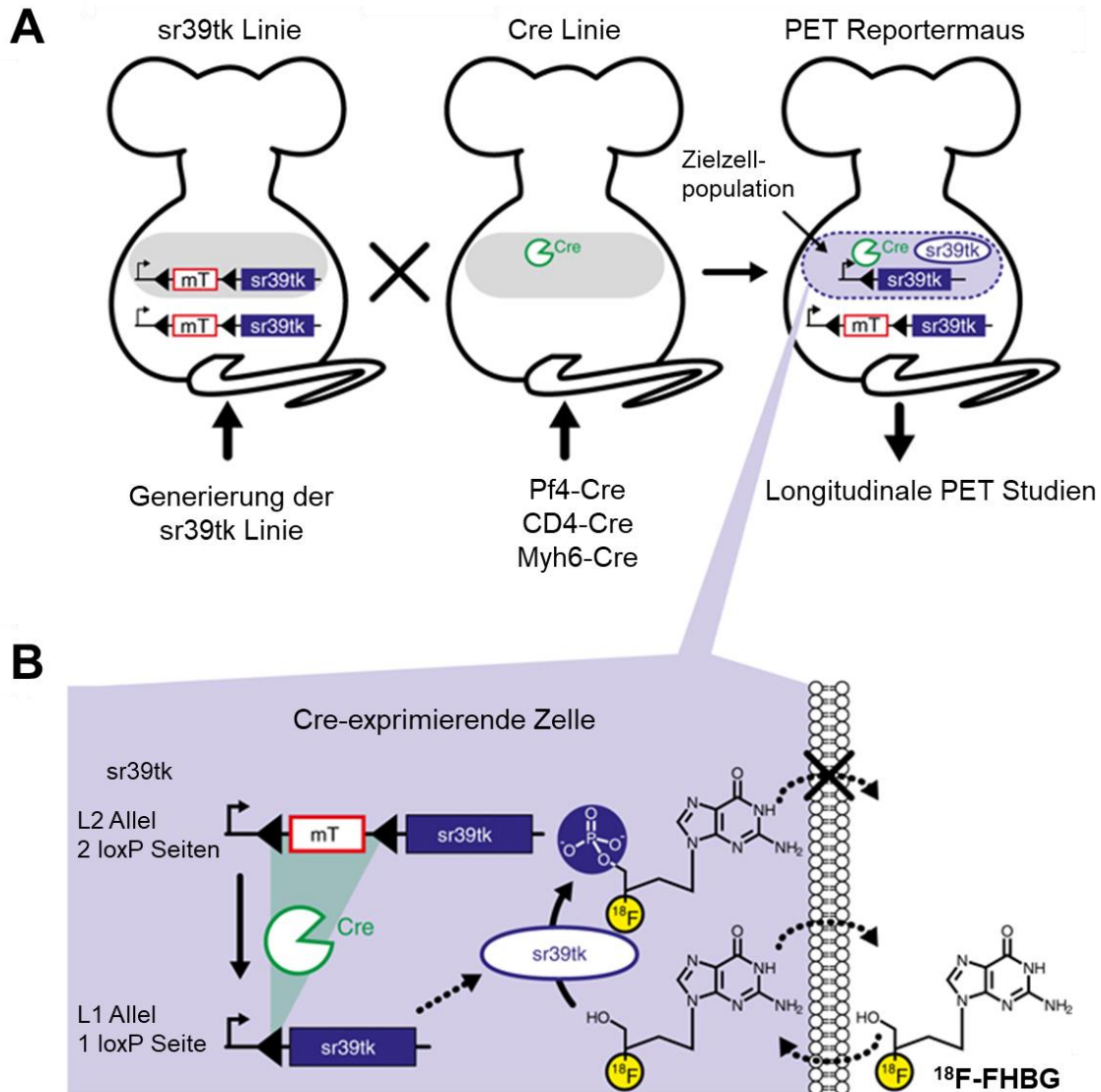


Abbildung 11: Schematische Illustration der Generierung von PET-Reportermausen zur Detektion von spezifischen Zellen mittels ^{18}F -FHBG-PET. (A) Zuerst wird die „sr39tk Mauslinie“ generiert, die die modifizierte HSV-1 Thymidinkinase „sr39tk“ in allen Zellen exprimiert. In dieser Mauslinie wird sr39tk durch die loxP-flankierte Gen-Kassette (zwischen den schwarzen Dreiecken) „*tomato red fluorescent protein*“ (mT) blockiert. Diese wird nun gekreuzt mit der „Cre Linie“, die die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines spezifischen Promoters (z.B. Pf4, CD4, Myh6) trägt. Diese Kreuzung führt zur Generation der Reportermaus, in der die Cre-Rekombinase die sr39tk Expression in der Zielzellpopulation aktiviert. (B) In Zellen ohne Cre-Rekombinase ist vom L2 Allel das mT, jedoch nicht sr39tk exprimiert. So gelangt nun ^{18}F -FHBG in die Zelle und kann diese schnell wieder verlassen. Unter der Cre-Rekombinase wird die mT Gen-Kassette entfernt und das L2-Allel konvertiert zum L1 Allel (das nur eine loxP Seite trägt) durch das sr39tk nun exprimiert werden kann. Gelangt nun ^{18}F -FHBG in die Zielzelle, wird es vom sr39tk phosphoryliert und kann die Zelle nicht mehr verlassen. Somit erfolgt die Akkumulation von ^{18}F -FHBG in den Zielzellen, die mittels ^{18}F -FHBG-PET dargestellt werden können. Abbildung nach Thunemann *et al.* [193].

1.6.2 Magnetresonanztomographie (MRT)

Die Magnetresonanztomographie (MRT) ist eins der zentralen Elemente in der heutigen Bildgebung zur Darstellung von Morphologie und Anatomie. Zur Beantwortung funktioneller Fragestellungen dient die funktionelle MRT (fMRT). Die Technik basiert auf dem von F. Bloch und E. M. Purcell entdeckten Phänomen der magnetischen Resonanz. Diese beschreibt den Effekt, bei dem Atomkerne eines Materials in einem konstanten Magnetfeld elektromagnetische Strahlung absorbieren und emittieren. F. Bloch und E. M. Purcell wurden aufgrund dieser Entdeckung 1952 mit dem Nobelpreis gekürt [210, 211]. Die frühen 1980er Jahre gelten als Startschuss für die routinemäßige klinische Applikation der MRT. Seitdem folgten diverse Entdeckungen, die die Anwendungsmöglichkeiten der MRT vervielfältigen. Diese sind unter anderem die Sequenz-Acquisitions-Strategien, funktionelle Messungen, Diffusionsgewichtete MRT, Perfusionsmessungen oder pH Messungen (z.B. CEST-MRT) [212-215]. Das Prinzip der MRT beruht auf der „Spin“-Eigenschaft einiger Atomkerne, wie z.B. bei den Isotopen ^1H oder ^{13}C [216]. Dieser Kernspin (auch: Eigendrehimpuls) beschreibt den Drehimpuls des Protons um die eigene Achse, wodurch ein lokales Magnetfeld mit Nord- und Südpol generiert wird. Im MRT herrscht ein starkes Magnetfeld (B_0). Somit richten sich die Protonen parallel zu B_0 und antiparallel zu B_0 aus. Die präferierte Ausrichtung der Protonen ist parallel zu B_0 , da diese weniger Energie benötigt. Folglich sind mehr Protonen parallel als antiparallel ausgerichtet. Insgesamt richten sich (unter dem Erdmagnetfeld) pro 10.000.000 parallel ausgerichteten Protonen rund 10.000.007 Protonen antiparallel zu B_0 aus [217]. Durch diesen kleinen Unterschied ergibt sich der Nettomagnetisierungsvektor (M_z). Die Spins, die nach B_0 ausgerichtet sind, sind nicht statisch fixiert, sondern kreisen in einer Rotationsbewegung um die Richtung von B_0 – die Präzession. Die Frequenz dieser Präzession, auch Larmorfrequenz bezeichnet, wird bestimmt durch die magnetische Feldstärke (B_0) und das gyromagnetische Verhältnis des Korns (γ). Larmorgleichung [218]):

$$2\pi F = \gamma B_0 \Leftrightarrow F = \frac{\gamma B_0}{2\pi}$$

M_z innerhalb von B_0 ist im Equilibrium und produziert kein messbares Signal. Um nun eine Information über den Kernspin zu erhalten, muss die Richtung von M_z verändert

werden. Dies geschieht mithilfe elektromagnetischer Strahlung (Radiofrequenz, RF) entsprechend der exakten Larmorfrequenz. Die Richtungsveränderung geschieht durch den Energietransfer von der RF zu den Protonen. Dieser Energietransfer kann nur gewährleistet werden, wenn die RF dieselbe Frequenz wie die Präzessionsfrequenz der Protonen hat und diese miteinander resonieren. Hierauf basiert der Term Magnetresonanz. Die RF hat zwei Effekte auf die Protonen: Zum einen erhalten die Protonen Energie und gelangen somit in einen höheren Energiezustand. Zum anderen sorgt die RF für einen synchronen Richtungswechsel der Protonen. Hierdurch entsteht die Transversalmagnetisierung, die im dreidimensionalen Feld auf der x-y-Achse liegt. Beim Abklingen der RF nimmt die Transversalmagnetisierung ab (transversale Relaxation) und die Protonen relaxieren in ihren Ursprungszustand (longitudinale Relaxation). Zur Modulierung des Kontrasts der MRT-Aufnahme können nun die Protonendichte und die Relaxationszeiten als Parameter genommen werden. In beispielsweise luftreichen Organen wie der Lunge herrscht eine geringe Protonendichte, sodass diese in einer T₂-gewichteten MRT-Aufnahme „*hypointense*“ erscheinen [219].

Die Ausrichtung an den Zustand vor der RF Exposition (Ursprungszustand) ist die **Längsrelaxation** und wird bestimmt durch die **T₁ Relaxationszeit**. Diese wird definiert als Zeit, die benötigt wird, um 63 % des Ursprungszustands nach RF Exposition zu erreichen. Diverse murine und humane Organe reflektieren verschiedene T₁ Werte. So hat zum Beispiel die humane Leber eine Relaxationszeit von 569 ± 39 ms, wobei die der Pankreas bei 1,172 ± 71 ms liegt (bei 1,5 T; Werte als Median angegeben) [220]. Die **transversale Relaxationszeit** wiederum basiert auf den Eigenschaften des Kernspins. Kurz nach RF Exposition präzessieren die Atomkerne vollständig synchron und es entsteht eine Transversalmagnetisierung. Mit der Zeit stellt sich eine Asynchronität ein, begünstigt durch kleine Unterschiede in der Larmorfrequenz, die durch lokale magnetische Unterschiede im Rahmen von Kernspin-Interaktionen im B₀ zustande kommen. Aufgrund dieser Eigenschaft der Kernspins wird dieser Prozess auch als Spin-Spin Relaxation bezeichnet und wird bestimmt durch die **T₂ Relaxationszeit**. Dies ist die Zeitspanne, nach der die Transversalmagnetisierung ca. 37 % zerfallen ist. Die Relaxationszeiten T₁ und T₂ unterscheiden sich je nach

Gewebeart und Wasser- oder Fettgehalt, die jeweils eine unterschiedliche Protonendichte aufweisen [221].

Zur akkuraten Signaldetektion werden zum Magnetfeld Gradientenspulen benutzt, die Gradienten in alle drei Richtungen (x/y/z) formen können. Hierdurch können die Protonen innerhalb eines 3D Gitterpunkt (Voxel) präzise lokalisiert werden. Zur Detektion des MRT-Signals werden die Spins mittels eines zusätzlichen Gradienten- oder RF-Pulses refokussiert und es entsteht ein Echo zur sogenannten Echozeit (engl.: *echo time*, TE). Die Zeitspanne zwischen der Aussendung zweier 90° RF-Pulse wird als Repetitionszeit (engl.: *repetition time*, TR) betitelt. Die Auswahl von TE und TR in einer Sequenz kann unterschiedliche Signalstärken von Geweben hervorbringen und steuert so den Kontrast zwischen den Geweben [222, 223].

1.6.3 Optische Bildgebung

Die optische Bildgebung umfasst diverse Applikationen basierend auf der Illumination von Licht im elektromagnetischen Spektrum von ultraviolett (200 nm – 400 nm) bis hin zu infrarot (760 nm – 1 mm) [224, 225]. Hierfür nimmt eine hochsensible *charge-coupled device* (CCD) Kamera die emittierten Photonen auf und verarbeitet diese. Diese CCD Kamera wird auf -90 °C gekühlt, um die Sensitivität zu steigern. Zur planaren optischen Bildgebung gehören die *in vivo* (Bio)-Lumineszenz und die *in vivo* Fluoreszenz Bildgebung [226, 227].

Die (Bio)-Lumineszenz ist ein natürlich vorkommender Prozess in Lebewesen. Hierbei wird durch chemische Prozesse freikommende Energie in Form von Licht abgegeben. Das wohl bekannteste Lebewesen, das mittels Biolumineszenz u.a. Paarungsbereitschaft signalisiert und zur Kommunikation einsetzt, ist das Glühwürmchen (lat.: *Photinus pyralis*) [228]. Hierbei wird Luciferin unter Verbrauch von Sauerstoff, Mg^{2+} und ATP durch das Enzym Luciferase in Oxyluciferin katalysiert, infolgedessen Licht emittiert wird. Das Oxyluciferin wird durch die Entstehung des Zwischenprodukts 2-cyano-6-hydroxybenzothiazole in Luciferin umgewandelt (**Abbildung 12**) [229].

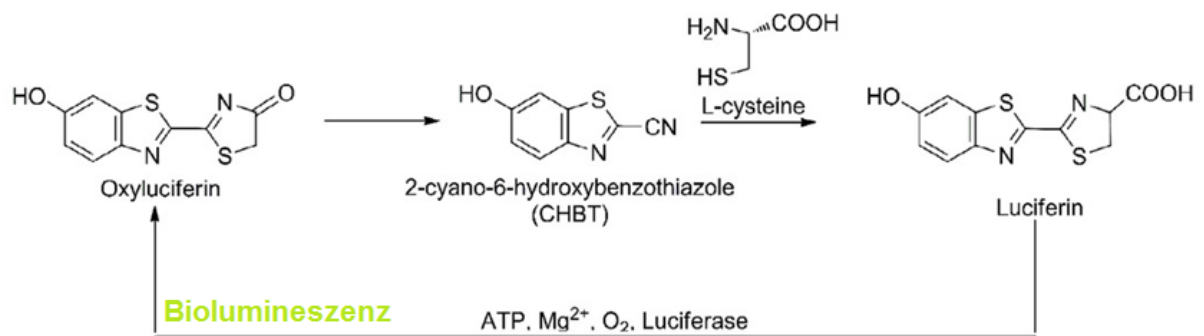


Abbildung 12: Illustration des biosynthetischen Mechanismus des Luciferin im Glühwürmchen.

Abbildung modifiziert nach Cheng *et. al.* (2019) [229].

In der biomedizinischen Forschung wird dieses Phänomen zur Visualisierung molekularer Strukturen bzw. deren Expressionsdynamiken angewandt. Zum Beispiel kann mittels Koppelung der Luciferase an einen Promotor die Aktivierung eines bestimmten Gens untersucht werden. Somit können temporale und räumliche Informationen über die Gen-Aktivität gewonnen werden. Wird das Gen aktiviert, so wird Luciferase synthetisiert. Daraufhin katalysiert die Luciferase Luciferin in OxyLuciferin, sodass Licht emittiert wird (**Abbildung 12**) [230].

Fluoreszenz nennt man den Prozess der Absorption eines energiereichen Photons und die daraus resultierende Emission eines energieärmeren Photons [231]. Hierbei regt das Laserlicht durch dessen hochenergetische Strahlung ($E_{in} = h\nu$) das Fluorophor an, worauf dieses einen Teil der Energie in Form von Photonen emittiert, die wiederum von einer CCD Kamera erfasst werden (**Abbildung 13**) [232].

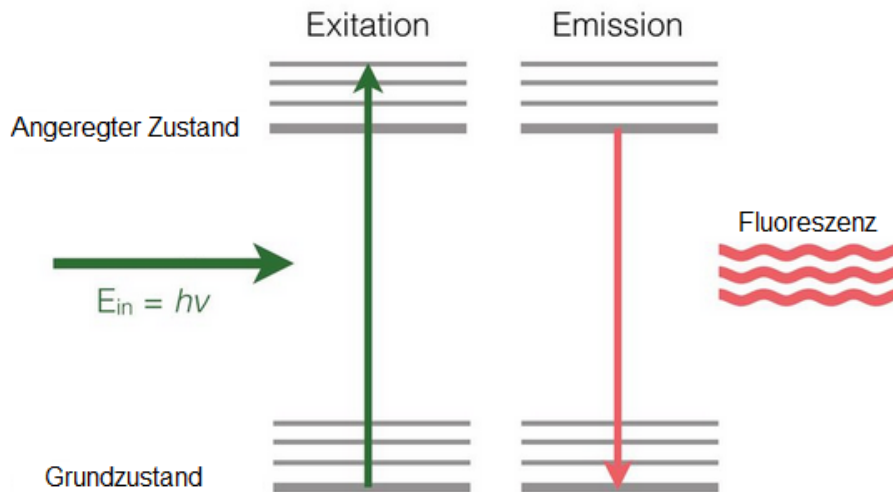


Abbildung 13: Schematische Illustration des Prinzips der Fluoreszenz. Hochenergetisches Laserlicht wird auf einen Fluorophor projiziert, wodurch dieser in einen angeregten (höher energetischen) Zustand versetzt wird. Während das Fluorophor wieder in den energetischen Grundzustand zurückfällt, verliert es einen Teil der absorbierten Energie und emittiert diese in Form von Photonen, die als Fluoreszenz gemessen werden. Abbildung modifiziert nach Pirovano *et. al.* (2020) [182].

In vielen Studien wird zum Beispiel das grün fluoreszierende Protein (GFP) als Reporter gen zur Quantifizierung von Zielproteinen verwendet. Die Intensität des GFP Fluoreszenz-Signals ist proportional zur Anzahl der GFP mRNA Produkte. Hierdurch lässt sich mittels Quantifizierung des Signals die Quantität des davorliegenden Promotorproteins bestimmen [233].

2. Zentrale Fragestellung

Das primäre Ziel dieser Dissertation ist die Evaluation des Therapieeffekts einer kombinierten Immuntherapie, die aus einer initialen Niedrigdosis-Ganzkörperbestrahlung (2 Gy), der *i.p.* Applikation von antigenspezifischen CD4⁺-Th1 Zellen (T_H1-Zellen) und der *i.p.* Gabe von Checkpoint-inhibierenden AK (anti-PD-L1/anti-LAG-3 AK) besteht. Für die kombinierte Viro-Immuntherapie wurde zusätzlich das onkolytische Virus OncoVEX appliziert.

Zur Evaluation des Therapieeffekts wurde das Tumorzellenbestimmte, zelluläre Analysen der Immunzellkomposition im Tumor und in den primär und sekundär lymphatischen Organen als auch molekularbiologische Untersuchungen zur Bestimmung des Grads der Virusinfektion durchgeführt. Des Weiteren wurde zur nichtinvasiven *in vivo* Visualisierung von OncoVEX-infizierten Tumorzellen kombinierte ¹⁸F-FHBG-PET/MRT Untersuchungen durchgeführt. Zudem wurde in tumortragenden ^{NFκB}Luc-Reporter Mäusen mit kombinierter Immuntherapie die NFκB Aktivierung der endogenen Immunzellen und residenten Zellen mittels Biolumineszenz-Bildgebung erfasst und der Effekt der Therapie auf das TME und das lymphatische System detailliert analysiert.

Folgende Fragestellungen sollen durch die vorgegebenen Experimente beantwortet werden:

- Welche Rolle spielen CD8⁺ T-Zellen im Hinblick auf die Wirksamkeit der kombinierten Immuntherapie und können diese das Überleben der RIP1-Tag2 Versuchsmäuse mit fortgeschrittenen Inselzellkarzinomen verlängern?
- Kann eine initiale Behandlung mit dem Zytostatikum Cyclophosphamid zur Depletion endogener Immunzellen die Niedrigdosis-Ganzkörperbestrahlung ersetzen und gar das Überleben der RIP1-Tag2 Mäuse verlängern?
- Erzielt man durch die additive Gabe des onkolytischen Virus OncoVEX im Rahmen der kombinierten Immuntherapie einen additiven Therapieeffekt und wie beeinflusst dies die einzelnen Komponenten der etablierten kombinierten Immuntherapie?
- Lassen sich die OncoVEX-infizierten Tumorzellen mittels nicht-invasiver *in vivo* ¹⁸F-FHBG PET/MRT visualisieren?

- Untersuchung der zeitlichen Dynamik der NFκB Aktivierung im Tumor und im Knochenmark im Verlauf einer kombinierten Immuntherapie in ^{NFκB}Luc-Reporter-mäusen mit sensitiven als auch nicht-sensitiven exogenen Tumoren.

3. Material und Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Isolation und Kultivierung der Tag-T_H1 / OVA-T_H1 Zellen

3.1.1.1 Vorbereitung

Als Medium zur Kultivierung der Tag-T_H1/OVA-T_H1 Zellen wurde Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM, 500 ml; Sigma Aldrich AG, Berlin, Deutschland) mit NaHCO₃, 4,5 g/L D-Glucose, L-Glutamin, ohne Natrium-Pyruvat verwendet und folgende Substanzen zugesetzt:

- 10 % fetales Kälberserum (FCS) nach einer Thermo-Inaktivierung im Wasserbad (56 °C für 30 Minuten; Thermo Fisher Scientific, Hyclone, Waltham, Vereinigte Staaten)
- 10 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure (HEPES)-Pufferlösung (PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland)
- 1 mM Natrium Pyruvat (Sigma Aldrich AG, Berlin, Deutschland)
- 1 % Minimales Essentielles Medium (MEM) Aminosäurelösung (Sigma Aldrich AG, Berlin, Deutschland)
- 100 U/ml Penizillin- und 100 µg/ml Streptomycin-Lösung (Sigma Aldrich AG, Berlin, Deutschland)
- 0,05 mM 2-β-Mercaptoethanol (Sigma Aldrich AG, Berlin, Deutschland)

Des Weiteren wurde 1 % FCS/PBS-Puffer: Phosphat gepufferte Saline (PBS, PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland) für die Aufarbeitung der Milz sowie der Lymphknoten verwendet. Als Spendermäuse für die Isolation und Kultivierung von Tag-T_H1/OVA-T_H1 Zellen wurden Tag-TCR bzw. OT-II Mäuse verwendet. Es wurden CD4⁺ T-Zellen und APCs aus der Milz und den Lymphknoten isoliert, um anschließend Tumorantigen-spezifische Tag-T_H1/OVA-T_H1 Zellen zu kultivieren. Der Kulturansatz erfolgte nach einem standardisierten Protokoll [234].

3.1.1.2 Isolation der CD4⁺ T-Zellen

Die Tag-TCR bzw. OT-II Spendertiere wurden in ihren Käfigen mittels CO₂ euthanasiert und für 2 Minuten in einem Behälter mit 80 % Ethanol (SAV Liquid PRODUCTION GmbH, Flintsbach am Inn, Deutschland) desinfiziert. Zur Präparation wurden eine anatomische Pinzette, eine chirurgische Pinzette sowie eine chirurgische Schere eingesetzt (Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland). Diese erfolgte unter streng sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank der Klasse II (Heasafe 2025, ThermoFisher Scientific, Langenselbold, Deutschland). Zur Fixation der zu sezierenden Tiere wurde ein mit Aluminiumfolie beschichteter Styroporblock benutzt, worauf die Tiere in Rückenlage mittels 14 G Kanülen (BD Microlance, Sarl, Schweiz) an den Extremitäten befestigt wurden. Mit der chirurgischen Schere wurde nun ein feiner Hautschnitt beginnend am Abdomen von unten nach oben (zur Mandibula) durchzogen. Anschließend erfolgte ein Hautschnitt von thorakal mittig bis zu den Pfoten der Vorderläufe sowie vom Abdomen mittig bis zu den Pfoten der Hinterläufe und die Haut und die darunterliegenden Strukturen freigelegt. Daraufhin konnten die inguinalen, axillären, brachialen und zervikalen Lymphknoten isoliert und in ein steriles Zellsieb (70 µm; Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) überführt werden. Zudem erfolgte die Öffnung des Peritoneums und die Isolation der Milz, welche in ein separates Zellsieb (70 µm) überführt wurde (**Abbildung 14**).

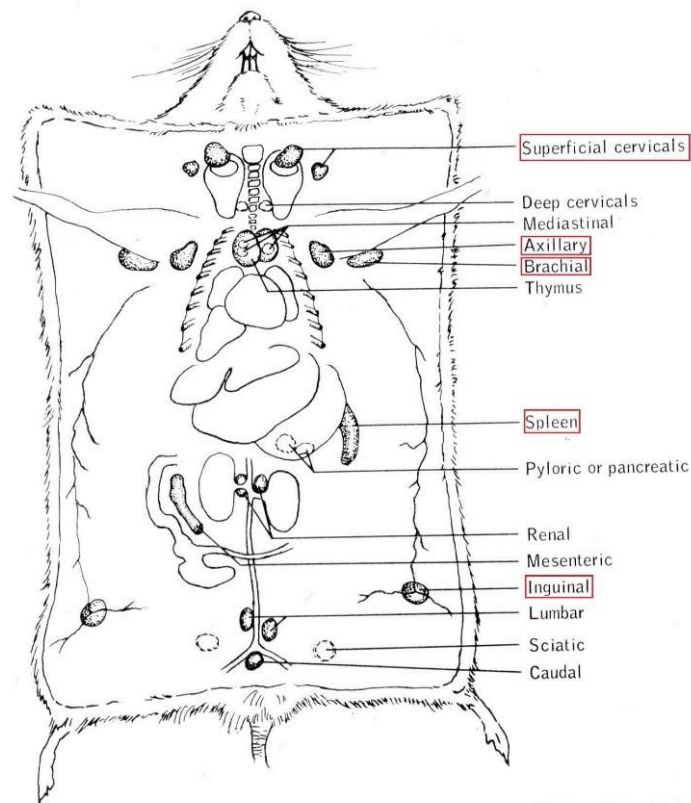


Abbildung 14: Illustration der Anatomie der Lymphknoten und sekundär lymphatischen Organe. Rot markiert sind die für die T-Zellkultivierung verwendeten Lymphknoten und die Milz (modifiziert nach Dunn, 1954 [235])

Die auf Falconröhrchen (50 ml Falcon, BD Biosciences, San José, CA, Vereinigte Staaten) aufgesetzten Zellsiebe wurden mit 5 ml des 1 % FCS/PBS Puffers durchgespült. Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension, wurden die Lymphknoten und Milzen mit dem Kopf eines Spritzestempels einer 1 ml Spritze (BD Biosciences) durch das Zellsieb gepresst. Anschließend wurden das Sieb sowie der Stempel mit weiteren 5 ml des 1 % FCS/PBS Puffers gespült. Nach der Zentrifugation (bei 1200 rpm für 5 min bei 4 °C) mit einer Multifuge 3SR+ (Thermo Fisher Scientific) wurde der Überstand verworfen und auf das Milz-Pellet 1,5 ml (pro Milz) ACK-Lyse-Puffer (Lonza, Walkesville, MD, Vereinigte Staaten) gegeben. Anschließend wurden die Zellen resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur zur Lyse der Erythrozyten inkubiert. Zum Stoppen der Erythrozytenlyse wurden 10 ml 1 % FCS/PBS hinzugegeben und die Lymphknoten- bzw. Milz-Zellsuspensionen in einem 50 ml Falconröhrchen zusammengeführt. Nach dem einmaligen Waschen mit einem 1 % FCS/PBS Puffer

erfolgte das „*Magnetic Activated Cell Sorting*“ (MACS) zur magnetischen Separierung (Positivselektion) von mit Microbeads-markierten Zellpopulationen. Zur Selektion der CD4⁺ T-Zellen wurden zur Zellsuspension Microbeads (50 nm große Eisenoxidpartikel)-gekoppelte CD4 AK (L3T4, Klon: RPA-T4; Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) zugegeben und das Zellpellet mit 15 µl der Microbeads Lösung (pro Tag-TCR Spendertier) in einer 1:10 Verdünnung mit 1 % FCS/PBS-Puffer für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Abstoppen mit 10 ml 1 % FCS/PBS-Puffer wurde die Zellsuspension einmal gewaschen und die Zellsuspension mit 3 ml 1 % FCS/PBS-Puffer resuspendiert und in eine MACS LS-Trennsäule (Miltenyi Biotec) überführt. Diese wurde zuvor in eine magnetische Vorrichtung, MACS-Multistand Quadro (Miltenyi Biotec), eingespannt, die mittels eines starken Magneten beim Durchfluss die Microbeads-markierten CD4⁺ T-Zellen in der Säule zurückhält. Die Zellen, die nicht mit Microbeads markiert wurden, sind in der Lage die Säule ungehindert zu passieren. Die Säule wurde zweimal mit 5 ml 1 % FCS/PBS-Puffer gespült, um die nicht-CD4⁺ exprimierenden Zellen aus der Säule herauszuspülen. Abschließend wurde die Säule mit 6 ml 1 % FCS/PBS-Puffer aufgefüllt, die Säule aus der magnetischen Vorrichtung entnommen, der Kolben auf die Säule aufgesetzt, die 6 ml der 1 % FCS/PBS-Puffer-Lösung durch die Säule durchgepresst und die CD4⁺ T-Zellen in einem separaten 50 ml Falconröhrchen aufgefangen. Nach einem erneuten Waschvorgang wurden die separierten CD4⁺ T-Zellen in 5 ml T-Zellmedium resuspendiert und bei 4 °C zwischengelagert.

3.1.1.3 Isolation der Antigenpräsentierenden Zellen (APC)

Nach der Separierung der CD4⁺ T-Zellen erfolgte die Aufarbeitung der APCs. Hierbei wurden die CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen mittels AK-Komplement-Reaktion depletiert. Zunächst wurde das Kaninchenkomplement (Cedarlane, Burlington, Kanada) zuerst in 1 ml destilliertem Wasser gelöst, mit 9 ml PBS aufgefüllt und mit Hilfe eines sterilen Filters (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) steril filtriert. Danach wurde das Zellpellet mit 1,5 ml Kaninchenkomplement, 0,5 ml anti-CD4 AK-Verdünnung (Klon Gk1.5), 0,5 ml anti-CD8 AK-Verdünnung (Klon: 53-6.7) und 0,5 ml Maus-anti-Ratte AK-Verdünnung (Klon: MAR 18.5) (jeweils pro Milz) resuspendiert und für 45 min bei 37 °C und 5 % CO₂ in einem Inkubator (Heracell 150i, Thermo Fisher Scientific)

inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Zellsuspension nach Zugabe von 20 ml T-Zellmedium resuspendiert und gewaschen. Zur Eindämmung der Proliferation der APCs wurde die APC-Zellsuspension (in 3 ml T-Zellmedium) in einem Gammacell 1000 Elite-Bestrahlungsgerät (Nordion Internation, Kanata, Kanada) mit 30 Gy (4 min, Tischhöhe 180 cm) bestrahlt. Durch die Bestrahlung bleibt die APC-Funktion (Antigenpräsentation etc.) erhalten.

3.1.1.4 Kultivierung der Tag- T_H1 /OVA- T_H1 Zellen

Nach der Isolation der APCs sowie der $CD4^+$ T-Zellen wurden die APCs auf 5×10^6 und $CD4^+$ T-Zellen auf 2×10^6 Zellen pro ml eingestellt. Zur Kultivierung als auch Th1-Differenzierung von antigenspezifischen Tag- T_H1 /OVA- T_H1 Zellen wurden 2×10^6 $CD4^+$ T-Zellen in 200 μ l T-Zellmedium mit 0,2 μ M CPG 1668-Oligonukleotid (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland), 10 μ g/ml anti-IL-4 AK (Klon: 11B11; BioXcell Hölzel, Köln, Deutschland), 5 U/ml IL-2 (Chiron, Emeryville, Vereinigte Staaten) und 80 nM Tag2-Peptid (4 μ M Stocklösung; EMC Microcollections GmbH, Tübingen, Deutschland) bzw. OVA (323-339) Peptid zusammen mit 5×10^6 APCs in 96-Well Flachboden-Platten (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) kultiviert. Das Tag- bzw. OVA-Peptid wird von den APCs phagozytiert und den $CD4^+$ T-Zellen über MHC-II-Moleküle präsentiert. Die Addition des CPG Oligonukleotids induziert die IL-12 Sekretion der APCs und fördert somit die Th1-Polarisation [236]. Die Differenzierung der $CD4^+$ T-Zellen zu Th2-Zellen wird durch die Zugabe von anti-IL-4 AK unterbunden [237]. IL-2 ist ein T-Zellwachstumsfaktor, der die T-Zellproliferation anregt [238].

Nach drei Tagen Kultivierung der Tag- T_H1 -Zellen bei 37 °C und 5 % CO_2 im Inkubator werden die Zellen unter dem Mikroskop auf Proliferationsherde untersucht und diese Beobachtung dokumentiert. Nach vier Tagen erfolgt die Umsetzung der Zellen von 96-Well- auf die 24-Well-Flachbodenplatte (Greiner Bio-One). Es werden je 4 Wells der 96-Well-Platte auf ein Well der 24-Well Platte überführt, 50 U/ml IL-2 zugegeben und die Kultivierung im Inkubator fortgesetzt. Bei optimalem Wachstum werden die Zellen nach weiteren drei Tagen von der 24-Well Flachbodenplatte in eine Zellkulturflasche (550 ml, 175 cm^2 ; Greiner Bio) mit 1×10^6 Zellen pro ml Zellkulturmedium transferiert und erneut 50 U/ml IL-2 zugegeben. Nach einem 10-tägigen Kulturansatz werden die

Tag- T_{H1} /OVA- T_{H1} Zellen in den Therapiestudien eingesetzt. Hierzu wird die Anzahl der Tag- T_{H1} /OVA- T_{H1} Zellen bestimmt und die gewünschte Anzahl aus der Zellkulturflasche entnommen und die Tag- T_{H1} /OVA- T_{H1} -Zell-Suspension zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgekippt und die Zellen einmal mit 30 ml PBS gewaschen, der Überstand verworfen und die Zellen auf 5×10^7 /ml in PBS eingestellt. Je Injektion werden den Versuchstieren 1×10^7 Tag- T_{H1} /OVA- T_{H1} Zellen in 200 μ l *i.p.* verabreicht. Zusätzlich erfolgte eine Qualitätskontrolle mittels Durchflusszytometrie zur Überprüfung der Th1 Differenzierung der Tag- T_{H1} /OVA- T_{H1} Zellen (BD Maus Th1/Th2/Th17 Phenotyping-Kit, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland).

3.1.2 Isolation und Kultivierung der Inselzellkarzinome

3.1.2.1 Vorbereitung

Für die *in vitro* Kultivierung der RIP1-Tag2 Tumorzellen müssen die Tumore zuvor im Rahmen eines speziellen Isolationsverfahrens isoliert werden. Hierzu werden folgende Lösungen benötigt:

- Präparierlösung 1: Hanks-Salzlösung (Hanks Balanced Salt Solution, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland) mit 2,8 mM Glukose: 500 ml + 0,275 g Glukose. Der pH-Wert der Lösung muss auf 7,25 eingestellt werden (mittels NaOH)
- Präparierlösung 2: 0,871 g BSA (V, 96 %) zu 250 ml
- Kollagenaselösung: 6 mg Kollagenase NB8 (Serva), 35 μ l 1 M $CaCl_2$, 6 ml Präparierlösung 1

3.1.2.2 Präparation und Isolation der RIP1-Tag2 Tumorzellen:

Zuerst wurde mit einem Blutglukosemessgerät (HemoCue® Glucose 201+ PE, Hitado, Arnsberg, Deutschland) der Blutglukosewert der RIP1-Tag2 Versuchsmäuse bestimmt. Mithilfe des Blutglukosewerts kann die Tumorprogression indirekt anhand der fallenden Blutglukosewerte ermittelt werden. Nur bei Versuchstieren mit fortgeschrittener Tumorprogression erfolgt die Isolation der RIP1-Tag2 Tumorzellen. Daraufhin wurden die RIP1-Tag2 Versuchsmäuse mit CO_2 euthanasiert und das

Tötungsverfahren mittels zervikaler Dislokation abgeschlossen. Analog zu der Präparation der Tag-TCR Spendertiere wurden die RIP1-Tag2 Versuchsmäuse euthanasiert und wie unter **3.1.1.2** beschrieben desinfiziert und präpariert.

Die Präparation des Pankreas wurde unter einem Mikroskop (Falttubus f170/f260 Zeiss, Oberkochen, Deutschland) durchgeführt. Das Intestinum und das Kolon wurden mittels Pinzette auf die rechte Seite geschoben, sodass eine freie Sicht auf das Pankreas und die Leber gewährleistet wurde. Dann erfolgte das Abbinden des *ductus hepaticus* mit einer chirurgischen Naht (6,5 mm, Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland) und das Abklemmen des Duodenum *dextra* und *sinister* der Papilla-Vateri. Die Papilla-Vateri wurde nun minimal eingeschnitten, sodass eine Spritzenkanüle eingeführt werden konnte. Anschließend wurden 3 ml Kollagenase durch in die Papilla-Vateri in das Pankreas injiziert. Dies führte zur Volumenzunahme des Pankreas, welches anschließend chirurgisch isoliert und in Kollagenaselösung in ein 50 ml Falconröhrchen überführt wurde. Die Kollagenase wurde im Falconröhrchen für 10 min bei 37 °C in einem Wasserbad aktiviert. Abschließend erfolgte das Abstoppen des Verdau mit 20 ml Präparierlösung B (enthält Ca²⁺ Fänder).

3.1.2.3 *In vitro* Kultivierung der RIP1-Tag2 Tumorzellen

Die Tumorzellen, die sich in dem Falconröhrchen befinden, wurden nach dem Abstoppen des Verdau zentrifugiert (900 rpm, 2 min / 800 U) und der Überstand nach der Zentrifugation verworfen. Anschließend erfolgten zwei Waschschrte: Hierbei wurden die Zellen mit 20 ml PBS aufgefüllt und der Überstand nach der Zentrifugation verworfen. Um die hyperplastischen Inseln voneinander zu separieren, wurden die sich in PBS befindlichen Tumorzellen mittels einer großen Kanüle (BD Microlance) durch mehrmalige Resuspension aufgetrennt. Folglich konnten die Tumore (die als rote Geschwülste identifizierbar sind) unter dem Mikroskop aufgesammelt und in ein auf Crash-Eis gekühltes Eppendorf-Röhrchen überführt werden. Der Überstand (PBS) wurde nun vorsichtig mit einer Pipette abgezogen und entsorgt und die Tumore in 0,5 ml Trypsin (PAN Biotech, auf 37 °C erwärmt) überführt. Anschließend wurden die Tumore in Trypsinlösung für 5 min mit einer Schere zerkleinert und abschließend für 5 min bei 37 °C inkubiert bevor der Verdau mit DMEM-Vollmedium abgestoppt und die

Tumore in ein 15 ml Falconröhrchen (15 ml Falcon, BD Biosciences) überführt und für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert wurden. Nach Zentrifugation wurden die Tumore in 0,5 ml T-Zellmedium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Für die Zellkultur wurden jeweils 200.000 Zellen / well in eine 24er Mikrotitrierplate überführt.

3.1.3 Kultivierung der (OVA)-B16 Melanom- und (OVA)-MC38 Kolon Adenokarzinom Zelllinien

Die OVA-B16 Tumorzellen wurden von ATCC (Manassas, Virginia, Vereinigte Staaten) gekauft und die OVA-MC38 Tumorzellen freundlicherweise von Frau Dr. Arnold-Schild (Universitätsklinikum Mainz) zur Verfügung gestellt. Beide Tumorzelllinien wurden in 90 % fetalem Kälberserum (FCS) (Thermo Fisher Scientific, Hyclone, Waltham, Vereinigte Staaten) und 10 % Dimethylsulfoxide (DMSO) (Honeywell, Charlotte, North Carolina, Vereinigte Staaten) bei -80 °C aufbewahrt.

Dem Medium zur Kultivierung der OVA-B16 sowie OVA-MC38 Tumorzellen wurde 500 ml DMEM mit NaHCO₃, 4,5 g/L D-Glucose, L-Glutamin, ohne Natrium-Pyruvat), 50 ml fetales Kälberserum (FCS) (Thermo Fisher Scientific, Hyclone, Waltham, Vereinigte Staaten) und 100 U/ml Penizillin-/100 µg/ml Streptomycin-Lösung zugesetzt. Dem MC38 Tumorzellmedium wurde zudem 5 ml (HEPES)-Pufferlösung (Biochrom AG) hinzugefügt.

Nach dem Auftauen der Tumorzellen wurden die Tumorzellen (OVA-B16 oder OVA-MC38) mit 10 ml des jeweiligen Kulturmediums versetzt und bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert. Nachdem der Überschuss verworfen wurde, wurden die Tumorzellen in einem 50 ml Falconröhrchen in 25 ml Kulturmedium resuspendiert und in einer T175 Zellkulturflasche ausgelegt und im Inkubator (bei 37 °C und 5 % CO₂) inkubiert. Ein Tag nach dem Aussäen der Tumorzellen wurde das Kulturmedium gewechselt, um nicht angehaftete Zellen zu entfernen. Des Weiteren diente der Wechsel des Kulturmediums zur Auswaschung des DMSOs. Ab einer Konfluenz von ca. 70 – 80 % (meist an Tag 2 – 3 nach dem Auslegen der Tumorzellen) wurden die Tumorzellen 1:10 passagiert. Hierzu wurden die adhärennten Tumorzellen zuerst mit 25 ml PBS gewaschen und mit 3 ml Trypsin im Inkubator bei 37 °C für 2 min abgelöst. Daraufhin wurden die Tumorzellen mit 22 ml Kulturmedium in einem 50 ml Falconröhrchen überführt, bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert und in 10 ml Medium resuspendiert.

Abschließend wurde 1 ml dieser Suspension in eine T175er Kulturflasche mit 24 ml Kulturmedium überführt. Die Tumorzellen wurde ein weiteres Mal nach ca. drei Tagen passagiert, um die Adaption der Tumorzellen an die *in vitro* Bedingungen zu gewährleisten.

3.1.4 Inokulation der (OVA)-B16 Melanom- und (OVA)-MC38 Kolon Adenokarzinomzellen

Die OVA-B16 sowie OVA-MC38 Tumorzellen wurden mit 25 ml PBS in einem Falconröhrchen gewaschen (zentrifugiert und der Überstand verworfen) und anschließend mit 3 ml Trypsin bei 37 °C für 2 min zur Ablösung der Tumorzellen inkubiert. Nach der Zugabe von 22 ml Kulturmedium und erneuter Zentrifugation (1500 rpm für 5 min) wurden die Tumorzellen in 10 ml Kulturmedium zur Zellzahlbestimmung resuspendiert. Hierbei wurden diese 1:10 mit Trypanblau verdünnt und unter dem Mikroskop (10x Magnifikation) gezählt.

Um ein Austrocknen der Kornea im Rahmen der Narkose zu verhindern wurden die Augen mit Augensalbe (Recugel, Bausch + Lomb) geschützt, bevor die Versuchsmäuse in eine gewärmte Narkosebox überführt und mittels Isofluran-Inhalationsanästhesie (1,5 Vol. % gemischt mit 100 % O₂) narkotisiert wurden. Daraufhin wurden die narkotisierten Versuchsmäuse aus der Narkosebox auf eine Wärmematte gelegt und es wurde eine Inhalationsanästhesie-Maske (1,5 Vol. % gemischt mit 100 % O₂) über die Schnauze gezogen. Anschließend wurden 7,5 x10⁶ OVA-B16 Tumorzellen intrakutan (*i.c.*) in einem Volumen von 25 µl PBS bzw. 0,5 x10⁶ OVA-MC38 Tumorzellen subkutan (*s.c.*) in einem Volumen von 100 µl PBS mit einer Insulinspritze (0,5 ml; U-40 Insulinspritze (BD Micro-Fine, Becton Dickinson and Company, NJ, Vereinigte Staaten) in die rechte Schulter der Empfängertiere inokuliert.

3.2 Versuchstiere

3.2.1 Zucht- und Haltungsbedingungen

Alle hier aufgelisteten Versuchsmäuse entstammen aus der eigenen Zucht in der Tierhaltung des Verfügungsgebäudes „FORS“ der Universität Tübingen und wurden

von ausgebildeten Tierpflegern täglich kontrolliert. Mit einem Alter von 3 Wochen wurden die Nachkommen nach ihrem Geschlecht aufgeteilt. Die Versuchstiere wurden unter pathogenfreien Bedingungen in „*Individually ventilated cages*“ (IVC) des Typs 2 Long mit maximal 5 Mäusen pro Käfig unter standardisierten Haltungsbedingungen (22 – 24 °C Raumtemperatur, mit einem Lichtzyklus von täglich 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus) gehalten. Des Weiteren wurden Zellstofftücher, für den Bau eines Nestes in den Käfigen platziert. Futter und Wasser wurde den Tieren *ad libitum* zur Verfügung gestellt. Die hier beschriebenen Versuche wurden vom Regierungspräsidium Tübingen (R12/14, R6/20G, R1/16) genehmigt und nach geltendem Tierschutzrecht (§ 8 Abs. 1 Tierschutzgesetz) durchgeführt.

3.2.2 Transgene Mauslinien

3.2.2.1 Versuchsmäuse

RIP1-Tag2 (C3.Cg-Tg(RIP1-Tag2)2Dh) Mäuse, auf C3H/HeJ Hintergrund, wurden als endogenes Inselzellkarzinom-Tumormodell verwendet. Die RIP1-Tag2 Mäuse entwickeln endogene Inselzellkarzinome, da die Insulin-produzierenden β -Zellen der Pankreas das Onkogen T-Antigen (Tag2) des Simian-Virus 40 unter Kontrolle des Ratten-Insulin-Promotors (Rip1) exprimieren.

C6.CBA tg(3x-NF κ B-Luc) auch: ^{NF κ B}Luc-Reportermaus:

Die ^{NF κ B}Luc-Reportermause, auf C57BL/6J Hintergrund, wurden von Herrn Prof. Harald Carlsen (Norwegian University of Life Sciences, Oslo, Norwegen) kreiert [239] und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Diese entstammen der eigenen Zucht. Das Reporter-gen Luciferase wird in Abhängigkeit der NF κ B Aktivierung exprimiert. Sobald NF κ B in der Zelle aktiv wird, wandert diese in den Zellkern und bindet an die DNA Responseelemente κ B, die dem Reporter-gen vorgeschaltet sind. Der Transkriptionsfaktor NF κ B bindet dementsprechend an eines dieser drei Responseelemente und aktiviert infolgedessen die Expression des Reporter-gens Luciferase. Wird Luciferin (Substrat für Luciferase) in ^{NF κ B}Luc-Reportermause injiziert, wandelt das Enzym Luciferase das Luciferin in Oxyluciferin um, welches sich in einem energetisch angeregten Zustand befindet. Unter Abgabe eines Photons fällt es in seinen Grundzustand zurück. Somit korreliert die im IVIS[®] (Perkin Elmer, Rodgau-

Jügesheim, Germany) nicht-invasiv *in vivo* gemessene Luciferase-assoziierte Signalintensität (S.I.) in den Zellen der ^{NFκB}Luc-Reportermäuse mit der NFκB Aktivität.

3.2.2.2 Spendermäuse

Tag-TCR (C3.Cg-Tg(Tag2-TCR)Dh) Donormäuse, auf C3H/HeJ Hintergrund, dienen in den hier beschriebenen Versuchen als Spendertiere zur Generierung der Tag2-Th1 Zellen für den adaptiven T-Zelltransfer. Die CD4⁺ T-Zellen exprimieren transgen den Tag2-T-Zell-Rezeptor (Tag2-TCR), dessen Tag2-Antigen spezifisch auf allen β-Zellen des RIP1-Tag2-Tumormausmodells exprimiert wird.

OT-II (B6.Cg-Tg(TcraTcrb)425Cbn/J) Donormäuse, auf C57BL/6J Hintergrund, exprimieren die alpha und beta Kette des TZR und bilden mit dem CD4 Co-Rezeptor eine Einheit, die spezifisch das mittels MHC-II präsentierte OVA (323-339) Peptid erkennt.

3.3 Kombinierte Viro-Immuntherapie

Die kombinierte Immuntherapie bestehend aus einer Niedrigdosis-Ganzkörperbestrahlung, dem adaptiven Tag-T_H1 Zelltransfer (*i.p.*), der Gabe der Immun-Checkpoint-inhibierenden monoklonalen anti-PD-L1 und anti-LAG-3 AK (*i.p.*) und der systemischen (*i.p.*) Applikation des onkolytischen Virus OncoVEX wurde in den hier beschriebenen Versuchen an weiblichen RIP1-Tag2 Mäusen eingesetzt und wird in den folgenden Abschnitten detailliert erläutert. Bei OncoVEX handelt es sich um das murine Äquivalent des FDA zugelassenen Medikaments Talimogen Laherparepvec; T-VEC. Der Versuchsaufbau wird in den Resultaten jeweils für jeden Versuch schematisch dargestellt. Der initiale Blutglukosewert der zu diesem Zeitpunkt 10-11 Wochen alten Versuchsmäuse wurde aufgrund von Schwankungen zwischen den Versuchsgruppen, zur vereinfachten Darstellung, auf 100 % gesetzt. Dies vereinfacht den Vergleich der verschiedenen Versuchsgruppen. Folglich werden in der hier vorgelegten Promotionsschrift ausschließlich relative Blutglukosewerte (rBGW) angegeben. Zusätzlich wird der initiale Blutglukosewert jeder Versuchsgruppe in mg/dl angegeben (entspricht einem rBGW von 100 %).

3.3.1 Depletion der endogenen Immunzellen mittels Niedrigdosis-Ganzkörperbestrahlung

Die Bestrahlungen der tumortragenden Versuchsmäuse wurden im Verfügungsgebäude der Immunologie (Verfügungsgebäude, Auf der Morgenstelle 15, 72076 Tübingen) mittels standardisierten γ -Strahlquellen (Gammacell 2000 Elite; [^{137}Cs]-Quelle) durchgeführt. Zum Zwecke der Depletion der endogenen Immunzellen wurde eine Bestrahlungsdosis von 2 Gy gewählt. Hierbei wurden die Versuchsmäuse in einen hierfür konzipierten Bestrahlungsbecher (Radius: ca. 5 cm; Höhe ca. 18 cm) geführt und einer Bestrahlungszeit von 22 Sekunden der [^{137}Cs]-Quelle ausgesetzt.

3.3.2 Depletion der endogenen Immunzellen mittels der Gabe von Cyclophosphamid

Zur Depletion der endogenen Immunzellen wurde den Versuchstieren Cyclophosphamid (250 $\mu\text{g/g}$ Körpergewicht) mittels *i.p.* Injektion verabreicht. Dieses wurde von der Universitäts-Apotheke des Universitätsklinikums Tübingen (20 mg/ml) zur Verfügung gestellt.

3.3.3 *In vivo* Depletion der CD8⁺ T-Zellen

Um die CD8⁺ T-Zellen in weiblichen RIP1-Tag2 Versuchsmäusen zu depletieren wurden 200 μg anti-CD8 AK (Klon: 53-5.8; BioXcell Hölzel) in einem Volumen von 100 μl PBS *i.p.* einmal wöchentlich in einem Versuchszeitraum von 4 Wochen appliziert. Es wurde strikt darauf geachtet, dass ein anderer Klon als bei der Tag-T_H1 Zellkultivierung verwendet wird (**3.1.1.3 Isolation der Antigenpräsentierenden Zellen (APC)**). Die Depletion wurde in einer Machbarkeitsstudie zuvor validiert.

3.3.4 Intraperitoneale (*i.p.*) Applikation der Tag-T_H1 Zellen

Die Isolation und Kultivierung der Tag-T_H1 Zellen wurde unter **3.1.1** detailliert beschrieben. Pro zu behandelnde RIP1-Tag2 Versuchsmaus wurden 1×10^7 Tag-T_H1 Zellen in einer 0,5 ml U-40 Insulinspritze (BD Micro-Fine) in einem Volumen von 200

µl PBS abdominal links oder rechts *i.p.* verabreicht. Den Kontrolltieren wurde ausschließlich PBS injiziert.

3.3.5 *I.p.* Applikation der Checkpoint-inhibierenden AK

Analog zur Tag-TH1 Zellapplikation wurden die AK anti-PD-L1 (Klon: 10F.9G2; BioXcell Hölzel) und anti-LAG-3 (Klon: C9B7W; BioXcell Hölzel) abdominal *i.p.* appliziert. Initial wurden 500 µg je AK in einem Volumen von 200 µl PBS injiziert. Die Folgeinjektionen erfolgten mit 200 µg je AK in 100 µl PBS. Allen Versuchstieren wurde zweimal pro Woche die Lösung mit den beiden AK injiziert. Den Kontrolltieren wurden in identischen Volumina und Konzentrationen Isotyp AK anti-IgG2b (Klon: LTF-2; BioXcell Hölzel) und anti-IgG1 (Klon: HRPN; BioXcell Hölzel) injiziert.

3.3.6 *I.p.* Applikation der onkolytischen Viren

Das onkolytische Virus OncoVEX wurde freundlicherweise von unserem Kollaborationspartner Prof. Dr. Lauer (Innere Medizin VIII, Medizinische Onkologie und Pneumologie, Universitätsklinikum Tübingen). Im Rahmen einer Kollaboration mit dem Pharmaunternehmen Amgen (Thousand Oaks, Kalifornien, Vereinigte Staaten) zur Verfügung gestellt. In der ersten und zweiten Therapiewoche wurde den RIP1-Tag2 Versuchstieren 5×10^6 PFU OncoVEX in einem Volumen von 100 µl PBS *i.p.* appliziert.

3.4 Therapie Monitoring

Zur Überwachung des Therapieeffekts und des Gesundheitszustands wurden die Versuchstiere in den jeweiligen experimentellen Abschnitten auf verschiedene Kriterien untersucht.

3.4.1 RIP1-Tag2 Versuchstiere

Um eine erhöhte Belastung der RIP1-Tag2 zu vermeiden wurde ein Score Sheet zur besseren Beurteilung des Gesundheitszustands und zur Vermeidung einer unnötig starken Belastung in Zusammenarbeit mit den Tierärzten verfasst.

Score Sheet

Hierzu wurden folgende Kriterien evaluiert:

Änderung im Körpergewicht bezogen auf das Ausgangsgewicht, korrigiert um die erwartete Gewichtszunahme gleichalter, gleichgeschlechtlicher Tiere derselben Linie im Beobachtungszeitraum.

1. Gewicht

Kategorie:

- 0: normal
- 1: < 15 % Gewichtsverlust
- 2: 15 - < 20 % Gewichtsverlust
- 3: \geq 20 % Gewichtsverlust

2. Pflegezustand:

Kategorie:

- 0: Fell glatt, anliegend
- 1: ungepflegtes Fell
- 2: Fell mittelgradig verschmutzt, struppig, verschmutzte Augen
- 3: Fell / Augen hochgradig verschmutzt, Piloerektion

3. Atmung:

Kategorie:

- 0: Normale Atmung
- 1: Atemfrequenz geringgradig erhöht
- 2: Atemfrequenz erhöht, geringgradig verstärkte abdominale Atmung
- 3: Atemfrequenz erhöht, mittelgradig verstärkte abdominale Atmung

4. Verhalten in der Gruppe:

Kategorie:

- 0: normal
- 1: verringerte Bewegung
- 2: Isolation von der Gruppe
- 3: Apathie

5. Blutglukosemessung:

Kategorie:

0:	normaler Wert: 100 – 140 mg/dl
1:	50 – 100 mg/dl
2:	30 – 50 mg/dl
3:	< 30 mg/dl

Folgende Handlungsweisen wurden je nach Stufe durchgeführt:

Stufe 1 = Geringe Belastung: Verantwortliche Person/en informieren. Sorgfältig weiter beobachten. Es sind ggf. Interventionen notwendig (z.B. Wärmezufuhr, Spezialfutter). Bei 3 Symptomen der Kategorie 1 ist von einer mittleren Belastung auszugehen und Anweisungen der Stufe 2 sind auszuführen.

Stufe 2 = Mittlere Belastung: Das Tier ist der verantwortlichen Person vorzustellen. Es sind ggf. Interventionen notwendig (z.B. Analgesie, Antibiotikum, Feuchtfutter).

Bei 2 Symptomen der Kategorie 2 zusammen mit einem Symptom der Kategorie 1 ist eine sofortige Tötung durchzuführen, sodass eine schwere Belastung der Versuchstiere vermieden wird.

Stufe 3 = Humaner Endpunkt: Durch die oben aufgeführten Maßnahmen wird diese Stufe hier nicht erreicht. Alle Tiere werden bereits VOR Eintritt dieses Kriteriums getötet (Entzug aus genehmigten Tierversuchsantrag R6/20G).

3.4.1.1 Gewichtskontrollen

Das Körpergewicht der Versuchstiere wurde (soweit keine Belastung zu beobachten war) zweimal wöchentlich mittels einer digitalen Waage (Ascuro Service GmbH, Lörrach, Deutschland) bestimmt. Zur Gewichtsbestimmung wurde jeweils eine Maus aus ihrem Käfig genommen und auf eine austarierte Messschale gelegt, die sich auf einer digitalen Waage befand.

3.4.1.2 Blutglukosemessungen der RIP1-Tag2 Tiere

Da die Zunahme des Tumorumens bedingt durch das maligne Wachstum der β -Zellen (Hyperplasie der Langerhans-Inseln) eine direkte Vermehrung der Insulinsekretion verursacht und somit der Blutglukosewert parallel sinkt, kann dieser zur Einschätzung des insgesamten Tumorumens herangezogen werden. Zweimal wöchentlich wurde der Blutglukosewert jeweils nach der Gewichtskontrolle bestimmt. Hierfür wurde eine Maus aus dem Käfig genommen und zur Ermöglichung der Entnahme eines Bluttröpfens mittels einer Spritzenkanüle (25 G) in die Schwanzspitze gestochen. Dieser wurde mit einer Glukose-Küvette aufgefangen und in das Blutglukosemessgerät (HemoCue® Glucose 201+ PE, Hitado) installiert. Der Blutglukosewert wurde notiert und in das Score Sheet eingetragen.

3.4.1.3 Humane Endpunkte

Bei Beeinträchtigungen der Tiere (sichtbare Verhaltensänderung, Veränderungen des Fells, Veränderungen des Schlafverhaltens, Gewichtsverlust, Verminderung der Nahrungsaufnahme oder entzündliche Veränderungen des Peritoneums) wurden die im Score Sheet vermerkten Handlungsanweisungen durchgeführt (Wärmezufuhr, Analgesie, Spezialfutter). Beim Feststellen von Anzeichen einer Erkrankung wurde ein Tierarzt zur Kontrolle konsultiert und falls keine adäquate Therapie zur Verfügung gestellt werden konnte, wurde die Versuchsmouse euthanasiert. Gemäß der EU Richtlinie 2010/63/EU Anhang VIII ist die Induktion des endogenen Inselzellkarzinoms einer mittleren Belastung zuzuordnen. Somit wurden die Versuchsmäuse noch vor Überschreitung einer mittleren Belastung euthanasiert. Zusätzlich zu den im Score Sheet festgelegten humanen Endpunkten, wurden folgende weitere humane Endpunkte definiert, die zur sofortigen Euthanasie der Versuchstiere führten: Anhaltender Durchfall von mehr als einem Tag, Akkumulation von Aszites im Bauchraum oder eine Hypertrophie der Milz, sowie anale Blutungen (modifizierter Auszug aus dem genehmigten Tierversuchsantrag R6/20G).

3.4.2 OVA-B16 und OVA-MC38 tragende Versuchstiere

OVA-B16 bzw. OVA-MC38 Tumorzellen wurden in weibliche ^{NFKB}Luc-Reportermause inokuliert. Zur Überprüfung und Monitoring des Gesundheitszustands sowie zur

Bestimmung der Therapieeffizienz wurden nach Anwachsen des Tumors die folgenden Parameter täglich erfasst:

3.4.2.1 Gewichtskontrollen

Die Bestimmung des Körpergewichts erfolgte wie unter **3.4.1.1** beschrieben. Das Körpergewicht der Versuchstiere wurde (soweit keine Belastung zu beobachten war) zweimal wöchentlich mittels einer Waage bestimmt.

3.4.2.2 Tumolvolumenbestimmung

Das Tumolvolumen wurde täglich nach Tumorinokulation mittels eines digitalen Messschiebers (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) gemessen. Hierbei wurde in zwei Dimensionen (die Länge und Breite) gemessen und das Volumen wurde mit folgender Formel berechnet: $Tumolvolumen = \frac{Länge \cdot Breite^2}{2}$

3.4.2.3 Humane Endpunkte

Folgende Kriterien wurden als Abbruchkriterien in den Studien definiert: Ein Versuchstier, das einen Tumordurchmesser von 15 mm überschreitet, wird unmittelbar aus dem Versuch genommen und euthanasiert. Des Weiteren erfolgte die sofortige Tötung des Tieres bei Auftreten von Verhaltensänderungen, Atembeschwerden bzw. starker Zunahme der Atemfrequenz, einem Gewichtsverlust von 20 % (verglichen mit dem Ausgangsgewicht, korrigiert um die zu erwartende mittlere Gewichtszunahme des jeweiligen Versuchstieres) und einem anhaltenden Durchfall (Auszug aus genehmigten Tierversuchsantrag R1/16).

3.5 Ex vivo Analysen

Die Tötung der Versuchstiere erfolgte strikt nach dem Eintreten der humanen Endpunkte bzw. am jeweiligen Versuchsende. Hierzu wurden die Versuchstiere in einer CO₂-Kammer eingeschläfert und anschließend eine zervikale Dislokation durchgeführt. Im Anschluss wurde u.a. Blut und selektiv Organe (Tumor, Milz, drainierende und nicht-drainierende Lymphknoten) entnommen und für die ex vivo Analysen zur aufgearbeitet.

3.5.1 Retrobulbäre Blutentnahme bei RIP1-Tag2 Versuchsmäusen

Zur Gewinnung von Vollblut bzw. Blutserum, welches bei den RIP1-Tag2 Versuchsmäusen zum Nachweis viraler HSV-1 DNA bzw. des von Virus infizierten Zellen produzierten GM-CSF (Biomarker des OncoVEX) erfolgte, wurden die Versuchsmäuse zunächst unter Isoflurananästhesie (1,5 Vol. % gemischt mit 100 % O₂) in einer Wärmebox narkotisiert. Danach wurde eine kleine Glaskapillare im medialen Augenwinkel der Versuchstiere platziert. Unter leichter Rotation und leichtem Druck und wurde der retro-orbitale Sinus aufgebrochen, sodass das Blut durch die Kapillare in eine vorbereitete EDTA-Microvette (CB 300, Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland) gesammelt werden konnte. Es wurden hierbei maximal 100 µl Blut gewonnen. Die Blutproben wurden nach Entnahme sofort auf Eis gelegt. Die Blutentnahme am Auge erfolgte wechselseitig (re. bzw. li.). Die Prozedur erfolgte nach den Regeln des *Institutional Animal Care and Use Committee* (IACUC).

3.5.2 Organisololation

Die Euthanasie und die Präparation zur Organentnahme der Versuchstiere erfolgte wie unter **3.1.1.2** beschrieben.

3.5.2.1 RIP1-Tag2 Versuchstiere

Die intestinalen Organe wurden nach rechts geklappt, um dorsal des Pankreas den pankreatischen Lymphknoten (pLK) zu isolieren. Anschließend wurde das Pankreas vorsichtig von der Milz und dem Duodenum getrennt. Zuerst wurde das Pankreas und dann die Milz isoliert. Die Präparation musste aufgrund der starken *postmortalen* autolytischen Aktivität des Pankreas so schnell wie möglich erfolgen.

3.5.2.2 OVA-B16 und OVA-MC38 tragende Versuchstiere

Zunächst wurde der Tumor an der rechten Schulter, dann die rechten (drainierenden) und linken (nicht-drainierenden) axillären und brachialen Lymphknoten und im Anschluss die Milz isoliert. Zuletzt wurde das *Femur* (links und rechts) präpariert und distal des *Caput femoris* getrennt und mithilfe einer Spritze inklusive Spritzenkanüle (25 G) mit ca. 3 – 5 ml FACS Puffer in ein 50 ml Falconröhrchen gespült.

3.5.3 Histologie

Nach der Organisolation wurden diese zunächst in Formalin (4,5 %) fixiert und anschließend mittels Entwässerungsautomat (Leica TP1020, Biosystems Switzerland AG) in steigender Alkoholkonzentration (2x 70 %, 2x 96 %, 2x 100 %; SAV, Liquid Production GmbH, Flintsbach am Inn, Deutschland) entwässert und am Ende in Xylol (SAV, Deutschland) zwischengelagert. Daraufhin wurden die Organproben in flüssiges Paraffin gelegt und in einem Wärmeschrank (Bachofer Laboratoriumsgerät, Reutlingen, Deutschland; bei 60 °C) getrocknet. Mithilfe des Paraffingeräts mit integriertem Paraffinspender (Leica EG 1150 C, Buffalo Grove, Vereinigte Staaten) wurden die Organe in flüssigem Paraffin eingegossen. Daraufhin erfolgte eine Kältebehandlung zur Verhärtung der Paraffinblöcke. Diese wurden im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Leticia Quintanilla-Martinez de Fend (Institut für Allgemeine und Molekulare Pathologie, Universitätsklinikum Tübingen) von der Pathologie in 5 µm dünne Paraffinschnitte geschnitten, gefärbt und mikroskopisch analysiert.

3.5.3.1 Hämatoxylin- und Eosin (H&E) Färbung

Es erfolgte zunächst eine 15-minütige Entparaffinierung der 5 µm Paraffinschnitte in Xylol (SAV, Deutschland). Daraufhin wurden die Paraffinschnitte jeweils für eine Minute in absteigender Alkoholkonzentration (2x 100 %, 2x 96 %, 2x 70 %; SAV, Deutschland) entwässert und anschließend in destilliertem Wasser zwischengelagert. Nach einer 12-minütigen Trockenzeit wurden die Schnitte jeweils 2x in Xylol gewaschen und erneut in absteigender Alkoholkonzentration entwässert (100 %, 96 %, 70 %). Daraufhin wurden die Schnitte für 30 s in destilliertes Wasser gelegt wonach sie für insgesamt 10 min in eine Hämatoxylin-Lösung (2,5 g Hämatoxylin, 2,5 l destilliertes Wasser, 0,5 g Natriumjodat, 125 g Chloralhydrat, 125 g Aluminiumkaliumsulfat und 2,5 g Zitronensäure) getränkt wurden. Es folgte eine 10-minütige Waschung in Leitungswasser. Anschließend wurden die Paraffinschnitte für 30 s in einer Eosin-Lösung (Merck) angefärbt. Daraufhin wurden die Schnitte für 10 s in Leitungswasser gelegt, um das nicht gebundene Eosin abzuwaschen. Zum Schluss erfolgte für 1 min die Entwässerung der Schnitte in ansteigender Alkoholkonzentration (70 %, 96 %, 100 %) wonach diese für 4 min in Xylol gelegt wurden.

3.5.3.2 Immunhistochemische Färbung

T-Zellen (CD3) und B-Zellen (B220) wurden immunhistochemisch an spezifische monoklonalen Primär-AK gebunden und mittels Sekundär-AK visualisiert. Hierzu wurden 5 µm Paraffinschnitte in frischem Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe (100 %, 95 %, 80 %) für jeweils 8 min inkubiert und anschließend in Leitungswasser gewaschen. Verbliebendes Paraffin wurde mittels einer zehn-minütiger Inkubation in Methanol-Peroxid (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, Vereinigte Staaten) abgewaschen. Anschließend wurden die Schnitte 20 bis 30 Minuten in einer 0,01 M Citrat-gepufferten Lösung erhitzt und daraufhin für zwei Stunden in Tris-Puffer (5 % FCS) inkubiert. Die Schnitte wurden anschließend für sechs Stunden mit den Primär-AK inkubiert (CD3, Thermo Fisher und B220, BD Biosciences) und daraufhin 10 Mal in Tris-Puffer gewaschen. Die Inkubation mit dem Sekundär-AK erfolgte mittels automatisiertem „Immunostainers“ (Ventana, Tucson, AZ, Vereinigte Staaten) nach dem Herstellerprotokoll unter Gebrauch des BasicDAB oder iVIEW DAB Detektionskits.

3.5.4 Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Immunfluoreszenzmikroskopie erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Schaller. Zu Beginn wurden 5 µm dünne Kryoschnitte mit Perjodat-Lysin-Paraformaldehyd (Sigma-Aldrich) fixiert. Danach wurden die Kryoschnitte 5 min in PBS gewaschen und 5 – 10 min in Waschpuffer gelagert. Daraufhin folgte die Blockade freier Bindungsstellen mittels 1:20 verdünntem Eselsserum (Sigma-Aldrich). Folglich wurden die Kryoschnitte in verdünnten Lösungen der spezifischen Primärantikörper eine Stunde lang inkubiert und danach dreimal in Waschpuffer gewaschen. Nach dem Waschvorgang wurden die Kryoschnitte in einer verdünnten Lösung des Sekundärantikörpers bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten drei weitere Waschschritte. Daraufhin wurden die Zellkerne für 5 min bei Raumtemperatur in einer in PBS verdünnten (1:2000) DAPI-Lösung (Sigma-Aldrich, D9542, 033M4064 – 78) gefärbt und danach 5 min in PBS gewaschen. Schließlich wurden die Schnitte auf einem Objektträger fixiert und mit einem konfokalen Lasermikroskop (LSM 800; Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, DE) untersucht und mit der Software ZEN 2.3 (Carl Zeiss) analysiert.

Primärantikörper	Hersteller
anti-HSV-1	Novusbio, NB120-9533, lot p564-NB
anti-Insulin	Genetex, GTX27842, lot822102563
anti-Ki67	Abcam, ab15580, lot GR3278/47-1 – 39
anti-CD3	DCS, # C1597C01, lot H 691
anti-CD4	R&D Systems, AF554, EPE0217091 – 156
anti-CD8	Abcam, ab217344, lot GR3366917 - 186
anti-Iba-1	Abcam, ab178846, lot GR3235737-15 – 168
anti-F4/80	Abcam ab 186073, lot Gr 207473-34 – 155
CD45R	eBioscience, 53-0452-82, lot 2452726

3.5.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie, auf Englisch „*Fluorescent activated cell sorting – FACS*“ ermöglicht die Analyse der Expression von Oberflächenproteinen (CDs, 1.1.2) verschiedener Zellpopulationen.

Um die Detektion von Oberflächenproteinen zu gewährleisten werden antigenspezifische monoklonale AK, die an Fluorochrome gekoppelt sind, verwendet. Diese spezifischen monoklonalen AK binden an die Membranproteine und können so mittels Durchflusszytometers detektiert werden. Mittels verschiedener Laser, welche jeweils in einem Mikrokanal angeordnet sind, werden im Durchflusszytomter die Fluorophor-monoklonale-AK-Zell-Komplexe erfasst. Die Fluorophore werden mit spezifischen Lasern angeregt, sodass die optischen Signale mittels verschiedener Photodioden detektiert und in elektrische Signale umgewandelt und somit analysiert werden können.

Die Größe und die Granularität einer einzelnen Zelle werden über die Lichtbrechung bestimmt: Für die Größe wird das Vorwärtsstreulicht (engl.: *forward scatter*, FSC) und für die Granularität das Seitwärtsstreulicht (engl.: *side scatter*, SSC) verwendet. Für diese Dissertation wurde das Durchflusszytometer des Typs LSR-II (BD® Biosciences, San José, CA, Vereinigte Staaten; max. 8 Farben) angewandt.

3.5.5.1 Aufarbeitung der Proben

Nach der Isolation wurden die frisch isolierten Organe durch ein 70 µm Sieb mittels eines 1 ml Spritzenkolben in ein 50 ml Falconröhrchen mit 2-prozentigem FCS-PBS Medium (FACS Puffer) gepresst und unmittelbar auf Eis gelagert. Die Milz und das Blut wurden zur Lyse der Erythrozyten mit 1,5 ml ACK-Lysepuffer behandelt und für 5 min inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen mit 10 ml FACS-Puffer einmal gewaschen (Zentrifugation für 5 min unter 1.200 rpm bei 4°C). Anschließend wurden die Zellen durch ein weiteres Sieb (40 µm) in das Analyseröhrchen (engl.: „Bluecap“) gepresst. In diesem erfolgte dann die Färbung der Zellsuspension mit dem vorbereiteten „AK-Cocktails“ in 50 µl PBS für 20 min bei 4 °C im Dunkeln. Abschließend wurden die Proben zweimal mit dem FACS Puffer gewaschen.

Folgende „AK-Cocktails“ wurden verwendet:

CD8 ⁺ T-Zelldepletion	
Zellpopulation	Fluorochrom
CD45 ⁺ Zellen	Pacific Blue
CD3 ⁺ T-Zellen	PE
CD4 ⁺ T-Zellen	PE-Cy7
CD8 ⁺ T-Zellen (clone: 53-6.7)	FITC

Kombinierte Viro-Immuntherapie RIP1-Tag2	
Zellpopulation	Fluorochrom
Zellviabilitätsmarker	7AAD
CD45 ⁺ Zellen	APC-Cy7
CD4 ⁺ T-Zellen	APC
CD8 ⁺ T-Zellen	PE-Cy7
TAG-TCR	PE

Kombinierte Viro-Immuntherapie RIP1-Tag2 „Myeloides Panel“

Zellpopulation	Fluorochrom
CD45 ⁺ Zellen	Pacific Orange
CD3 ⁺ T-Zellen	Pacific Blue
CD19 ⁺ B-Zellen	APC-Cy7
Granulozyten (CD11b)	PE-Cy7
Makrophagen (F4/80)	APC

Kombinierte Viro-Immuntherapie RIP1-Tag2 „T-Zell Panel“

Zellpopulation	Fluorochrom
CD45 ⁺ Zellen	Pacific Orange
CD3 ⁺ T-Zellen	APC-Cy7
CD4 ⁺ T-Zellen	APC
CD8 ⁺ T-Zellen	PE
PD-1 Immuncheckpoint	FITC

Kombinierte Viro-Immuntherapie RIP1-Tag2

Zellpopulation	Fluorochrom
CD45 ⁺ Zellen	Pacific Orange
CD3 ⁺ T-Zellen	Pacific Blue
CD4 ⁺ T-Zellen	APC-Cy7
CD8 ⁺ T-Zellen	PE-Cy7
CD25 ⁺ Zellen	APC
Aktivierungsmarker (CD69)	FITC
TAG-TCR	PE

Kombinierte Immuntherapie ^{NFκB} Luc-Reportermaus	
Zellpopulation	Fluorochrom
Zellviabilitätsmarker	7AAD
CD4 ⁺ T-Zellen	APC
CD8 ⁺ T-Zellen	APC-Cy7
CD19 ⁺ B-Zellen	Pacific Blue
Aktivierungsmarker (CD69)	FITC

3.5.5.2 Analyse der Daten der Durchflusszytometrie

Die Analyse erfolgte mit Hilfe des Programms FlowJo, (LCC, Ashland, OR, Vereinigte Staaten). Als Erstes wurde die Größe der Zellpopulation (FSC Signal) gegen dessen Granularität (SSC Signal) in einem Dot-Plot-Diagramm gegenübergestellt, um die Lymphozytenpopulation zu erfassen. Anschließend wurde ein Rahmen „engl.: *gate*“ eingezeichnet und in einem neuen Dot-Plot-Diagramm die sich außerhalb dieses *gates* befindlichen Zell-Dubletten ausgeschlossen. Im Weiteren wurde (wenn vorhanden) der Zellviabilitätsmarker 7AAD untersucht um mit Hilfe eines weiteren *gates* ausschließlich die lebenden Zellen zu erfassen. Als Nächstes wurde die Lymphozytenpopulation mittels CD45⁺ definiert und daraufhin die T-Zellpopulationen CD4⁺, CD8⁺ und die B-Zellpopulation CD19⁺ erfasst. In diesen Gates wurde der Aktivierungsmarker CD69 bestimmt. Zusätzlich wurden T_{Regs} mittels CD25 definiert. Der Gebrauch von Einzelfärbungen wurde zur Quantifizierung der Fluoreszenzsignale genutzt.

3.6 Präklinische Bildgebung

3.6.1 *In vitro* cell uptake assay

Hierzu wurden drei verschiedene Tumorzelllinien (OVA-B16, OVA-MC38, und RIP1-Tag2 Tumorzellen) analysiert. Von jeder Tumorzelllinie wurden 10^6 Tumorzellen in jeweils ein Well eine 6-Well Flachbodenplatte überführt und über Nacht in 10 ml des jeweiligen Mediums bei 37 °C im Inkubator bei 5 % CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Tumorzellen mit drei verschiedenen Viruskonzentrationen (engl.: *multiplicity of infections*, MOIs) infiziert: niedrige MOI: 0,1; mittlere MOI: 1,0; höchste MOI: 5,0; mit jeweils OncoVEX und T-VEC infiziert. Nach einer Inkubation von 24 h wurden die Tumorzellen mit 4 MBq (0,4 MBq/ml) ¹⁸F-FHBG für jeweils 60 min und 120 min inkubiert. Folglich wurde das Tumorzellhomogenisat zweimal mittels MultiScreen[®]HTS Vakuumfiltrationssystem (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) gewaschen, um das nicht gebundene ¹⁸F-FHBG zu entfernen. Abschließend wurde die Radioaktivität mittels γ -counters bestimmt (**Abbildung 15**).

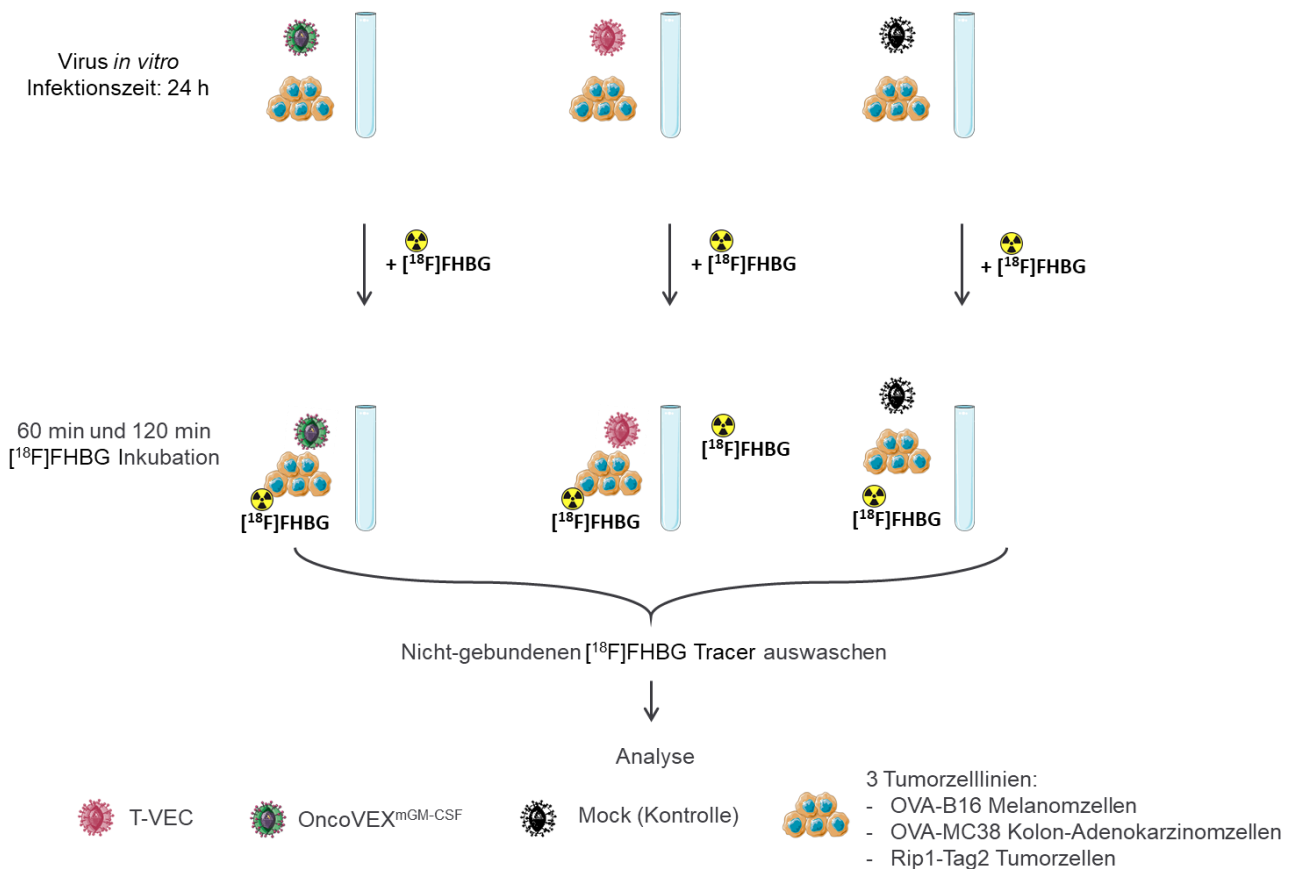


Abbildung 15: Schematische Illustration des *in vitro* ¹⁸F-FHBG Aufnahme Assays. 10⁶ Tumorzellen der OVA-B16 Melanomzellen, OVA-MC38 Kolon Adenokarzinomzellen und RIP1-Tag2 Inselzellkarzinomzellen wurden in 6-Well Platten ausgesät und über Nacht unter 37 °C im Inkubator inkubiert. Die Tumorzellen wurden mit zwei verschiedenen Viren (murines OncoVEX, humanes T-VEC) und einer Mock Kontrolle (leere Virushülle) in verschiedenen Konzentrationen für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Tumorzelllinien für 60 min und 120 min mit ¹⁸F-FHBG inkubiert und anschließend zwei Mal mithilfe des MultiScreen[®]_{HTS} Vakuumfiltrationssystems (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) gewaschen. Das in den Tumorzellen irreversibel gebundene ¹⁸F-FHBG wurde mittels γ -Counter-Messung erfasst und quantifiziert.

3.6.2 Allgemeine Vorbereitungen der Versuchstiere für die ¹⁸F-FHBG-PET/MRT Untersuchung

Für die *in vivo* ¹⁸F-FHBG-PET Analysen wurden drei RIP1-Tag2 Mäuse, eine nicht-behandelte RIP1-Tag2 Maus und drei C3H Mäuse im Alter von 10 Wochen untersucht. Den Versuchsmäusen wurde einmalig OncoVEX 5 x10⁶ PFU mittels *i.p.* Injektion verabreicht. Drei Tage später erfolgte die kombinierte ¹⁸F-FHBG-PET/MRT Messung

(Siemens Preclinical Solutions, Knoxville, TN, Vereinigte Staaten /Bruker Biospin, Ettlingen, DE). Hierzu wurden alle Versuchstiere mittels Isoflurananästhesie (1,5 Vol. % gemischt mit 100 % O₂) in einer Wärmebox narkotisiert und die Augen mit einem Augengel (Corneregel, Gerhard Mann GmbH, Berlin, DE) zum Schutz vor dem Austrocknen behandelt. Unter Narkose wurden die Versuchstiere zur Tracerinjektion auf eine Wärmematte platziert. Hierbei wurde ein Katheter aus einer Einwegspritzenkanüle (30 G) und einem Schlauch aus Polyethylen angefertigt. Anschließend wurde ¹⁸F-FHBG in 0,9 % NaCl (vermischt mit 0,8 U/ml Heparin) verdünnt und ein Gesamtvolumen von 50 µl intravenös (*i.v.*) injiziert. Daraufhin wurde jeder Versuchsmaus jeweils 2 MBq ¹⁸F-FHBG mittels einer Insulinspritze (20 U) *i.v.* injiziert und mit ca. 20 µl NaCl nachgespült. Nach der ¹⁸F-FHBG Injektion wurden die Versuchstiere in den Heimkäfig überführt, nach einem dreistündigen Uptake (im Wachzustand) entnommen und erneut als Vorbereitung für die PET Untersuchung mit Isofluran narkotisiert. Hiernach erfolgte die ¹⁸F-FHBG-Positronen-Emissions-Tomographie. Die Versuchsmäuse wurden im Anschluss auf einer PET/MRT kompatiblen Liege aus Polymethylmethacrylat (PMMA; Bruker Biospin, Ettlingen, DE) unter Isoflurananästhesie (1,5 Vol. % gemischt mit 100 % O₂) fixiert, bevor ein 20-minütiger statischer PET Scan zur funktionellen Untersuchung der ¹⁸F-FHBG Anreicherung in OncoVEX infizierten RIP1-Tag2 Inselzellkarzinomen erfolgte. Unmittelbar nach Beendigung des PET-Scans wurden die Versuchstiere auf der PET/MRT kompatiblen Liege zum MRT gebracht und es erfolgte die ¹⁸F-FHBG-PET-Magnetresonanztomographie. Zur anatomischen Co-Lokalisation wurde ein T₂-gewichteter MRT Ganzkörper-Scan mit Fokus auf die Pankreas-Region angefertigt. Zunächst wurde ein Messprotokoll zur Lokalisierung der Versuchsmaus verwendet – der „*Localizer*“. Hiermit kann die Position der Versuchsmaus erfasst werden. Die Präzision der MRT Messung lag vor allem auf dem gastrointestinalen Bereich zur Erfassung des Pankreas inklusive der Inselzellkarzinome. Um ein Atmungs-Artefakt (durch das Heben und das Senken des Thorax) zu verringern, wurde eine Atemsonde unterhalb des Thoraxbereichs angebracht. Mittels einer *Gating*-Kontrolleinheit wurde ausschließlich im Zeitraum zwischen den Atemimpulsen gemessen – „*Triggering*“. Zur anatomischen Visualisierung wurde das T₂-gewichtete „3D Turbo Spin Echo“ gewählt.

Die Atmung wurde sowohl während der PET als auch MRT Untersuchung mit einer Atemsonde überwacht.

3.6.3 Optische Bildgebung

3.6.3.1 Technische Informationen zur optischen Bildgebung und Analyse

Für die *in vivo* Untersuchungen wurde das IVIS[®] Spectrum OI System (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim, Germany) verwendet. Zum Zwecke der Sensitivitätserhöhung und zur Reduktion des thermischen Rauschens wird die CCD-Kamera auf -90 °C gekühlt. Das IVIS System umfasst eine lichtundurchlässige Dunkelkammer und eine Epi-Illumination zur Visualisierung des Biolumineszenz Signals. 28 Filter (430 – 850 nm) unterstützen die Erkennung des Signals innerhalb eines 23 cm großen, quadratischen Felds, auf dem bis zu 5 Versuchsmäuse gleichzeitig (in Isoflurananästhesie, 1,5 Vol. % gemischt mit 100 % O₂) gemessen werden können. Die anschließende Analyse wurde mit der Software *Living Image Software* (Perkin Elmer, Waltham, Vereinigte Staaten) durch das Einzeichnen der *Regions of Interest* (ROIs) durchgeführt. ROIs wurden für den Tumor und das Knochenmark eingezeichnet. Es erfolgte jeweils eine semi-quantitative Analyse der *average radiance* (mittlere Strahlungsemission; Photonen pro Sekunde pro cm² pro Steradianen; p/s/cm/sr) der emittierten Luciferase Aktivität 5 min. nach *i.p.* Injektion des Luciferins.

3.6.3.2 Allgemeine Vorbereitung für die optische Bildgebung

Die Versuchstiere wurden drei Tage vor Tumorinokulation mittels Isoflurananästhesie (1,5 Vol. % gemischt mit 100 % O₂) narkotisiert und die Augen mit Augensalbe (Corneregel[®], Bausch & Lomb, Berlin, Deutschland) benetzt. Unter Narkose folgte die Rasur mit einem Kurzhaarschneider und die anschließende Enthaarung der inguinalen, zervikalen sowie dorsalen Areale (zur Prävention der Absorption des Biolumineszenzsignals durch das Fell) mittels Veet[®]-Enthaarungscreme (Reckitt Benckiser, Slough, UK). Anschließend wurden die Versuchsmäuse wieder in die Heimkäfige zurückgesetzt.

3.6.3.3 Durchführung der Messung

Zur Visualisierung der NFκB Aktivitätsorte der ^{NFκB}Luc-Reportermäuse wurden diese jeweils 5 Minuten vor Beginn des Scans mit 75 mg/kg Luciferin *i.p.* injiziert. Es wurden ein bis maximal fünf Versuchsmäuse auf der beheizten Plattform (37 °C) unter Isoflurananästhesie (1,5 Vol. % gemischt mit 100 % O₂) positioniert. Es wurden je zwei Aufnahmen durchgeführt: a) dorsal (auf dem Bauch liegend) und b) ventral (auf dem Rücken liegend). Fokus dieser Untersuchung ist die NFκB Aktivierung im Tumor als auch im Knochenmark (**Abbildung 16**). Folgende Einstellungen wurden zur optischen Bildgebung verwendet:

Binning: Medium, F-Stop: 1, Foto Belichtung: Auto und verschiedene Belichtungszeiten von 1 s, 2 s, 5 s, 10 s, 30 s und 60 s.

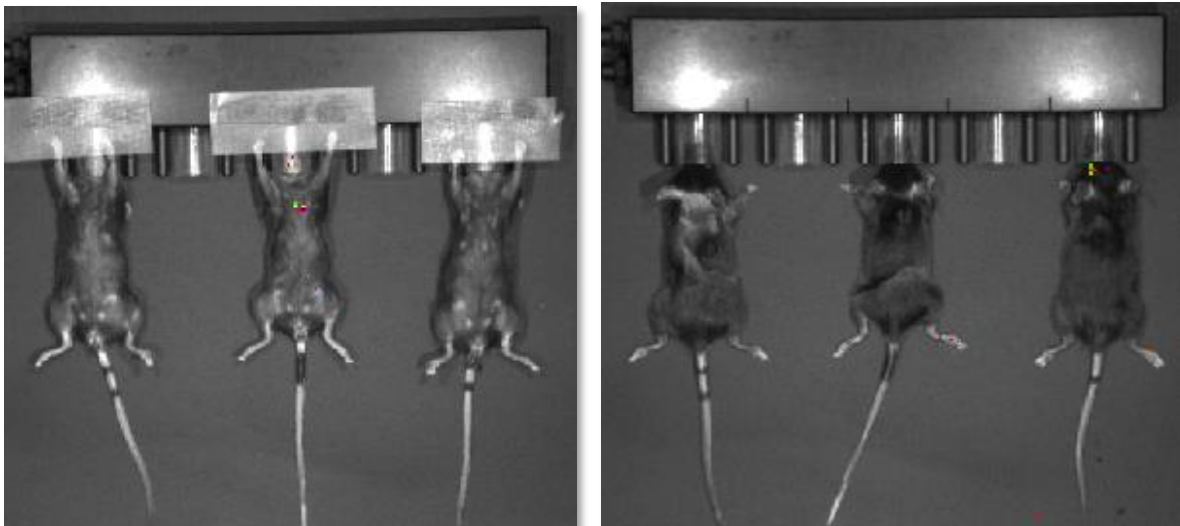


Abbildung 16: Visualisierung der Positionierung der Versuchstiere in der Dunkelkammer zur Erfassung der NFκB Aktivierung im Tumor als auch im Knochenmark; Rückenlage (links) und Bauchlage (rechts).

3.7 Statistische Analyse

Die Resultate der relativen Blutglukosekurven der RIP1-Tag2 Mäuse unter der kombinierten Viro-Immuntherapie wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts („Standard Error of the Mean“, SEM) dargestellt. Für den Vergleich von unabhängigen Stichproben wurde der initiale rBGW (100 %) mit dem Mittelwert des rBGW zu einem definierten Zeitpunkt mittels ungepaartem parametrischem T-Test

verglichen. Ebenso wurde der ungepaarte parametrische T-Test für den Vergleich einer Zellpopulation zwischen 2 Behandlungsgruppen verwendet. Für den Vergleich der rBGW des insgesamten Behandlungszeitraums von 2 Behandlungsgruppen wurden zunächst die Flächen unter den Kurven beider Gruppen (*Area under the curve*, AUC) berechnet und diese dann mittels parametrischem T-Test miteinander verglichen. Das relative Tumolvolumen der OVA-B16 und OVA-MC38 tragenden ^{NFκB}Luc-Reportermause und die S.I. (Optische Bildgebung) wurden ebenfalls zu einem definierten Zeitpunkt mittels ungepaartem parametrischem T-Test miteinander verglichen.

Für den Vergleich des medianen Überlebens wurde der Log-rank (Mantel-Cox) Test benutzt.

Für den Vergleich der rBGW innerhalb 3 verschiedener Behandlungsgruppen wurde die AUC berechnet und die Mittelwerte mittels einfaktoriellem ANOVA verglichen. Zur Korrektur für Mehrfachtestungen wurde jeweils eine Bonferroni-Korrektur des Signifikanzniveaus angewendet. Der Vergleich der relativen Anzahl einer definierten Zellpopulation innerhalb 3 Behandlungsgruppen wurde ebenfalls mittels einfaktoriellem ANOVA mit einer Bonferroni-Korrektur verglichen.

Für den Vergleich von mehreren Zellpopulationen (≥ 2) zwischen 2 oder 3 Behandlungsgruppen wurde der zweifaktorielle ANOVA gefolgt von einer Bonferroni-Korrektur herangezogen. Die in den Experimenten gebrauchten statistischen Analysen sind unter den jeweiligen Abbildungen beschrieben. Falls nicht explizit erwähnt, wurden Werte von $p < 0,05$ als statistisch signifikant bestimmt. Für die statistische Auswertung wurde die Software GraphPad Prism Version 9.3.1 (GraphPad Software, Inc., San Diego, Kalifornien, Vereinigte Staaten) genutzt.

Tabellarische Zusammenfassung der verwendeten statistischen Tests:

Log-rank (Mantel Cox)	Ungepaarter parametrischer T-Test	Einfaktorieller ANOVA + Bonferroni Korrektur	Zweifaktorieller ANOVA + Bonferroni Korrektur
Medianes Überleben	rBGW (ein Zeitpunkt)		
	AUC von rBGW (Verlauf zwischen 2 Gruppen)	AUC von rBGW (Verlauf zwischen 3 Gruppen)	
	FACS (1 Zellpopulation + 2 Gruppen)	FACS (1 Zellpopulation + 3 Gruppen)	FACS (2 oder mehr Zellpopulation + 3 Gruppen)
	Relatives Tumervolumen (ein Zeitpunkt)		
	S.I. (ein Zeitpunkt)		

4. Resultate

Die Wirksamkeit der Immuntherapie basierend auf Tag-spezifischen T_{H1}-Zellen wurde im RIP1-Tag2 Tumormausmodell bereits von der AG Röcken (Hautklinik, Universitätsklinikum Tübingen) grundlegend untersucht [240]. Hierbei wurden in einem protektiven Ansatz fünf Wochen alte RIP1-Tag2 Versuchsmäuse (♀) *i.p.* mit Tag-T_{H1} Zellen behandelt, wodurch ein permanenter Wachstumsarrest in den RIP1-Tag2 Tumoren induziert wurde. In diesem Alter befinden sich die RIP1-Tag2 Tumore noch in einem hyperplastischen Stadium. Im Alter von 8 Wochen erfolgt der sogenannte *angiogenic switch*. Infolgedessen entwickeln sich in der 10. Lebenswoche kleine solide Tumore. Anhand des gesunkenen Blutglukosewerts lässt sich die Tumorprogression indirekt messen. Des Weiteren lassen sich Inselzellkarzinome bereits mittels MRT nicht-invasiv *in vivo* darstellen [241]. In einer weiteren Studie wurden RIP1-Tag2 Versuchsmäuse mit fortgeschrittenem Tumorstadium im Alter von 10 bis 11 Wochen mit einer kombinierten Immuntherapie bestehend aus Tag-T_{H1} Zellen und den Immun-Checkpoint-blockierenden AK anti-PD-L1 und anti-LAG-3 therapiert. Diese kombinierte Immuntherapie konnte die Therapieeffizienz im Vergleich zu der Solotherapie signifikant steigern. Zudem wurde keine signifikante Tumorprogression im Versuchszeitraum von ca. 3,5 Wochen registriert [242].

Im Rahmen der kombinierten Immuntherapie sollte nun in RIP1-Tag2 Versuchsmäusen der Einfluss der CD8⁺ T-Zellen auf die Therapieeffizienz untersucht werden. Hierzu wurden die CD8⁺ T-Zellen mittels CD8 AK vollständig depletiert.

4.1 Der Einfluss von CD8⁺ T-Zellen auf die Therapieeffizienz einer kombinierten Immuntherapie im fortgeschrittenen murinen Inselzellkarzinommodell

4.1.1 Validierung der CD8⁺ T-Zell Depletion

Zur Validierung der CD8⁺ T-Zell Depletion wurde ein Vorversuch initiiert, in dem C3H Wildtyp Mäuse mit CD8 depletierenden AK mittels *i.p.* Applikation behandelt wurden. Initial wurden 500 µg und für die Folgeinjektionen 200 µg des anti-CD8 AKs appliziert, um eine vollständige systemische Saturierung zu erzielen. Es wurde initial vor und jeweils wöchentlich nach der CD8 AK-Applikation eine Analyse des Blutes mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Das Blut wurde mittels retrobulbärer Blutentnahme gewonnen. Nach einer vier-wöchigen anti-CD8 AK-Applikation wurden die Versuchsmäuse eingeschläfert und die inguinalen, abdominalen, brachialen und zervikalen Lymphknoten sowie die Milz und das Blut zur Untersuchung der Anwesenheit von CD8⁺ T-Zellen isoliert. Die Analyse wurde mittels Durchflusszytometrie durchgeführt (**Abbildung 17**).

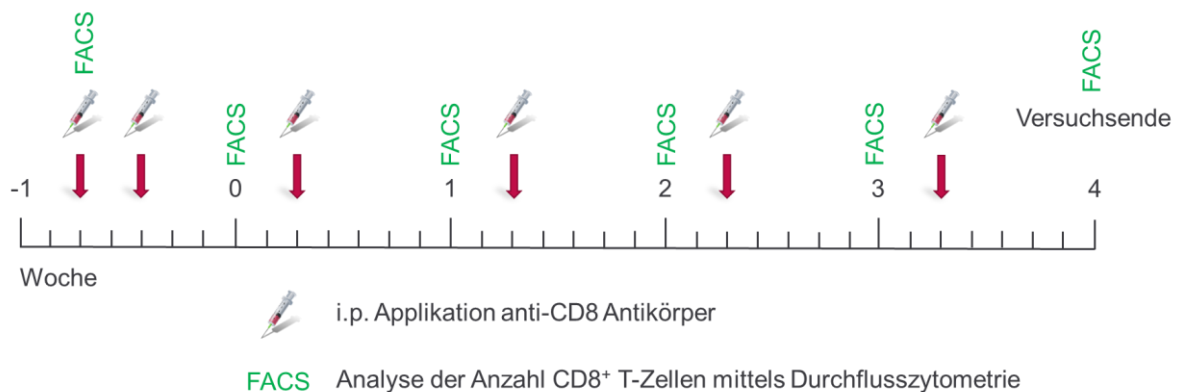
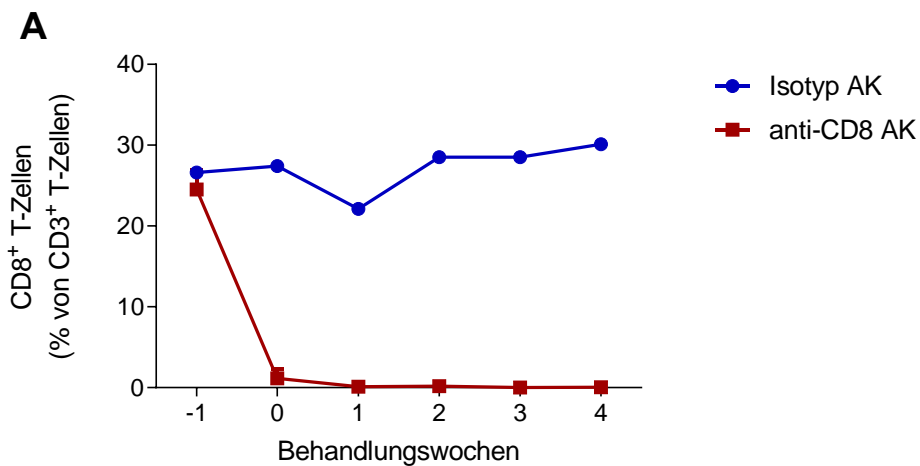


Abbildung 17: Versuchsschema zur Validierung der CD8⁺ T-Zell Depletion. C3H Wildtyp-Mäuse wurden mit einer *i.p.* Injektion von anti-CD8 AK (n = 2) bzw. mit Isotyp AK (n = 1) zur Depletion endogener CD8⁺ T-Zellen behandelt. Initial wurden 500 µg anti-CD8 AK in einem Volumen von 200 µl und für die Folgeinjektionen 200 µg in einem Volumen von 100 µl appliziert. Zur Analyse der Anwesenheit von CD8⁺ T-Zellen im zeitlichen Verlauf wurde repetitiv retrobulbäres Blut gewonnen und im Anschluss mittels Durchflusszytometrie analysiert. Zusätzlich erfolgte am Versuchsende die Analyse des Blutes, der Lymphknoten und der Milz zur Validierung der erfolgreichen CD8⁺ T-Zell Depletion mittels Durchflusszytometrie.

Die relative Anzahl der CD8⁺ T-Zellen im Blut betrug zu Beginn der Analyse 22 – 27 % gemessen an der Gesamtzahl CD3⁺ T-Zellen. Der Mittelwert der CD8⁺ T-Zellen betrug initial 24,5 % und verringerte sich nach zwei anti-CD8 AK Applikationen auf 2,3 %. Nach der dritten anti-CD8 AK Applikationen wurde eine nahezu vollständige Depletion der CD8⁺ T-Zellen erzielt (**Abbildung 18A**; 0,210 %). Die Bestimmung der CD8⁺ T-Zellen im Blut, in den Lymphknoten und in der Milz nach vierwöchiger Applikation der anti-CD8 AK bestätigte eine beinahe vollständige Depletion der CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zur Isotyp-Behandlungsgruppe (Blut: 30,10 % vs. 0,04 %; Lymphknoten: 24,80 % vs. 0,45 %; Milz: 20,30 % vs. 0,23 %; dargestellt als Quotient: CD8⁺ T-Zellen/CD3⁺ T-Zellen) (**Abbildung 18B + C**).



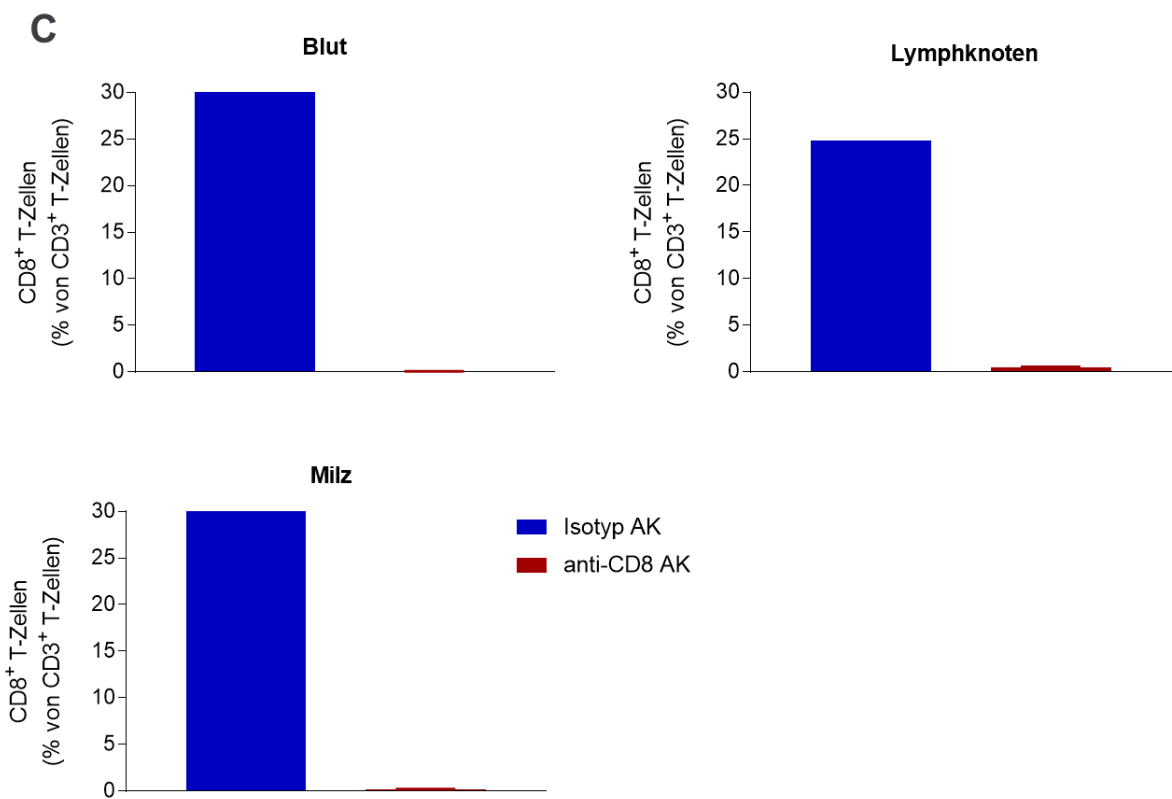
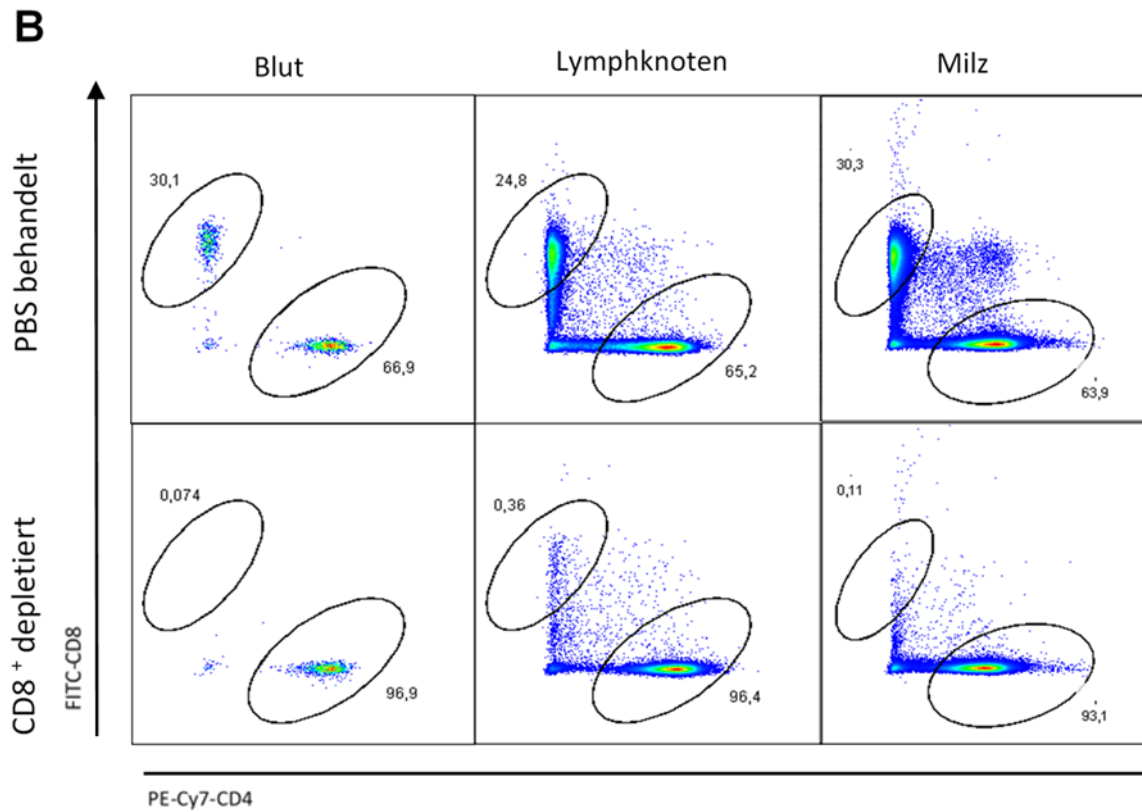


Abbildung 18: Monitoring der Depletion von CD8⁺ T-Zellen mittels Durchflusszytometrie. Die CD8⁺ T-Zellen wurden als Prozent der CD3⁺ T-Zellen angegeben. **(A)** Longitudinale Analyse der CD8⁺ T-Zelldynamik im Blut unter 6-maliger anti-CD8 AK Gabe über einen Zeitraum von 4 Wochen. **(B)** Schematische Illustration der *Gating*-Strategie der CD8⁺ T-Zellen nach 6-maliger anti-CD8 AK Gabe im Blut, in den inguinalen und axillären Lymphknoten und in der Milz. **(C)** Analyse der CD8⁺ T-Zellexpression in Versuchsmäusen nach 6-maliger Verabreichung eines Isotyp-AK bzw. depletierenden anti-CD8 AK.

4.1.2 Einfluss der CD8⁺ T-Zellen auf die Therapieeffizienz der kombinierten Immuntherapie mit einer initialen 2 Gy Niedrigdosis-Ganzkörperbestrahlung

Nach der Validierung der erfolgreichen CD8⁺ T-Zell Depletion sollte nun der Einfluss der CD8⁺ T-Zellen auf die Therapieeffizienz der bereits etablierten kombinierten Immuntherapie in 10 – 11 Wochen alten RIP1-Tag2 Versuchsmäuse überprüft werden. Zunächst wurden die Versuchstiere analog an die oben beschriebene Vorstudie vor Therapiestart mit einer zweimaligen Applikation von anti-CD8 AK (Initial: 500 µg; Folgeinjektion: 200 µg) zur Depletion der CD8⁺ T-Zellen behandelt. Die Gabe der anti-CD8 AK erstreckte sich über den gesamten Versuch jeweils einmal wöchentlich. Infolgedessen wurden die Tiere analog zu Brenner *et al.* initial mit einer 2 Gy Niedrigdosis-Ganzkörperbestrahlung zum Zweck der Depletion endogener Immunzellen bestrahlt [242]. Die *i.p.* Applikation der 10⁷ Tag-T_H1-Zellen erfolgte 24 Stunden später und im Verlauf einmal wöchentlich. Zusätzlich wurden 24 Stunden nach der Applikation der Tag-T_H1-Zellen anti-PD-L1/anti-LAG-3 AK zur Immuncheckpoint-Blockade (im Folgenden als ICB abgekürzt) zweimal wöchentlich *i.p.* appliziert. Der Blutglukosewert wurde bei den Versuchsmäusen zur indirekten Kontrolle des Wachstums der Inselzellkarzinome zweimal wöchentlich bestimmt (**Abbildung 19**).

Der initiale Blutglukosewert der Versuchsmäuse (Alter: 10-11 Wochen) zum Zeitpunkt des Therapiestarts wurde aufgrund von Schwankungen zwischen den Versuchsgruppen zur vereinfachten Darstellung auf 100 % gesetzt. Dies vereinfacht den Vergleich der verschiedenen Versuchsgruppen. Folglich werden in der hier vorgelegten Promotionsschrift ausschließlich rBGWs angegeben. Zusätzlich wird der

initiale Blutglukosewert jeder Versuchsgruppe in der Beschreibung der **Abbildung 20** in mg/dl angegeben (entspricht einem rBGW von 100 %).

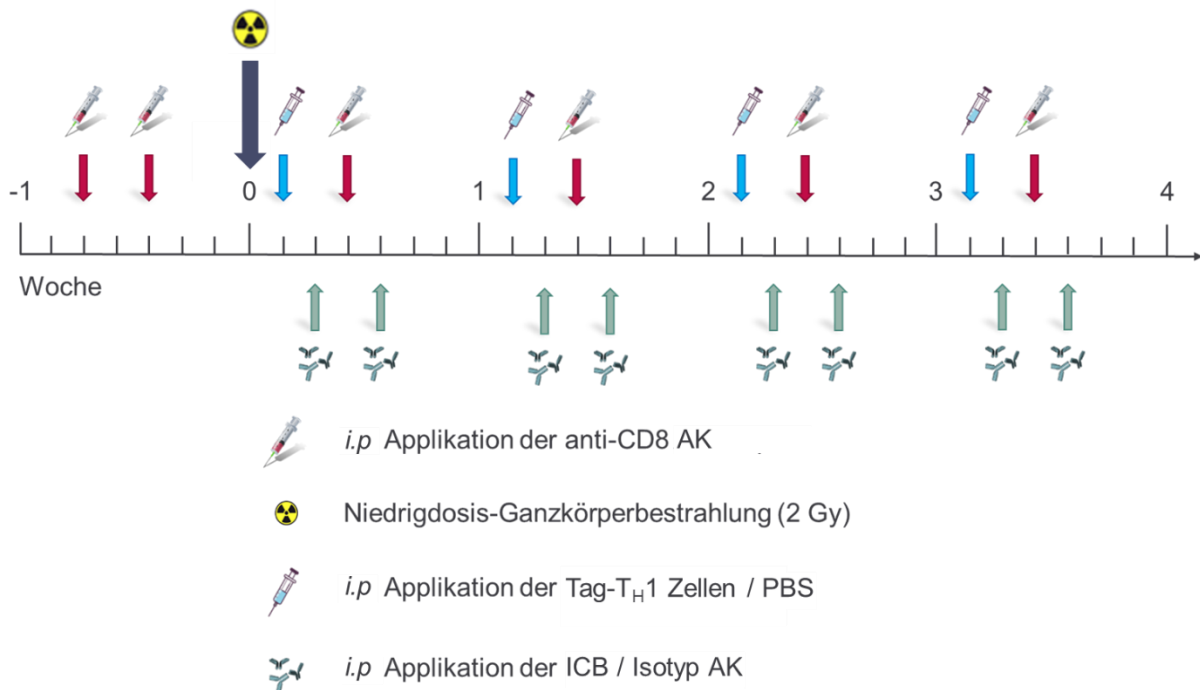


Abbildung 19: Versuchsschema der kombinierten Immuntherapie mit initialer 2 Gy Niedrigdosis-Ganzkörperbestrahlung und Depletion der $CD8^+$ T-Zellen. 10 – 11 Wochen alte RIP1-Tag2 Versuchsmäuse wurden initial vor Versuchsbeginn zweimal und anschließend bis zum Versuchsende jeweils einmal pro Woche mit anti-CD8 AK (*i.p.*) zur Depletion der endogenen $CD8^+$ T-Zellen behandelt. Die kombinierte Immuntherapie startete in Woche 0 mit einer Niedrigdosis-Ganzkörperbestrahlung (2 Gy) gefolgt von der *i.p.* Applikation von Tag- T_H1 Zellen/PBS (einmal wöchentlich) und der *i.p.* Gabe der ICB/Isotyp AK (zweimal wöchentlich). Zudem wurde zweimal wöchentlich der Blutglukosewert bestimmt.

Zunächst wurde überprüft, welchen Einfluss $CD8^+$ T-Zellen auf den Verlauf der Tumorprogression ohne Behandlung haben. Hierzu wurde die Tumorprogression in RIP1-Tag2 Versuchsmäusen im Rahmen einer Überlebensstudie analysiert. Die Versuchsmäuse wurden mit anti-CD8 depletierenden AK und Isotyp AK (Isotyp-AK zur ICB) behandelt. Es konnte kein signifikanter Unterschied im rBGW zwischen den $CD8^+$ T-Zell-depletierten und nicht-depletierten RIP1-Tag2 Versuchsmäusen beobachtet werden (**Abbildung 20A**). Des Weiteren konnte kein Effekt der $CD8^+$ T-Zell-Depletion auf das Überleben festgestellt werden (**Abbildung 20B**).

Anschließend wurde der Einfluss von CD8⁺ T-Zellen auf die Therapieeffizienz der kombinierten Immuntherapie evaluiert. Hierzu wurden RIP1-Tag2 Versuchsmäuse 4 Wochen lang mit der kombinierten Immuntherapie behandelt und zusätzlich die CD8⁺ T-Zellen mittels anti-CD8 AK depletiert. In den behandelten Versuchsmäusen ohne CD8⁺ T-Zell-Depletion konnte 8 Tage nach Behandlungsbeginn ein Anstieg des rBGWs um 59,52 % ± 17,19 % beobachtet werden. Dieser Anstieg rBGWs war unter Depletion der CD8⁺ T-Zellen deutlich geringer (23,32 % ± 12,01 %; **Abbildung 20C**) und es zeigte sich über die Zeit kein *Peak*.

Die kombinierte Immuntherapie führte zur Stabilisierung des rBGWs der Versuchsmäuse beider Versuchsgruppen über einen Zeitraum von drei Wochen (nach 2 Wochen: 109,19 % ± 7,00 %; **Abbildung 20C**). Wobei sich die rBGWs der Versuchsgruppe mit Depletion der CD8⁺ T-Zellen auf einem stabilen Niveau ohne auffällige Schwankungen verhielt und die Versuchsgruppe ohne Depletion der CD8⁺ T-Zellen einen wellenförmigen Verlauf mit Peak zeigte (**Abbildung 20C**). Hingegen zeigten die Versuchsmäuse, die nur mit den Isotyp AK behandelt wurden, zu diesem Zeitpunkt bereits einen Abfall des rBGWs auf 69,25 % ± 5,17 %; **Abbildung 20A**).

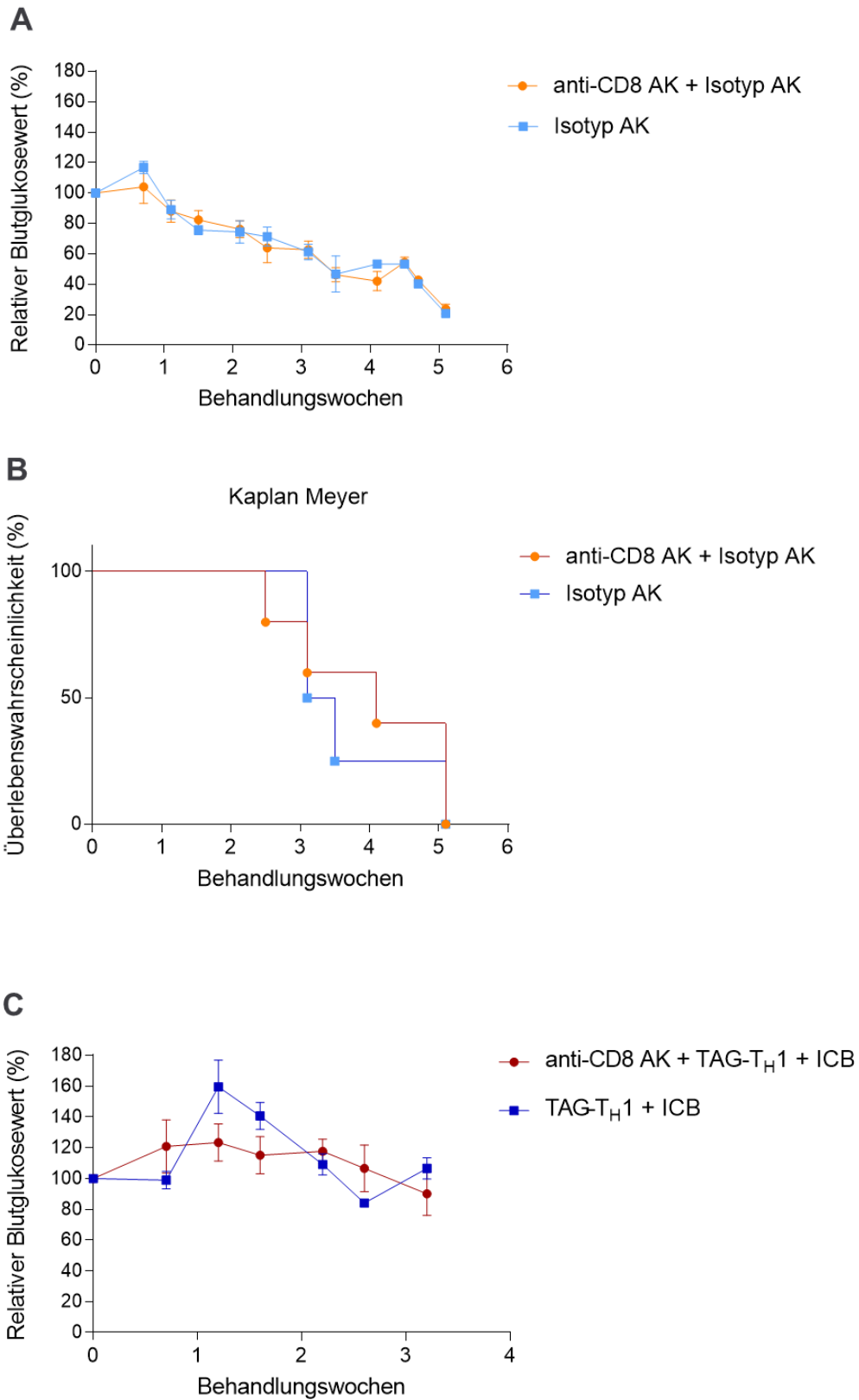


Abbildung 20: Einfluss der Depletion der CD8⁺ T-Zellen auf die rBGWs und das Überleben von 10-11 Wochen alten RIP1-Tag2 Versuchsmäusen (A) Zeitlicher Verlauf der rBGWs der mit Isotyp AK behandelten Versuchsmäuse mit (anti-CD8 AK + Isotyp AK; n = 5) und ohne Depletion (Isotyp AK; n =

4) der CD8⁺ T-Zellen. 100 % des rBGWs entsprechen zum Zeitpunkt 0 einem Mittelwert der Blutglukose von $74,40 \pm 4,99$ mg/dl der anti-CD8 AK + Isotyp AK Versuchsgruppe und $73,75 \pm 6,33$ mg/dl der Isotyp AK Versuchsgruppe. **(B)** Überlebensrate der Versuchsmäuse mit Isotyp AK Behandlung mit und ohne Depletion der CD8⁺ T-Zellen. **(C)** Zeitlicher Verlauf der rBGW von Versuchsmäusen mit kombinierter Immuntherapie mit (anti-CD8 AK + Tag-T_{H1} + ICB; n = 3) und ohne Depletion der CD8⁺ T-Zellen (Tag-T_{H1} + ICB; n = 3). 100 % des rBGWs entsprechen einem Mittelwert der Blutglukose von $69,33 \pm 9,60$ mg/dl für die anti-CD8 AK + Tag-T_{H1} + ICB Versuchsgruppe (n = 3) und $67,67 \pm 3,18$ mg/dl die Tag-T_{H1} + ICB Versuchsgruppe (n = 3) zum Zeitpunkt 0.

4.1.3 Einfluss der CD8⁺ T-Zellen auf die Therapieeffizienz der kombinierten Immuntherapie mit einer initialen Cyclophosphamid Behandlung

Analog zum unter 4.1.2 beschriebenen Versuchsaufbau wurde im Weiteren der Einfluss der CD8⁺ T-Zellen auf die Therapieeffizienz in Kombination mit einer Cyclophosphamid-Behandlung (anstelle der Niedrigdosis-Ganzkörperbestrahlung) untersucht. Da es sich bei Cyclophosphamid um ein zur Tumorthherapie beim Menschen zugelassenes Zytostatikum handelt, werden unter Verwendung dieses Zytostatikums klinisch translatierbare Bedingungen geschaffen. Im Gegensatz hierzu wird sich eine 2 Gy Niedrigdosis-Ganzkörperbestrahlung kaum in die Klinik translatieren lassen. Wie bereits zuvor wird der initiale Blutglukosewert der zu diesem Zeitpunkt 10-11 Wochen alten Versuchsmäuse aufgrund von Schwankungen zwischen den Versuchsgruppen, zur vereinfachten Darstellung, auf 100 % gesetzt. Der initiale Blutglukosewert jeder Versuchsgruppe ist in der Beschreibung der **Abbildung 22** in mg/dl angegeben (entspricht einem rBGW von 100 %).

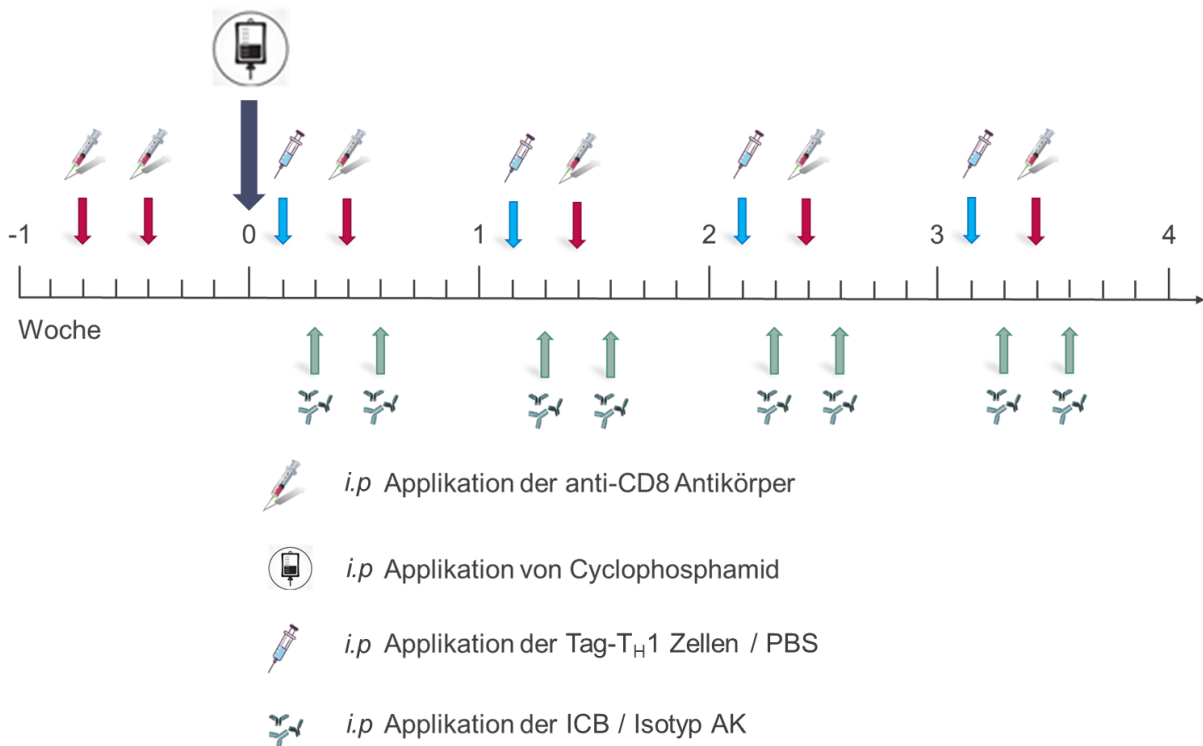


Abbildung 21: Versuchsschema der kombinierten Immuntherapie mit initialer Cyclophosphamid Behandlung (250 µg/g Körpergewicht) und Depletion der CD8⁺ T-Zellen. 10 – 11 Wochen alte RIP1-Tag2 Versuchsmäuse wurden initial vor Versuchsbeginn zweimal und anschließend bis zum Versuchsende jeweils einmal pro Woche mit anti-CD8 AK (*i.p.*) zur Depletion der endogenen CD8⁺ T-Zellen behandelt. Die kombinierte Immuntherapie startete in Woche 0 mit einer initialen *i.p.* Cyclophosphamid Applikation, gefolgt von der *i.p.* Applikation von Tag-T_{H1} Zellen/PBS (einmal wöchentlich) und der *i.p.* Gabe der ICB/Isotyp AK (zweimal wöchentlich). Zudem wurde zweimal wöchentlich der Blutglukosewert bestimmt.

10 – 11 Wochen alte RIP1-Tag2 Versuchsmäuse wurden wie in **Abbildung 21** dargestellt initial mit Cyclophosphamid behandelt. Im Weiteren wurde die kombinierte Immuntherapie (Tag-T_{H1} + ICB) mit oder ohne Depletion der CD8⁺ T-Zellen bis zum Erreichen der humanen Endpunkte durchgeführt. Alle Versuchsgruppen ohne ICB Gabe wurden mit den entsprechenden Isotyp AK behandelt und alle Versuchsgruppen ohne Tag-T_{H1} Injektion erhielten anstelle der Tag-T_{H1} Injektion eine Injektion mit PBS (**Abbildung 21**).

Der rBGW der Versuchsgruppe, die mit der kombinierten Immuntherapie (Tag-T_{H1} + ICB) behandelt wurde, zeigte einen ähnlichen Verlauf wie im Vorversuch (**4.1.2**). Zwei

Wochen nach Behandlungsbeginn konnte in dieser Gruppe ein signifikanter Anstieg des Blutglukosewerts auf $125,71 \% \pm 10,29 \%$ (* $p = 0,0368$) beobachtet werden. Der deutliche Anstieg des rBGWs konnte in der CD8⁺ T-Zell-depletierten Versuchsgruppe mit kombinierter Immuntherapie nur in sehr abgeschwächtem Ausmaß beobachtet werden ($106,41 \% \pm 13,46 \%$;

Abbildung 22A). Dies impliziert, dass die CD8⁺ T-Zellen zu diesem frühen Zeitpunkt der kombinierten Immuntherapie eine wichtige Rolle für die Therapieeffizienz spielen. Im weiteren Therapieverlauf konnte kein Unterschied im rBGW zwischen den mit kombinierter Immuntherapie behandelten Versuchsgruppen mit und ohne Depletion der CD8⁺ T-Zellen beobachtet werden. Zudem zeigten die Versuchsmäuse, die mit dem Isotyp AK behandelt wurden, einen ähnlichen Verlauf des rBGWs wie die Kontrollgruppe mit Depletion der CD8⁺ T-Zellen

Abbildung 22A).

Die Versuchsmäuse, die mit der kombinierten Immuntherapie behandelt wurden überlebten im Median 6,4 Behandlungswochen und exakt genauso lange wie die Kontrollgruppe mit depletierten CD8⁺ T-Zellen

Abbildung 22B). Wurden die Versuchsmäuse mit Isotyp AK behandelt, so betrug das mediane Überleben nur 5,6 Wochen. Wurden den Isotyp AK behandelten Versuchsmäusen zusätzlich anti-CD8 AK appliziert, verringerte sich das mediane Überleben auf 4,6 Behandlungswochen. Zusammenfassend, konnte das Überleben der Versuchsmäuse durch die Gabe der kombinierten Immuntherapie um 0,8 Wochen signifikant verlängert werden (** $p = 0,0077$;

Abbildung 22B). Vergleicht man die Versuchsgruppen mit depletierten CD8⁺ T-Zellen so konnte das Überleben durch den Einsatz der kombinierten Immuntherapie um 1,8 Wochen verlängert werden (** $p = 0,0093$;

Abbildung 22B).

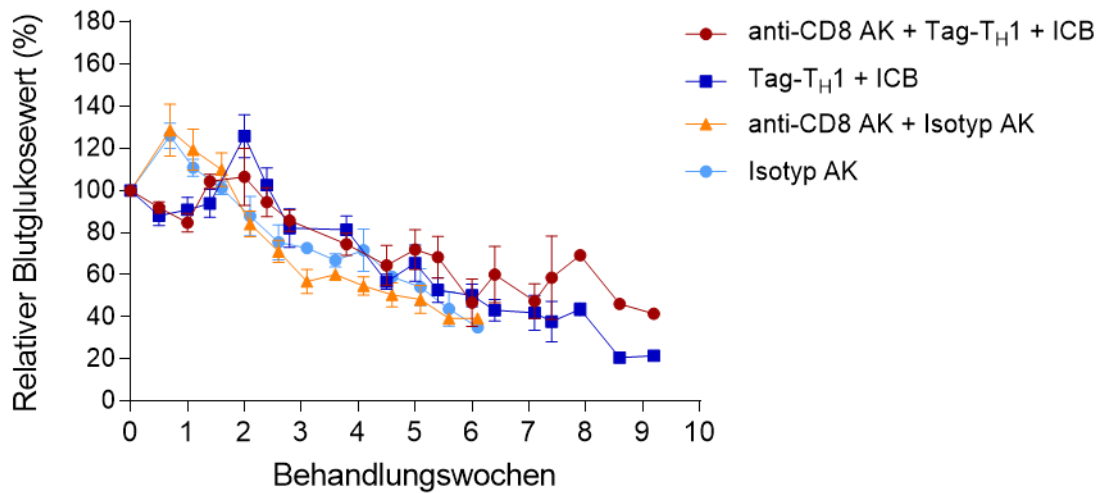
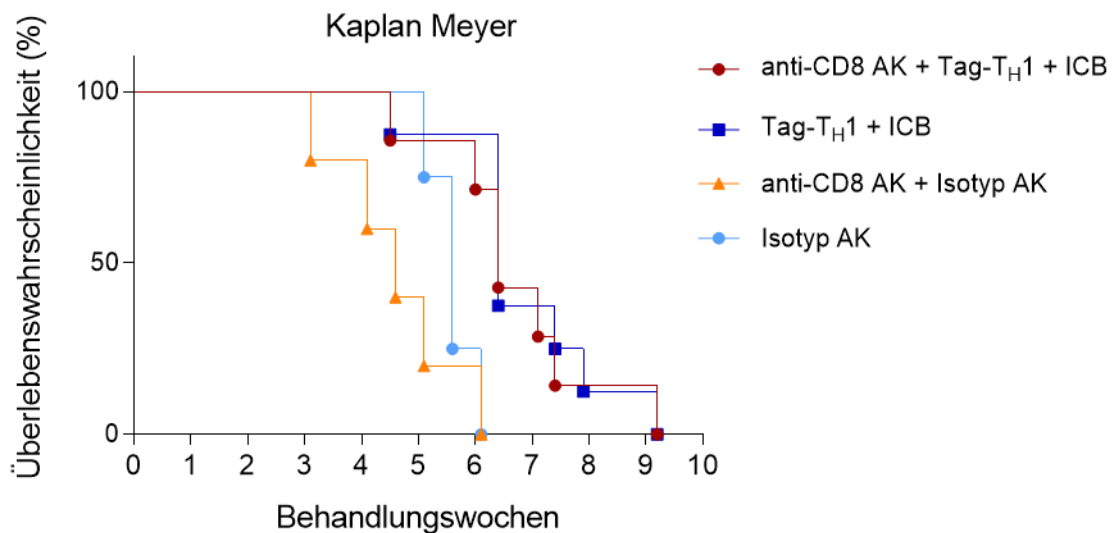
A**B**

Abbildung 22: Verlauf der rBGW in 10-11 Wochen alten RIP1-Tag2 Versuchsmäusen mit initialer Cyclophosphamid-Behandlung und kombinierter Immuntherapie mit/ohne Depletion der CD8⁺ T-Zellen (A) Zeitlicher Verlauf der rBGW von Versuchsmäusen mit initialer Cyclophosphamid-Behandlung, kombinierter Immuntherapie mit (anti-CD8 AK + Tag-T_H1 + ICB; n = 7) und ohne Depletion der CD8⁺ T-Zellen (anti-CD8 AK + Tag-T_H1 + ICB; n = 8). Eine Kontrollgruppe wurde ausschließlich mit Isotyp AK behandelt; mit (anti-CD8 AK + Isotyp AK; n = 5) und ohne Depletion der CD8⁺ T-Zellen (anti-CD8 AK + Isotyp AK; n = 5). 100 % des rBGWs entsprechen einem Mittelwert der Blutglukose von 76,57 ± 3,85 mg/dl für die anti-CD8 AK + Tag-T_H1 + ICB Versuchsgruppe, 86,88 ± 6,95 mg/dl für die Tag-T_H1 + ICB, 62,20 ± 3,50 mg/dl für die anti-CD8 AK + Isotyp AK Versuchsgruppe und 67,40 ± 3,50 mg/dl für die Isotyp AK Versuchsgruppe. Zur statistischen Evaluation wurde der Zeitpunkt des Peaks (2 Wochen)

mit dem Behandlungsbeginn (Zeitpunkt 0) verglichen und mittels ungepaartem parametrischem T-Test ausgewertet. **(B)** Überlebensrate der Versuchsmäuse mit initialer Cyclophosphamid-Behandlung, kombinierter Immuntherapie bzw. Isotyp AK Behandlung mit und ohne Depletion der CD8⁺ T-Zellen. Die Signifikanz des medianen Überlebens wurde mittels Log-rank (Mantel-Cox) Test berechnet.

4.2 Einfluss der onkolytischen Viren OncoVEX auf die Therapieeffizienz der kombinierten Immuntherapie (kombinierte Viro-Immuntherapie)

Die Kombination aus onkolytischen Viren und Checkpoint-blockierenden AK hat bereits einen synergistischen Therapieeffekt bei verschiedenen Tumoren gezeigt, wie beispielsweise beim murinen Adenokarzinom Py230, beim murinen B16 Melanom oder bei der humanen Nierzellenlinie 293T [243]. Die kombinierte Viro-Immuntherapie bestehend aus onkolytischen Viren, einer 2 Gy Niedrigdosis-Ganzkörperbestrahlung, Tag-T_H1 T-Zellen und ICB soll in den nachfolgenden Experimenten evaluiert werden. Es soll überprüft werden ob die Addition von OncoVEX zur bereits etablierten kombinierten Immuntherapie bei RIP1-Tag2 Versuchsmäusen im fortgeschrittenen Tumorstadium einen additiven Therapieeffekt erzielt. Somit wurden zusätzlich zur kombinierten Immuntherapie, 24 Stunden nach Applikation der anti-PD-L1/anti-LAG-3 AK, 5 x10⁶ PFU OncoVEX in der Behandlungswoche 1 und 2 appliziert. Analog zu den Vorversuchen wurden 10 – 11 Wochen alte RIP1-Tag2 Versuchsmäuse behandelt (**Abbildung 23**) und der Blutglukosewert 2-mal wöchentlich bestimmt. Zudem wurde jeweils eine retrobulbäre Blutentnahme vor der OncoVEX Injektion sowie 4 Stunden und 72 Stunden danach als auch 4 Stunden, 96 Stunden und 14 Tage (Versuchsende) nach der zweiten OncoVEX Injektion zum Nachweis viraler DNA durchgeführt.

Zum Versuchsende wurden der Pankreas inklusive der Inselzellkarzinome als auch die Milz isoliert und zur histopathologischen Begutachtung fixiert und nach Entwässerung in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden die Organblöcke geschnitten und H&E Färbungen als auch immunhistochemische Färbungen der T-Zellinfiltrate und von OncoVEX infizierten Zellen angefertigt. Der initiale Blutglukosewert der zu diesem Zeitpunkt 10-11 Wochen alten Versuchsmäuse wurde aufgrund von Schwankungen zwischen den Versuchsgruppen, zur vereinfachten Darstellung, auf 100 % gesetzt. Der initiale Blutglukosewert jeder Versuchsgruppe ist

in der Beschreibung der **Abbildung 24** in mg/dl angegeben (entspricht einem rBGW von 100 %).

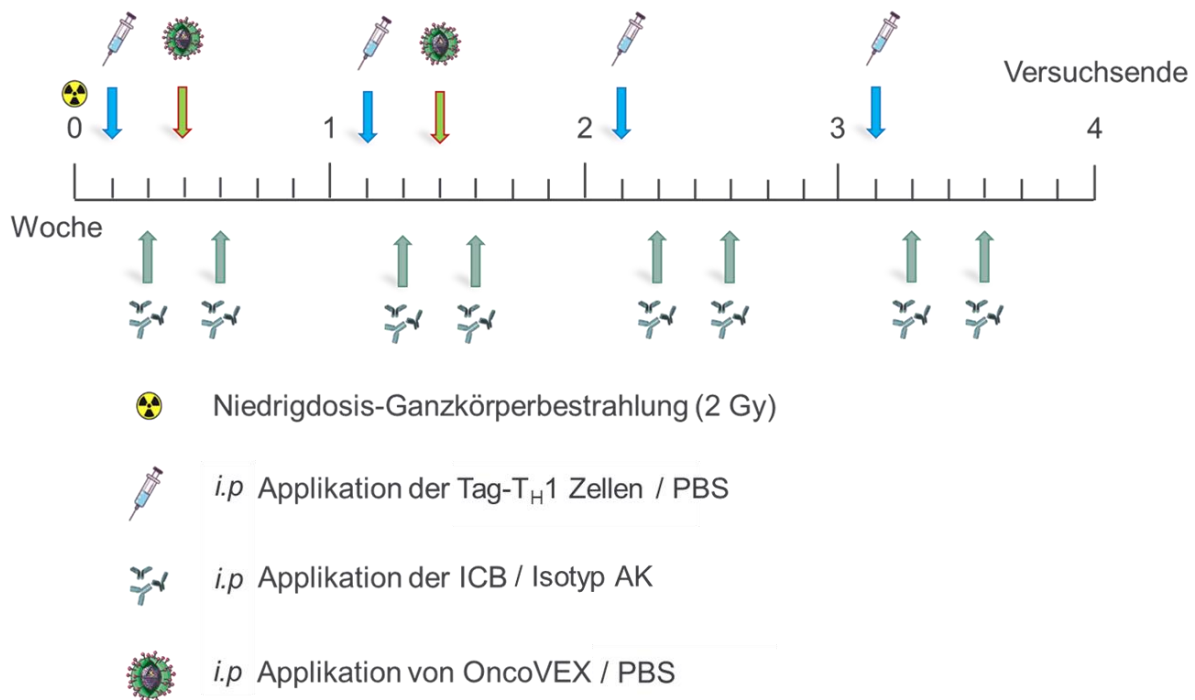


Abbildung 23: Versuchsschema der kombinierten Viro-Immuntherapie. 10 – 11 Wochen alte RIP1-Tag2 Versuchsmäuse wurden über einen Zeitraum von 4 Wochen behandelt. Die kombinierte Viro-Immuntherapie startete zum Zeitpunkt 0 mit einer 2 Gy Niedrigdosis-Ganzkörperbestrahlung gefolgt von der *i.p.* Applikation von Tag-T_H1 Zellen/PBS (einmal wöchentlich) und der *i.p.* Gabe von den Immuncheckpoint-Inhibitoren anti-PD-L1 und anti-LAG-3 (ICB, zweimal wöchentlich). Daraufhin wurde das onkolytische Virus OncoVEX (erste und zweite Behandlungswoche) appliziert. Zudem wurde zweimal wöchentlich der Blutglukosewert bestimmt. Zur Evaluation der erfolgreichen OncoVEX Replikation wurde vor und nach Virus Applikation Blut genommen.

4.2.1 Analyse der Therapieeffizienz der kombinierten Viro-Immuntherapie mittels Blutglukosewertmessung bei RIP1-Tag2 Versuchsmäusen

Die RIP1-Tag2 Versuchsmäuse wurden analog zum Versuchsschema in **Abbildung 23** therapiert. Eine Gruppe wurde mit der vollständigen kombinierten Viro-Immuntherapie behandelt (OncoVEX + Tag-T_H1 + ICB). Eine Kontrollgruppe wurde mit der kombinierten Immuntherapie und anstelle von OncoVEX mit PBS behandelt (Tag-

T_H1 + ICB) und eine weitere Kontrollgruppe mit OncoVEX + Isotyp AK (OncoVEX + Isotyp AK).

Der Blutglukosewert betrug zu Therapiebeginn durchschnittlich 80 – 100 mg/dl (in **Abbildung 24A+B** angegeben als rBGW in Prozent des initialen Blutglukosewertes einen Tag vor Therapiebeginn). Sechs Tage nach der ersten OncoVEX-Injektion (erster *Peak*, dies entspricht 1,43 Wochen nach Therapiestart) konnte ein signifikanter Anstieg des rBGWs um 50,83 % ± 21,12 % in dieser Versuchsgruppe beobachtet werden (*p = 0,0369; **Abbildung 24A+B**). Sieben Tage nach der zweiten OncoVEX-Injektion (zweiter *Peak*, entspricht 2,71 Wochen) wurde erneut ein signifikanter Anstieg des rBGWs um 32,00 % ± 12,00 % gemessen (*p = 0,0369; **Abbildung 24A+B**).

Wie bereits von Brenner *et al.* beobachtet, zeigte die Kontrollgruppe, die mit der kombinierten Immuntherapie behandelt wurde, einen stabilen Blutglukosewert über den Behandlungszeitraum von 4 Wochen [242]. Der rBGW betrug zum Zeitpunkt des Therapieendes 91,60 % ± 9,45 % und war im Vergleich zum Therapiestart nicht signifikant gesunken (p = 0,3506; **Abbildung 24A**). Der rBGW der Versuchsmäuse, die nur mit OncoVEX und Isotyp AK behandelt wurden, befand sich über einen Behandlungszeitraum von 2 Wochen auf einem konstanten Niveau und fiel nach der 2. OncoVEX-Injektion rasch ab (**Abbildung 24A**).

Die statistische Analyse der relativen Blutglukosespiegel über den gesamten Behandlungszeitraum („*area under the curve*“ (AUC)) ergab einen signifikant höheren rBGW der kombinierten Viro-Immuntherapie-Versuchsgruppe (443,50 ± 25,36 a.u.) im Vergleich zur OncoVEX + Isotyp AK Versuchsgruppe (327,90 ± 21,09; **p = 0,0076; **Abbildung 24C**).

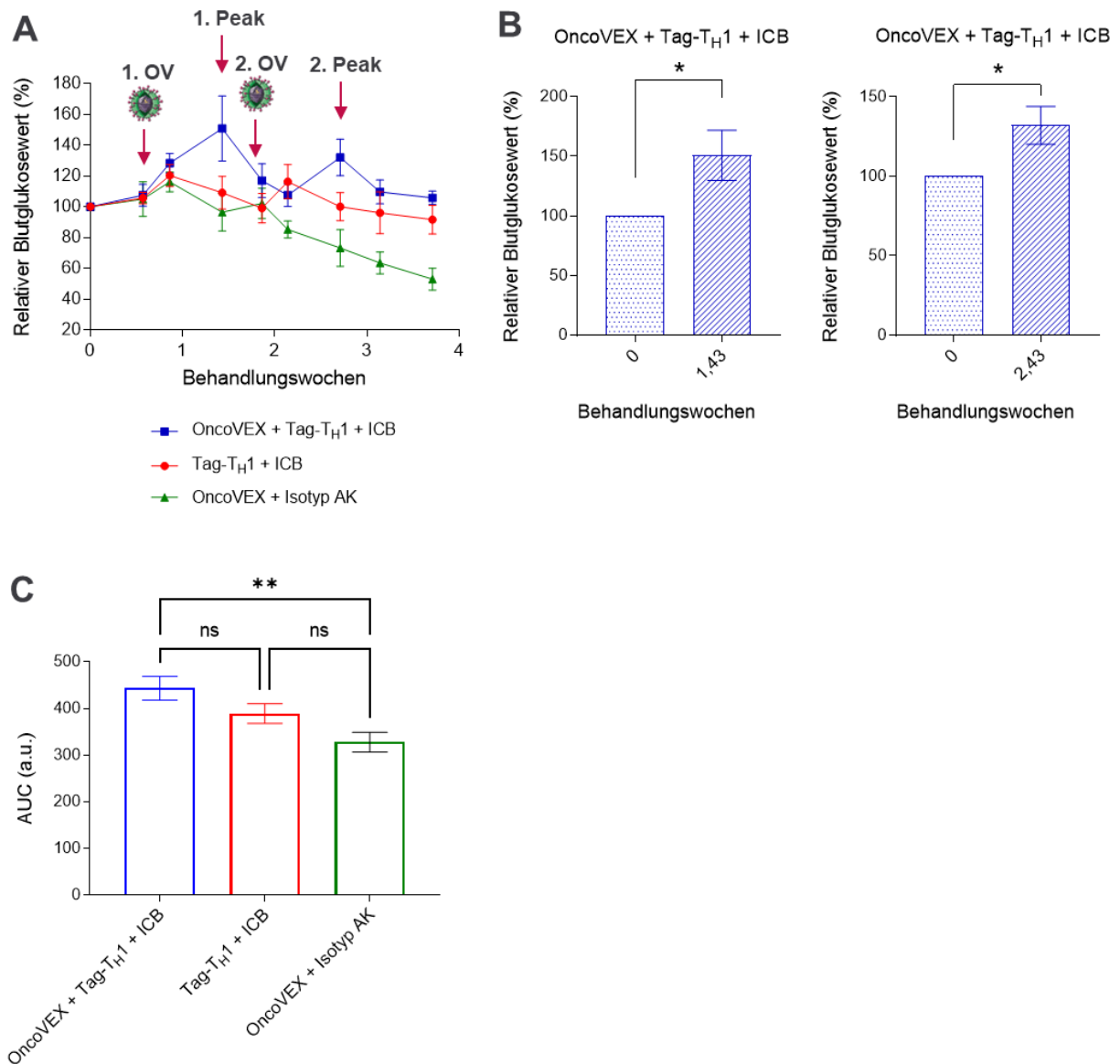


Abbildung 24: rBGW der RIP1-Tag2 Versuchsmäusen im Verlauf der kombinierten Viro-Immuntherapie (zum Zeitpunkt 0). (A) Zeitlicher Verlauf der rBGW der Versuchsmäuse mit kombinierter Viro-Immuntherapie (OncoVEX + Tag-T_H1 + ICB; n = 6). Eine Kontrollgruppe erhielt die etablierte kombinierte Immuntherapie und eine PBS Injektionen (Tag-T_H1 + ICB; n = 6). Eine weitere Kontrollgruppe wurden mit OncoVEX und Isotyp AK behandelt (OncoVEX + Isotyp AK; n = 6). 100 % des rBGWs entsprechen einem Mittelwert der Blutglukose von $69,33 \pm 3,83$ mg/dl für die OncoVEX + Tag-T_H1 + ICB Versuchsgruppe und von $69,33 \pm 5,57$ mg/dl für die Tag-T_H1 + ICB Versuchsgruppe und von $90,50 \pm 4,37$ mg/dl für die OncoVEX + Isotyp AK Versuchsgruppe. OV = *i.p.* OncoVEX Gabe (B) Um den Anstieg des rBGWs statistisch zu evaluieren, wurde der rBGW zum Zeitpunkt des Behandlungsstarts mit den Zeitpunkten der beiden *Peaks* (6 Tage nach erster OncoVEX Injektion; 1,43 Wochen nach Therapiestart und sieben Tage nach zweiter OncoVEX Injektion; 2,43 Wochen nach Therapiestart) mittels ungepaartem parametrischem T-Test evaluiert. (C) Zur statistischen Auswertung

wurden die Flächen unter den relativen Blutglukosekurven („*area under the curve*“ (AUC)) über den gesamten Behandlungszeitraum mittels einfaktoriellem ANOVA mit Bonferroni-Korrektur für Mehrfachtestungen ($k = 3$) miteinander verglichen (Flächeneinheit, engl.: *area unit*, a.u.). ** $p = 0,0076$.

4.2.1.1 Bestimmung der Anwesenheit von OncoVEX im Vollblut von RIP1-Tag2 Mäusen mittels qPCR

Im Verlauf der vier-wöchigen Behandlung wurde den RIP1-Tag2 Versuchsmäusen mehrmals Blut zum Nachweis viraler DNA abgenommen. Dies erfolgte einmal vor der ersten OncoVEX Applikation sowie 4 Stunden und 72 Stunden danach. Des Weiteren 4 Stunden, 96 Stunden und zwei Wochen nach der zweiten OncoVEX Applikation. Das Blut wurde infolgedessen mittels quantitativer PCR auf die Anwesenheit von HSV-1 DNA (OncoVEX) untersucht. Als Negativ-Kontrolle wurde die Tag- T_{H1} + ICB Versuchsgruppe, welche keine OncoVEX Injektionen erhielten, analysiert.

Bereits 4 Stunden nach der ersten und zweiten OncoVEX Injektion konnte in der kombinierten Viro-Immuntherapiegruppe (OncoVEX + Tag- T_{H1} + ICB) HSV-1 DNA mittels quantitativer PCR im Blut nachgewiesen werden (**Abbildung 25**); ebenso 72 Stunden nach der ersten und 96 Stunden nach der zweiten OncoVEX Injektion. Da der CT Wert (*Cycle Threshold*, Schwellenwertzyklus) bei 35 – 45 liegt, ist jedoch von einer relativ geringen Virus-DNA-Konzentration im Blut auszugehen. 17 Tage nach der zweiten OncoVEX Injektion (Tag 24) konnte im Blut keine Virus-DNA mehr nachgewiesen werden (**Abbildung 25**). In der Kontrollgruppe (Tag- T_{H1} + ICB) ohne OncoVEX Injektion konnte zu keinem Zeitpunkt Virus-DNA nachgewiesen werden (**Abbildung 25**).

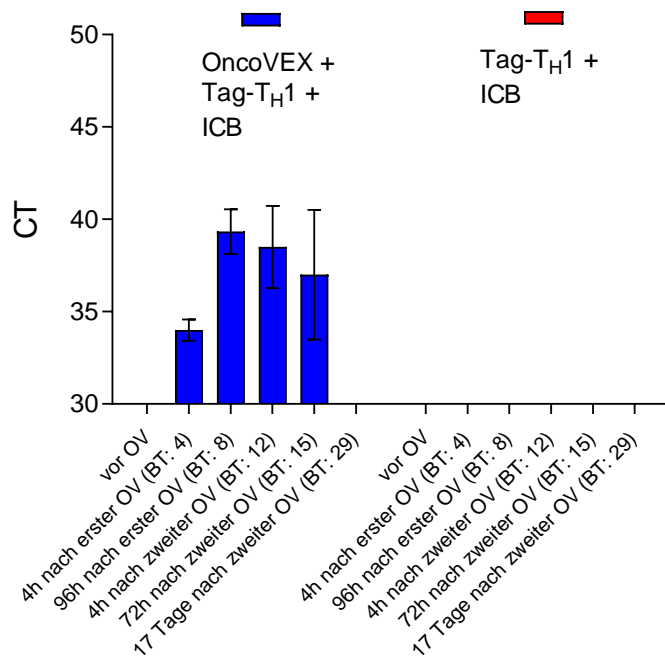


Abbildung 25: Quantitative PCR zum Nachweis viraler DNA im Verlauf der vier-wöchigen kombinierten Viro-Immuntherapie. Vor und nach den zwei OncoVEX Injektionen wurde den 10 – 11 Wochen alten RIP1-Tag2 Versuchsmäusen retrobulbär Blut abgenommen und die virale DNA mittels quantitativer PCR quantifiziert. Der CT Wert (*Cycle Threshold*, Schwellenwertzyklus) gibt die Anzahl der Zyklen wieder. Es wurden folgende Versuchsgruppen analysiert: OncoVEX + Tag-TH1 + ICB und Tag-TH1 + ICB. BT = Behandlungstag; Therapiestart = Behandlungstag: 1. (n = 2 – 4).

4.2.1.2 Histopathologische Evaluation der Inselzellkarzinome und der Milz von RIP1-Tag2 Versuchsmäusen nach vierwöchentlicher kombinierter Viro-Immuntherapie

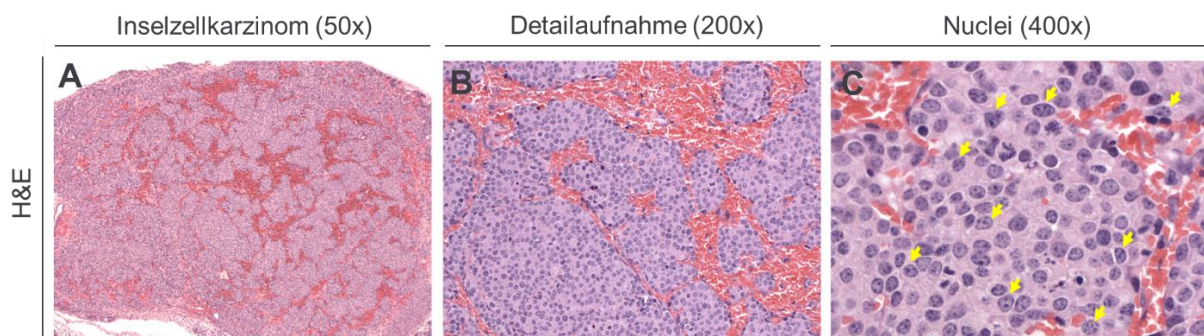
Am Versuchsende wurden alle Versuchstiere euthanasiert und das Pankreas inklusive der Inselzellkarzinome sowie die Milz isoliert. Der Pankreas wurde mit Hilfe eines Skalpell in drei Teile geschnitten und die Milz in zwei Teile. Der an der Milz anlehende Teil des Pankreas und der kraniale Teil der Milz wurden in Formalin fixiert und nach dem Entwässern in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden 5 µm Schnitte der beiden Organe angefertigt und H&E Färbungen als auch immunhistochemische Färbungen durchgeführt (Institut für Allgemeine und Molekulare Pathologie des Universitätsklinikums Tübingen unter der Leitung von Prof. Dr. Leticia Quintanilla de Fend).

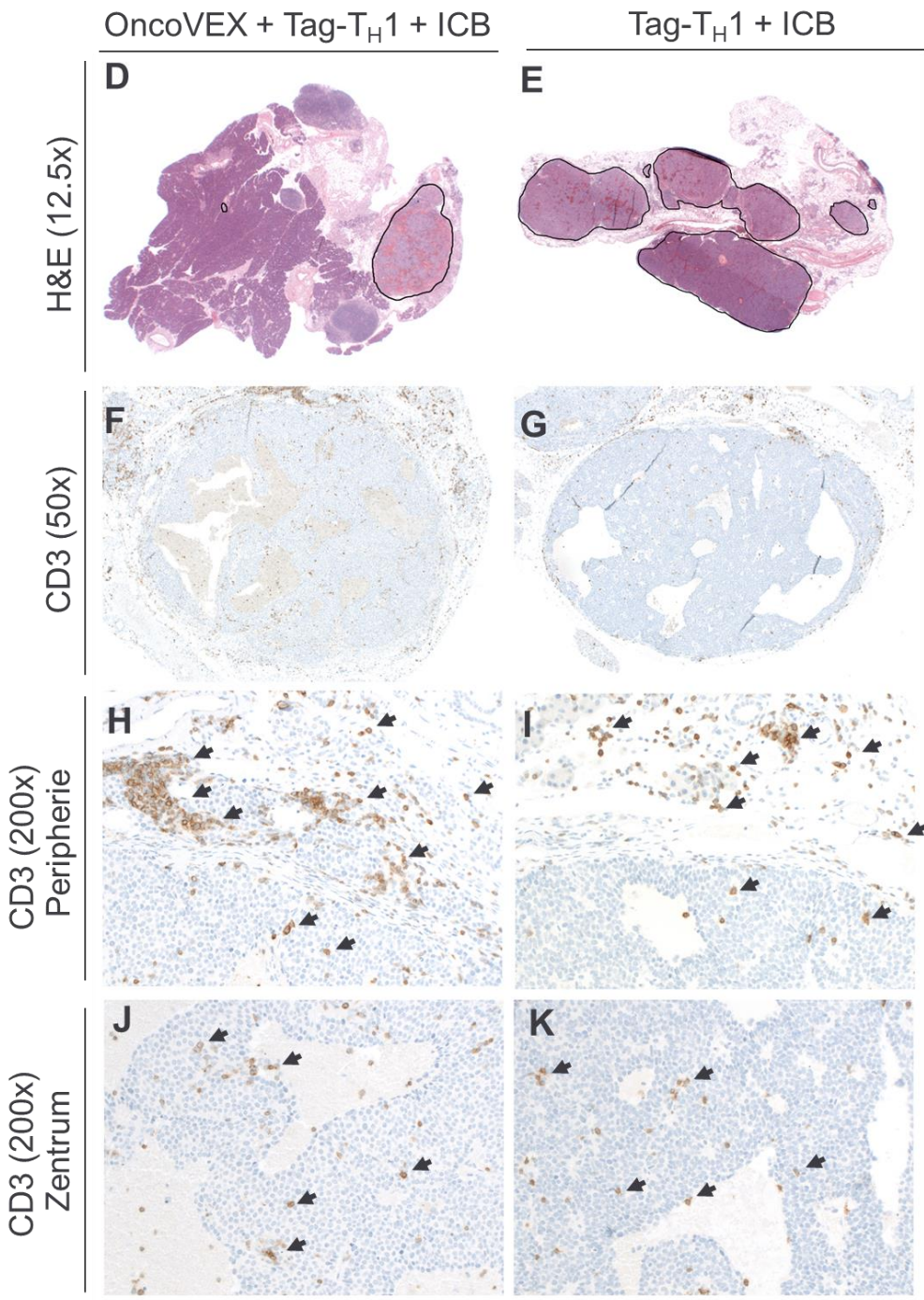
Das Pankreas als auch die Milz der beiden Versuchsgruppen 'OncoVEX + Tag-T_H1 + ICB' und 'Tag-T_H1 + ICB' wurden mittels H&E-Färbung morphologisch analysiert (**3.5.3.1**). Zusätzlich wurde immunhistochemische Analysen der Pankreata der beiden Versuchsgruppen veranlasst, mit Fokus auf CD3⁺ T-Zellen und HSV-1 (**3.5.3.2**).

Analysen des Pankreas

In den Pankreata aller untersuchten RIP1-Tag2 Mäuse waren Inselzellkarzinome erkennbar. Im Zentrum der Inselzellkarzinome waren viele dilatierte Blutgefäße anzutreffen (**Abbildung 26A+B**). Zudem wiesen die Inselzellkarzinomzellen deutlich weniger Zytoplasma auf (**Abbildung 26C**). Die Inselzellkarzinome bestanden aus kleinen bis mittelgroße Zellen und wiesen „Salz-und-Pfeffer-Chromatin“ auf (**Abbildung 26C**). In der Versuchsgruppe mit der kombinierten Viro-Immuntherapie waren die Inselzellkarzinome kleiner als in der Versuchsgruppe die mit der etablierten kombinierten Immuntherapie ohne OncoVEX-Gabe behandelt wurde (**Abbildung 26D+E**).

Insgesamt zeigten die Versuchstiere, die nicht zusätzlich mit OncoVEX behandelt wurden, eine geringere relative Anzahl an CD3⁺ T-Zellen im und in der Peripherie der Inselzellkarzinome (**Abbildung 26F+G**). Generell konnten in beiden Versuchsgruppen die CD3⁺ T-Zellen vorwiegend im Randbereich der Inselzellkarzinome detektiert werden (**Abbildung 26H+I**). Vereinzelt CD3⁺ T-Zellen konnten jedoch auch innerhalb der Inselzellkarzinome detektiert werden (**Abbildung 26J+K**). In beiden Versuchsgruppen konnte mittels immunhistochemischer Analyse keine HSV-1 (OncoVEX) Expression nachgewiesen werden (**Abbildung 26L**). Als Positiv-Kontrolle der HSV-1 Immunhistochemie wurde humanes HSV-1 exprimierendes, mit T-VEC behandeltes Tumorgewebe (malignes Melanom) verwendet (**Abbildung 26M**).





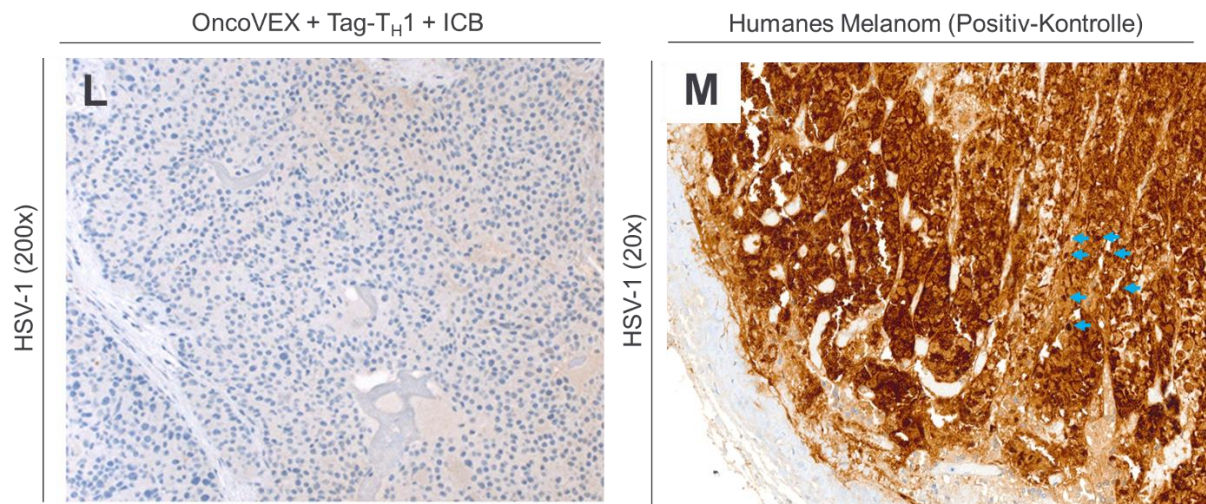


Abbildung 26: Histopathologische (H&E) und immunhistochemische (CD3) Analyse des Pankreas von RIP1-Tag2 Mäusen nach vier-wöchiger Behandlung mit der kombinierten Viro-Immuntherapie. (A-C) Repräsentative H&E Färbung der Inselzellkarzinomen von OncoVEX + Tag- T_{H1} + ICB behandelten Versuchsmäusen. **(A)** Die Übersichtsaufnahme (Vergrößerung: 50x) zeigt das Inselzellkarzinom und **(B)** eine Detailaufnahme des Inselzellkarzinoms (Vergrößerung: 200x). **(C)** zeigt die 'Salz und Pfeffer' Nuklei (Vergrößerung: 400x) mit gelben Pfeilen markiert. **(D+E)** Repräsentative Darstellung das Pankreasgewebes inklusive der Inselzellkarzinomen (schwarz gestrichelte Linie; H&E) dargestellt. **(F-K)** Repräsentative CD3 Immunhistochemie der Pankreata inklusive den Inselzellkarzinomen der beiden Versuchsgruppen (OncoVEX + Tag- T_{H1} + ICB; Tag- T_{H1} + ICB) in der Übersicht **(F+G)**; Vergrößerung: 50x) und in der Detailaufnahme (Vergrößerung: 200x) mit Fokus **(H+I)** den Randbereich des Inselzellkarzinoms und **(J+K)** des Zentrums. Die schwarzen Pfeile deuten auf CD3 positive T-Zellen hin. Zum Nachweis von OncoVEX infizierten Zellen wurde eine HSV-1 immunhistochemische Analyse durchgeführt. **(L)** Repräsentative HSV-1 Immunhistochemie ohne Nachweis von HSV-1 positive Zellen ($n = 3 - 4$) (Vergrößerung: 200x). **(M)** Das maligne Melanom eines Tumorpatienten diente als Positiv-Kontrolle der HSV-1 Immunhistochemie. Die HSV-1 Viren sind mit blauen Pfeilen markiert (Vergrößerung: 20x).

Analyse der Milz

Die histopathologische Untersuchung der Milzen der mittels kombinierter Viro-Immuntherapie (OncoVEX + Tag- T_{H1} + ICB) behandelten Versuchstiere ergab in drei der sechs Milzen eine Hypertrophie mit milder Expansion der roten Pulpa (gelb gestrichelte Linie) und Atrophie der weißen Pulpa (weiß gestrichelte Linie; **Abbildung 27A-D**). Zudem konnte in den Milzen dieser drei Versuchstieren eine erhöhte Hämatopoese und die Akkumulation von Granulozyten um die Sinusoide der roten Pulpa herum festgestellt werden (**Abbildung 27E-H**). In den Milzen der

Versuchsmäuse, die eine Kombinationstherapie ohne Verabreichung von OncoVEX (Tag- T_H1 + ICB) erhielten, war keine Hypertrophie der Milz jedoch eine milde Expansion der roten Pulpa und Atrophie der weißen Pulpa nachweisbar (**Abbildung 27E-H**). In den Milzen aller Tiere der beiden Versuchsgruppen konnte eine erhöhte Anzahl an Megakaryozyten detektieren (gelber Pfeil; **Abbildung 27G+H**), was vermutlich auf die multiplen Blutuntersuchungen (6 Blutabnahmen; je Analyse maximal 50 μm) zurückzuführen ist.

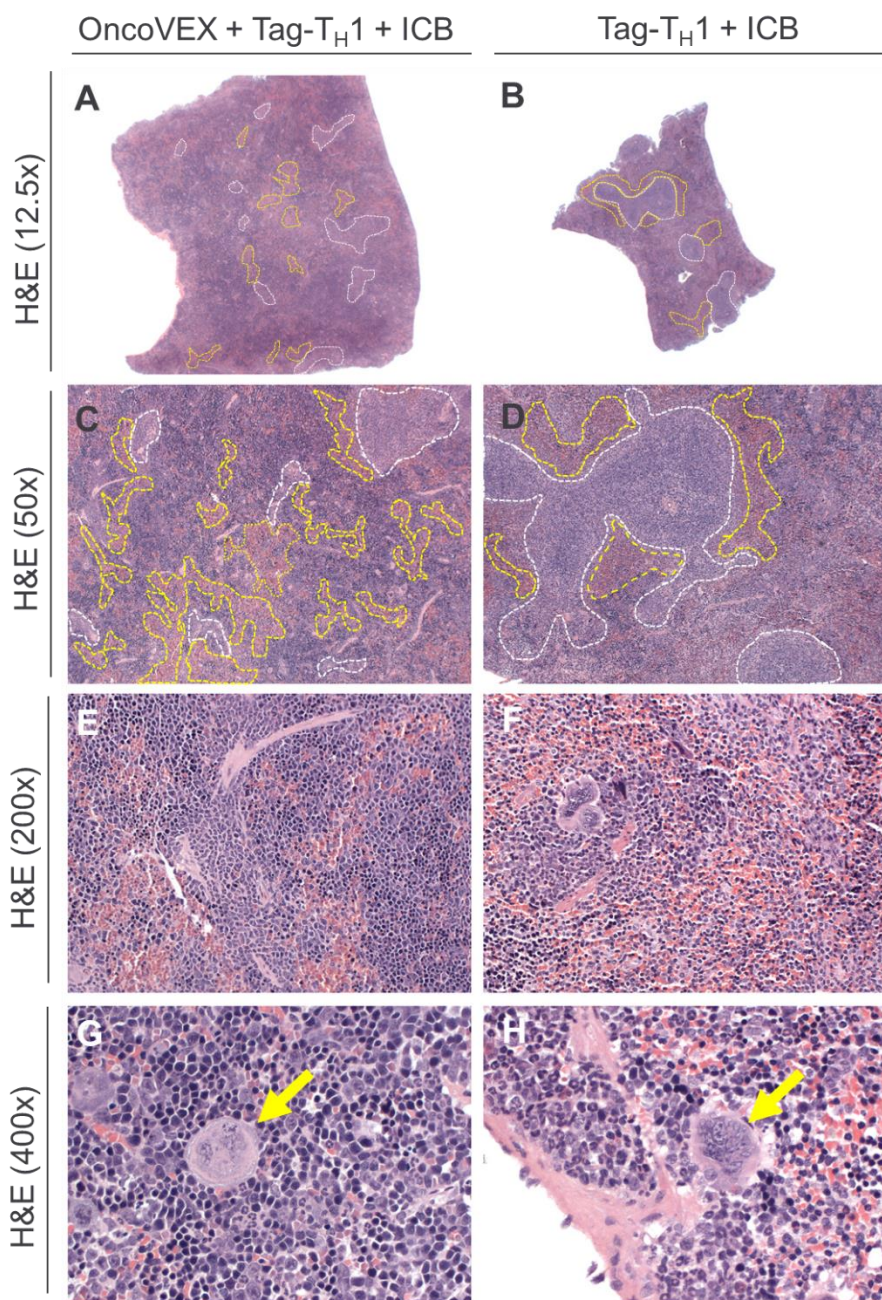


Abbildung 27: Histologische (H&E) und immunhistochemische (CD3) Analyse der Milz von RIP1-Tag2 Versuchsmäusen nach vier-wöchiger Behandlung mit der kombinierten Viro-Immuntherapie. Repräsentative H&E Färbung der Milzen der beiden Versuchsgruppen (OncoVEX + Tag- T_{H1} + ICB; Tag- T_{H1} + ICB) in der Vergrößerung **(A+B)** 12,5x, **(C+D)** 50x, **(E+F)** 200x und **(G+H)** 400x. Die Areale der roten Pulpa sind mit einer gestrichelten gelben Linie umrandet. Die Areale der weißen Pulpa sind mit einer gestrichelten weißen Linie umrandet. Repräsentativer Megakaryozyten sind mit einem gelben Pfeil markiert. (n = 4).

4.2.1.3 Untersuchung der T-Zellpopulationen in der Milz unter Einfluss der kombinierten Viro-Immuntherapie mittels Durchflusszytometrie

Um die Wirkmechanismen der kombinierten Viro-Immuntherapie (**Abbildung 23**) auf zellulärer Ebene zu evaluieren, wurden CD45.2 positive Immunzellpopulationen der Milz mit Fokus auf die CD4⁺- und CD8⁺ T-Zellen analysiert. Hierzu wurde am Versuchsende nach vier-wöchiger kombinierter Viro-Immuntherapie der kaudale Anteil der Milz aller Versuchstiere zur Untersuchung der Immunzellpopulationen mittels Durchflusszytometrie aufgearbeitet (**3.5.5**).

Im Folgenden werden die prozentualen Anteile der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen jeweils in Bezug auf die relative Anzahl der CD45.2 positiven Immunzellen angegeben.

Die Milzen der Versuchsmäuse, die mit der kombinierten Viro-Immuntherapie behandelt wurden, zeigten mit $7,25 \pm 1,54$ % signifikant weniger CD4⁺ T-Zellen verglichen zu den Milzen der Versuchsmäuse, die mit OncoVEX + Isotyp AK behandelt wurden ($25,04 \pm 1,36$ % CD4⁺ T-Zellen; ****p < 0,0001; **Abbildung 28A**). In diesem Zusammenhang ist zu beachten, dass die CD4⁺ T-Zellen sowohl die endogenen als auch die therapeutischen Tag- T_{H1} Zellen inkludieren. Die Therapie der RIP1-Tag2 Mäuse mit OncoVEX + Tag- T_{H1} Zellen + ICB ($7,25 \pm 1,54$ %) oder auch Tag- T_{H1} Zellen + ICB ($10,50 \pm 0,63$ %) führte im Vergleich zur OncoVEX + Isotyp AK Therapie ($22,37 \pm 1,09$ %) zu einer signifikanten Reduktion der CD4⁺ T-Zellen in der Milz (****p < 0,0001, **Abbildung 28A**). Identisch zu den CD4⁺ T-Zellen führte die Therapie der RIP1-Tag2 Mäuse mit OncoVEX + Tag- T_{H1} Zellen + ICB ($0,88 \pm 0,24$ %; ***p = 0,0001) oder Tag- T_{H1} Zellen + ICB ($1,19 \pm 0,16$ %) im Vergleich zur OncoVEX + Isotyp AK Therapie ($7,48 \pm 0,55$ %; ***p = 0,0003) ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der CD8⁺ T-Zellen in der Milz (**Abbildung 28A**).

Anschließend wurde die relative Anzahl der therapeutischen Tag- T_H1 Zellen in den Milzen der Versuchsmäuse der beiden mit Tag- T_H1 Zellen behandelten Versuchsgruppen, mit und ohne zusätzliche Behandlung mit OncoVEX bestimmt. Die zusätzliche Verabreichung von OncoVEX führte in den Milzen der Versuchstiere zu einem 33 %igen, jedoch nicht signifikanten Anstieg der Tag- T_H1 Zellen ($9,72 \pm 1,41$ %) im Vergleich zu Versuchstieren ohne OncoVEX Gabe ($7,33 \pm 0,70$ %; **Abbildung 28B**).

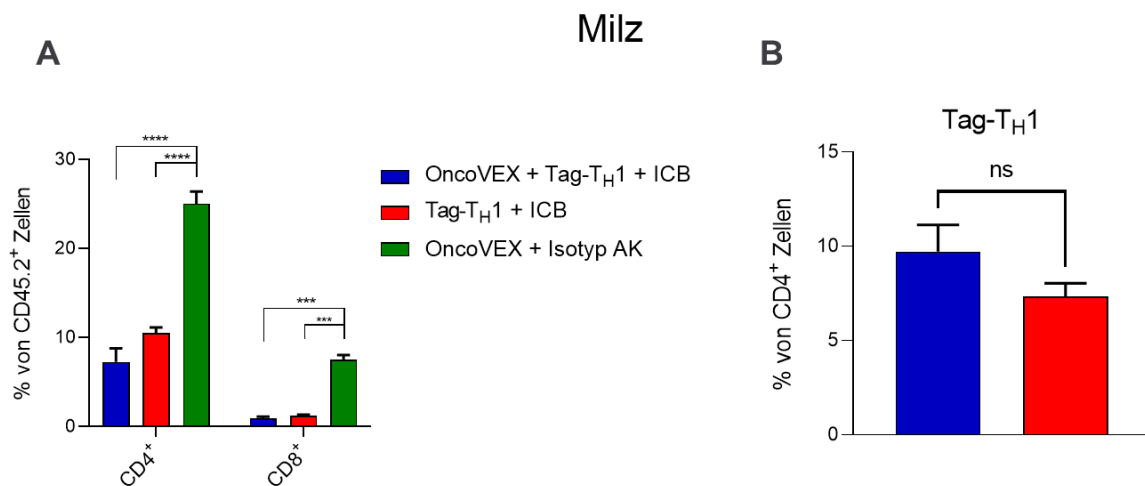


Abbildung 28: Analyse der CD4⁺, CD8⁺ T-Zellen und Tag- T_H1 Zellen in den Milzen von RIP1-Tag2 Mäusen nach vier-wöchiger Therapie (A) Prozentualer Anteil der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in Bezug auf die relative Anzahl der CD45.2 positiven Immunzellen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Zur statistischen Auswertung wurde ein zweifaktorieller ANOVA mit Bonferroni-Korrektur für Mehrfachtestungen ($k = 3$) verwendet. Ein Balken präsentiert jeweils den Mittelwert \pm SEM einer Gruppe (OncoVEX + T_H1 + ICB; $n = 6$, T_H1 + ICB, $n = 5$; OncoVEX + Isotyp AK, $n = 5$). **** $p < 0,0001$. CD8⁺ T-Zellen: OncoVEX + T_H1 + ICB vs. OncoVEX + Isotyp AK: *** $p = 0,0001$; T_H1 + ICB vs. OncoVEX + Isotyp AK: *** $p = 0,0003$ (B) Prozentuale Anzahl der Tag- T_H1 Zellen in Bezug auf die CD4⁺ T-Zellen. Zur statistischen Auswertung wurden die jeweiligen Gruppen miteinander mittels ungepaartem parametrischem T-Test verglichen. (ns = nicht signifikant).

4.2.2 Monitoring der Therapieeffizienz der kombinierten Viro-Immuntherapie (ohne Tag-T_H1 Zellen) bei RIP1-Tag2 Versuchsmäusen im fortgeschrittenen Tumorstadium mittels Blutglukosespiegel

Im Rahmen von weiterführenden Experimenten wurde die Therapieeffizienz einer bimodalen Viro-Immuntherapie bestehend aus OncoVEX und ICB ohne Gabe von therapeutischen Tag-T_H1 Zellen bestimmt, um den additiven Effekt der Tag-T_H1 Zellen in den vorangegangenen Studien zu eruieren. Identisch zu den vorangegangenen Studien erhielten die RIP1-Tag2 Versuchsmäuse im Alter von 10 – 11 Wochen initial eine 2 Gy Niedrigdosis-Ganzkörperbestrahlung und erhielten anschließend identisch zum Basistherapieschema (**Abbildung 23**) zweimal pro Woche eine *i.p.* Injektion mit ICB sowie in der Behandlungswoche 1 und 2 eine *i.p.* OncoVEX Injektion. Die beiden Kontrollgruppen wurden ausschließlich mit OncoVEX oder ICB behandelt (**Abbildung 29**). Zum Monitoring der Progression der Inselzellkarzinome der RIP1-Tag2 Mäuse wurden die Blutglukosewerte zweimal wöchentlich bestimmt. Zudem wurde den RIP1-Tag2 Mäusen zur Determination viraler DNA 4 und 96 Stunden nach der ersten OncoVEX Gabe und 4 und 72 Stunden nach der zweiten OncoVEX Gabe retrobulbär Blut abgenommen als auch am Versuchsende.

Zudem wurden am Versuchsende nach der Tötung der Tiere mittels CO₂ die Pankreata mit fortgeschrittenen Inselzellkarzinomen und die Milz isoliert, in Formalin fixiert, in Paraffin-Blöcken eingebettet und geschnitten. Zur histopathologischen Beurteilung wurden H&E Färbungen und immunhistochemische Färbungen veranlasst. Der initiale Blutglukosewert der zu diesem Zeitpunkt 10-11 Wochen alten Versuchsmäuse wurde aufgrund von Schwankungen zwischen den Versuchsgruppen, zur vereinfachten Darstellung, auf 100 % gesetzt. Der initiale Blutglukosewert jeder Versuchsgruppe ist in der Beschreibung der **Abbildung 30** in mg/dl angegeben (entspricht einem rBGW von 100 %).

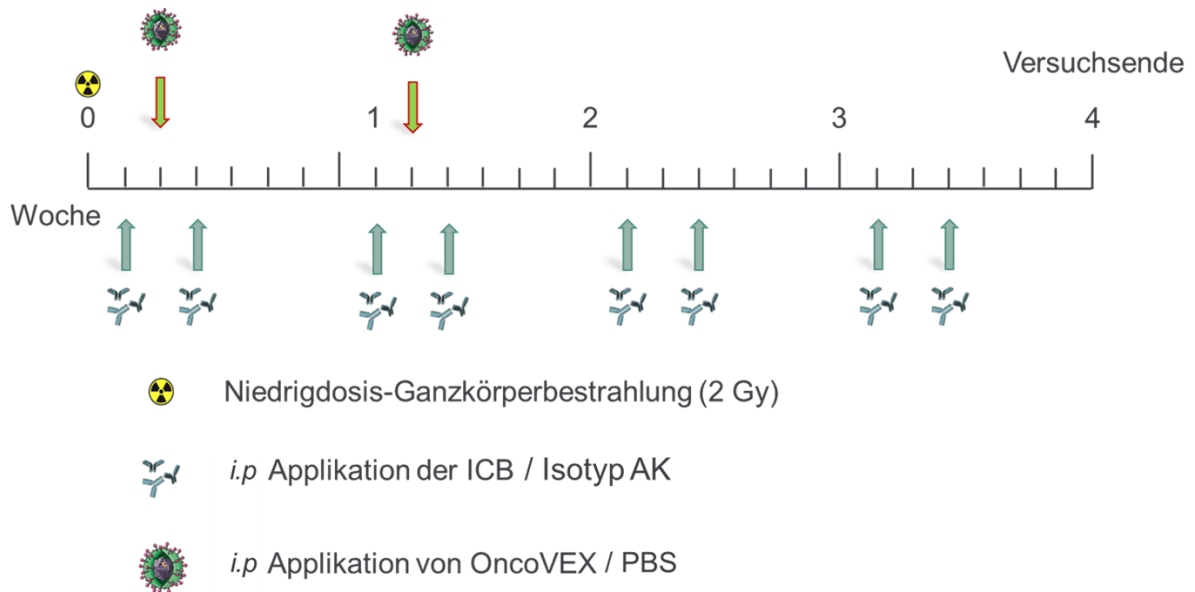


Abbildung 29: Versuchsschema der kombinierten Viro-Immuntherapie ohne Tag-T_{H1} Zell-Gabe.

10 – 11 Wochen alte RIP1-Tag2 Versuchsmäuse wurden über einen Zeitraum von 4 Wochen behandelt. Die kombinierte Viro-Immuntherapie startete in Woche 0 mit einer 2 Gy Niedrigdosis-Ganzkörperbestrahlung gefolgt von *i.p.* Gabe der Immuncheckpoint inhibierenden AK anti-PD-L1 und anti-LAG-3 (ICB, zweimal wöchentlich). Das onkolytische Virus OncoVEX wurde jeweils in der ersten und zweiten Behandlungswoche appliziert. Zudem erfolgte zweimal wöchentlich die Bestimmung der Blutglukosewerte. Zur Evaluation der erfolgreichen OncoVEX Replikation wurde jeweils vor und nach Virus Applikation Blut zum Nachweis viraler DNA genommen.

Bereits zwei Tage nach der primären OncoVEX Injektion wurde ein signifikanter Anstieg des rBGWs in beiden mit OncoVEX behandelten Gruppen detektiert (**Abbildung 30A+B**). Die Behandlungsgruppe, die sowohl mit OncoVEX und ICB behandelt wurde, zeigte 2 Tage nach der primären OncoVEX Injektion einen prozentualen Anstieg von $26,00 \pm 4,19 \%$ (** $p = 0,0001$; **Abbildung 30A+B**). In der Kontrollgruppe, die ausschließlich mit OncoVEX und Isotyp AK (OncoVEX und Isotyp AK) behandelt wurde, konnte zum gleichen Zeitpunkt ein Anstieg des rBGWs um $31,17 \pm 5,38 \%$ beobachtet werden (** $p = 0,0001$; **Abbildung 30A+B**). Die Versuchsgruppe, die ausschließlich mit ICB behandelt wurde, zeigte im Vergleich zum Therapiebeginn keine signifikante Erhöhung des rBGWs ($103,25 \pm 10,48 \%$, **Abbildung 30A+B**).

Die statistische Analyse der relativen Blutglukosespiegel über den gesamten Behandlungszeitraum (a.u.c. = Fläche unter der Kurve) zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Versuchsgruppen. Dennoch zeigte die

Versuchsgruppe, die ausschließlich mit OncoVEX und Isotyp AK behandelt wurde, den tendenziell höchsten Wert ($362,3 \pm 20,89$ a.u.) verglichen zu den übrigen beiden Versuchsgruppen (OncoVEX + ICB: $338,10 \pm 12,47$ a.u.; ICB: $295,30 \pm 22,7$ a.u.; **Abbildung 30C**).

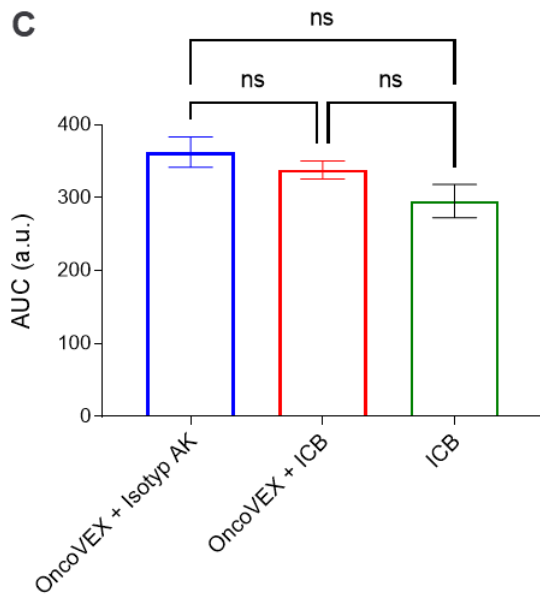
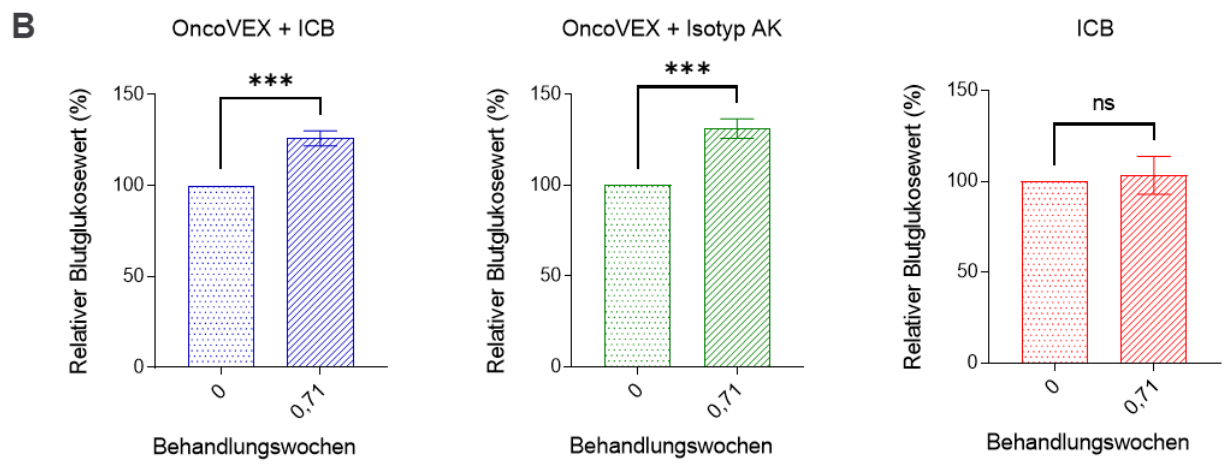
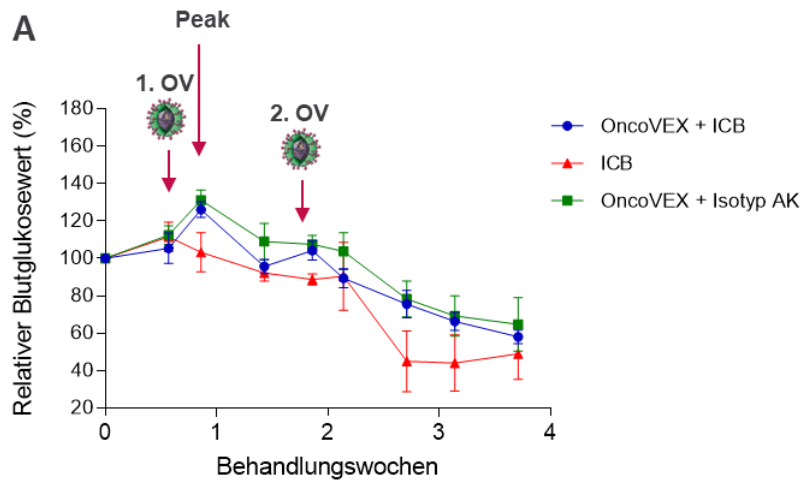


Abbildung 30: Monitoring des Blutglukosewertes in RIP1-Tag2 Versuchsmäusen unter der bimodalen- oder Mono-Therapie mit OncoVEX und ICB. (A) Zeitlicher Verlauf der rBGW der mit bimodalen Therapie mit OncoVEX und ICB (OncoVEX + ICB; n = 6). Eine Kontrollgruppe wurde anstatt von OncoVEX mit PBS behandelt (ICB; n = 4) und eine Kontrollgruppe anstelle von ICB mit Isotyp AK behandelt (OncoVEX + Isotyp AK; n = 6). Für die Versuchsgruppe OncoVEX + ICB entsprechen 100 % des rBGWs einem Mittelwert der Blutglukose von $90,50 \pm 4,84$ mg/dl; für die Versuchsgruppe ICB entsprechen 100 % des rBGWs einem Mittelwert von $90,50 \pm 5,74$ mg/dl; für die Versuchsgruppe OncoVEX + Isotyp AK entsprechen 100 % des rBGWs einem Mittelwert von $86,40 \pm 3,80$ mg/dl. OV = *i.p.* OncoVEX Gabe. **(B)** Zur statistischen Analyse des Anstiegs des rBGWs wurde in allen drei Versuchsgruppen der rBGW zum Zeitpunkt des Behandlungsstarts mit dem Zeitpunkt des Blutzucker-Peaks (2 Tage nach der ersten OncoVEX Injektion; 0,71 Wochen) mittels ungepaartem parametrischem T-Test verglichen. **(C)** Zur statistischen Auswertung wurden die Flächen unter den relativen Blutglukosekurven („*area under the curve*“ (AUC)) über den gesamten Behandlungszeitraum mittels einfaktoriellem ANOVA mit Bonferroni-Korrektur für Mehrfachtestungen (k = 3) miteinander verglichen (Flächeneinheit, engl.: *area unit*, a.u.). ns = nicht signifikant.

4.2.2.1 Bestimmung der Anwesenheit von OncoVEX im Vollblut von RIP1-Tag2 Mäusen mittels qPCR

Zu verschiedenen Zeitpunkten der vier-wöchigen Behandlung wurde den RIP1-Tag2 Versuchsmäusen zum Nachweis OncoVEX DNA Blut abgenommen. Dies erfolgte einmal vor der ersten OncoVEX Applikation sowie 4 Stunden und 72 Stunden danach. Des Weiteren 4 Stunden, 96 Stunden und zwei Wochen nach der zweiten OncoVEX Applikation. Das Blut wurde dann mittels quantitativer PCR auf die Anwesenheit von HSV-1 DNA (OncoVEX) untersucht.

Bereits 4 Stunden nach der Primär- und Sekundärinjektion von OncoVEX konnte HSV-1 DNA mittels quantitativer PCR im Blut nachgewiesen werden (**Abbildung 31**).

Beide OncoVEX Versuchsgruppen zeigen 72 – 96 Stunden nach der primären und sekundären OncoVEX Injektionen in etwa den gleichen Trend. In diesem Zusammenhang ist wichtig darauf hinzuweisen, dass die CT Werte (*Cycle Threshold*, Schwellenwertzyklus) unserer Analysen verhältnismäßig hoch, bei 35 – 45 lagen. Deshalb ist von einer relativ geringen Viruskonzentration im Blut auszugehen. Im Regelfach konnte 17 Tage nach der Sekundärinjektion von OncoVEX (Behandlungstag 29) im Blut keine Virus-DNA nachgewiesen werden. In einer Versuchsmaus konnte jedoch auch kurz vor Versuchsende, am Tag 3 (72 Stunden)

nach der zweiten OncoVEX Verabreichung, virale DNA im Vollblut der Versuchsmäuse nachgewiesen werden.

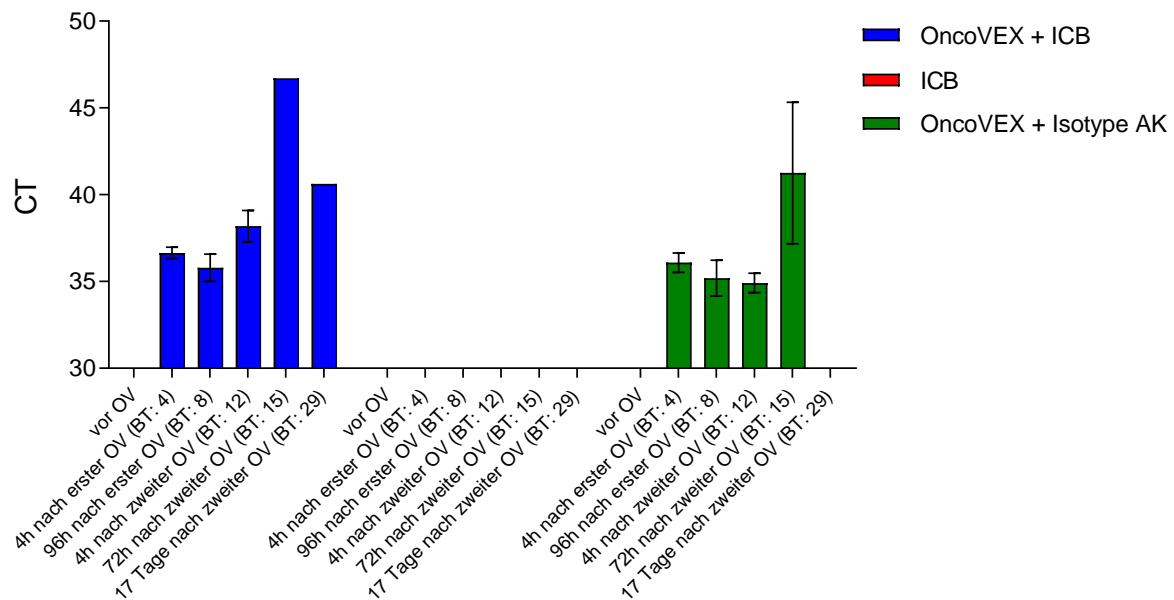


Abbildung 31: Quantitative PCR Analyse des Vollbluts der RIP1-Tag2 Mäuse zum Nachweis der Virus-DNA. Vor und nach den beiden OncoVEX Injektionen (OV) wurde den 10 – 11 Wochen alten RIP1-Tag2 Versuchsmäusen durch retrobulbärer Blutabnahme Blut abgenommen und mittels quantitativer PCR zum Nachweis viraler DNA untersucht. Der CT Wert (*Cycle Threshold*, Schwellenwertzyklus) gibt die Anzahl der Zyklen bis zum Nachweis der viralen DNA an. (n = 2 – 6).

4.2.2.2 Histopathologische Evaluation der Inselzellkarzinome und der Milz von RIP1-Tag2 Versuchsmäusen nach vierwöchiger kombinierter Viro-Immuntherapie ohne Verabreichung von Tag-T_H1 Zellen

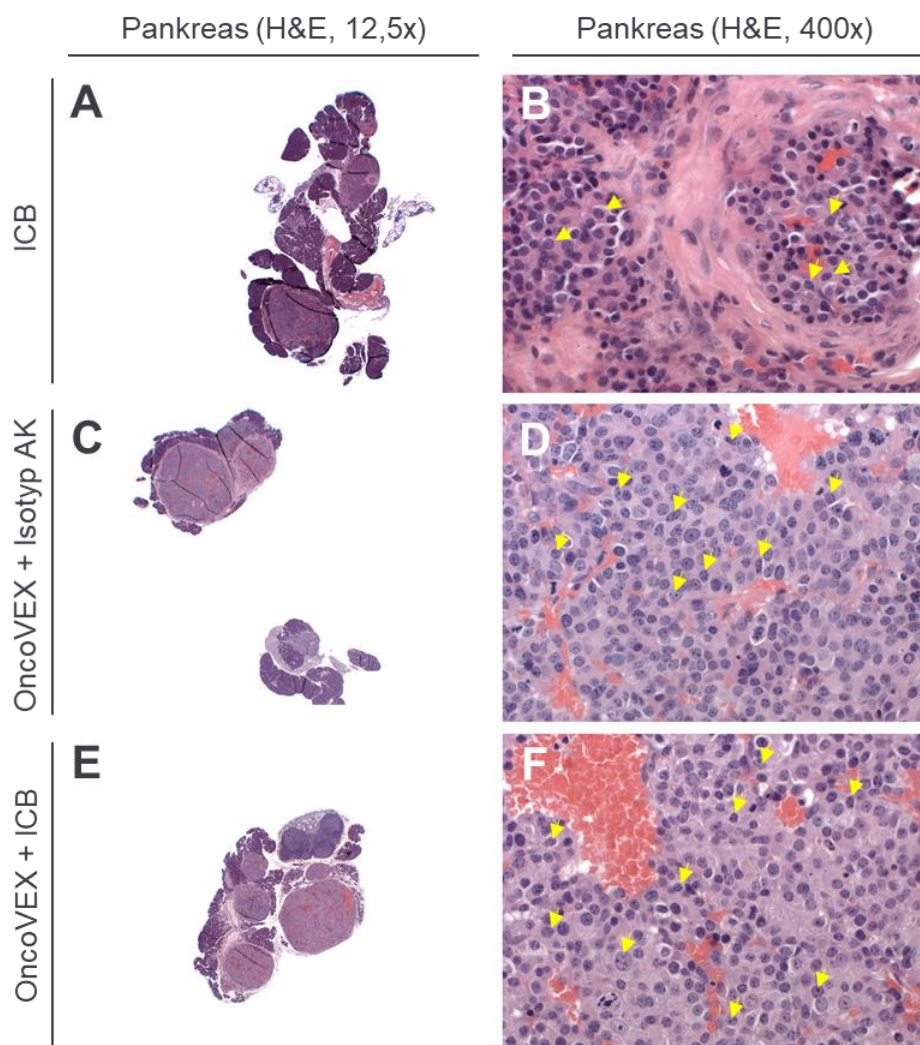
Analog zum Vorversuch wurden die Pankreata und die Milzen aller Versuchstiere mittels H&E-Färbung morphologisch analysiert (3.5.3.1) und mittels CD3 Immunhistochemie untersucht (3.5.3.2 Immunhistochemische Färbung).

Pankreas

Die Inselzellkarzinome bestehen aus mittelgroßen polymorphen Zellen mit ‘Salz und Pfeffer’ Nuklei (**Abbildung 32A-F**). Die Tumorzellen zeigen weniger Zytoplasma als die gesunden Zellen. An dem hohen mitotischen und apoptotischen Muster ist die hohe Proliferations- und Apoptose-Rate zu erkennen. In den repräsentativen

Detailaufnahmen der drei Versuchsgruppen sind ‘Salz und Pfeffer’ Nuklei mittels gelben Pfeil markiert (**Abbildung 32B, D, F**). Die größeren Tumore zeigen dilatierte Blutgefäße, wobei die kleinen Tumore insgesamt weniger Blutgefäße haben. Fokal konnte in den Blutgefäßen Tumorinvasionen nachgewiesen werden. Histopathologisch konnten keine Unterschiede zwischen den drei Versuchsgruppen detektiert werden (**Abbildung 32A-F**).

Die immunhistochemische Untersuchung zeigt relativ wenig CD3⁺ T-Zellinfiltrate. Jedoch zeigte die Versuchsgruppe, die mit OncoVEX + ICB behandelt wurde, eine erhöhte CD3⁺ T-Zellinfiltration verglichen mit den anderen beiden Versuchsgruppen (**Abbildung 32G-L**). Die meisten CD3⁺ T-Zellen waren in der Peripherie der Inselzellkarzinome nachweisbar und nur zu einem sehr geringfügigen Ausmaß im Tumorzentrum anzutreffen.



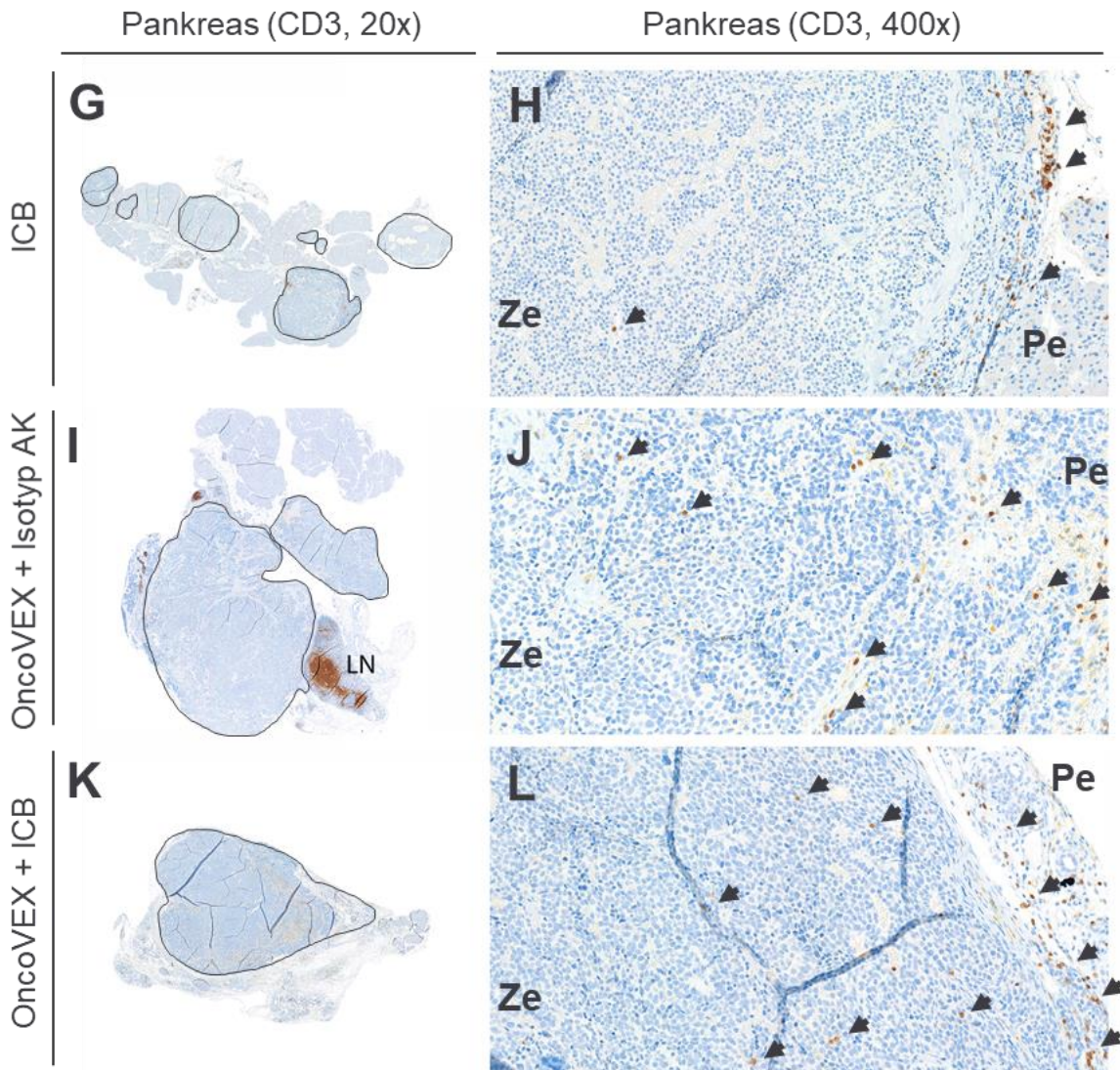


Abbildung 32: Histopathologische (H&E) und immunohistochemische (CD3) Analyse des Pankreasgewebes von RIP1-Tag2 Versuchsmäusen nach vier-wöchiger Behandlung mit der kombinierten Viro-Immuntherapie ohne Gabe von therapeutischen Tag-T_H1 Zellen. Die repräsentative H&E Färbungen der verschiedenen Versuchsgruppen zeigen die Pankreata inklusive den Inselzellkarzinomen (OncoVEX+ ICB; ICB; OncoVEX + Isotyp AK) in der Übersicht (**A+C+E**; Vergrößerung: 12,5x) und im Detail (**B+D+F**; Vergrößerung: 400x). Die 'Salz und Pfeffer' Nuklei sind in der Detailaufnahme mit gelben Pfeilen markiert (**B+D+F**). Repräsentative CD3 Immunhistochemie der Pankreata inklusive der Inselzellkarzinome (schwarze Umrandungen) der verschiedenen Versuchsgruppen (OncoVEX+ ICB; ICB; OncoVEX + Isotyp AK) in der Übersicht (**G+I+K**; Vergrößerung: 20x) und in der Detailaufnahme (**H+J+L**; Vergrößerung: 400x) mit Markierung des Tumorrandbereichs (Pe = Peripherie) und des Tumorzentrums (Ze = Zentrum). Die schwarzen Pfeile deuten auf CD3 positive T-Zellen in der Peripherie des Tumors hin. n = 2 – 5.

Milz

Die Milz der Versuchstiere aller drei Versuchsgruppen zeigte eine intakte Architektur mit einer gut definierten weißen (weiße Umrandungen) und roten Pulpa (gelbe Umrandungen; **Abbildung 33A+C+E**). Des Weiteren zeigten einige Milzen eine Akkumulation von Granulozyten um die Sinusoide der roten Pulpa, eine erhöhte Anzahl Megakaryozyten (gelbe Pfeile) und eine milde bis moderate Erythropoese, die durch die regelmäßigen Blutentnahmen erklärt werden kann (**Abbildung 33B+D+F**).

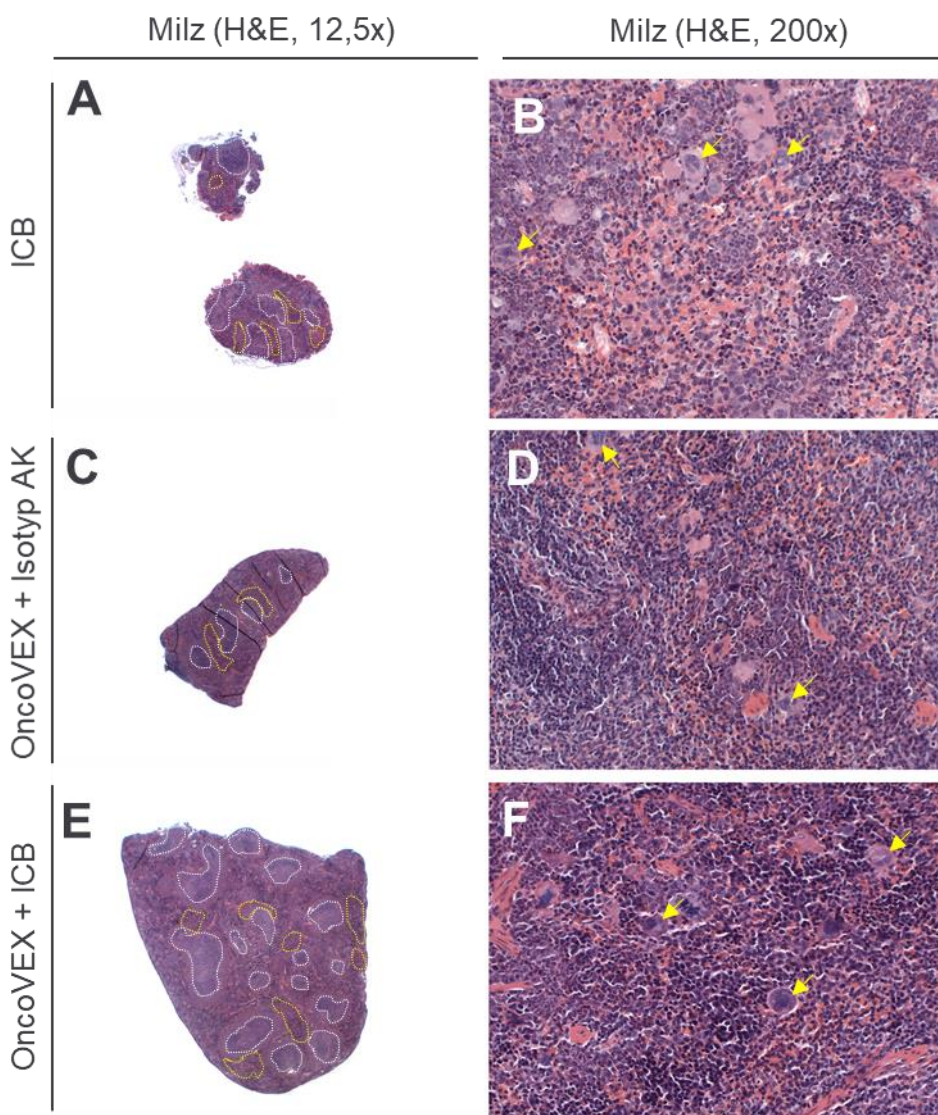


Abbildung 33: Histopathologische (H&E) Analyse der Milz der RIP1-Tag2 Versuchstiere nach vier-wöchiger Behandlung mit der kombinierten Viro-Immuntherapie ohne die Gabe von Tag-T_H1 Zellen. Repräsentative H&E Färbungen der Milzen der verschiedenen Versuchsgruppen (OncoVEX + ICB; ICB; OncoVEX + Isotyp AK) in der Übersicht (**A+C+E**; Vergrößerung: 12,5x) und im Detail (**B+D+F**;

Vergrößerung: 200x). Die Areale der roten Pulpa sind mit einer gestrichelten gelben Linie umrandet. Die Areale der weißen Pulpa sind mit einer gestrichelten weißen Linie umrandet. Megakaryozyten sind mit gelben Pfeilen markiert. n = 2 – 5.

4.2.2.3 Untersuchung der T-Zellpopulationen in der Milz unter Einfluss der kombinierten Viro-Immuntherapie ohne Gabe der Tag-T_H1 Zellen mittels Durchflusszytometrie

Um den additiven Therapieeffekt der Tag-T_H1 Zellen der kombinierten Viro-Immuntherapie auf zellulärer Ebene zu evaluieren, wurden die Milzen der Versuchstiere entnommen, aufgearbeitet und mittels Durchflusszytometrie auf CD45.2 positive Immunzellpopulationen mit Fokus auf die CD4⁺-und CD8⁺ T-Zellen analysiert. Die prozentualen Angaben sind im Folgenden jeweils auf die Anzahl CD45.2 positiver Immunzellen angegeben. Die Versuchsmäuse, die mit OncoVEX + ICB behandelt wurden, zeigten trotz der fehlenden Tag-T_H1 Behandlung eine Reduktion der T-Zellen auf $16,16 \pm 1,4 \%$ verglichen zur Kontrollgruppe, die mit der OncoVEX Solotherapie behandelt wurde ($20,27 \% \pm 0,78 \%$, *p = 0,0262; **Abbildung 34**). Die relative Anzahl der T-Zellen der Versuchsmäuse, die nur mit ICB therapiert wurden, war ebenfalls mit $14,79 \pm 0,45 \%$ geringer als die mit OncoVEX + Isotyp AK therapierten Versuchsmäuse (*p = 0,0337; **Abbildung 34**). Die relative Anzahl der B-Zellen, Granulozyten und Makrophagen zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Behandlungsgruppen (**Abbildung 34**). Die Anzahl B-Zellen in der Milz war überraschend gering, sodass vermutlich ein technischer Grund zu dieser Beobachtung beigetragen hat. Sonanini *et al.* zeigte nach einer 2 Gy Niedrigdosis-Ganzkörperbestrahlung eine deutlich höhere Anzahl an B-Zellen in der Milz [244].

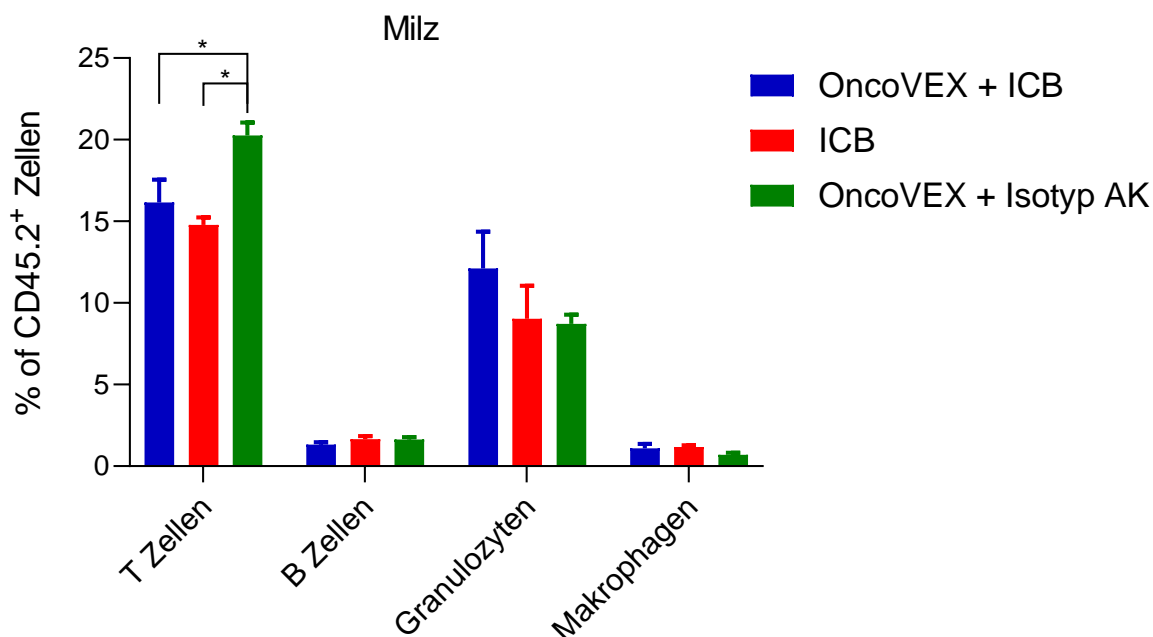


Abbildung 34: Analyse der Immunzellen der Milz von RIP1-Tag2 Versuchsmäusen nach vierwöchiger Behandlung mit der kombinierten Viro-Immuntherapie ohne die Gabe der Tag-T_H1 Zellen mittels Durchflusszytometrie. Prozentuale Anzahl der CD3⁺ T-Zellen, B-Zellen (CD19), Granulozyten (CD11b) und Makrophagen (F4/80) von CD45.2⁺ T-Zellen. Zur statistischen Auswertung wurde ein zweifaktorieller ANOVA mit Bonferroni-Korrektur für Mehrfachtestungen (k = 3) verwendet. Ein Balken präsentiert jeweils den Mittelwert ± SEM einer Gruppe (OncoVEX + ICB: n = 6; ICB: n = 2; OncoVEX + Isotyp AK: 5). T-Zellen: ICB vs. OncoVEX + Isotyp AK: *p = 0,0337; OncoVEX + Isotyp AK vs. OncoVEX + ICB: *p = 0,0262.

Des Weiteren wurde die Expression des Immuncheckpoints PD-1 auf der Membranoberfläche der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen untersucht.

Nur $2,26 \pm 0,14$ % der CD4⁺ T-Zellen der Milz der mit OncoVEX + Isotyp AK behandelten Versuchstiere exprimierten PD-1. Im Gegensatz hierzu führte die Therapie mit ICB zum eindrucksvollen, 6 – 10-fachen Anstieg der PD-1 Expression der CD4⁺ T-Zellen. $22,57 \pm 4,06$ % der CD4⁺ T-Zellen der ausschließlich mit ICB-behandelten Versuchsmäuse und $14,59 \pm 1,42$ % der CD4⁺ T-Zellen der mit ICB + OncoVEX-behandelten Versuchsmäuse exprimierten PD-1 auf deren Membranoberfläche (**Abbildung 35A**). Ein ähnlicher ICB-abhängiger Anstieg der membranären PD-1 Expression wurde bei den CD8⁺ T-Zellen beobachtet (**Abbildung 35B**). Nur $2,38 \pm 0,26$ % der CD8⁺ T-Zellen der Milz der mit OncoVEX + Isotyp AK

behandelten Versuchstiere exprimierten PD-1. Im Gegensatz hierzu führte die Therapie mit ICB zum eindrucksvollen, 8 – 13-fachen Anstieg der PD-1 Expression der CD8⁺ T-Zellen. 30,76 ± 15,17 % der CD8⁺ T-Zellen der ausschließlich mit ICB-behandelten Versuchsmäuse und 19,51 ± 5,48 % der CD4⁺ T-Zellen der mit ICB + OncoVEX-behandelten Versuchsmäuse exprimierten PD-1 auf deren Membranoberfläche (**Abbildung 35B**).

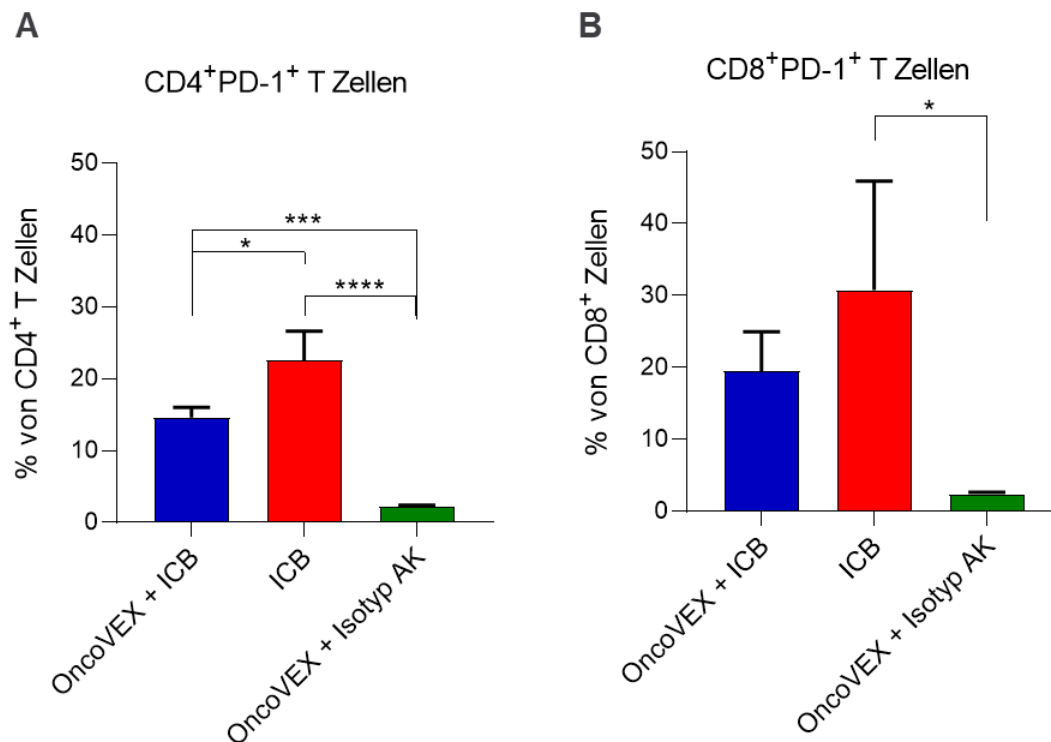


Abbildung 35: Analyse der membranären PD-1 Expression von CD4⁺, CD8⁺ T-Zellen in der Milz von RIP1-Tag2 Versuchsmäusen nach vier-wöchiger Behandlung mit der kombinierten Viro-Immuntherapie ohne die Gabe der Tag-T_H1 Zellen mittels Durchflusszytometrie. Zur statistischen Auswertung wurde ein einfaktorielles ANOVA mit Bonferroni-Korrektur für Mehrfachtestungen (k = 3) verwendet. Ein Balken präsentiert jeweils den Mittelwert ± SEM einer Gruppe (OncoVEX + ICB: n = 6; ICB: n = 2; OncoVEX + Isotyp AK: n = 5). **(A)** CD4⁺PD-1⁺ T-Zellen: OncoVEX + Isotyp AK vs. ICB: ****p < 0,0001; OncoVEX + ICB vs. OncoVEX + Isotyp AK: ***p = 0,0002; OncoVEX + ICB vs. ICB: *p = 0,0288 **(B)** CD8⁺PD-1⁺ T-Zellen: OncoVEX + Isotyp AK vs. ICB: *p = 0,0471; OncoVEX + ICB vs. OncoVEX + Isotyp AK: ns; OncoVEX + ICB vs. ICB: ns. ns = nicht signifikant.

4.2.3 Analyse der Therapieeffizienz der kombinierten Viro-Immuntherapie mittels Blutglukosewertmessung bei RIP1-Tag2 Versuchsmäusen ohne ICB-Gabe

Im nächsten Versuchsvorhaben wurde die Therapieeffizienz einer bimodalen Viro-Immuntherapie bestehend aus Tag- T_{H1} und OncoVEX untersucht um auf den additiven Therapieeffekt der ICB rückzuschließen. Der Versuchsaufbau erfolgte analog zum in **Abbildung 23** dargestellten Schema. Eine RIP1-Tag2 Versuchsgruppe wurde mit der vollständigen kombinierten Viro-Immuntherapie therapiert (OncoVEX + Tag- T_{H1} + ICB) und die Kontrollgruppe wurde anstelle von ICB mit Isotyp AK behandelt (**Abbildung 36A**). Der initiale Blutglukosewert der zu diesem Zeitpunkt 10-11 Wochen alten Versuchsmäuse wurde aufgrund von Schwankungen zwischen den Versuchsgruppen, zur vereinfachten Darstellung, auf 100 % gesetzt. Der initiale Blutglukosewert jeder Versuchsgruppe ist in der Beschreibung der **Abbildung 36** in mg/dl angegeben (entspricht einem rBGW von 100 %).

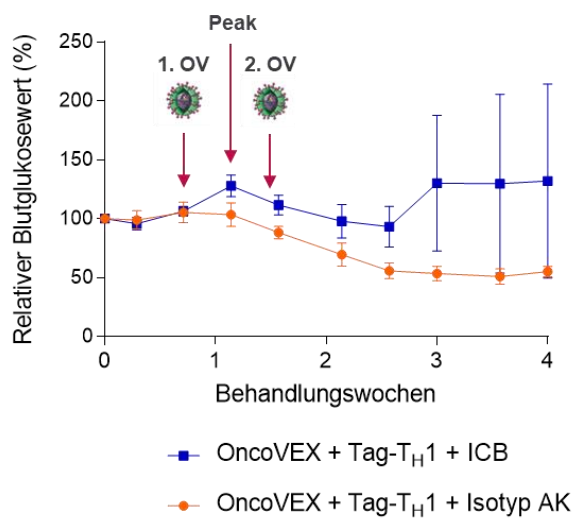
Der Blutglukosewert der beiden Versuchsgruppen lag zu Therapiebeginn durchschnittlich bei ca. 90 – 95 mg/dl (**Abbildung 36A**). 5 Tage nach der OncoVEX Primäinjektion wurde in der Therapiegruppe ein signifikanter Anstieg des rBGWs auf $128,88 \pm 9,25$ % beobachtet (**Abbildung 36A+B**). In der Kontrollgruppe hingegen blieb der rBGW zu diesem Zeitpunkt mit $103,40 \pm 10,11$ % konstant.

Somit war die zusätzliche Gabe der ICB für den signifikanten Anstieg des Blutglukosewertes verantwortlich (**Abbildung 36A+B**). Zudem entwickelte eine Versuchsmaus der vollständigen kombinierten Viro-Immuntherapie Diabetes mellitus mit deutlicher Entgleisung der Blutglukosewerte. Der rBGWs lag am Versuchsende bei 376 %, das die hohe Standardabweichung (SEM) in **Abbildung 36A** erklärt. Nach der Organisation stellte sich heraus, dass durch die kombinierte Viro-Immuntherapie die Inselzellkarzinome in dieser Versuchsmaus vollständig eradiziert wurden (**Abbildung 37**). Eine statistische Analyse der relativen Blutglukosespiegel über den Behandlungszeitraum zeigte, dass durch die kombinierte Viro-Immuntherapie ($451,80 \pm 86,79$ a.u.) ein höherer rBGW im Vergleich zur Kontrolltherapie ohne ICB $305,70$ a.u. $\pm 20,31$ a.u erzielt werden konnte (**Abbildung 36C**).

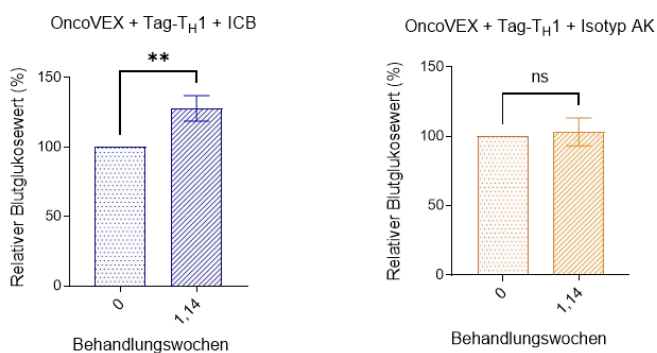
Zudem zeigte eine Versuchsmaus aus der Gruppe, die mit der kombinierten Immuntherapie behandelt wurde, einen erheblichen Anstieg des rBGWs (zu

Therapieende: 376 %), dass die hohe Standardabweichungen (SEM) in **Abbildung 36A** erklärt. Im Rahmen der Eröffnung des Peritoneums konnten in diesem Versuchstier visuell keine Inselzellkarzinome des Pankreas identifiziert werden (**Abbildung 37A**). Die histopathologische Analyse des Pankreas dieser Versuchsmaus zeigte eine ausgeprägte Apoptose in den Langerhans-Inseln (schwarzer Pfeil, **Abbildung 37B**) zusammen mit einem ausgeprägten Entzündungsinfiltrat. Die Insulin Immunhistochemie-Analyse zeigte eine extensive Atrophie aller β -Zellen (**Abbildung 37B**).

A



B



C

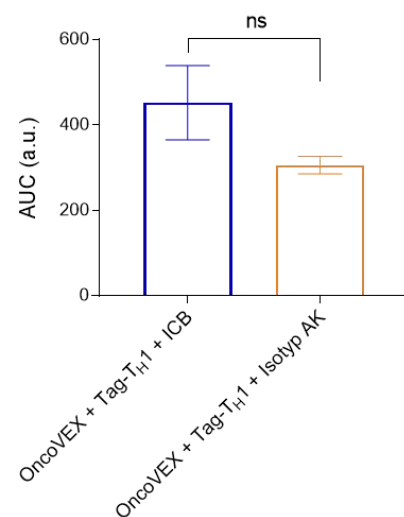


Abbildung 36: Evaluierung des Blutglukosewertes in RIP1-Tag2 Versuchsmäusen unter der kombinierten Viro-Immunitherapie mit und ohne ICB Gabe. (A) Zeitlicher Verlauf der rBGW der beiden Versuchsgruppen (OncoVEX + Tag- T_{H1} + ICB: n = 8; OncoVEX + Tag- T_{H1} + Isotyp AK: n = 8). Für die Versuchsgruppe OncoVEX + Tag- T_{H1} + ICB entsprechen 100 % des rBGWs einem Mittelwert der Blutglukose von $89,50 \pm 3,84$ mg/dl; Für die Versuchsgruppe OncoVEX + Tag- T_{H1} + Isotyp AK entsprechen 100 % des rBGWs einem Mittelwert von $95,50 \pm 7,44$ mg/dl. **(B)** Um den Anstieg des rBGWs statistisch zu evaluieren, wurde in jeder Versuchsgruppe der rBGW zum Zeitpunkt des Behandlungsstarts, mit dem rBGW zum Zeitpunkt des *Peaks* (5 Tage nach erster OncoVEX Injektion; Behandlungswoche: 1,14; **p = 0,0093) mittels ungepaartem parametrischem T-Test verglichen. **(C)** Zur statistischen Auswertung wurden die Flächen unter den relativen Blutglukosekurven für den Behandlungszeitraum mittels ungepaartem parametrischem T-Test miteinander verglichen und sind mit der Einheit (Flächeneinheit, engl.: *area unit*, a.u.) angegeben.

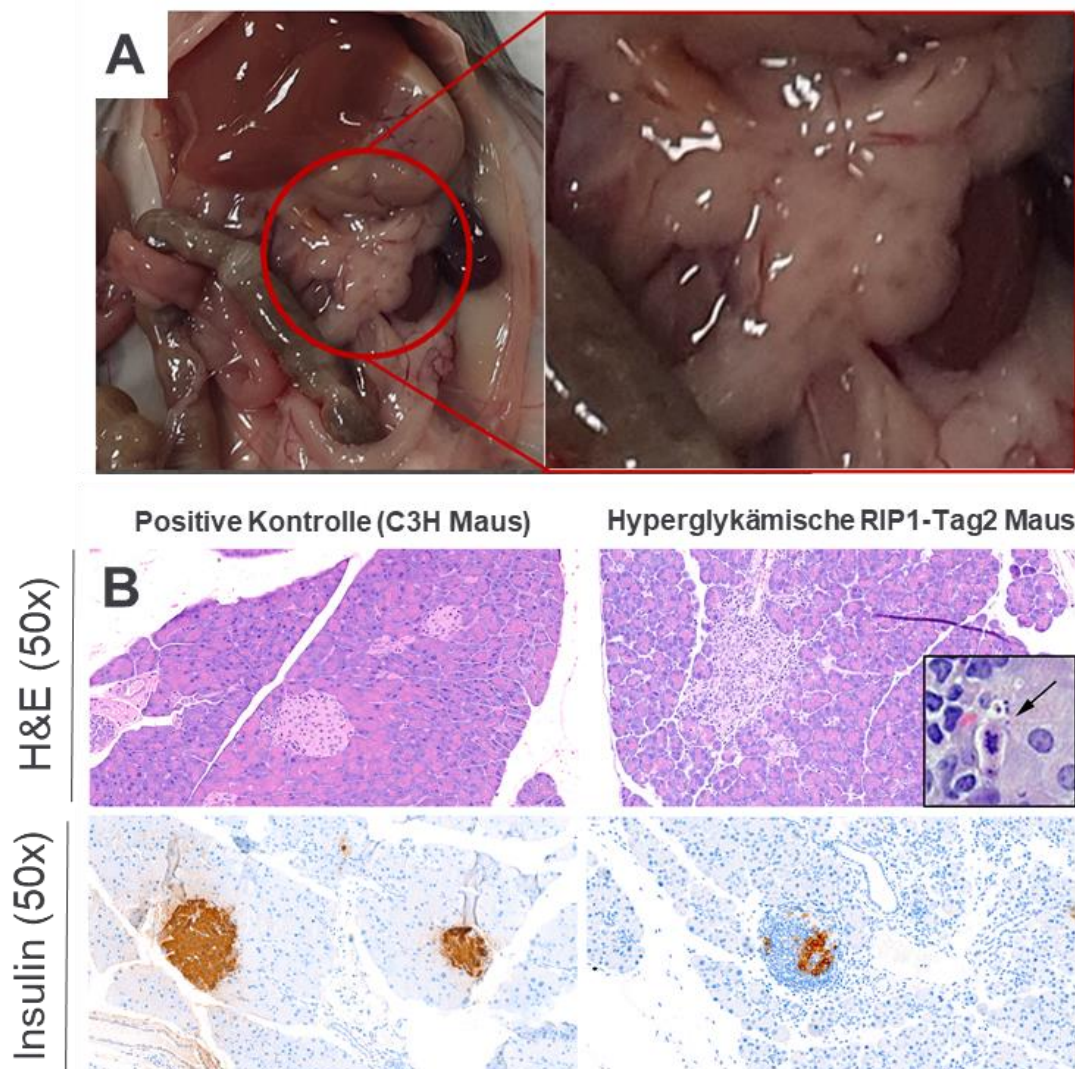


Abbildung 37: (A) Fotografie des Pankreas der hyperglykämischen RIP1-Tag2 Versuchsmaus nach vier-wöchiger kombinierter Viro-Immuntherapie (OncoVEX + Tag-T_H1 + ICB). (A) Ab der 3. Behandlungswoche entwickelte dieses Versuchstier einen rBGW von 359,00 % (284 mg/dl). Die Abbildung zeigt das Pankreas (in situ) nach Eröffnung des Peritoneums am Versuchsende. **(B)** Die repräsentative H&E Färbung (oben) zeigt in der hyperglykämischen RIP1-Tag2 Versuchsmaus apoptotische Inselzellen (schwarzer Pfeil) mit prominentem Immunzellinfiltrat während in der C3H Kontrollmaus intakte Langerhans-Inseln detektiert wurden. Die Insulin Immunhistochemie (unten) zeigt eine ausgeprägte Atrophie der β -Zellen (braun, Insulin IHC) in allen Langerhans-Inselzellen der hyperglykämischen RIP1-Tag2 Versuchsmaus während in der C3H Kontrollmaus intakte Insulin-produzierende β -Zellen nachgewiesen wurden.

4.2.3.1 Histopathologische Evaluation der Inselzellkarzinome und der Milz von RIP1-Tag2 Versuchsmäusen nach vierwöchiger kombinierter Viro-Immuntherapie mit oder ohne ICB Gabe

Pankreas

In allen Pankreata der RIP1-Tag2 Versuchsmäuse der beiden Versuchsgruppen konnten histopathologisch (H&E Färbungen) Inselzellkarzinome nachgewiesen werden. Diese zeigten eine ähnliche Morphologie wie die Inselzellkarzinome in den Vorversuchen (4.2.2.2).

Größere Tumorherde zeigen mehr dilatierte Blutgefäße als kleinere Tumore (**Abbildung 38A+C**). Des Weiteren waren die Tumorzellen eng gepackt und zeigten eine höhere Proliferationsrate als gesunde Betazellen (**Abbildung 38B+D**). Die CD3⁺ T-Zellen sind primär in der Peripherie des Tumors verteilt (**Abbildung 38E-H**). Des Weiteren konnten in der Peripherie der Inselzellkarzinome deutlich mehr CD3⁺ T-Zellen durch die zusätzliche Behandlung mit ICB (OncoVEX + Tag-T_H1 + ICB) verglichen mit der Kontrollgruppe (OncoVEX + Tag-T_H1 + Isotyp AK) beobachtet werden (**Abbildung 38F+H**).

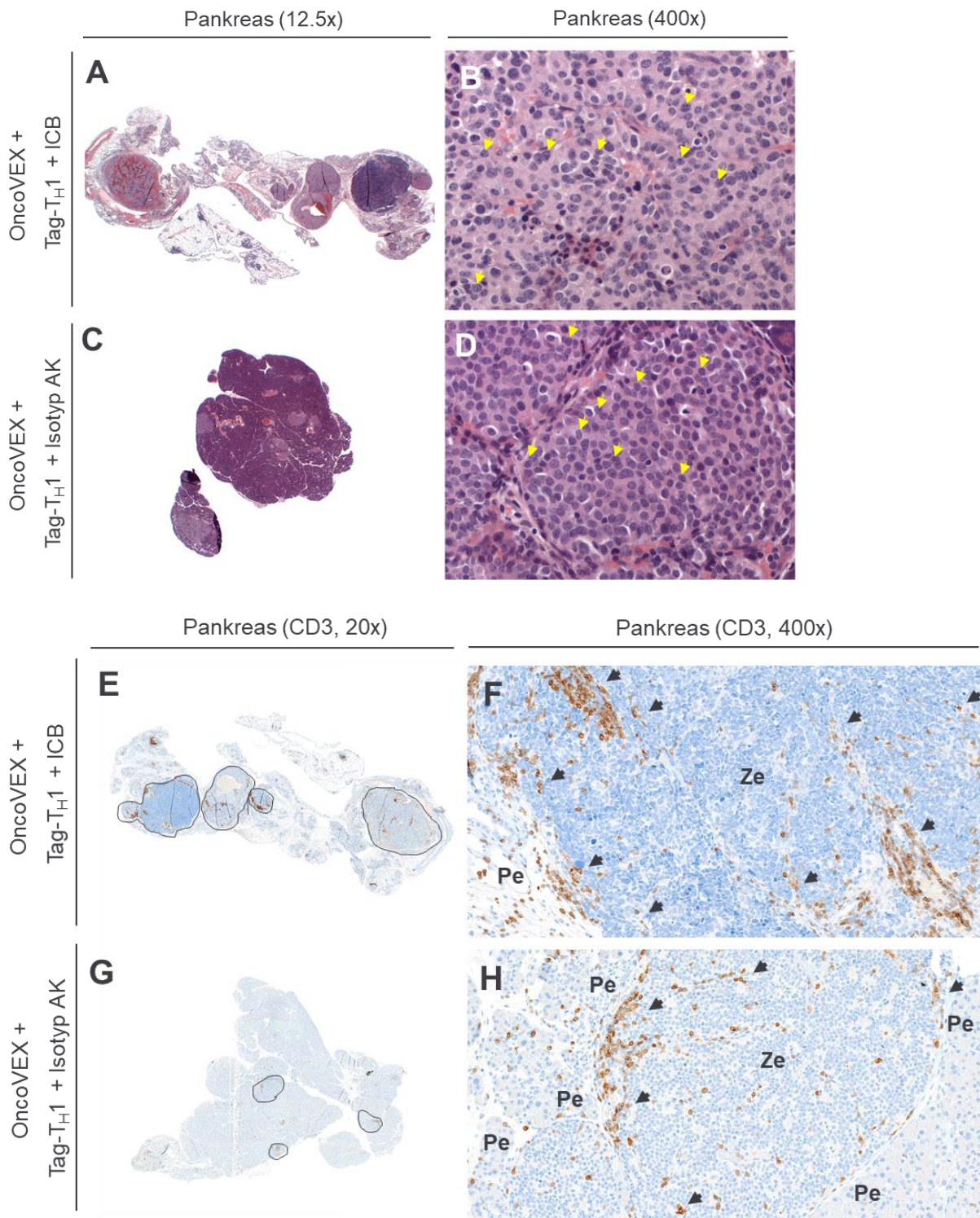


Abbildung 38: Histopathologische (H&E) und immunhistochemische (CD3) Analyse des Pankreasgewebes von RIP1-Tag2 Versuchsmäusen nach vier-wöchiger Behandlung mit der kombinierten Viro-Immuntherapie mit und ohne die ICB Gabe. Die repräsentative H&E Färbungen zeigen den Pankreas inklusive der Inselzellkarzinome der therapierten Versuchsmäuse (OncoVEX + Tag-T_H1 + ICB) und die der Kontrollgruppe (OncoVEX + Tag-T_H1 + Isotyp AK) in der Übersicht (A+C**; Vergrößerung: 12,5x und im Detail (**B+D**; Vergrößerung: 400x). Die 'Salz und Pfeffer' Nuklei sind in der**

Detailaufnahme mit gelben Pfeilen markiert. Repräsentative CD3 Immunhistochemie der Pankreata inklusive der Inselzellkarzinome (schwarze Umrandungen) der verschiedenen Versuchsgruppen (OncoVEX + Tag- T_{H1} + ICB; OncoVEX + Tag- T_{H1} + Isotyp AK) in der Übersicht (**E+G**; Vergrößerung: 20x) und in der Detailaufnahme (**F+H**; Vergrößerung: 400x) mit Markierung des Tumorrandbereichs (Pe = Peripherie) und des Tumorzentrums (Ze = Zentrum). Die schwarzen Pfeile deuten auf CD3 positive T-Zellen in der Peripherie des Tumors hin. n = 4 – 7.

Milz

Die Milz aller Versuchsmäuse zeigte eine intakte Architektur mit gut definierter weißer (weiß gestrichelte Linie) und roter Pulpa (gelb gestrichelte Linie; **Abbildung 39A+C**). Des Weiteren konnte eine erhöhte Anzahl an Granulozyten und an Megakaryozyten (gelbe Pfeile) im Bereich der Sinusoide der roten Pulpa als auch eine milde bis moderate Erythropoese beobachtet werden (**Abbildung 39B+D**). Zwischen den Gruppen konnte kein histopathologischer Unterschied festgestellt werden.

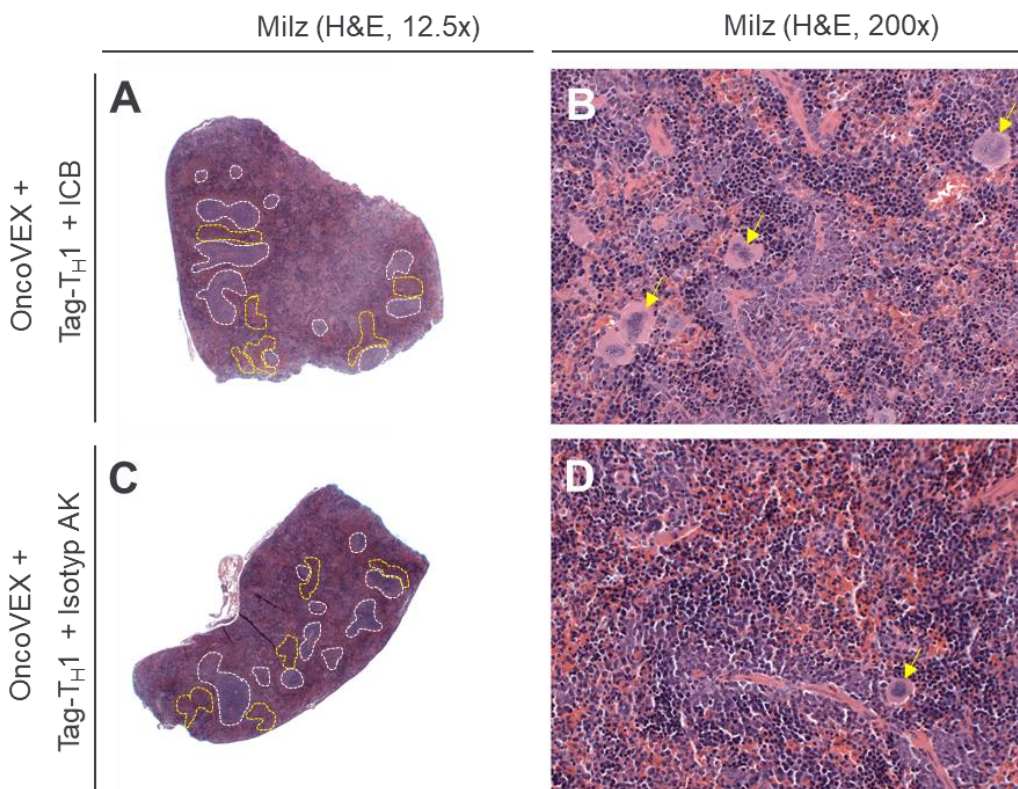


Abbildung 39: Histopathologische (H&E) Untersuchung der Milz der RIP1-Tag2 Versuchstiere nach vier-wöchiger Behandlung mit der kombinierten Viro-Immuntherapie mit und ohne die Gabe von ICB. Repräsentative H&E Färbungen der Milzen der verschiedenen Versuchsgruppen (Tag- T_{H1} + OncoVEX + ICB; Tag- T_{H1} + OncoVEX + Isotyp AK) in der Übersicht (A+C**; Vergrößerung: 12,5x) und**

im Detail (**B+D**; Vergrößerung: 200x). Die Areale der roten Pulpa sind mit einer gestrichelten gelben Linie umrandet. Die Areale der weißen Pulpa sind mit einer gestrichelten weißen Linie umrandet. Megakaryozyten sind mit gelben Pfeilen markiert. n = 4 – 7.

4.2.3.2 Untersuchung der T-Zellpopulationen in der Milz unter Einfluss der kombinierten Viro-Immuntherapie ohne die Gabe der ICB mittels Durchflusszytometrie

Um den additiven Therapieeffekt der ICB im Rahmen der kombinierten Viro-Immuntherapie auf zellulärer Ebene zu evaluieren, wurden die Milzen, das Blut, die inguinalen (iLK) und die drainierenden Pankreas Lymphknoten (pLK) der Versuchstiere entnommen, aufgearbeitet und mittels Durchflusszytometrie auf CD45.2 positive Immunzellpopulationen mit Fokus auf die CD4⁺- und CD8⁺ T-Zellen analysiert. Die prozentualen Angaben sind im Folgenden jeweils auf die relative Anzahl CD45.2 positiver Immunzellen angegeben.

Im Blut der Versuchsmäuse, die zusätzlich mit ICB behandelt wurden, konnte eine um in etwa 50 % verringerte Anzahl von CD4⁺ T-Zellen ($16,49 \pm 4,703$ %) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tag-T_{H1} + OncoVEX + Isotyp AK), die nicht mit ICB behandelt wurde ($31,44 \pm 5,16$ %; *p = 0,0406) gemessen werden (**Abbildung 40B**).

Zudem konnte in der Milz, im Blut und in den iLK und pLK eine tendenziell geringere Anzahl von CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tag-T_{H1} + OncoVEX + Isotyp AK) detektiert werden (**Abbildung 40A-D**). Die geringere relative Anzahl an CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen deutet darauf hin, dass die zusätzliche Gabe der ICB die Migration dieser Zellen aus den sekundären lymphatischen Organen und dem Blut zum Tumor unterstützt.

Des Weiteren wurden CD25 (IL-2R) und CD69 exprimierende CD4⁺ T-Zellen zum Nachweis der Zellaktivierung und Tag-TZR zur Identifikation von Tag-T_{H1} Zellen untersucht.

In der Versuchsgruppe, die zusätzlich mit ICB behandelt wurde, konnten sowohl in der Milz, im Blut als auch in den pLK und iLK eine (1,5 – 2-fach) erhöhte relative Anzahl an CD25 exprimierenden CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden (**Abbildung 40E-H**).

Zudem wurde in der Milz unter zusätzlicher ICB Behandlung eine signifikant, in etwa zweifach, erhöhte relative Anzahl an aktivierten CD69 exprimierenden CD4⁺ T-Zellen

(10,00 ± 1,00 %) im Vergleich zur Kontrollgruppe (ohne ICB Gabe) nachgewiesen (5,74 ± 0,36 %; **Abbildung 40E**). Eine tendenziell erhöhte Aktivierung (CD69) der CD4⁺ T-Zellen konnte auch in den iLK und pLK unter zusätzlicher ICB Behandlung nachgewiesen werden (**Abbildung 40G+H**).

Da alle Versuchstiere mit Tag-spezifischen T_{H1} Zellen behandelt wurden (die letzte *i.p.* Applikation war vor 5 Tagen) konnten in allen analysierten lymphatischen Organen die therapeutischen Tag-spezifischen T_{H1} Zellen nachgewiesen werden. Die zusätzliche Behandlung mit ICB führte zu einem signifikanten Anstieg der relativen Anzahl von Tag-T_{H1} Zellen in der Milz, im Blut und den pLK, (**Abbildung 40E+F+H**).

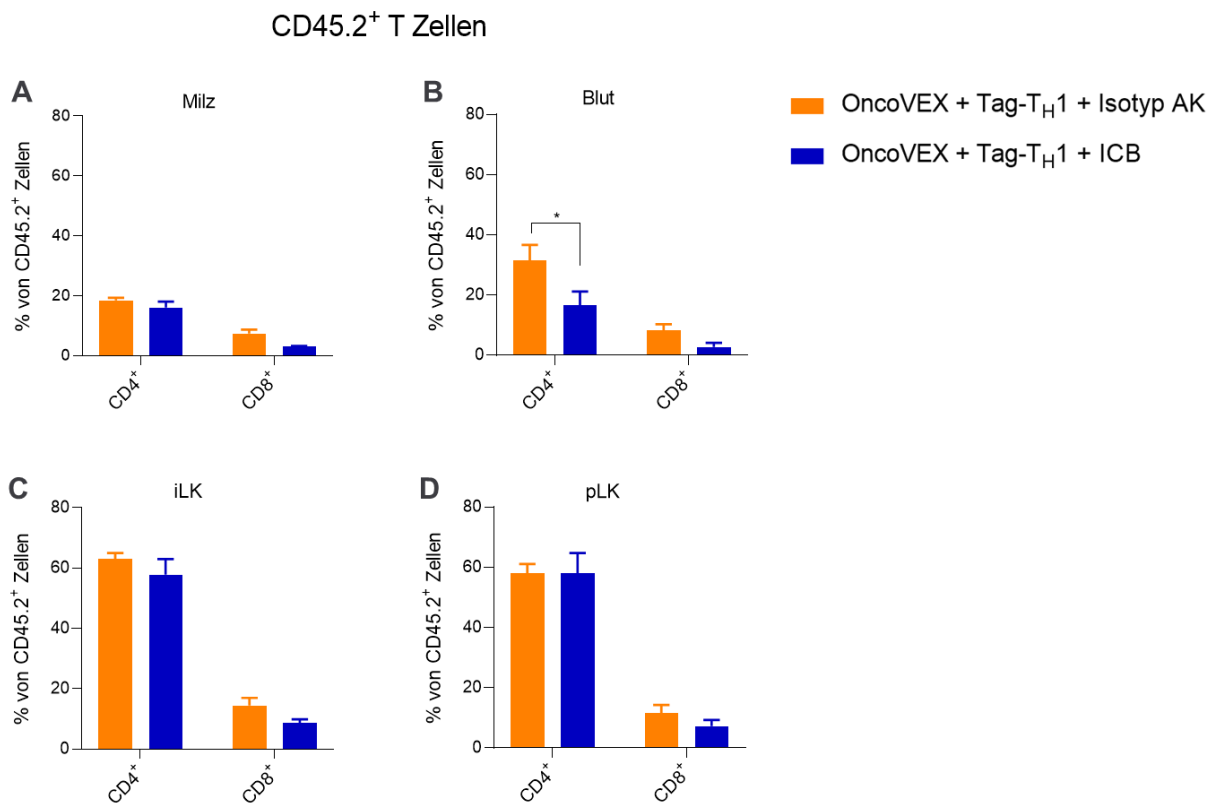
Der größte Anstieg war in der Milz und im peripheren Blut zu verzeichnen. In der Milz der mit der kombinierten Viro-Immuntherapie (OncoVEX + Tag-T_{H1} + ICB) behandelten Versuchstiere wurden 25,48 ± 5,19 % Tag-T_{H1} Zellen detektiert, während 9,74 ± 2,68 % Tag-T_{H1} Zellen in der Milz der Versuchstiere ohne ICB Gabe gemessen wurden (****p = 0,0001; **Abbildung 40E**). Des Weiteren wurde im Blut der Versuchstiere, die mit der vollständigen kombinierten Viro-Immuntherapie behandelt wurden, 17,02 ± 5,97 % Tag-T_{H1} Zellen analysiert. Im Blut der Versuchstiere ohne ICB Gabe wurden hingegen nur 5,08 ± 1,78 Tag-T_{H1} Zellen detektiert (**p = 0,0064; **Abbildung 40F**). Die relative Anzahl Tag-T_{H1} Zellen stieg im pLK unter der zusätzlichen Behandlung mit ICB (18,58 ± 3,99 %) im Vergleich zur Kontrollgruppe ebenfalls signifikant an (33,77 ± 2,62 %, **p = 0,0018; **Abbildung 40H**).

Analog an die Untersuchungen der CD4⁺ T-Zellen wurde die membranäre CD25 und CD69 Expression der CD8⁺ T-Zellen im Hinblick auf den Effekt einer zusätzlichen ICB Behandlung untersucht (**Abbildung 40I-K**).

In der Milz, als auch in den iLK und pLK lag der prozentuale Anteil der CD25 exprimierenden CD8⁺ T-Zellen bei unter 3 %.

In der Milz der zusätzlich mit ICB behandelten Versuchsmäuse konnte eine zwar geringe, aber dennoch signifikant beinahe vierfach erhöhte relative Anzahl an CD25 exprimierenden CD8⁺ T-Zellen (0,40 ± 0,05 %) im Vergleich zur Kontrollgruppe (0,12 ± 0,01 %; nicht signifikant) nachgewiesen werden (**Abbildung 40I**). Ein identischer Trend zeigte sich auch in den iLK und pLK (**Abbildung 40J+K**).

Des Weiteren führte die zusätzliche ICB-Gabe zur signifikanten Steigerung der Aktivierung der endogenen CD8⁺ T-Zellen in der Milz und den iLK und pLK im Vergleich zur Kontrollgruppe (**Abbildung 40I-K**). Die additive Gabe von ICB führte in der Milz der Versuchstiere zu einem dreifachen Anstieg der relativen Anzahl der aktivierten CD69 exprimierenden CD8⁺ T-Zellen ($6,38 \pm 0,53$ %) im Vergleich zur Versuchsgruppe ohne ICB Gabe ($2,41 \pm 0,33$ %; ****p < 0,0001; **Abbildung 40I**). Zudem induzierte die zusätzliche ICB Gabe in den iLK der Versuchstiere eine doppelt so hohe relative Anzahl an CD8⁺CD69⁺ T-Zellen ($6,69 \pm 0,96$ %) verglichen mit der relativen Anzahl in den iLK ($3,72 \pm 0,56$ %) ohne die ICB Administration (**p < 0,0043; **Abbildung 40J**). In den drainierenden pLK wurden in der Versuchsgruppe mit ICB Gabe identisch zu den iLK eine doppelt so hohe relative Anzahl an aktivierten CD8⁺ T-Zellen ($8,98 \pm 2,32$ %) im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne ICB Gabe detektiert ($4,29 \pm 0,48$ %; **p < 0,0017, **Abbildung 40K**).



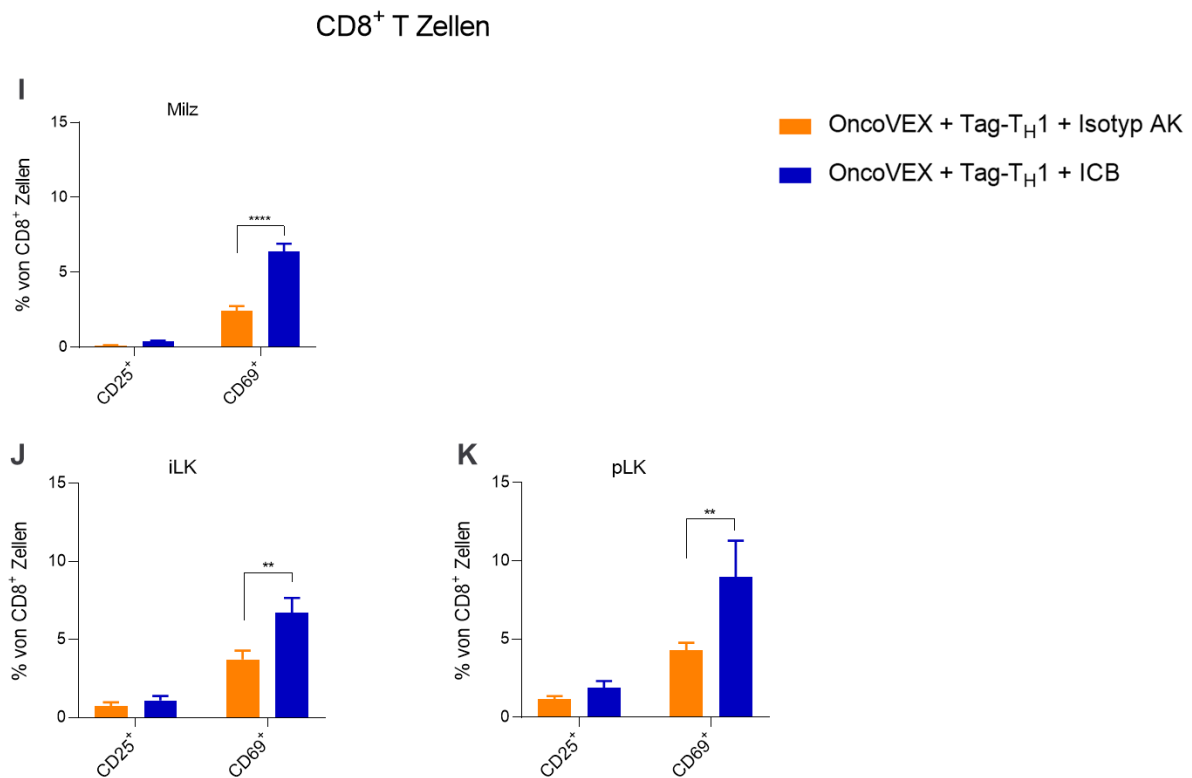
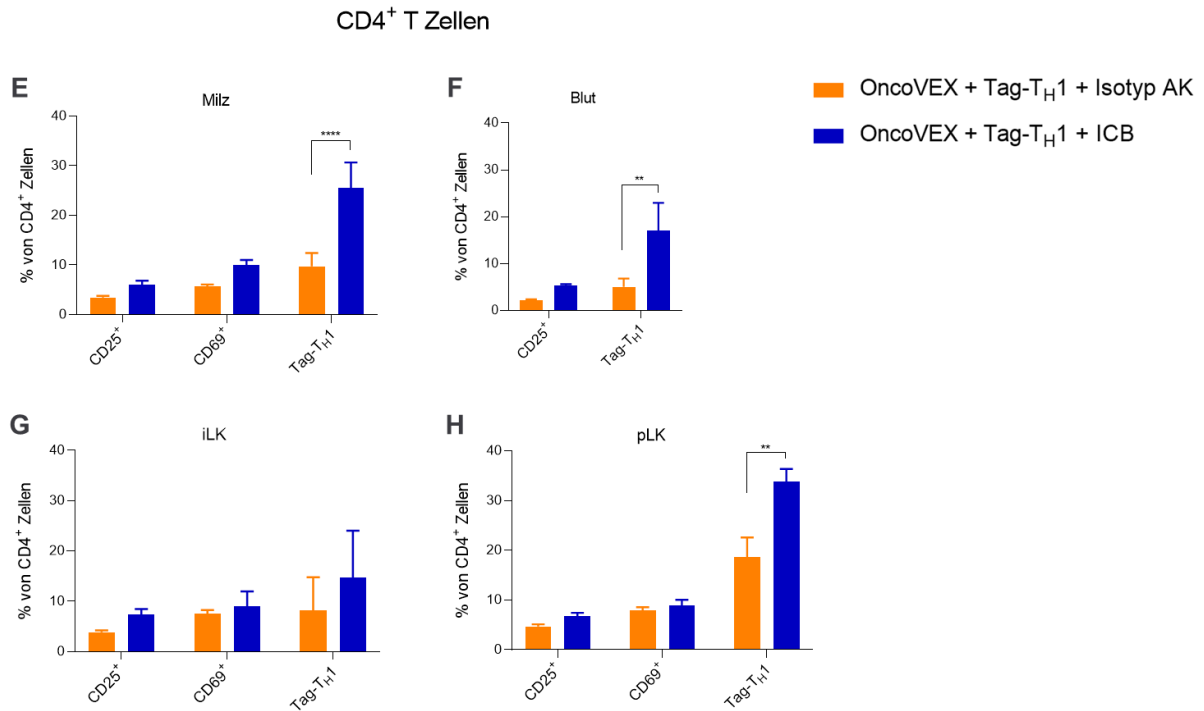


Abbildung 40: Analyse der Lymphozyten (CD45.2⁺ Zellen) in den lymphatischen Organen von RIP1-Tag2 Versuchsmäusen nach vier-wöchiger Behandlung mit der kombinierten Viro-Immuntherapie mittels Durchflusszytometrie. Es wurden die Milz, das Blut, der inguinale Lymphknoten (iLK) und der pankreatische Lymphknoten (pLK) untersucht. (A-D) Prozentuale Anzahl

der CD4⁺– und CD8⁺ T-Zellpopulationen von CD45.2⁺ T-Zellen. **(E-H)** Prozentuale Anzahl der CD25 oder CD69 exprimierenden CD4⁺ T-Zellen und Tag-T_H1 Zellen. **(I-K)** Prozentuale Anzahl der CD25 und CD69 exprimierenden aktivierenden CD8⁺ T-Zellen. Zur statistischen Auswertung wurde ein zweifaktorieller ANOVA mit Bonferroni-Korrektur für Mehrfachtestungen (k = 2 – 3) verwendet. Ein Balken präsentiert jeweils den Mittelwert ± SEM einer Gruppe. **(B)**: CD4⁺ T-Zellen: *p = 0,0406; **(E)** Tag-T_H1: *p = 0,0146; **(F)** Tag-T_H1: **p = 0,0064; **(H)** Tag-T_H1: **p = 0,0018; **(I)** CD4⁺CD69⁺: ****p < 0,0001; **(J)** CD4⁺CD69⁺: **p = 0,0043; **(K)** CD4⁺CD69⁺: **p = 0,0017. n = 3 – 7.

4.2.4 *In vitro* Replikationsvermögen von OncoVEX in RIP1-Tag2 Zellen

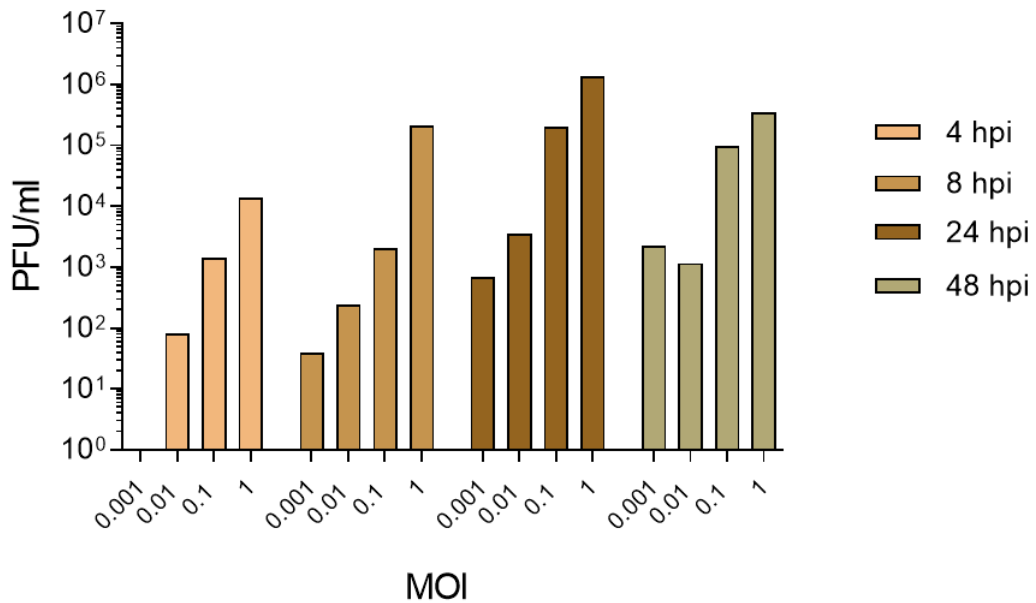
Zur Evaluation des Replikationsvermögens von OncoVEX wurden RIP1-Tag2 Tumorzellen, wie bereits in **3.1.2** erläutert, aus RIP1-Tag2 Mäusen isoliert, und in 6-Well Platten ausgesät. Zur Untersuchung der GM-CSF Expression wurden die RIP1-Tag2 Zellen im Weiteren in 24-Well Platten in Kultur genommen und mit OncoVEX infiziert. Hierbei wurden 4 verschiedene MOIs (Multiplizität der Infektion; engl.: *multiplicity of infection*, MOIs: 0,001; 0,01; 0,1 und 1) gewählt. Die MOI beschreibt das zahlenmäßige Verhältnis von OncoVEX Viruspartikeln zu RIP1-Tag2 Zellen. Bei einer MOI von 1 ist die Anzahl der OncoVEX Viruspartikel identisch mit der Anzahl RIP1-Tag2 Zellen. Zu jeweils vier Zeitpunkten nach der Infektion (4 Stunden, 8 Stunden, 24 Stunden und 48 Stunden) wurde die Viruskonzentration (PFU/ml) und die GM-CSF Expression im Überstand bestimmt.

Es konnte zu allen Zeitpunkten ein linearer Anstieg der Viruskonzentration in Relation zur MOI festgestellt werden (**Abbildung 41A**).

Die Auswertung der GM-CSF Expression zeigte bei einer MOI von 1 nach 24 (11280,35 pg/ml ± 460,72 pg/ml) und 48 Stunden (13217,97 pg/ml ± 369,84 pg/ml) die höchste Konzentration. Nach 4 (476,24 pg/ml ± 45,79 pg/ml) und 8 Stunden (5378,39 pg/ml ± 559,619 pg/ml) konnte ein linearer Anstieg der GM-CSF Konzentration beobachtet werden. Die höchste GM-CSF Konzentration wurde 48 Stunden nach der Infektion gemessen (**Abbildung 41B**).

A

Replikation von OncoVEX in RIP1-Tag 2 Tumorzellen

**B**

GM-CSF Expression in RIP1-Tag2 Tumorzellen nach der OncoVEX Infektion

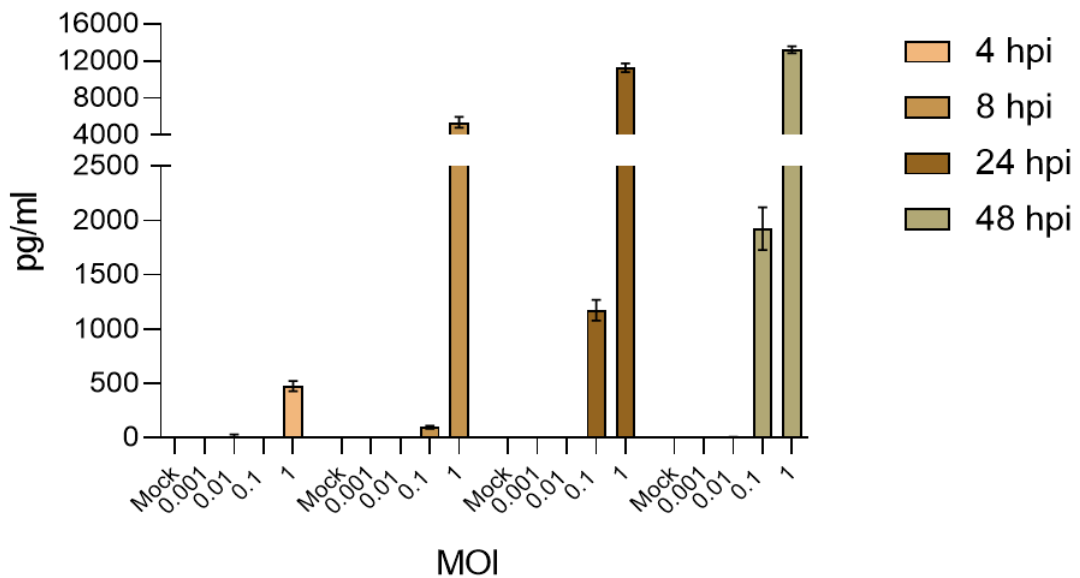


Abbildung 41: *In vitro* Virusreplikation und GM-CSF ELISA von OncoVEX infizierten RIP1-Tag2 Tumorzellen. RIP1-Tag2 Tumorzellen für die Bestimmung der Virusreplikation in 6-Well Platten und für die Durchführung der GM-CSF ELISA in 24-Well Platten ausgelegt. Am nächsten Tag wurden diese mit OncoVEX mit den MOIs: 0,001; 0,01; 0,1 und 1 infiziert. **(A)** Die Virusreplikation in den Tumorzellen wurde 4 h, 8 h, 24 h und 48 h nach der Infektion bestimmt. Die Titration der MOIs wurde mithilfe von

Vero Zellen durchgeführt. Die Wachstumskurven werden durch die jeweiligen Balken zu den MOIs repräsentiert. Die y-Achse wird als logarithmische Skala angegeben. n = 1. **(B)** Für die Bestimmung der GM-CSF Freisetzung wurde der Überstand 4 h, 8 h, 24 h und 48 h nach Infektion mittels ELISA analysiert. n = 3.

4.3 Theranostischer Ansatz

4.3.1 *In vitro* Quantifizierung von OncoVEX infizierten Tumoren mittels γ -Counter

Hierzu wurden RIP1-Tag2 Inselzellkarzinomzellen, MC38 Kolon Adenokarzinomzellen und B16 Melanomzellen bezüglich der Infektions-Suszeptibilität untersucht. Die RIP1-Tag2 Tumorzellen wurden hierzu zuerst aus RIP1-Tag2 Versuchsmäusen isoliert und kultiviert (**3.1.2**). Daraufhin wurden die drei Tumorzelllinien mit verschiedenen Viruskonzentrationen (MOI: niedrig: 0,1, mittel: 0,5, hoch: 2,5) der von OncoVEX 24 h infiziert und am Folgetag für jeweils 60 min (**Abbildung 42A**) und 120 min (**Abbildung 42B**) ^{18}F -FHBG inkubiert. Zur Kontrolle wurden die Tumorzellen identisch zu OncoVEX mit der leeren Virus-Hülle (Mock) inkubiert und ebenfalls am Folgetag für jeweils 60 min (**Abbildung 42A**) und 120 min (**Abbildung 42B**) mit ^{18}F -FHBG inkubiert.

Nach der 60-minütigen ^{18}F -FHBG Inkubation konnte unabhängig von der Viruskonzentration sowohl in RIP1-Tag2 Tumorzellen als auch in MC38 Tumorzellen eine in etwa identisch ca. 9-fach-erhöhte ^{18}F -FHBG Aufnahme im Vergleich zur Mock Kontrolle beobachtet werden. Im Gegensatz hierzu konnte in B16 Tumorzellen im Vergleich zur Mock-Kontrolle überhaupt keine OncoVEX-infektion assoziierte, vermehrte ^{18}F -FHBG Aufnahme detektiert werden (**Abbildung 42A**).

So konnte beispielsweise in OncoVEX-infizierten RIP1-Tag2 Tumorzellen unter einer mittleren MOI nach 60 Minuten Inkubation mit ^{18}F -FHBG eine Aktivität von $1,20 \times 10^{-7} \mu\text{Ci} \pm 6,56 \times 10^{-8} \mu\text{Ci}$ detektiert werden. Im Gegensatz hierzu war die Aktivität in Mock-infizierten RIP1-Tag2 Tumorzellen 11-fach niedriger und lag bei $9,02 \times 10^{-8} \mu\text{Ci} \pm 1,01 \times 10^{-8} \mu\text{Ci}$ (**Abbildung 42A**).

Die 120-minütige ^{18}F -FHBG Inkubation der drei Tumorzelllinien ergab neben einer ca. 100-fach erhöhten Tracer-Aufnahme den identischen Trend. Es wurde erneut eine

erhöhte Aufnahme von ^{18}F -FHBG in OncoVEX-infizierten RIP1-Tag2 und MC38 Tumorzellen, nicht jedoch in B16 Tumorzellen gemessen (**Abbildung 42B**).

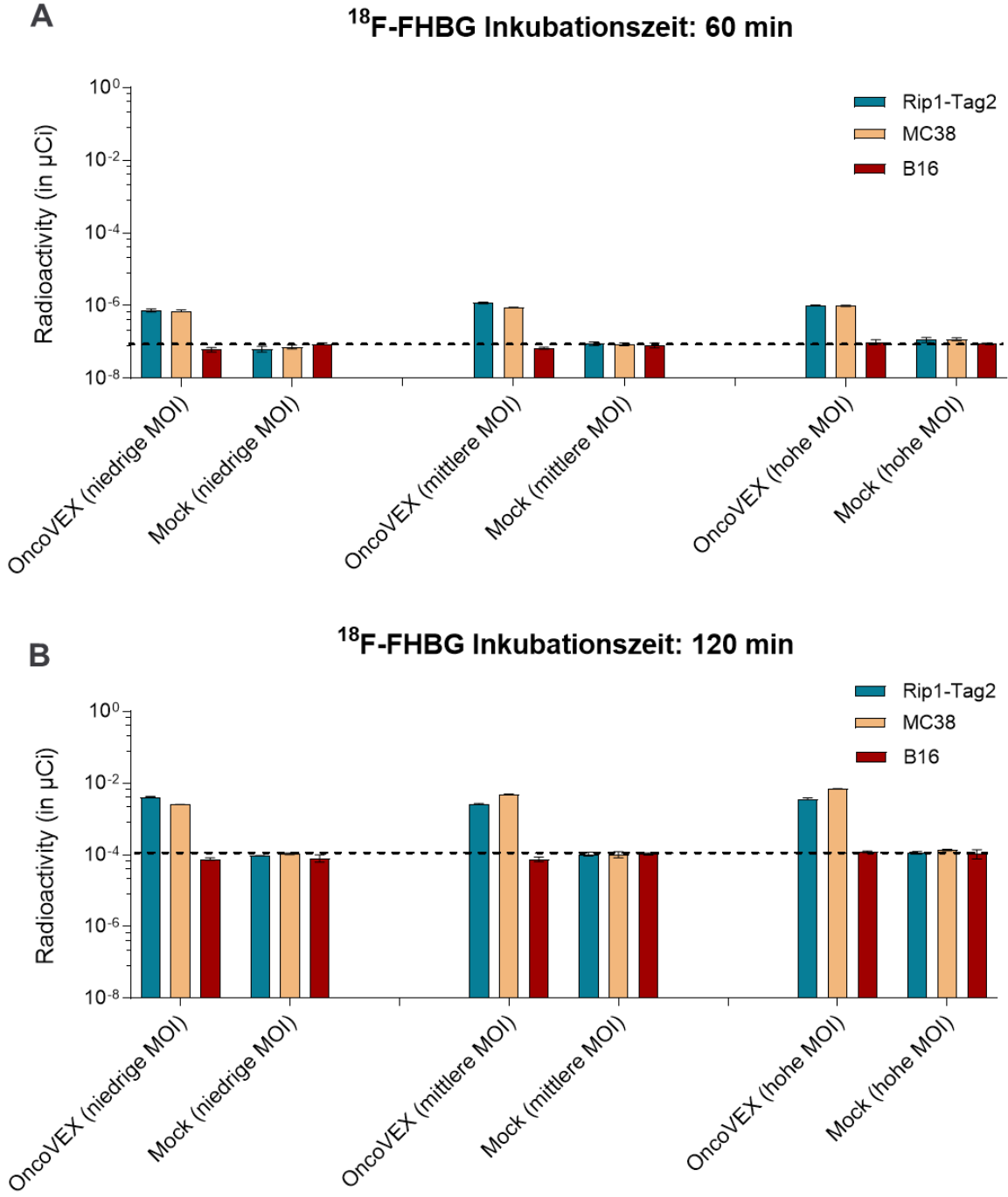


Abbildung 42: *In vitro* Untersuchung der ¹⁸F-FHBG Aufnahme von OncoVEX- oder Mock-infizierten Tumorzellen. 10⁶ B16 Melanomzellen, Adenokarzinomzellen und RIP1-Tag2 Tumorzellen wurden zuerst in einer 6-Well Platte ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am Folgetag wurden die Tumorzellen entweder mit OncoVEX oder Mock (leere Virushülle) mit je verschiedenen MOIs (*multiplicity of infection*, MOI; niedrig: 0,1, mittel: 0,5, hoch: 2,5) für 24h infiziert. Daraufhin wurden die infizierten Tumorzellen für jeweils **(A)** 60 min oder **(B)** 120 min mit ¹⁸F-FHBG inkubiert. Anschließend wurden die Tumorzellen zweimal gewaschen und die ¹⁸F-FHBG-Aktivität der Tumorzellen mittels γ-counter gemessen. n = 3.

4.3.2 *In vivo* Visualisierung OncoVEX-infizierter Tumorzellen mittels kombiniertem ¹⁸F-FHBG-PET/MRT

Im folgenden Versuch wurde eruiert, ob die systemische Applikation von OncoVEX simultan zum Nachweis von Tumoren als auch zum Monitoring einer OncoVEX-Infektion eingesetzt werden kann.

Nach erfolgreicher *in vitro* Validierung einer verstärkten ¹⁸F-FHBG Aufnahme in OncoVEX-infizierten, TK exprimierenden, RIP1-Tag2 Tumorzellen, sollte nun im Rahmen von weiterführenden Versuchen die *in vivo* Praktikabilität der Ganzkörper ¹⁸F-FHBG-PET Bildgebung zum Monitoring einer OncoVEX-Infektion verifiziert werden.

Hierzu wurden 10 – 11 Wochen alte RIP1-Tag2 Versuchsmäuse drei Tage nach einer Niedrigdosis-Ganzkörperbestrahlung mit dem OncoVEX behandelt. 72 Stunden nach *i.p.* Gabe von OncoVEX Gabe wurde den Versuchsmäusen 2 MBq ¹⁸F-FHBG *i.v.* injiziert. Nach einem Uptake von 3 Stunden (ohne Anästhesie) erfolgte eine 20-minütige statische PET Untersuchung und im unmittelbaren Anschluss eine MRT Untersuchung auf einem Bett mit spezifischen PET und MRT Markern zur Ermöglichung der Überlagerung der Aufnahmen (**Abbildung 43**). Als Negativkontrolle wurde eine RIP1-Tag2 Versuchsmaus ohne OncoVEX Behandlung und zwei C3H Wildtyp-Mäuse, ohne Tumore, mit ¹⁸F-FHBG injiziert und mittels PET/MRT untersucht. Die fortgeschrittenen RIP1-Tag2 Inselzellkarzinome konnten in allen RIP1-Tag2 Versuchstieren mittels MRT sehr gut detektiert werden und hatten einen Durchmesser von 2 – 6 mm (**Abbildung 44**, weiße Pfeile). Im Gastrointestinaltrakt aller Versuchstiere zeigte sich ein relativ starkes ¹⁸F-FHBG Signal unabhängig von der *i.p.* Administration von OncoVEX. Leider konnte in den RIP1-Tag2 Versuchsmäusen, die

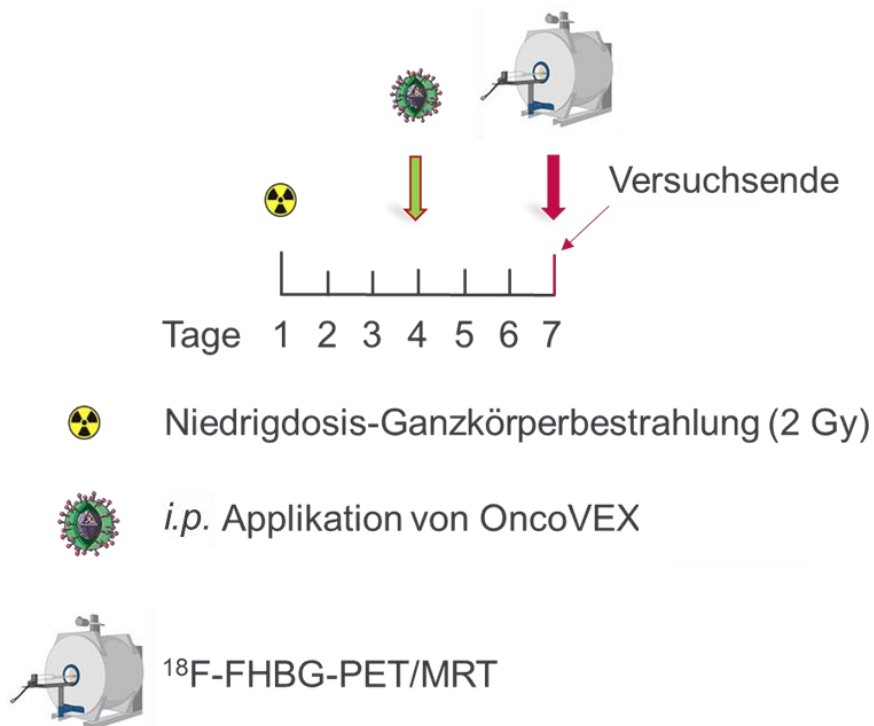
mit OncoVEX (*i.p.*) behandelt wurden, keine intra-tumorale Akkumulation von ^{18}F -FHBG detektiert werden.

Nach der kombinierten ^{18}F -FHBG-PET/MRT Messung wurde von allen Versuchstieren das Pankreas, die iLK und pLK als auch die Milz entnommen. Das Pankreas und die Milz wurden kryofixiert, und anschließend auf einer Röntgenspeicherfolie fixiert und mittels Phosphorimager gemessen. Zur Detektion der ^{18}F -FHBG-Aufnahme in den Lymphknoten wurden die vollständigen iLK und pLK auf der Belichtungsplatte (ohne Schneiden) analysiert. Als Kontrollorgan zur Ermöglichung der Normalisierung der Autoradiographiedaten wurde von den Versuchsmäusen der linke musculus quadriceps femoris isoliert, kryofixiert, 20 μm Kryoschnitte angefertigt und anschließend auf der Belichtungsplatte zur Autoradiographie-Analyse fixiert.

Zur Auswertung der ^{18}F -FHBG Aufnahme in der Pankreas, der Milz oder den iLK und pLK wurde das Organ/Muskel Verhältnis der jeweiligen Versuchsmäuse bestimmt. Die Auswertung der verschiedenen Versuchstiere ergab keine deutliche vermehrte ^{18}F -FHBG Anreicherung in den Organen der OncoVEX-behandelten Versuchsmäusen im Vergleich zu den Kontrollmäusen, ohne OncoVEX *i.p.* Administration (**Abbildung 45**).

Zusätzlich, um die Morphologie des Pankreas nach OncoVEX Therapie sowie die Anzahl CD3⁺ T-Zellen und die Anwesenheit von OncoVEX (HSV-1) zu überprüfen, wurde das Pankreas nach der Isolation in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden von den drei mit OncoVEX behandelten RIP1-Tag2 Versuchsmäusen und der ausschließlich mit PBS behandelten RIP1-Tag2 Versuchsmaus histopathologische (H&E) und immunhistochemische Färbungen (CD3 und HSV-1) des Pankreas angefertigt (**Abbildung 46**). Die Pankreata aller untersuchten Versuchsmäuse zeigten kleine bis mittelgroße Tumore mit einer hohen Proliferationsrate und dilatierten Blutgefäßen (**Abbildung 46A+B**). In keinen der beiden Versuchsgruppen wurden vermehrt Immuneinfiltrate beobachtet. In beiden Versuchsgruppen zeigten sich die meisten CD3⁺ T-Zellen in der Peripherie des Tumors bzw. um den Tumor herum. Vereinzelt konnten CD3⁺ T-Zellen innerhalb der Tumore angetroffen werden (schwarze Pfeile, **Abbildung 46C+D**). Des Weiteren konnten in keiner der drei mit OncoVEX behandelten RIP1-Tag2 Versuchsmäuse

HSV-1 positive, Virus infizierte Zellen (OncoVEX) in den Inselzellkarzinomen oder im TME nachgewiesen werden (**Abbildung 46E+F**).



 Niedrigdosis-Ganzkörperbestrahlung (2 Gy)

 *i.p.* Applikation von OncoVEX

 ¹⁸F-FHBG-PET/MRT

Abbildung 43: Versuchsschema der *in vivo* ¹⁸F-FHBG-PET/MRT Untersuchung zur Visualisierung OncoVEX-infizierter RIP1-Tag2 Tumorzellen. Hierzu wurden 10 – 11 Wochen alte RIP1-Tag2 Versuchsmäuse 72 h nach einer 2 Gy Niedrigdosis-Ganzkörperbestrahlung mit OncoVEX behandelt (*i.p.* Gabe). Nach weiteren 72 h wurde allen Versuchsmäusen 2 MBq ¹⁸F-FHBG *i.v.* injiziert und nach einer *in vivo* Anreicherungszeit (wach) von 3 h erfolgte zuerst die PET Messung und im unmittelbaren Anschluss die MRT Untersuchung. Zur *ex vivo* Validierung wurden die Pankreata, die Milz und die iLK und pLK isoliert und mittels Autoradiographie untersucht.

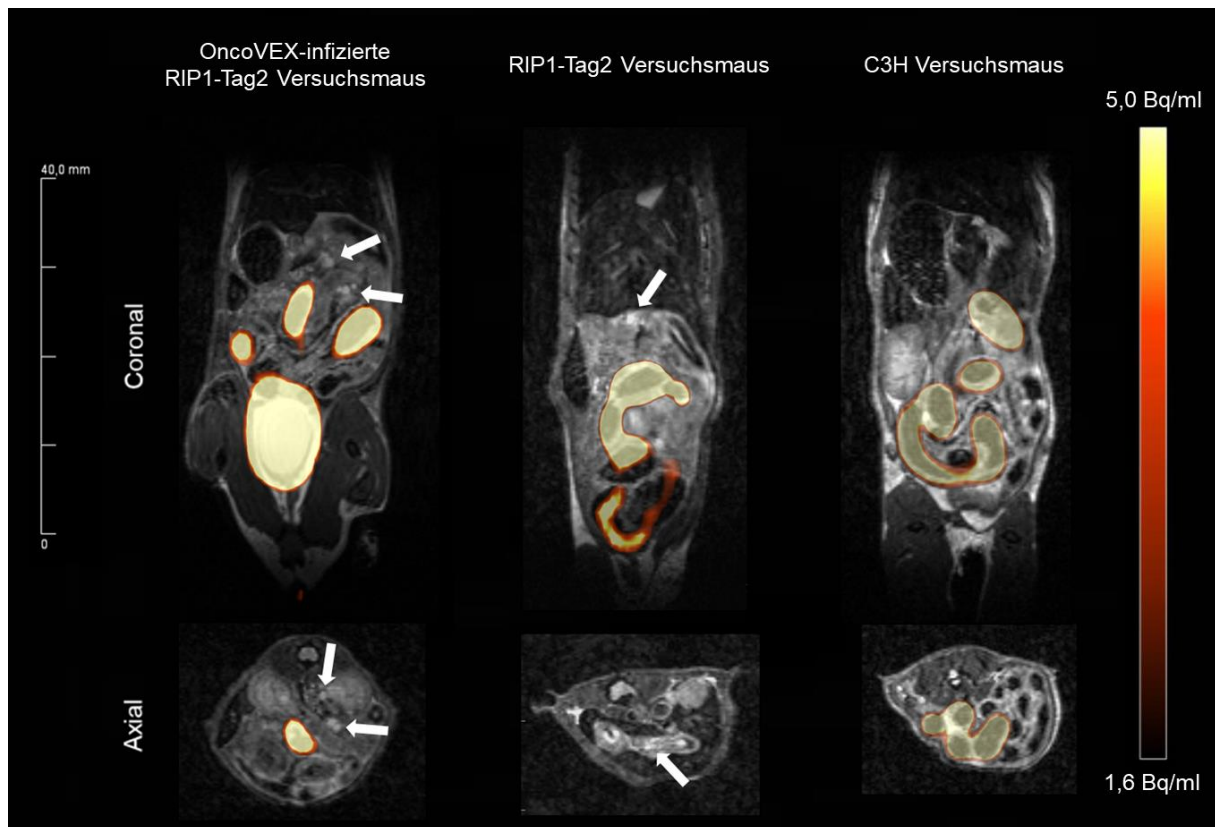


Abbildung 44: *In vivo* ^{18}F -FHBG-PET/MRT zur Überprüfung der Anreicherung von ^{18}F -FHBG in OncoVEX-infizierten RIP1-Tag2 Versuchsmäusen. Die RIP1-Tag2 Versuchsmäuse erhielten 72 h nach einer 2 Gy Niedrigdosis-Ganzkörperbestrahlung *i.p.* OncoVEX Applikation. 3 Tage später erfolgte die *i.v.* ^{18}F -FHBG Applikation und nach einer ^{18}F -FHBG Anreicherungszeit („*Uptake*“) von 3 Stunden die PET Messung. Im direkten Anschluss erfolgte die MRT Untersuchung zur anatomischen Co-Lokalisation (T_2 -gewichteten 3D Turbo RARE). n = 1 – 3.

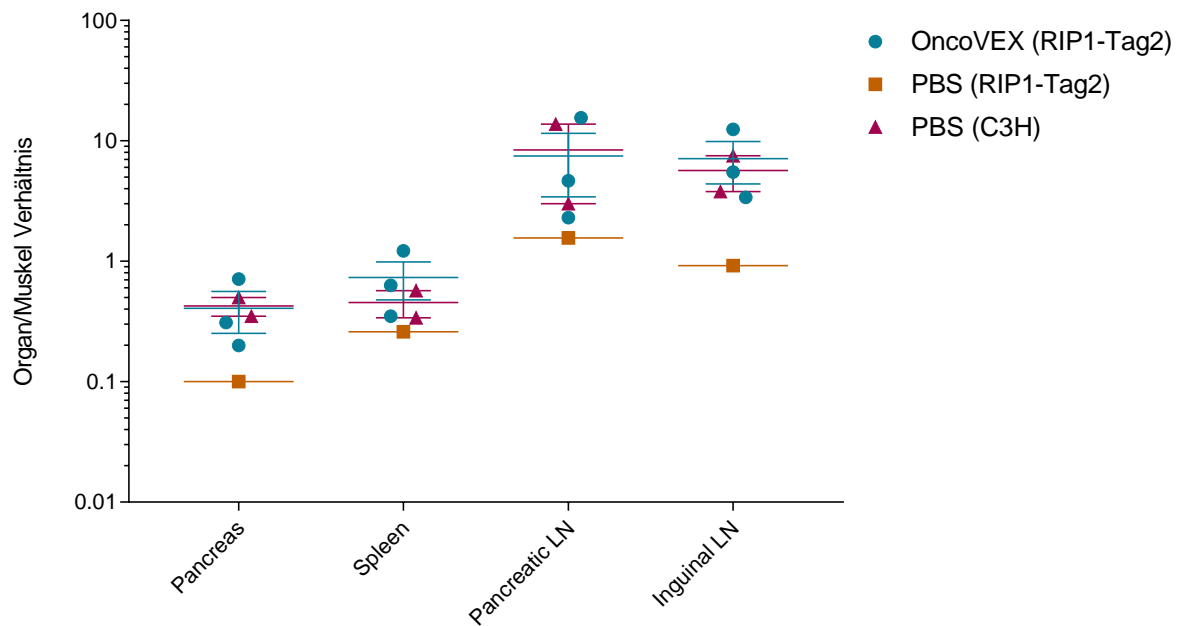


Abbildung 45: Ex vivo Autoradiographie von ^{18}F -FHBG-injizierten RIP1-Tag2 Versuchsmäusen mit und ohne OncoVEX-Administration. Unmittelbar nach der ^{18}F -FHBG-PET/MRT Untersuchung wurden alle Versuchsmäuse getötet und unmittelbar im Anschluss das Pankreas, die Milz, die iLK und die pLK isoliert. Das Pankreas und die Milz wurden kryofixiert, und anschließend auf einer Belichtungsplatte fixiert und mittels Phosphorimager gemessen. Zur Detektion der ^{18}F -FHBG-Aufnahme in den Lymphknoten wurden die vollständigen iLK und pLK auf der Belichtungsplatte (ohne Schneiden) analysiert. Als Kontroll-Organ zur Ermöglichung der Normalisierung der Autoradiographiedaten wurde von den Versuchsmäusen der linke musculus quadriceps femoris isoliert, kryofixiert, 20 μm Kryoschnitte angefertigt und anschließend auf der Belichtungsplatte zur Autoradiographie-Analyse fixiert. Zur normalisierten Darstellung wurde das Organ/Muskel Verhältnis der ^{18}F -FHBG Aufnahme gebildet. n = 1 – 3.

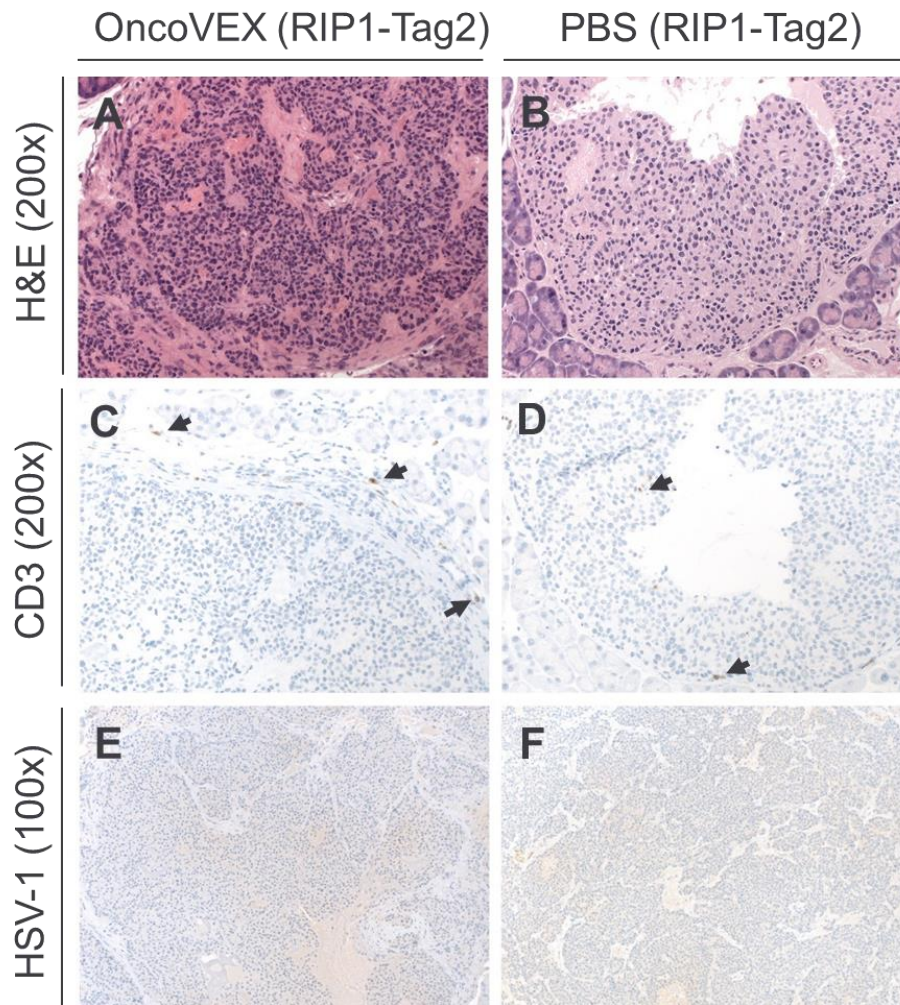
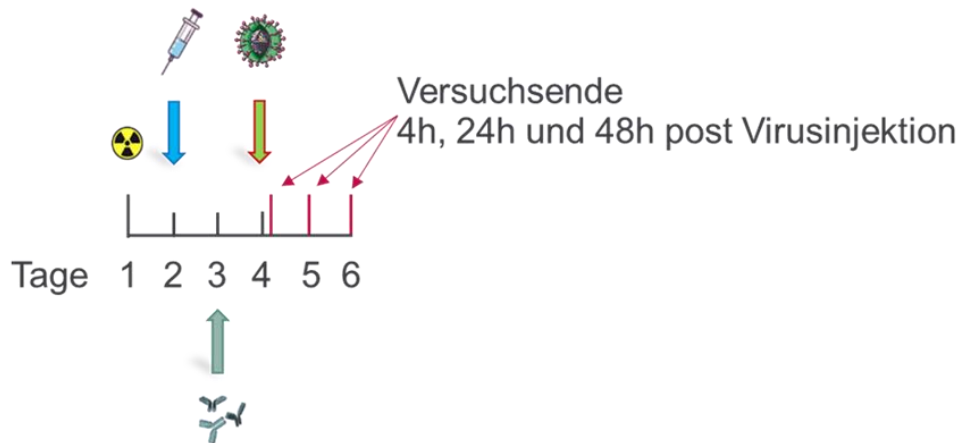


Abbildung 46: Histopathologische (H&E) und immunohistochemische (CD3, HSV-1) Analyse des Pankreas von RIP1-Tag2 Mäusen nach 2 Gy Niedrigdosis-Ganzkörperbestrahlung und einmaliger *i.p.* Verabreichung von OncoVEX oder PBS. Repräsentative H&E Färbung der Inselzellkarzinome einer RIP1-Tag2 Maus ca. 75,5 Stunden nach **(A)** OncoVEX oder **(B)** PBS Injektion (Vergrößerung: 200x). **(C+D)** Repräsentative CD3 Immunhistochemie der Pankreata inklusive der Inselzellkarzinome (Vergrößerung: 200x). Die schwarzen Pfeile deuten auf CD3 positive T-Zellen in der Peripherie des Tumors hin. **(E+F)** Zur Analyse der Anwesenheit von OncoVEX wurde eine HSV-1 immunohistochemische Analyse durchgeführt. Diese konnte keine HSV-1 positiven Zellen in der OncoVEX-Versuchsgruppe nachweisen (Vergrößerung: 100x). (n = 1 – 3).

4.3.3 Bestimmung der Viruslast im Pankreas zu verschiedenen Zeitpunkten nach OncoVEX Administration

Da durch die additive Verabreichung mit OncoVEX innerhalb der kombinierten Viro-Immuntherapie ein additionaler Therapieeffekt festgestellt werden konnte, wurde nun die Viruslast bzw. die Konzentration des Virus, die im Pankreas und in dem Inselzellkarzinomgewebe bestimmt. Hierzu wurden die Versuchsmäuse einmalig mit der kombinierten Viro-Immuntherapie nach dem in **Abbildung 47** abgebildeten Versuchsschema behandelt. Die Isolation des Pankreas zur Bestimmung der Viruslast und der GM-CSF Konzentration erfolgte jeweils 4 h, 24 h und 48 h nach der OncoVEX Administration. Alle Versuchsmäuse wurden mit der im Rahmen dieser Dissertationsschrift etablierten Viruskonzentration von 5×10^6 PFU *i.p.* behandelt. Diese Viruskonzentration wurde auch im Rahmen der kombinierten Viro-Immuntherapie erfolgreich eingesetzt. Drei der vier analysierten RIP1-Tag2 Versuchsmäuse, zeigten 4 h nach der OncoVEX Administration in den Pankreata eine Viruslast von ca. $77,27 \text{ PFU/ml} \pm 17,07 \text{ PFU/ml}$. Somit erreichen nur wenige der injizierten OncoVEX Viren nach der Zeitspanne von 4 h die Inselzellkarzinomzellen im Pankreas. Interessanterweise war 24 h und 48 h nach OncoVEX Applikation kein Virus mehr nachweisbar (**Abbildung 48A**).

Die GM-CSF Konzentration im Pankreasgewebe betrug 4 h nach OncoVEX Injektion $69,22 \pm 23,13 \text{ pg/ml}$, nach 24 Stunden $37,90 \pm 23,37 \text{ pg/ml}$ und nach 48 Stunden $307,58 \pm 194,87 \text{ pg/ml}$ GM-CSF (**Abbildung 48B**). Diese Werte wurden jeweils auf 50 mg Gewebe normalisiert.



☢ Niedrigdosis-Ganzkörperbestrahlung (2 Gy)

💉 *i.p.* Applikation der Tag- T_H1 Zellen

🛡️ *i.p.* Applikation der ICB

🦠 *i.p.* Applikation von OncoVEX

Abbildung 47: Versuchsschema zur Bestimmung der Viruslast. Die 10 – 11 Wochen alten RIP1-Tag2 Versuchsmäuse wurden mit der kombinierten Viro-Immuntherapie behandelt (2 Gy Niedrigdosis-Ganzkörperbestrahlung + Tag- T_H1 Zellen (*i.p.*) + anti-PD-L1/anti-LAG-3 AK (ICB; *i.p.*) + OncoVEX (*i.p.*)). Es wurden 3 Kohorten RIP1-Tag2 Versuchsmäuse unter kombinierter Viro-Immuntherapie behandelt und zu verschiedenen Zeitpunkten (4 h, 24 h, 48 h) nach der OncoVEX Applikation getötet und das Pankreas zur Bestimmung der Viruslast- und der GM-CSF-Konzentration analysiert.

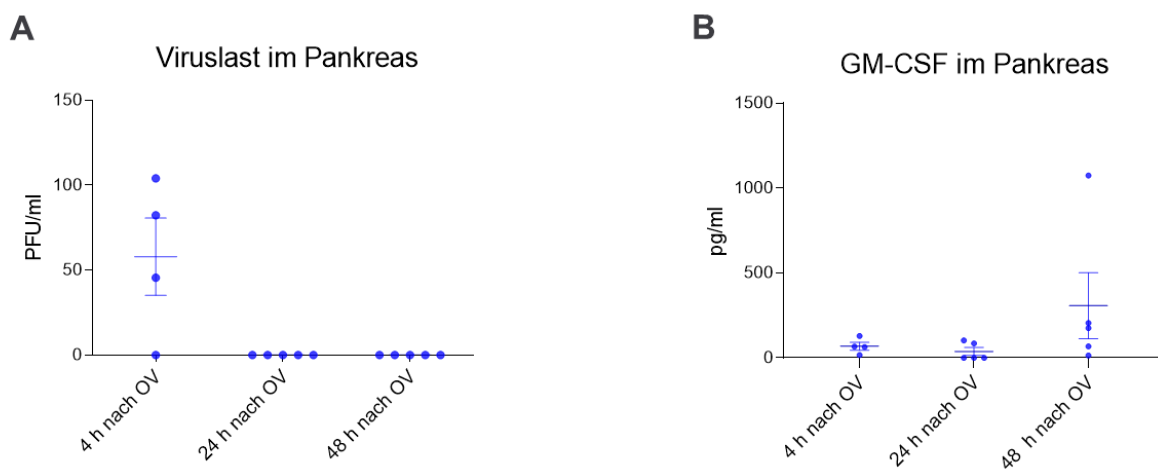


Abbildung 48: In vivo Viruslast und GM-CSF Konzentration von OncoVEX infizierten und lysierten RIP1-Tag2 Tumorzellen. Die Versuchsmäuse wurden wie in **Abbildung 47** beschrieben behandelt und die Pankreata 4 h, 24 h und 48 h nach OncoVEX Gabe (*i.p.*) bezüglich der **(A)** Viruslast und **(B)** GM-CSF Konzentration analysiert. Alle Werte wurden auf 100 mg Gewebe normalisiert. OV = OncoVEX. (n = 4 – 5).

4.3.4 Analyse der Immuzellinfiltration in den Pankreata mittels kombinierter Viro-Immuntherapie behandelten RIP1-Tag2 Versuchsmäusen zum Zeitpunkt des höchsten rBGWs

In **4.2.1** wurde festgestellt, dass die RIP1-Tag2 Versuchsmäuse, die mit OncoVEX + Tag-T_H1 + ICB behandelt wurden, 6 Tage nach der ersten OncoVEX Gabe, sowie 7 Tage nach der zweiten OncoVEX Injektion einen „Peak“ im rBGWs aufzeigen (**Abbildung 24A**). Der Anstieg ist zum Zeitpunkt der beiden „Peaks“ im Vergleich zum initialen rBGW signifikant erhöht. Im Rahmen dieses Versuchsansatzes sollte nun eruiert werden, welche Zellen für den signifikanten Anstieg des rBGWs entscheidend sein könnten. Die kombinierte Viro-Immuntherapie wurde in 10 – 11 Wochen alten Versuchsmäusen wie in **Abbildung 49** dargestellt durchgeführt. Fünf Tage nach der OncoVEX Gabe (Tag 8 nach Behandlungsbeginn) wurden die Pankreata der Versuchsmäuse isoliert und mittels Immunfluoreszenzhistologie mit Fokus auf das Immuzellinfiltrat im TME untersucht. Zu Behandlungsbeginn lag der rBGW bei 100 % (103,40 ± 3,91 mg/dl). Am Tag 3 der kombinierten Viro-Immuntherapie fiel der rBGW in beiden Versuchsgruppen moderat auf ca. 90 % und stieg bis zum Tag 8 nach Initiierung der Therapie ausschließlich in der Viro-Immuntherapiegruppe wieder auf 97,40 ± 4,77 % an. Im Vergleich zur Isotyp-AK-Kontrollgruppe (77,33 ± 1,76 %) war der Unterschied im rBGW in der Viro-Immuntherapiegruppe (97,40 ± 4,77 %) am Tag 8, signifikant erhöht (*p = 0,0213; **Abbildung 49**).

Mittels Immunfluoreszenzmikroskopischer Analyse gelang es 5 Tage nach der therapeutischen Infektion von OncoVEX mit HSV-1-Viren infizierte Inselzellkarzinome in den Pankreata der RIP1-Tag Mäuse mit kombinierter Viro-Immuntherapie nachzuweisen (weiße Pfeile, **Abbildung 50A**). Des Weiteren konnten im Vergleich zur Isotyp AK Kontrollgruppe in den Inselzellkarzinomen der Versuchsmäuse eine deutlich

gesteigerte Einwanderung von Makrophagen (Iba-1 – blau) und T-Zellen (CD3 – rot) nachgewiesen werden (**Abbildung 50C+D**). In einer weiterführenden immunfluoreszenzmikroskopischen Analyse mit Fokus auf CD4⁺ (rot) und CD8⁺ T Zellen (grün) und F4/80 positiven Makrophagen gelang ausschließlich der Nachweis von CD4⁺ und CD8⁺ T Zellen. Wobei deutlich mehr CD4⁺ als CD8⁺ T Zellen detektiert werden konnten (**Abbildung 50E+F**).

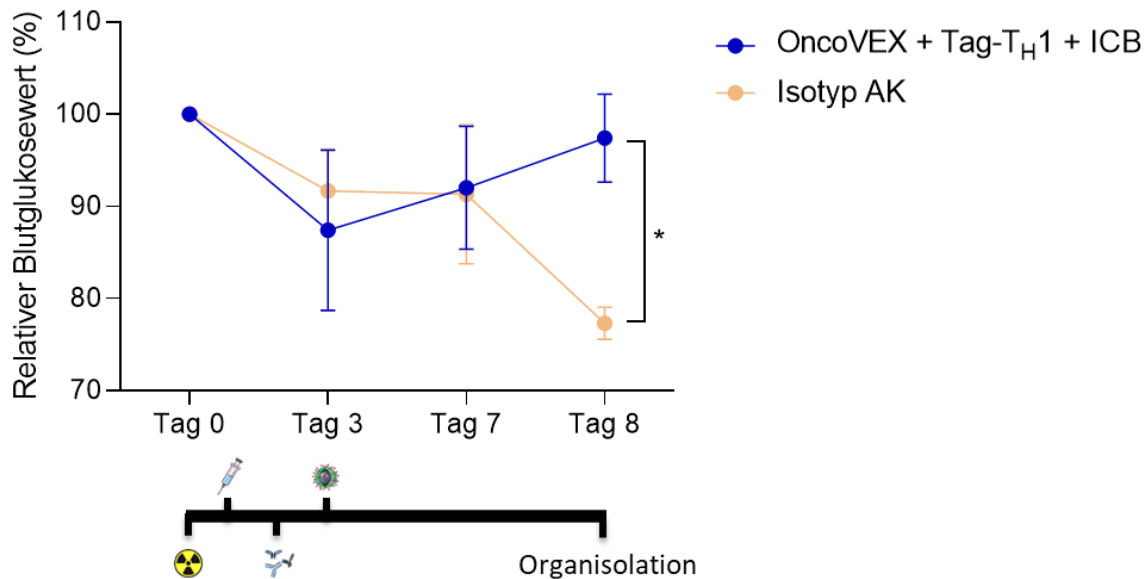


Abbildung 49: Evaluierung des relativen Blutglukosewertes in RIP1-Tag2 Versuchsmäusen unter der Gabe von OncoVEX und ICB. (A) Zeitlicher Verlauf der rBGW, der mit der kombinierten Viro-Immuntherapie behandelten Versuchsmäuse (OncoVEX + Tag-T_H1 + ICB; n = 5). Die Kontrollgruppe (Isotyp AK; n = 3) wurde mit Isotyp AK (anstelle von ICB) und zwei PBS Injektionen (anstelle von Tag-T_H1 und OncoVEX) behandelt. 100 % des rBGWs entsprechen einem Mittelwert der Blutglukose von $103,40 \pm 3,91$ mg/dl für die Versuchsgruppe OncoVEX + Tag-T_H1 + ICB, von $108,33 \pm 2,73$ mg/dl für die Versuchsgruppe Isotyp AK. Zur statistischen Evaluation wurde der rBGW an Tag 8 zwischen den beiden Versuchsgruppen mittels ungepaartem parametrischem T-Test verglichen. *p = 0,0213.

OncoVEX + Tag-T_H1 + ICB

Isotype AK

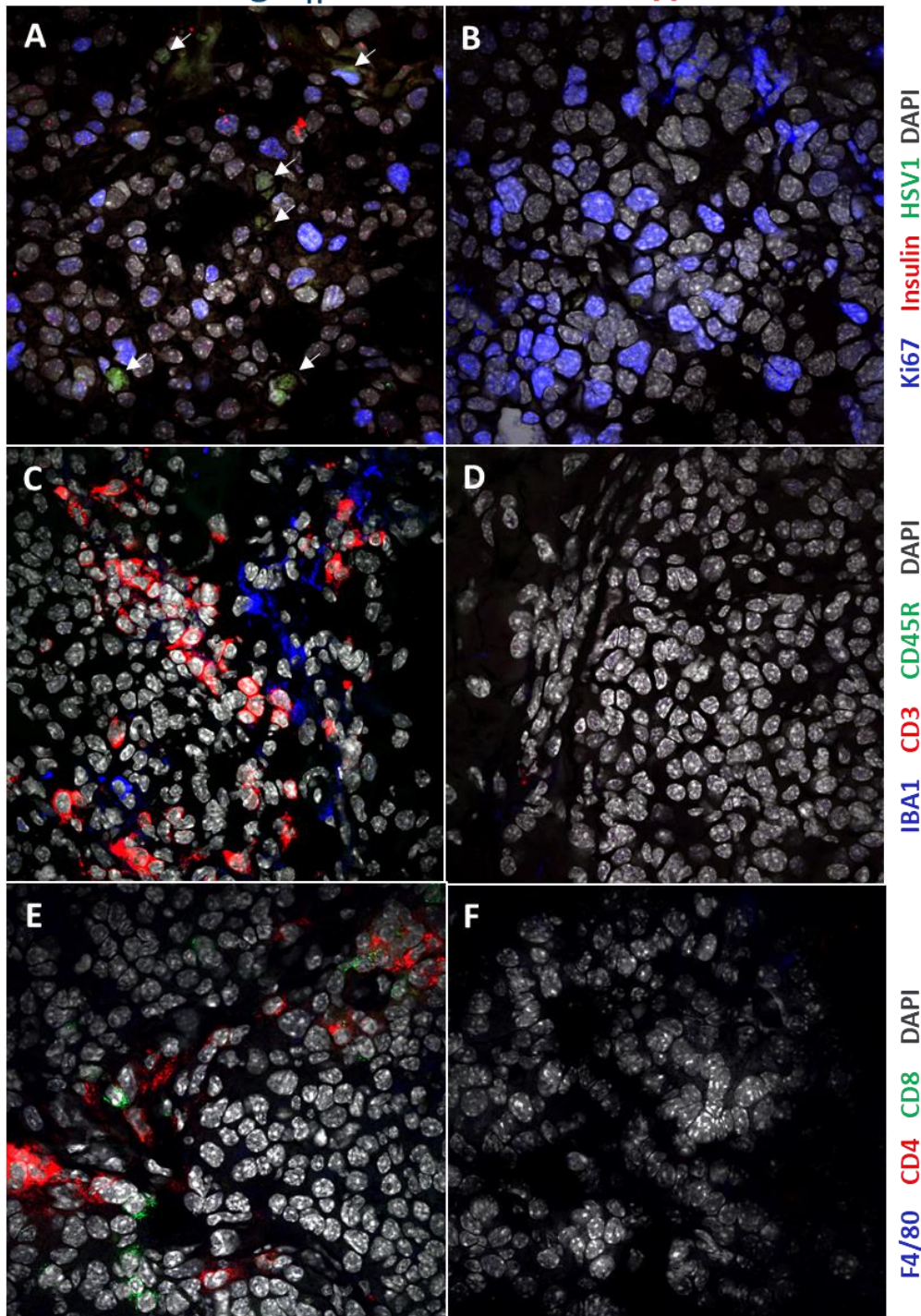


Abbildung 50: Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse der Inselzellkarzinome von 10 – 11 Wochen alten RIP1-Tag2 Versuchstieren nach einmaliger kombinierter Viro-Immuntherapie bzw. Isotyp AK-Behandlung. (A+B) Repräsentative Immunfluoreszenzmikroskopie der mit OncoVEX infizierten (HSV-1, weiße Pfeile) und proliferierenden (Ki67) Inselzellkarzinome, **(C+D)** der T-Zellen (CD3), Makrophagen (Iba-1) und B-Zellen (CD45R) im TME **(E+D)** sowie der Inselzell-Infiltrierenden Makrophagen (F4/80), CD4⁺- und CD8⁺ T-Zellen. DAPI stellt die Färbung der Zellkerne dar. (n = 3)

4.4 Aufklärung der Wirkmechanismen unserer kombinierten T_H1-Zell-basierten Immuntherapie mit Fokus auf die NFκB-Aktivierung

Zur Evaluation der Wirkungsorte von adoptiv transferierten (*i.p.*) Tumorantigen-spezifischen T-Zellen (OT-II Th1, im Folgenden: OVA-T_H1) im Rahmen einer kombinierten Immuntherapie bestehend aus einer 2 Gy Niedrigdosis-Ganzkörperbestrahlung, der Gabe von OVA-T_H1 Zellen und der 3-maligen Verabreichung von anti-PD-L1/anti-LAG-3 AK (ICB) in zwei verschiedenen Tumormausmodellen mit membranärer OVA-Expression der Tumorzellen (OVA-B16 Melanom und OVA-MC38 Kolon Adenokarzinom) wurden ^{NFκB}Luc-Reportermause verwendet. In den ^{NFκB}Luc-Reportermäusen kommt es im Rahmen der Aktivierung von NFκB zur Expression von Luciferase welche nach Verabreichung von Luciferin mittels Biolumineszenz in der optischen Bildgebung semiquantitativ detektiert werden kann. Den ^{NFκB}Luc-Reportermäusen wurden an der rechten Flanke OVA-B16 oder OVA-MC38 Tumorzellen inokuliert. Hierbei ist es wichtig zu betonen, dass weder die inokulierten OVA-B16 und OVA-MC38 Tumorzellen noch unsere therapeutischen OVA-T_H1 den ^{NFκB}Luc-Reporter exprimieren. Andererseits stammt das Stroma der OVA-B16 und OVA-MC38 Tumoren von den ^{NFκB}Luc-Reportermäusen. Folglich kann ein Biolumineszenzsignal der Tumore ausschließlich auf eine NFκB-Aktivierung des Stromas zurückgeführt werden. 3 Tage nach Inokulation der Tumorzellen erfolgte eine 2 Gy Niedrigdosis-Ganzkörperbestrahlung und nach weiteren 24 h die *i.p.* Applikation der OVA-T_H1 Zellen und nach weiteren 24 h und im Weiteren alle 2 Tage die *i.p.* Verabreichung der ICB. Das Tumolvolumen der tumortragenden ^{NFκB}Luc-Reportermause wurden ab Tag 4 täglich bestimmt und zusätzlich die NFκB Aktivität mittels optischer Bildgebung gemessen. Am Tag 10 wurden die Versuchsmäuse getötet und anschließend die Tumore sowie die primär (Knochenmark) und sekundär lymphatischen Organe (Milz, drainierende (dLK), kontralaterale Lymphknoten (kLK)) für weiterführende Analysen entnommen. Es erfolgte die histopathologische (H&E) und immunhistochemische Analyse der OVA-B16 oder OVA-MC38 Tumore sowie eine Durchflusszytometrie-Analyse mit Fokus auf das Immunzellinfiltrat (B-Zellen, der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen) und Immunzellaktivierungsmarker (**Abbildung 51**). Zudem erfolgte eine Durchflusszytometrie-Analyse des Knochenmarks, der Milz als auch der dLK und der kLK.

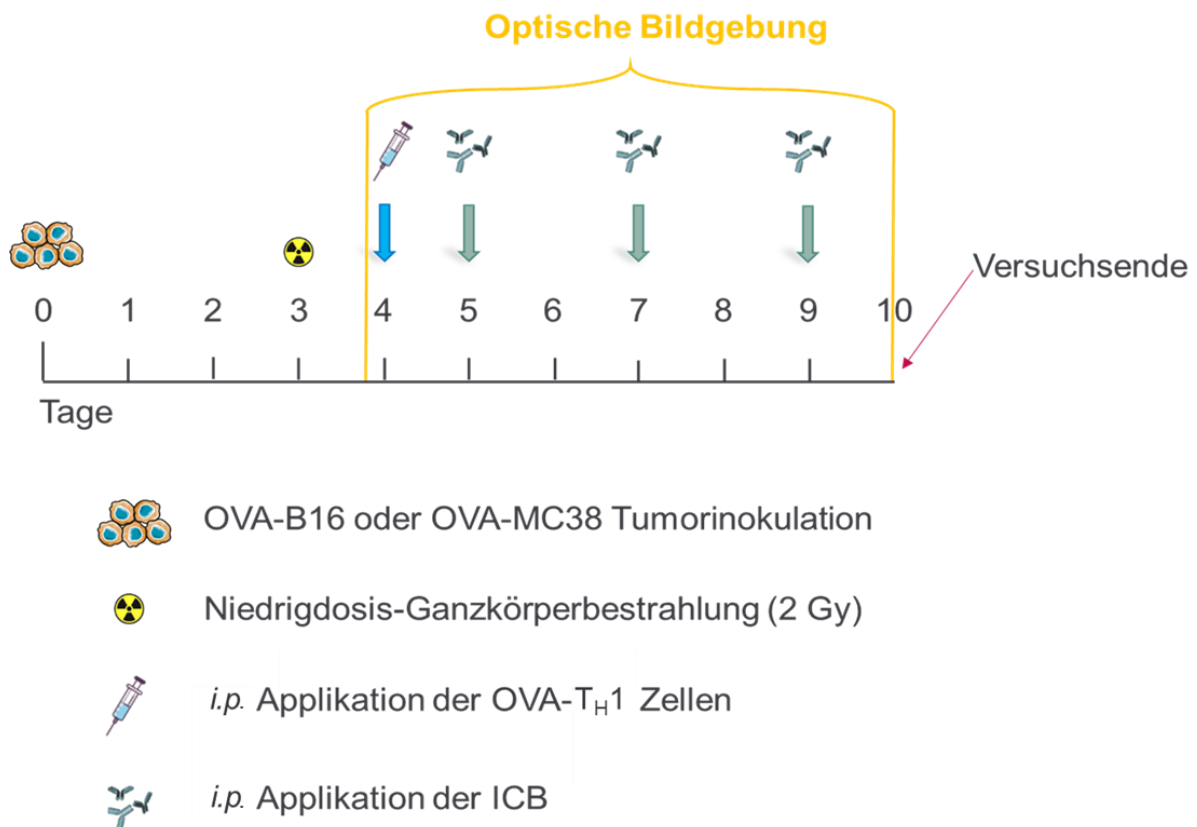


Abbildung 51: Versuchsschema zur Evaluation der NF κ B Aktivierungsorte in OVA-B16 und OVA-MC38 tumortragenden NF κ B Luc-Reporter-mäusen mit kombinierter T_H1-Zell-basierter Immuntherapie. In diesem Versuchsansatz wurden OVA-B16 Melanom- und OVA-MC38 Kolon Adenokarzinomzellen s.c. in NF κ B Luc-Reporter-mäuse inokuliert. Das Tumolvolumen der tumortragenden NF κ B Luc-Reporter-mäuse wurden ab Tag 4 täglich bestimmt und zusätzlich die NF κ B Aktivität mittels optischer Bildgebung gemessen. Am Tag 10 wurden die Versuchsmäuse getötet und anschließend die Tumore sowie die primär (Knochenmark) und sekundär lymphatischen Organe (Milz, drainierende (dLK), kontralaterale Lymphknoten (kLK)) für weiterführende Analysen entnommen.

4.4.1 Evaluierung des Tumorzvolumens zur Evaluation des Therapieansprechens

Das Tumorzvolumen wurde ab Tag 4 nach Tumorzvokulation mit einem Messchieber (VWR International GmbH) täglich bestimmt (**3.4.2.2**). Das initiale Tumorzvolumen der Versuchsmäuse zum Zeitpunkt des Therapiestarts wurde zur vereinfachten Darstellung auf 100 % gesetzt. Diese Darstellung gewährleistet einen korrekten Vergleich der Tumorzvolumina trotz der zum Teil unterschiedlichen initialen Tumorzvolumina.

Die kombinierte Immuntherapie zeigte bei den OVA-B16 tumortragenden Versuchsmäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Isotyp AK) keinerlei Einfluss auf das Tumorzvachstum (**Abbildung 52A**). In den OVA-MC38 tumortragenden Versuchsmäusen konnte in der Kohorte mit kombinierter Immuntherapie im Vergleich zur Kontrollkohorte bereits am Tag 7 nach Tumorzvokulation (dies entspricht dem Tag 4 nach Behandlungsbeginn) ein erkennbar verringertes relatives Tumorzvolumen festgestellt werden. Bis zum Tag 10 nach Tumorzvokulation zeigten die OVA-MC38 Tumore der mit Isotyp AK-therapierten ^{NFKB}Luc-Reportermause einen deutlichen Anstieg des Volumens, während die OVA-MC38 Tumore der mit OVA-TH1 Zellen + ICB behandelten ^{NFKB}Luc-Reportermause keine erkennbare Volumenzunahme zeigten. Aufgrund der starken Standardabweichung der Volumina, der OVA-MC38 Tumore der mit Isotyp AK behandelten ^{NFKB}Luc-Reportermause am Tag 10 (2206,40 ± 991,74 %), ergab der statistische Intergruppen-Vergleich mit der behandelten Versuchsgruppe (237,75 ± 36,45 %) einen nicht signifikanten Unterschied (p = 0,1236; **Abbildung 52B**).

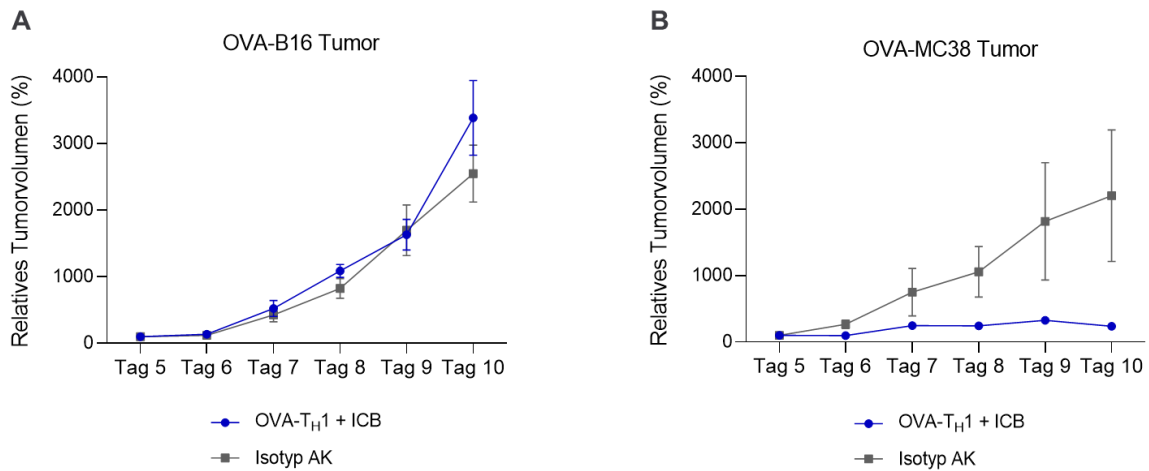


Abbildung 52: Relatives OVA-B16 und OVA-MC38 Tumolvolumen von $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Luc-Reporter-mäusen mit kombinierter Immuntherapie. Den $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Luc-Reporter-mäusen wurden am Tag 0 OVA-B16 oder OVA-MC38 Tumorzellen s.c. inokuliert. Nach drei Tagen erfolgte eine 2 Gy Niedrigdosis-Ganzkörperbestrahlung. Einen Tag später (Tag 4) erhielten die Versuchstiere einen adoptiven Transfer von OVA-T_H1 bzw. eine PBS Applikation (*i.p.*). An Tag 5, Tag 7 und Tag 9 erfolgte die *i.p.* Gabe der Immuncheckpoint-Inhibitoren anti-PD-L1 und anti-LAG-3 (ICB). Ab Tag 5 nach Tumorzellinokulation wurde das relative Tumolvolumen bis zum Versuchsende an Tag 10 täglich mittels Messschieber bestimmt. Ab Tag 5 waren die Tumore in allen Versuchsmäusen messbar, weshalb die Tumolvolumina an diesem Tag als Referenzwert dienten. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert \pm SEM einer Gruppe; OVA-MC38 Tumor an. Zur statistischen Auswertung wurden die beiden Versuchsgruppen der OVA-MC38 Tumor tragenden $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Luc-Reporter-mäuse an Tag 10 miteinander mittels ungepaartem parametrischen T-Test verglichen. $p = 0,1236$. $n = 4 - 5$.

4.4.2 Longitudinale Auswertung des $\text{NF}\kappa\text{B}$ Signals mittels optischer Bildgebung

Mittels optischer Bildgebung wurde täglich ab Tag 4, einen Tag bevor in allen $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Luc-Reporter-mäusen Tumore detektierbar waren, die nicht-invasive *in vivo* Biolumineszenz optische Bildgebung zur Erfassung der $\text{NF}\kappa\text{B}$ Aktivität durchgeführt.

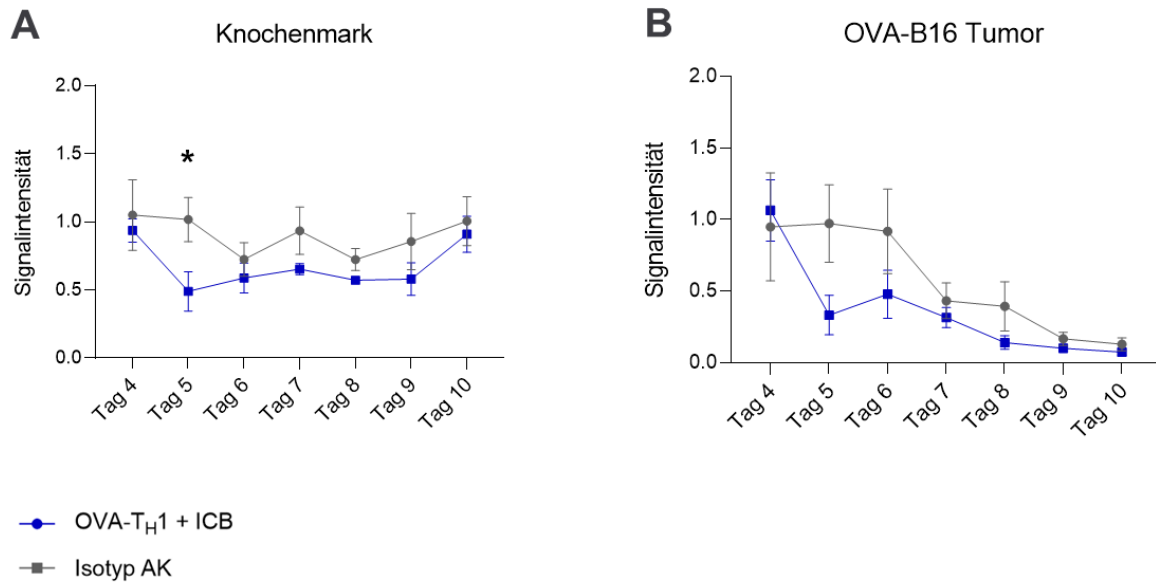
Zur vereinfachten Darstellung wurde zunächst je Versuchsgruppe der Mittelwert der S.I. ($\text{p/s/cm}^2/\text{sr}$) an Tag 4 (Start der Messungen) gebildet und auf den Wert 1 normiert. Für die darauffolgenden Tage wurde der Quotient der S.I. ($\text{p/s/cm}^2/\text{sr}$) aus dem S.I. Wert an Tag X durch den S.I. Wert an Tag 4 gebildet. Repräsentative Aufnahmen der tumortragenden $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Luc-Reporter-mäuse der beiden Therapiegruppen sind in **Abbildung 54** dargestellt.

Für die *in vivo* Untersuchungen wurden die Versuchsmäuse, wie in **3.6.3.2** erläutert, vorbereitet und wie in **Abbildung 51** erklärt, behandelt. Die Auswertung der Biolumineszenz-S.I. in den OVA-B16-Tumor tragenden ^{NFκB}Luc-Reporterermäusen ergab einen Tag nach der Verabreichung der therapeutischen OVA-T_H1 Zellen (Tag 5) einen signifikanten Abfall der NFκB abhängigen S.I. im Knochenmark (**Abbildung 53A**) sowie in den OVA-B16 Tumoren (**Abbildung 53B**) verglichen zur Kontrollgruppe (Isotyp AK). Zur Erfassung der S.I. im Knochenmark wurden die unbehaarten Hinterläufe als ROI eingezeichnet (**Abbildung 54**).

Diese Beobachtung impliziert einen therapie-induzierten Abfall der NFκB Aktivität im Knochenmark und im TME der OVA-B16-Tumor tragenden ^{NFκB}Luc-Reporterermäuse. Die mit Isotyp AK behandelten OVA-B16-tragenden Versuchsmäuse zeigten an Tag 5 eine S.I. im Knochenmark von $1,02 \pm 0,16$ %, wohingegen die mit der Kombinationstherapie behandelten Versuchsmäuse auf einen Wert von $0,49 \pm 0,14$ % abfielen (*p = 0,0410; **Abbildung 53A**). Das Biolumineszenzsignal im Knochenmark der OVA-MC38 Versuchsmäuse zeigte verglichen mit dem Signal in den OVA-B16 Versuchsmäusen einen sehr ähnlichen Trend (**Abbildung 53C**).

In den OVA-MC38 Tumoren der ^{NFκB}Luc-Reporterermäuse mit kombinierter Immuntherapie (OVA-T_H1 + ICB) wurde im zeitlichen Verlauf der Behandlung eine tendenziell höhere S.I. detektiert. Sieben Tage nach der Tumordinokulation war die S.I. in den OVA-MC38 Tumoren der mittels kombinierter Immuntherapie behandelten Versuchsmäuse ($0,75 \pm 0,10$ %) im Vergleich zur Isotyp AK behandelten Versuchsgruppe ($0,43 \pm 0,14$ %) signifikant erhöht (*p = 0,0159; **Abbildung 53D**). Dies impliziert eine gesteigerte NFκB Aktivierung unter der kombinierten Immuntherapie.

OVA-B16 Versuchsmäuse



OVA-MC38 Versuchsmäuse

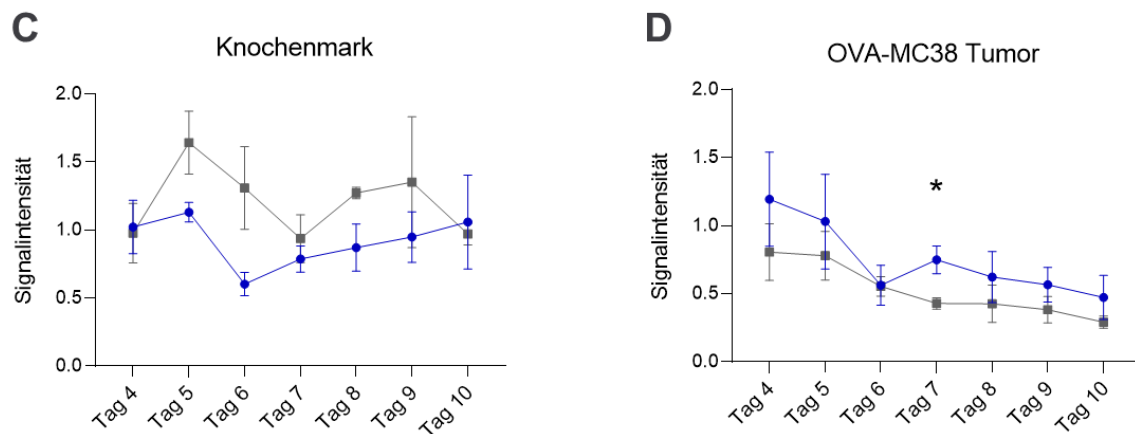


Abbildung 53: Monitoring der relativen S.I. in ^{NFκB}Luc-Reporter-mäusen unter der kombinierten Immuntherapie (OVA-T_H1 + ICB) oder Isotyp AK Kontrollbehandlung. Den ^{NFκB}Luc-Reporter-mäusen wurden am Tag 0 OVA-B16 oder OVA-MC38 Tumorzellen s.c. inokuliert. Nach drei Tagen erfolgte eine 2 Gy Niedrigdosis-Ganzkörperbestrahlung. Einen Tag später (Tag 4) erhielten die Versuchstiere einen adoptiven Transfer von OVA-T_H1 bzw. eine PBS Applikation (*i.p.*). An Tag 5, Tag 7 und Tag 9 erfolgte die *i.p.* Gabe der Immuncheckpoint-Inhibitoren anti-PD-L1 und anti-LAG-3 (ICB). Ab Tag 5 nach Tumorzellinokulation wurde mittels optischer Bildgebung die S.I. des Biolumineszenzsignals zur Untersuchung der NFκB Aktivität in beiden Versuchsgruppen bestimmt.

Dargestellt ist die relative S.I. des Biolumineszenzsignals (**A**) des Knochenmarks (Tag 5: *p = 0,0410) und (**B**) des OVA-B16 Tumors der OVA-B16 tragenden ^{NFκB}Luc-Reporter-mäuse und die (**C**) des Knochenmarks und (**D**) des OVA-MC38 Tumors der OVA-MC38 tragenden ^{NFκB}Luc-Reporter-mäuse (Tag 7: *p = 0,0159). Zur vereinfachten Darstellung wurde zunächst je Versuchsgruppe der Mittelwert

der Signalintensität (S.I.; p/s/cm²/sr) an Tag 4 (Start der Messungen) gebildet und auf den Wert 1 normiert. Für die darauffolgenden Tage wurde der Quotient der S.I. (p/s/cm²/sr) aus dem S.I. Wert an Tag X durch den S.I. Wert an Tag gebildet. Zur statistischen Auswertung wurden die beiden Versuchsgruppen miteinander am selben Tag mittels ungepaartem parametrischen T-Test verglichen. n = 4 – 5.

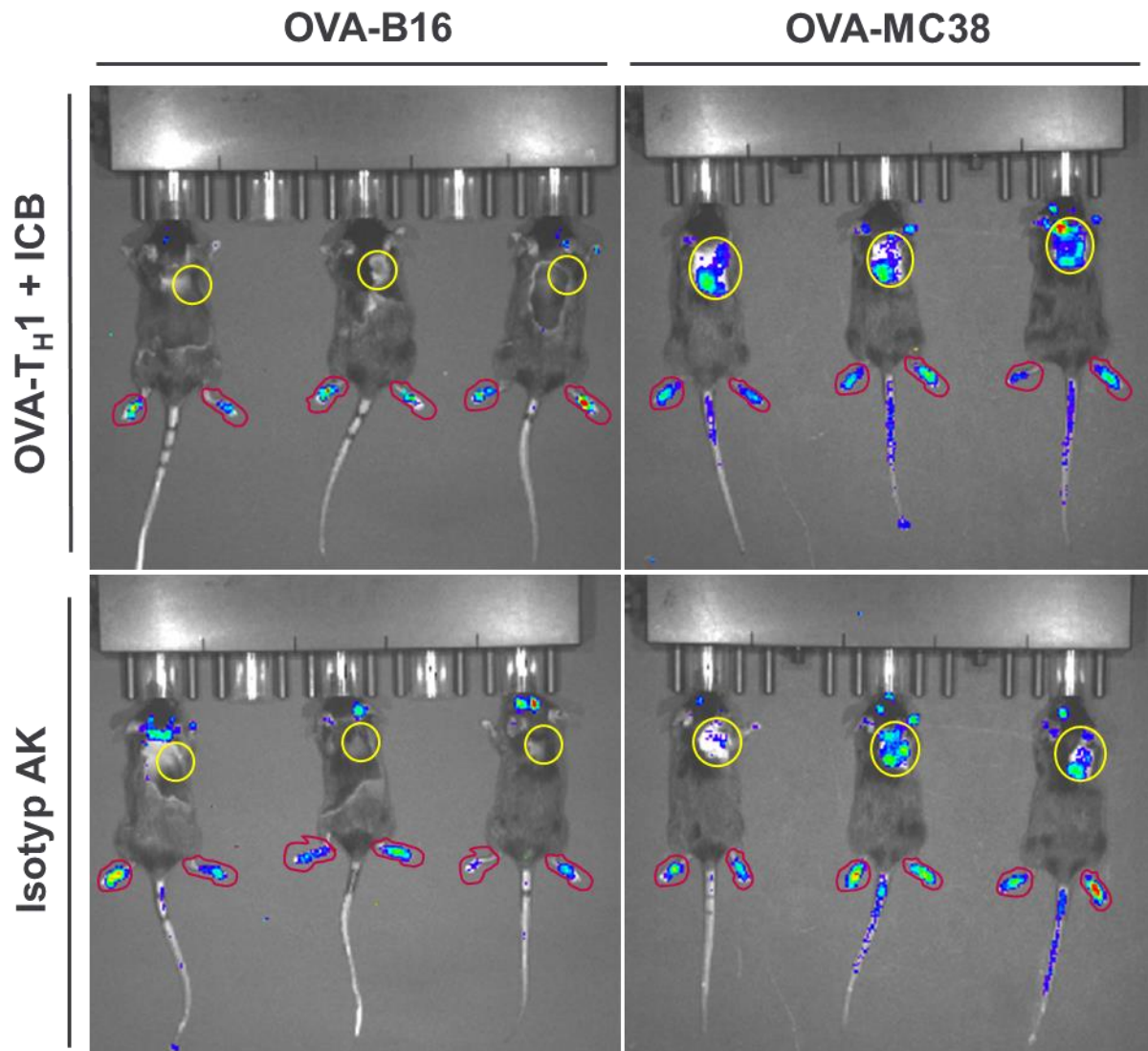


Abbildung 54: Repräsentative Biolumineszenz-Aufnahmen von OVA-B16 und OVA-MC38 tragenden ^{NFκB}Luc-Reporterermäusen mit kombinierter Immuntherapie oder Isotyp AK Kontrollbehandlung. Den ^{NFκB}Luc-Reporterermäusen wurden am Tag 0 OVA-B16 oder OVA-MC38 Tumorzellen s.c. inokuliert. Nach drei Tagen erfolgte eine 2 Gy Niedrigdosis-Ganzkörperbestrahlung. Einen Tag später (Tag 4) erhielten die Versuchstiere einen adoptiven Transfer von OVA-T_H1 bzw. eine PBS Applikation (*i.p.*). An Tag 5, erfolgte die *i.p.* Gabe der Immuncheckpoint-Inhibitoren anti-PD-L1 und anti-LAG-3 (ICB). Abgebildet ist die S.I. des Biolumineszenzsignals an Tag 7 nach Tumoringokulation zur Untersuchung der NFκB Aktivität in beiden Versuchsgruppen. Hierzu wurde den ^{NFκB}Luc-

Reportermäusen Luciferin *i.p.* appliziert und nach einer Uptake-Zeit von 5 min wurden diese unter Isofluran-Narkose in das IVIS® platziert. Das Signal spiegelt die Aktivität von NFκB im Knochenmark (rote Umrandung) und im Tumor (gelbe Umrandung) wider.

4.4.3 Histologische (H&E) und immunhistochemische (CD3 und B220) Evaluation der OVA-B16 und OVA-MC38 Tumore

Zehn Tage nach Tumorinokulation wurden die OVA-B16 und OVA-MC38 tumortragenden Versuchsmäuse der beiden Behandlungsgruppen unmittelbar nach der letzten Messung mittels optischer Bildgebung euthanasiert und der Tumor für die histopathologische (H&E) und immunhistochemische (CD3 und B220) Evaluation, wie in **3.5.3** erklärt, isoliert und aufgearbeitet. Die histopathologische Analyse zeigte, kleine bis mittelgroße OVA-B16 Tumore in allen Versuchsmäusen der beiden Therapiegruppen (**Abbildung 55A+B**). Die Tumore besaßen große Nuklei mit offenem Chromatin (gelbe Pfeile, **Abbildung 55E+F**). Zudem zeigten die OVA-B16 Tumorzellen beider Gruppen eine hohe Mitose- und Apoptose-Rate. Des Weiteren war das entzündliche Infiltrat im Randbereich der OVA-B16 Tumore beider Therapiegruppen geringgradig bis mild ausgeprägt und im Zentrum des Tumors minimal. Die immunhistochemische Evaluation der T-Zellen-Verteilung (CD3) ergab in beiden Therapiegruppen gleichermaßen eine verstärkte Ansammlung von T-Zellen in dem Randbereich der Tumore (orange Pfeile, **Abbildung 55I+J**) und eine geringere T-Zell-Akkumulation im Tumorzentrum (orange Pfeile, **Abbildung 55M+N**). Die immunhistochemische Analyse der B-Zellen (B220) zeigte in den mit der kombinierten Immuntherapie-therapierten und den Isotyp AK-therapierten Versuchsmäusen ebenfalls eine erhöhte Anzahl B-Zellen im Randgebiet des OVA-B16 Tumors (grüne Pfeile, **Abbildung 55Q+R**) und eine geringere Anzahl im Zentrum des OVA-B16 Tumors (grüne Pfeile, **Abbildung 55U+V**). Die Anzahl B-Zellen in den OVA-B16 Tumoren der Versuchsmäuse mit kombinierter Immuntherapie (OVA-T_H1 + ICB) war tendenziell höher als die Anzahl in den OVA-B16 Tumoren der mit Isotyp AK-therapierten Tiere.

Die histopathologische Analyse der OVA-MC38 Tumore zeigte in beiden Therapiegruppen relativ kleine OVA-M38 Tumore (**Abbildung 55C+D**) mit mittelgroßen Spindelzellen, mit einem polymorphen Zellkern mit multiplen großen

Nucleoli (schwarze Pfeile, **Abbildung 55G+H**). Das Entzündungsinfiltrat im TME der OVA-MC38 Tumoren beider Therapiegruppen war nur geringfügig ausgeprägt und war primär am Tumorrand lokalisiert.

Die immunhistochemische Evaluation der T-Zellen (CD3) beider Therapiegruppen ergab eine deutlich verstärkte Ansammlung von CD3⁺ T-Zellen im Randbereich der OVA-MC38 Tumoren (orange Pfeil, **Abbildung 55K+L**) und eine nur geringfügige Ansammlung im Tumorzentrum (orange Pfeil, **Abbildung 55O+P**). Es konnte kein Unterschied in der Anzahl der T-Zellen im TME der OVA-M38 Tumoren beider Therapiegruppen (OVA-T_H1 + ICB; Isotyp AK) festgestellt werden.

Des Weiteren ergab die immunhistochemische Analyse der B-Zellen (B220) vereinzelte B-Zellen im Randgebiet der OVA-MC38 Tumoren (grüner Pfeil, **Abbildung 55S+T**) und nur sehr wenige B-Zellen im Tumorzentrum (grüner Pfeil, **Abbildung 55W+X**).

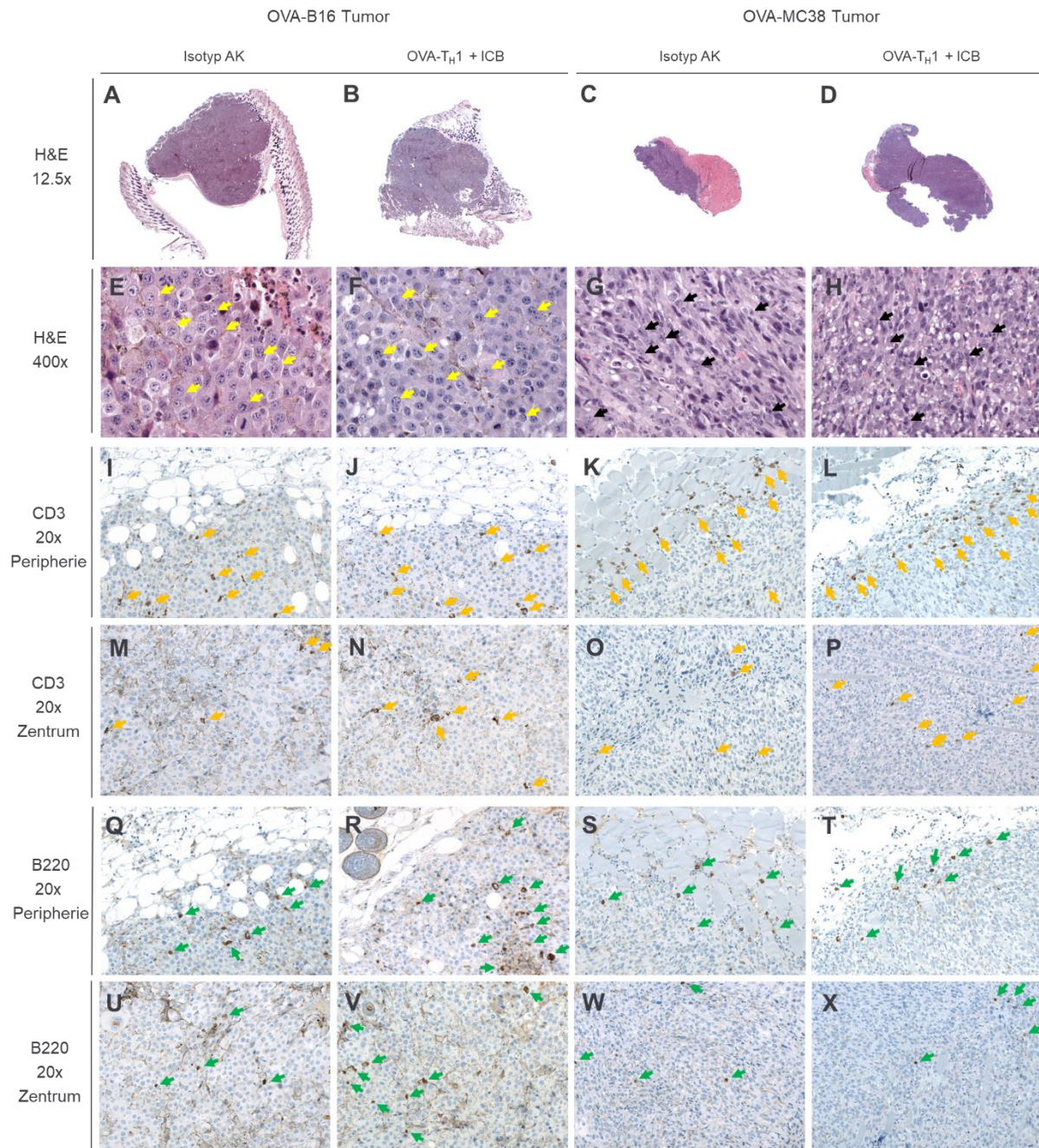


Abbildung 55: Histopathologische (H&E) und immunohistochemische (B220 + CD3) Analyse der OVA-B16 und OVA-MC38 Tumore der ^{NFκB}Luc-Reporterermäuse 10 Tage nach Tumorinokulation und der Behandlung mit der kombinierten Immuntherapie (OVA-T_H1) bzw. PBS. Repräsentative H&E Aufnahmen der OVA-B16 Tumore (links) und der OVA-MC38 Tumore (rechts) beider Therapiegruppen in der Übersicht (Vergrößerung: 12,5x; **A-D) und im Detail (Vergrößerung: 400x; **E-H**). (**E+F**) Die großen runden Nuclei der OVA-B16 Tumorzellen sind in der Detailaufnahme mit gelben Pfeilen markiert. (**G+H**) Die polymorphen Zellkerne bestehend aus multiplen Nucleoli der OVA-MC38 Tumorzellen sind mit schwarzen Pfeilen hervorgehoben. Die repräsentative CD3 Immunhistochemie der T-Zellen der beiden Versuchsgruppen zeigt den Randbereich des Tumors (Vergrößerung: 20x; **I-L**) und**

das Tumorzentrum (Vergrößerung: 20x; **M-P**). Die B-Zellen sind mit grünen Pfeilen markiert. H&E: n = 6. Immunhistochemie: n = 2 – 3. (**Q-X**) Die repräsentative B220 Immunhistochemie zeigt die B-Zellen der OVA-B16 Tumore (links) und der OVA-MC38 Tumore (rechts) beider Therapiegruppen im Tumorrandbereich (Vergrößerung: 20x; **Q-T**) und im Tumorzentrum (Vergrößerung: 20x; **U-X**).

4.4.4 Untersuchung der T- und B-Zellpopulationen und deren Aktivierung mittels Durchflusszytometrie

Zum Versuchsende an Tag 10 wurden die Versuchsmäuse nach der letzten Messung mittels optischer Bildgebung euthanasiert und die Tumore und als auch die lymphatischen Organe (Tumor, Knochenmark, Milz, dLK und kLK) entnommen. Anschließend erfolgte die Aufarbeitung für die Durchflusszytometrieanalyse (**3.5.5**). Zunächst wurde die relative Anzahl der CD4⁺ T-Zellen, CD8⁺ T-Zellen und CD19⁺ B-Zellen als Prozent der Anzahl viabler Zellen in den Tumoren oder lymphatischen Organen analysiert. Zudem wurden aktivierte T und B Zellen mittels der membranären CD69 Expression bestimmt.

In OVA-B16 Tumoren der mittels kombinierter Immuntherapie behandelten Versuchsmäuse wurden signifikant mehr CD4⁺ T-Zellen ($5,41 \pm 0,70$ %) und tendenziell mehr CD8⁺ T-Zellen ($1,68 \pm 0,32$ %) im Vergleich zu den Tumoren der Isotyp AK behandelten Kontrollgruppe (CD4⁺ T-Zellen: $3,25 \pm 0,49$ %; **p = 0,0016; CD8⁺ T-Zellen: $1,40 \pm 0,17$ %; nicht signifikant; **Abbildung 56A**) nachgewiesen.

In den OVA-B16 Tumoren der mittels kombinierter Immuntherapie oder mittels Isotyp AK behandelten Versuchsmäuse konnten am Tag 7 nach Therapiestart keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl aktivierter (CD69 exprimierender) CD4⁺-, CD8⁺ T-Zellen oder CD19⁺ B-Zellen nachgewiesen werden (**Abbildung 56A**).

Dies impliziert einen Therapie-induzierten Anstieg der CD4⁺ T-Zellen. Für eine zielgerichtete Analyse des frühen Lymphozyten-Aktivierungsmarkers CD69 ist der Tag 7 nach Start der kombinierten Immuntherapie womöglich zu spät, um Unterschiede aufzuzeigen. Im Knochenmark (**Abbildung 56B**) sowie in der Milz (**Abbildung 56C**) konnte zudem kein signifikanter Unterschied im prozentualen Anteil der T- und B-Zellen zwischen den beiden Versuchsgruppen festgestellt werden.

In den dLK der mittels kombinierter Immuntherapie behandelten OVA-B16 Tumor tragenden Versuchstiere wurden tendenziell weniger CD4⁺ T-Zellen (35,69 ± 6,29 %) und CD8⁺ T-Zellen (8,68 ± 1,50 %) im Vergleich zu den Tumoren der Isotyp AK-behandelten Kontrollgruppe (CD4⁺ T-Zellen: 45,13 ± 1,99 %; CD8⁺ T-Zellen: 13,69 ± 1,25 %) gemessen (Unterschiede nicht signifikant; **Abbildung 56D**).

Interessanterweise wurde in den kLK identisch zu dem Trend in den dLK eine signifikante Reduktion der CD4⁺ T-Zellen (38,58 ± 44,17 %) unter Gabe der kombinierten Immuntherapie im Vergleich zur Kontrollgruppe (44,17 ± 1,15 %) nachgewiesen (*p = 0,0411; **Abbildung 56E**). Des Weiteren wurde im kLK wie bereits im dLK eine Therapie-induzierte Reduktion der CD8⁺ T-Zellen (11,49 ± 1,02 %) im Vergleich zur Kontrollgruppe (15,29 ± 0,87 %) beobachtet (nicht signifikant, **Abbildung 56E**). Diese Beobachtung spricht für eine Therapie-induzierte Auswanderung der CD4⁺- und CD8⁺ T-Zellen aus den drainierenden und nicht-drainierenden Lymphknoten. Interessanterweise wurden in den kLK der immuntherapierten Versuchsmäuse signifikant weniger CD69 exprimierende CD19⁺ B-Zellen (8,22 ± 1,49 %) verglichen mit den kLK der mit Isotyp AK-behandelten Versuchsmäuse (12,77 ± 2,37 %) detektiert (*p = 0,0363; **Abbildung 56E**).

OVA-B16 Versuchsmäuse

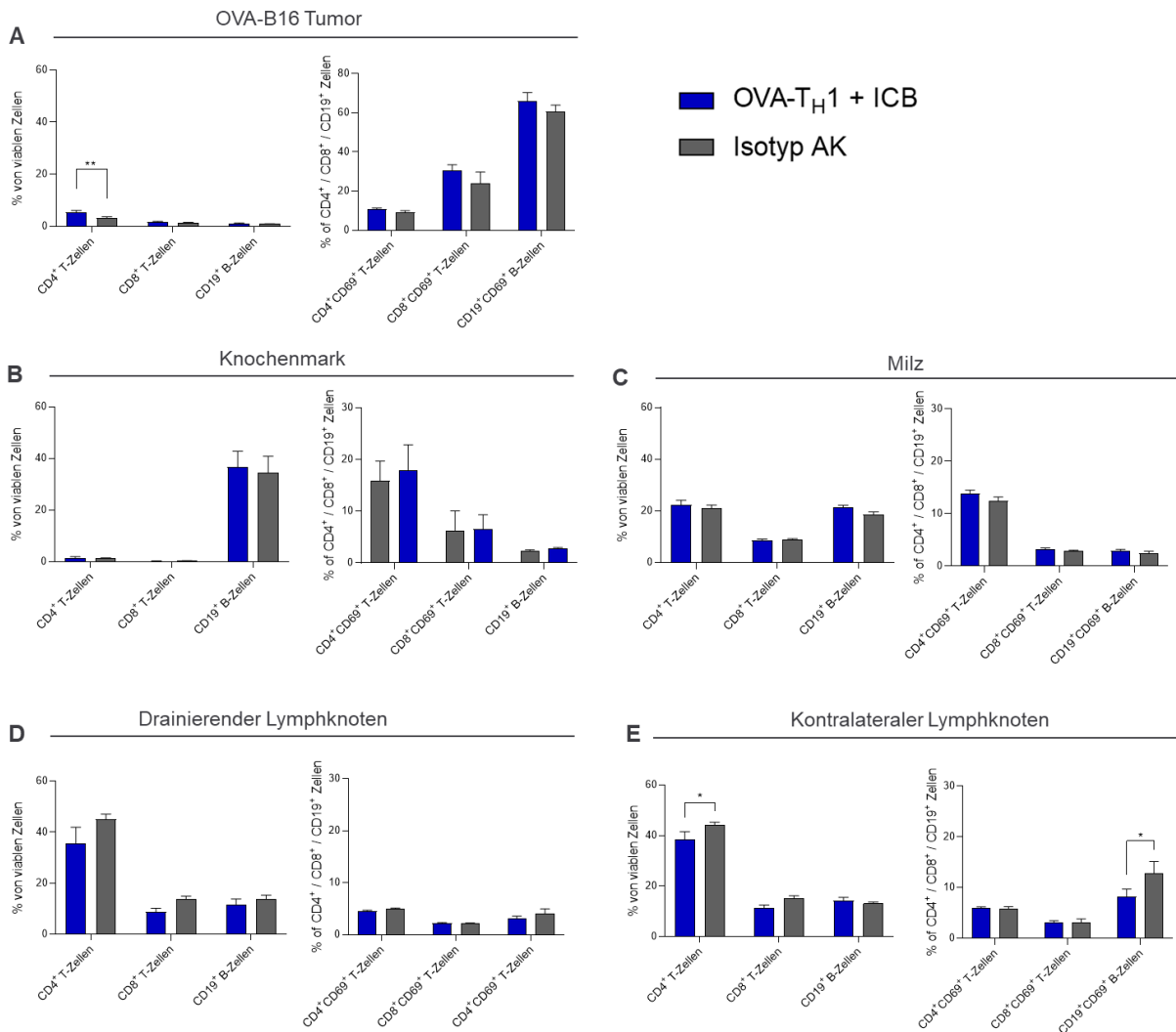


Abbildung 56: Analyse der prozentualen Anzahl von T und B Zellen in OVA-B16 Tumoren und den primär und sekundär lymphatischen Organen von mittels kombinierter Immuntherapie oder mit Isotyp AK behandelten ^{NFκB}Luc-Reporter-mäusen. 10 Tage nach der Tumordinokulation (7 Tage nach Therapiestart) wurde die prozentuale Anzahl der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, die Expression von CD69 und der CD19⁺ B-Zellen in **(A)** dem OVA-B16 Tumor (CD4⁺ T-Zellen: **p = 0,0016), **(B)** dem Knochenmark, **(C)** der Milz, **(D)** dem dLK und **(E)** dem kLK (CD4⁺ T-Zellen: *p = 0,0411; CD19⁺CD69⁺ B-Zellen: *p = 0,0363) bestimmt. Zur statistischen Auswertung wurde ein zweifaktorieller ANOVA mit Bonferroni-Korrektur für Mehrfachtestungen (k = 2 – 3) verwendet. Ein Balken präsentiert jeweils den Mittelwert ± SEM einer Gruppe (OVA-T_H1 + ICB, n = 6; Isotyp AK, n = 6).

Im OVA-MC38 Tumormodel konnte in den Tumoren der Versuchsmäuse mit kombinierter Immuntherapie eine tendenziell höhere relative Anzahl an CD8⁺ T-Zellen (8,44 ± 3,22 %), im Vergleich zu Tumoren der Isotyp AK behandelten Kontrollgruppe

(7,57 ± 1,26 %) detektiert werden (Unterschied nicht signifikant; **Abbildung 57A**). Interessanterweise konnten bei den therapierten Versuchstieren mit kombinierter Immuntherapie verglichen mit der Kontrollgruppe fast 1,5-mal so viele CD19⁺ B-Zellen in den OVA-B16 Tumor detektiert werden; der Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen war jedoch nicht signifikant (**Abbildung 57A**). Im Knochenmark der mittels kombinierter Immuntherapie behandelten Versuchsmäuse konnte ebenso eine prozentuell höhere relative Anzahl an CD19⁺ B-Zellen (15,78 ± 1,66 %) verglichen zu mit Isotyp-AK-therapierten Versuchsmäusen gemessen werden (13,68 ± 2,58 %; nicht signifikant; **Abbildung 57B**).

Interessanterweise konnte des Weiteren im Knochenmark eine erhöhte relative Anzahl CD69 exprimierender CD4⁺ (43,81 ± 1,89 %) und CD8⁺ T-Zellen (19,87 ± 3,18 %) in den mit kombinierter Immuntherapie behandelten Versuchsmäusen im Vergleich zu den Isotyp-AK-behandelten Mäusen detektiert werden (CD4⁺ T-Zellen: 39,00 ± 3,95 %, CD8⁺ T-Zellen: 14,89 ± 2,53 %; Unterschiede nicht signifikant **Abbildung 57B**). Zudem wurde in der Milz der Kombinationstherapiegruppe eine signifikant höhere prozentuelle Anzahl an CD4⁺CD69⁺ T-Zellen (21,31 ± 1,18 %) im Vergleich zur Kontrollgruppe detektiert (17,75 ± 0,75 %, *p = 0,0124; **Abbildung 57C**). Die prozentuelle Anzahl der CD8⁺CD69⁺ T-Zellen (13,41 ± 1,18 %) war in der Milz von mittels kombinierter Immuntherapie behandelten OVA-MC38 tragenden Versuchsmäusen verglichen mit der Kontrollgruppe (9,44 ± 0,31 %) signifikant erhöht (**p = 0,0052, **Abbildung 57C**). Diese Tendenz wurde ebenso in der Anzahl CD19⁺CD69⁺ B-Zellen beobachtet (**Abbildung 57C**).

Zudem war die prozentuelle Anzahl der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in den dLK der mit Isotyp AK-therapierten OVA-B16 tumortragenden Versuchsmäuse tendenziell leicht (nicht signifikant) erhöht (**Abbildung 57D**). Interessanterweise führte die kombinierte Immuntherapie (OVA-T_H1 + ICB) in den dLK der OVA-MC38 tragenden Versuchsmäuse zu einer doppelt so hohen prozentuellen Anzahl von CD19⁺ B-Zellen (32,31 ± 4,46 %) verglichen zu Isotyp AK-behandelten Versuchstieren (16,46 ± 3,17 %; *p = 0,0366; **Abbildung 57D**). Des Weiteren zeigten Versuchsmäuse mit kombinierter Immuntherapie im Vergleich zur Kontrollgruppe in den dLK eine tendenziell leicht erhöhte prozentuelle Anzahl an CD69 exprimierenden CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen (nicht signifikant; **Abbildung 57D**). Interessanterweise wurden in den

dLK der Versuchsmäuse mit Kombinationstherapie tendenziell weniger CD69 exprimierender CD19⁺ B-Zellen im Vergleich zu den Isotyp-AK-behandelnden Kontrollmäusen detektiert (**Abbildung 57D**).

Im kLK konnte der identische im dLK beobachtete Trend bezüglich der etwas verringerten prozentuellen Anzahl an CD69 exprimierenden CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen detektiert werden (**Abbildung 57E**). Im Gegensatz zum dLK war die Anzahl CD19⁺ B-Zellen in den OVA-MC38 tumortragenden Mäusen, welche mittels kombinierter Immuntherapie behandelt wurden ($20,68 \pm 3,48$ %) verglichen zur Kontrollgruppe ($14,90 \pm 1,94$ %) nur tendenziell erhöht (nicht signifikant; **Abbildung 57E**). Auch hier konnte zwischen den beiden Versuchsgruppen kein Unterschied in der prozentuellen Anzahl der CD69 exprimierender T- und B-Zellen gemessen werden (**Abbildung 57E**).

OVA-MC38 Versuchsmäuse

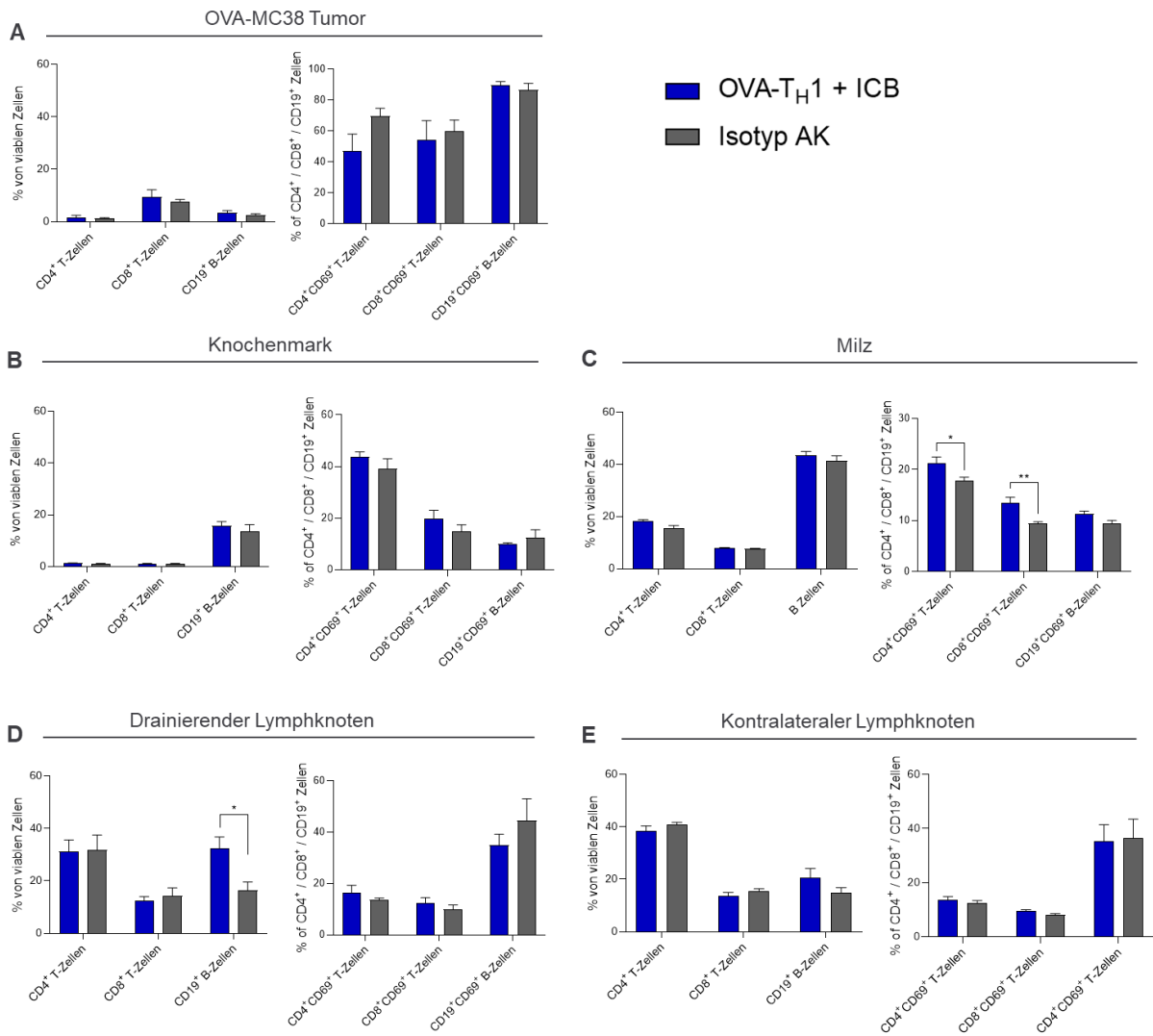


Abbildung 57: Analyse der prozentualen Anzahl von T und B Zellen in OVA-MC38 Tumoren und den primär und sekundär lymphatischen Organen von mittels kombinierter Immuntherapie oder mit Isotyp AK behandelten ^{NFκB}Luc-Reporter-mäusen. 10 Tage nach der Tumorinokulation (7 Tage nach Therapiestart) wurde die prozentuale Anzahl der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, die Expression von CD69 und der CD19⁺ B-Zellen (CD19) in **(A)** dem OVA-MC38 Tumor, **(B)** dem Knochenmark, **(C)** der Milz (CD4⁺CD69⁺ T-Zellen: *p = 0,0124; CD8⁺CD69⁺ T-Zellen: **p = 0,0052), **(D)** dem dLK (CD19⁺ B-Zellen: *p = 0,0366), und **(E)** dem kLK bestimmt. Zur statistischen Auswertung wurde ein zweifaktorieller ANOVA mit Bonferroni-Korrektur für Mehrfachtestungen (k = 2 – 3) verwendet. Ein Balken präsentiert jeweils den Mittelwert ± SEM einer Gruppe (OVA-T_H1 + ICB, n = 4; Isotyp AK, n = 5).

5. Diskussion

5.1 Wirkmechanismus der Th1-basierten kombinierten Immuntherapie unter der Depletion von CD8⁺ T-Zellen im fortgeschrittenen murinen Inselzellkarzinommodell

Die CD8⁺ T-Zell-vermittelte anti-tumorale Immunantwort zählte aufgrund ihrer adaptiven und zielorientierten Immunreaktion lange Zeit als goldener Standard der Immuntherapie [245]. Die CD8⁺ T-Zelle produziert Perforin, das sich in die Zellmembran der Tumorzelle integriert und die Bildung einer transmembranären Pore induziert. Infolgedessen scheidet die CD8⁺ T-Zelle Granzyme (Serinproteasen) aus, die wiederum durch die gebildete Pore in das Zytoplasma der Tumorzelle gelangen und intrazelluläre Caspasen aktivieren, welche die Apoptose einleiten [246, 247].

Allerdings zeigen Studien mit der Behandlung von Tumorantigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen erhebliche Limitationen bezüglich der Therapieeffizienz unter der Beobachtung von mittelgraden bis starken Nebenwirkungen [248, 249]. Zudem ist bis heute (Stand 2023) noch keine einzige CD8⁺ T-Zellbasierte Therapie von der FDA oder EMA in die Liste für zugelassene Therapieansätze aufgenommen worden. Dies deutet darauf hin, dass der alleinige Einsatz von Tumorantigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen nicht zu einer ausreichenden Therapieeffizienz beitragen kann. Ein Grund der Limitation könnte in der tumorinduzierten CD8⁺ „*T-cell exhaustion*“ liegen, welche durch eine länger andauernde Exposition mit dem Tumor initiiert wird [250]. Biatsch *et al.* zeigten, dass die Tumorantigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in den Metastasen von Patienten mit Melanomen eine große Bandbreite an Genen mit einem *T-cell exhaustion* Profil aufweisen [250].

Naive CD4⁺ T-Zellen verfügen über eine breite Varietät an potenziellen Differenzierungsoptionen und spielen eine multifaktorielle Rolle in der Anti-Tumor-Immunität. Somit können aktivierte und differenzierte IFN- γ produzierende CD4⁺ T-Zellen (Th1) direkt an der klonalen Expansion antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen beteiligt sein. Zudem wurde gezeigt, dass diese Th1 Zellen die Differenzierung der aktivierten CD8⁺ T-Zellen in CD8⁺ Gedächtniszellen fördern [251-253]. Des Weiteren sind folliculäre CD4⁺ T-Zellen (T_{FH}) für die Induktion der humoralen Immunantwort gegen spezifische Tumorantigene mittels CD40 L (auf CD4⁺ T-Zellen) und CD40 (auf

B-Zellen) Interaktion zur Initiierung der B-Zell Differenzierung und deren Maturation zu Plasmazellen unverzichtbar [254, 255].

Zusätzlich können aktivierte CD4⁺ T-Zellen Effektor Zytokine die Fas-medierte Apoptose der Tumorzellen einleiten und somit direkt eine anti-tumorale Immunantwort induzieren [256, 257]. Außerdem wurde dargelegt, dass CD4⁺ T-Zellen zur Aktivierung von Monozyten im Rahmen von intestinalen Infektionen benötigt werden [258].

Somit induzieren CD4⁺ T-Zellen eine Bandbreite an anti-tumoralen Immunkaskaden, und sind deshalb in das Zentrum der Forschung gerückt. Müller-Hermelink *et al.* therapierten fünf Wochen alte RIP1-Tag2 Versuchsmäuse mittels 10⁷ Tag-T_H1 Zellen und initialer 2 Gy Niedrigdosis-Ganzkörperbestrahlung und konnten so das Überleben der Versuchsmäuse im Vergleich zur Sham-Behandlungsgruppe verdoppeln. Der Blutglukosewert, als indirekter Marker für die Tumormasse, blieb hierbei in den Tag-T_H1-behandelten Versuchsmäusen bis auf einen leichten Abfall über den gesamten Versuchszeitraum stabil, während der Blutglukosewert der Kontrollgruppe im Laufe der Zeit kritisch fiel [162]. Im gleichen Tumormodel konnten Braumüller *et al.* später zeigen, dass die IFN- γ und TNF sezernierenden Tag-T_H1 Zellen in den Inselzellkarzinomen der RIP1-Tag2 Versuchsmäuse einen permanenten Wachstumsarrest induzieren [259].

Da es sich hierbei um einen protektiven Therapieansatz handelt, also der Startzeitpunkt der Therapie noch vor der Entwicklung von Inselzellkarzinomen angesetzt ist, sind diese Studien nur sehr schwer auf den Menschen zu übertragen, da Patienten sich zumeist erst nach dem Auftreten von Symptomen, also im weiter fortgeschrittenen Tumorstadium, in ärztliche Behandlung begeben.

Um klinisch translatierbare Ergebnisse zu erzielen, haben Brenner *et al.* eine kombinierte Tag-T_H1- und ICB-basierte Immuntherapie Therapie mit initialer 2 Gy Niedrigdosis-Ganzkörperbestrahlung bei bereits symptomatischen 10-11 Wochen alten RIP1-Tag2 Mäusen mit bereits signifikant verringerten Blutglukosewert und mittels MRT detektierbaren Inselzellkarzinomen durchgeführt [242]. Im Rahmen dieses innovativen Versuchsansatzes konnte gezeigt werden, dass die kombinierte Immuntherapie in der Lage war, den bereits gesunkenen Blutglukosewert der RIP1-Tag2 Versuchsmäuse aufgrund der induzierten Tumorregression und des Wachstumsarrestes der Tumorzellen zu normalisieren. Bei Versuchsmäusen, die nur

mit einer Komponente der kombinierten Immuntherapie behandelt wurden oder nur eine Sham-Behandlung erhielten, konnte keine Regression der Inselzellkarzinome erzielt werden, weswegen der Blutglukosewert bei diesen drei Behandlungsgruppen stetig abfiel [242].

Innerhalb dieser Dissertation sollte nun geklärt werden, welchen Einfluss die CD8⁺ T-Zellen auf die Therapieeffizienz der kombinierten Immuntherapie in 10-11 Wochen alten RIP1-Tag2 Mäusen im fortgeschrittenen Tumorstadium haben.

Hierzu wurde zuerst die *in vivo* CD8⁺ T-Zell Depletion etabliert (**4.1.1**). Einerseits um eine vollständige Depletion der CD8⁺ T-Zellen zu überprüfen. Andererseits um auszuschließen, dass diese einen pathologischen Effekt auf die Versuchsmäuse hat oder gar zum Tode dieser führt.

Nach der erfolgreichen Depletion der CD8⁺ T-Zellen (**Abbildung 18**) wurden die 10-11 Wochen alten RIP1-Tag2 Mäuse unter der Gabe der depletierenden anti-CD8 AK mit der kombinierten Immuntherapie behandelt.

Im Rahmen der hierzu durchgeführten Studien konnte kein signifikanter Unterschied im rBGW zwischen den CD8⁺ T-Zell-depletierten und nicht-depletierten RIP1-Tag2 Versuchsmäusen mit kombinierter Immuntherapie (Tag-T_H1 Zellen + ICB (+ 2Gy Niedrigdosis-Ganzkörperbestrahlung)) beobachtet werden (**Abbildung 20A**).

Des Weiteren hatte die CD8⁺ T-Zell-Depletion keinen Einfluss auf das Überleben der Versuchsmäuse (**Abbildung 20B**). In den Versuchsmäusen, die mit der kombinierten Immuntherapie behandelt wurden, konnte 8 Tage nach Behandlungsbeginn ein deutlicher Anstieg des rBGWs festgestellt werden. Interessanterweise blieb dieser Anstieg in der CD8⁺ T-Zell-Depletion-Gruppe aus. Die kombinierte Immuntherapie führte in beiden Versuchsgruppen zur Stabilisierung des rBGWs über einen Zeitraum von 3 Wochen (**Abbildung 20C**). Diese Beobachtungen implizieren, dass der Anstieg des rBGW 8 Tage nach Behandlungsbeginn im Rahmen der kombinierten Immuntherapie aufgrund der Anwesenheit von CD8⁺ T-Zellen induziert wird. Somit scheinen die CD8⁺ T-Zellen insbesondere zu Behandlungsbeginn eine wesentliche Rolle in der Tumoreradikation zu spielen. Im weiteren Behandlungsverlauf zeigten die rBGW der beiden Versuchsgruppen über den Versuchszeitraum von 3 Wochen ähnliche Werte. Dies impliziert wiederum, dass die CD8⁺ T-Zellen im weiteren Therapieverlauf für eine effiziente Tumoreradikation nicht mehr relevant sind oder,

dass die CD8⁺ T-Zellen und deren Effektorfunktion in den depletierten Versuchstieren durch andere Mechanismen kompensiert werden können.

Ein Beispiel für eine mögliche Kompensation durch Immunzellen kann aus aktuellem Anlass anhand von SARS-CoV-2 Patienten, die mit einer Tumorerkrankung diagnostiziert wurden, aufgezeigt werden. Huang *et al.*, inkludierten 45 Patienten mit hämatologischen Tumoren, welche zuvor mit anti-CD20 AK zur Depletion der B-Zellen behandelt wurden. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Patienten, die eine Hospitalisierung aufgrund einer COVID-19 Infektion überlebten, eine höhere relative Anzahl an CD8⁺ T-Zellen und einen geringeren viralen Titer aufwiesen. Somit scheinen trotz der fehlenden B-Zell-basierten humoralen Ig-Immunantwort die CD8⁺ T-Zellen in der Lage zu sein, die von Viren infizierten Zellen effizient zu dezimieren. Somit können die CD8⁺ T-Zellen eine fehlende humorale Immunantwort effizient kompensieren [242]. Ein weiteres Beispiel für eine Zell-basierte Kompensation der Immunantwort wurde von Konishi *et al* gezeigt. Im Rahmen einer Studie zur Untersuchung der mikroglialen Phagozytose an Irf8-defizitären Mäusen, die eine dysfunktionale Mikroglia aufweisen, konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass der angesammelte Debris, der üblicherweise von Mikroglia phagozytiert wird, von aktivierten pro-inflammatorischen Astrozyten beseitigt werden kann. Somit sind proentzündliche Astrozyten in der Lage, Aufgaben der mikroglialen Phagozytose erfolgreich zu übernehmen und die mikrogliale Funktion zu kompensieren [260]. Somit ist die zentrale Frage, welche Zellpopulation die CD8⁺ T-Zellen ersetzen.

Naheliegender wäre die Induktion Tumorantigen-spezifischer zytotoxischer CD4⁺ T-Zellen, da diese analog zu den CD8⁺ T-Zellen eine Tumorantigen-spezifische Immunantwort unter Einsatz von Granzyme und Perforin Tumorzellen eradizieren können [261]. Es wurde gezeigt, dass zytotoxische CD4⁺ T-Zellen aus Th1 entstehen und durch CD11c Antigen-exprimierende Zellen induziert werden [262]. Da die in der Dissertation angewandte kombinierte Immuntherapie u.a. aus Tumorantigen-spezifischen Tag-T_H1 Zellen besteht, könnten sich diese in Tumorantigen-spezifische zytotoxische CD4⁺ T-Zellen differenzieren. Weiterführende *in vitro* und *in vivo* Studien werden zeigen, ob zytotoxische CD4⁺ T Zellen im Rahmen unserer etablierten Immuntherapie eine Rolle spielen.

Des Weiteren wurde in einem weiteren Versuch (4.1.3) überprüft, ob die Gabe von Cyclophosphamid die Niedrigdosis-Ganzkörperbestrahlung zur endogenen Immunzelldepletion ersetzen kann, da Cyclophosphamid zu diesem Zweck häufig in der klinischen Routine verwendet wird und so das in der vorliegenden Dissertationsschrift verwendete Versuchsdesign die Therapie beim Menschen widerspiegelt. Der Versuchsaufbau war identisch zu dem Vorversuch (4.1.2). Es wurde lediglich die 2 Gy Niedrigdosis-Ganzkörperbestrahlung mit der Cyclophosphamid Behandlung ersetzt und eine Überlebensstudie durchgeführt.

Interessanterweise konnte in der Versuchsgruppe, welche mit der Cyclophosphamid-basierten kombinierten Immuntherapie therapiert wurde (ohne CD8⁺ T-Zell-Depletion) zwei Wochen nach Therapiestart ein deutlicher Anstieg des Blutglukosewertes detektiert werden. Der Anstieg des rBGW blieb in den RIP1-Tag2 Mäusen mit Cyclophosphamid-basierter kombinierter Immuntherapie und Depletion der CD8⁺ T-Zellen aus (**Abbildung 22A**).

Analog zu dem Vorversuch glich sich der Blutglukosewert beider Gruppen wieder an. Somit wurde wie bereits im Vorversuch die initiale Tumoreradikation sehr wahrscheinlich maßgeblich von den CD8⁺ T-Zellen induziert. Im weiteren Verlauf der Therapie schienen die CD8⁺ T-Zellen gemessen am sinkenden rBGW in allen Gruppen jedoch keinen essentiellen Einfluss auf die Tumoreradikation zu haben.

Zudem zeigten CD8⁺ T-Zell-depletierte Versuchsmäuse im Vergleich zu nicht depletierten Versuchsmäusen unter kombinierter Immuntherapie keinen Unterschied im Überleben (**Abbildung 22B**). Rundqvist *et al.* depletierten CD8⁺ T-Zellen in I3TC Brusttumor-tragenden FVB Versuchsmäusen. In diesem Versuchsansatz wurden den Versuchsmäusen identisch zu unserem Versuchsansatz einmal wöchentlich 200 µg anti-CD8 AK *i.p.* verabreicht. 60 Tage nach der I3TC-Tumorzell-Inokulation zeigten die Versuchsmäuse mit Depletion der CD8⁺ T-Zellen keinen Unterschied in den Tumolvolumina verglichen zur nicht CD8⁺ T-Zell-depletierten Kontrollgruppe [263]. Müller-Hermelink *et al.* behandelten im Rahmen einer protektiven Behandlung 5 Wochen alte RIP1-Tag2 Versuchsmäuse mit einer *i.p.* Applikation von Tag-T_H1 Zellen und einer 2 Gy Niedrigdosis-Ganzkörperbestrahlung. Müller-Hermelink *et al.* zeigten, dass die Tag-T_H1 Zellen die Tumor-Angiogenese in einen Arrest versetzen. Dabei wurde in den Inselzellkarzinomen der RIP1-Tag2 Versuchsmäuse die Aufnahme von

[¹²⁵I]Gluco-RGD, das mit hoher Affinität an $\alpha_v\beta_3$ integrin (ein Biomarker für Angiogenese) bindet, gemessen. In den Inselzellkarzinomen von 9 Wochen alten Sham-behandelten RIP1-Tag2 Versuchsmäusen stieg die Aufnahme von [¹²⁵I]Gluco-RGD 4 – 5-fach an. Interessanterweise war die Aufnahme von [¹²⁵I]Gluco-RGD in den Inselzellkarzinomen von 9 bis 12 Wochen alten, mit Tag- T_H1 Zell-behandelten RIP1-Tag2 Versuchsmäusen auf dem Niveau von unbehandelten 7 Wochen alten RIP1-Tag2 Versuchsmäusen. Um auszuschließen, dass der Arrest der Tumor-Angiogenese durch die CD8⁺ T-Zellen induziert wurde, welche potenziell von den Tag- T_H1 Zellen induziert wurden, wurden die CD8⁺ T-Zellen in einem weiteren Versuchsansatz eine Woche vor Therapiestart mittels anti-CD8 AK depletiert. Auch in der Abwesenheit von CD8⁺ T-Zellen blieb die Aufnahme von [¹²⁵I]Gluco-RGD in 15 Wochen alten RIP1-Tag2 Versuchsmäusen auf einem sehr niedrigen Niveau. Somit kamen die Autoren zur Schlussfolgerung, dass CD8⁺ T-Zellen an der Induktion des Angiogenese-Arrests nicht beteiligt sind [162].

In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass vor allem CD4⁺ T-Zellen einen signifikanten Einfluss auf das Überleben haben. Laheurte *et al.* haben in 170 Patienten mit Nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom (NSCLC) die Tumorantigen-spezifische Th1 Zellantwort mittels ELISpot Assay untersucht. Die Patienten wurden in Kohorten eingeteilt, in Patienten mit einem hohen und in Patienten mit einem niedrigen prozentuellen Anteil an Tumorantigen-spezifischen Th1 Zellen (anti-TERT Th1^{high} und anti-TERT Th1^{low}). Die 2 Jahres-Überlebensquote war in der anti-TERT Th1^{high} Kohorte um 2,5 Mal höher als in der anti-TERT Th1^{low} Kohorte. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass Patienten mit einer NSCLC Progression eine abgeschwächte „*exhausted*“ (PD-1 + TIM-3 Expression der CD4⁺ T-Zellen) anti-TERT Th1 Immunantwort haben [264].

Dies impliziert, dass Tumorantigen-spezifische Th1 Zellen einen signifikanten Einfluss auf das Überleben haben können. Die Th1-Zell-assoziierte Steigerung der Überlebensrate wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben [265, 266]. Zudem haben Oshi *et al.* gezeigt, dass die Anwesenheit Tumorantigen-spezifischer Gedächtnis-CD4⁺ T-Zellen mit einer erhöhten relativen Anzahl an CD8⁺ T-Zellen assoziiert ist und dies zu einer verbesserten Überlebensrate bei Patientinnen mit Dreifach-negativem Brustkrebs (TNBC) einhergeht [267].

Dieses Zusammenspiel scheint die Therapieeffizienz und das Überleben deutlich zu beeinflussen. Interessanterweise konnte auch das Überleben der RIP1-Tag2 Versuchsmäuse, welche mit der kombinierten Immuntherapie behandelt wurden, verglichen zur Isotyp AK-Kontrollgruppe im medianen Überleben signifikant um knapp eine Woche verlängert werden (**Abbildung 22B**). Trotz CD8⁺ T-Zell-Depletion konnte das Überleben der RIP1-Tag2 Mäuse mit Hilfe der kombinierten Immuntherapie im Vergleich zur Isotyp-AK-Kontrollgruppe um 1,8 Wochen verlängert werden (**Abbildung 22B**). Da insgesamt kein CD8⁺ T-Zell-abhängiger Unterschied im Überleben der beiden mittels kombinierter Immuntherapie behandelten RIP1-Tag2 Versuchsgruppen (mit / ohne Depletion der CD8⁺ T Zellen) festgestellt wurde, impliziert dieses Resultat, dass CD8⁺ T-Zellen keinen Einfluss auf das Überleben haben. Trotz CD8⁺ T-Zell-Depletion lebten die RIP1-Tag2 Versuchsmäuse mit kombinierter Immuntherapie im Median exakt 6,4 Behandlungswochen und somit genauso lang wie die Versuchsmäuse mit CD8⁺ T-Zellen. Interessanterweise überlebten die mit Isotyp-AK behandelten RIP1-Tag2 Versuchsmäuse mit CD8⁺ T-Zell-Depletion eine Woche weniger als ihre Artgenossen mit vorhandenen CD8⁺ T-Zellen (Unterschied nicht signifikant; **Abbildung 22B**). Somit war das Tumorwachstum in den RIP1-Tag2 Versuchsmäusen mit intakten CD8⁺ T-Zellen weniger fortgeschritten. Andere Studien konnten dies bestätigen. Jackaman *et al.* haben Mesotheliom-tragende C57BL/6 Versuchsmäuse mittels anti-CD8 AK depletiert und beobachtet, dass das Tumorwachstum von jungen Versuchsmäusen im Alter von 2 – 3 Monaten in Abwesenheit der CD8⁺ T-Zellen signifikant schneller voranschreitet als in den nicht depletierten Kontrollmäusen [268]. Des Weiteren haben van Braeckel-Budimir *et al.* MC38-Tumor tragende C57BL/6 Versuchsmäuse mittels anti-PD-L1, anti-OX40 und anti-4-1BB AK behandelt und die CD8⁺ T-Zellen mit anti-CD8 AK depletiert. Am Tag 27 nach Tumornokulation war das Tumolvolumen der CD8⁺ T-Zell-depletierten Versuchsmäuse signifikant höher als in der Kontrollgruppe [269]. Zudem haben Xiao *et al.* gezeigt, dass aktivierte CD8⁺ T-Zellen die Expression von CD8 herunterregulieren und die CD8⁺ T-Zell-Antigen-Sensitivität bei längerer Aktivierung stark sinkt [270]. Diese Down-Regulation wurde ebenso bei CD4⁺ T-Zellen beobachtet [271]. Somit könnte der in den ersten Behandlungswochen stabile Verlauf des rBGWs unter der CD8⁺ T-Zell-Depletion erklärt werden. Unter der CD8⁺ T-Zell-

Depletion können kurzlebige CD8⁺ Effektorzellen eine ausreichende Immunantwort gegen die Inselzellkarzinome entfalten. Bei anhaltender Aktivierung kommt es jedoch zu einer deutlichen Verringerung der membranären CD8 Expression der CD8⁺ T-Zellen [270].

Des Weiteren konnte durch den Einsatz von Cyclophosphamid in der Isotyp behandelten Versuchsgruppe ein Anstieg des medianen Überlebens um 2,3 Wochen verglichen zu Niedrigdosis-Ganzkörperbestrahlten RIP1-Tag2 Mäusen beobachtet werden (**Abbildung 20B** und **Abbildung 22B**). Dies bestätigt die Wirksamkeit des Cyclophosphamids, das bereits in der Literatur weitläufig beschrieben wurde und im klinischen Alltag oftmals zum Einsatz kommt [272].

5.2 Einfluss von OncoVEX auf die Therapieeffizienz der kombinierten Immuntherapie

Die protektive Behandlung von 5 Wochen alten RIP1-Tag2 Versuchsmäusen mit der Gabe von Tag-T_H1 Zellen hat zu einer Verdopplung des Überlebens geführt [162]. Im Gegensatz hierzu ist die Tag-T_H1 Zell-Therapie in 10 Wochen alten RIP1-Tag2 Versuchsmäusen im fortgeschrittenem Tumorstadium nicht effizient [273]. Brenner *et al.* konnten zeigen, dass die zusätzliche Verabreichung von ICB die Therapieeffizienz signifikant steigern kann [242]. Des Weiteren konnte von Braumüller *et al.* gezeigt werden, dass die von Tag-T_H1 Zellen sezernierten Zytokine IFN- γ und TNF in der Lage sind, eine p16^{Ink4a} vermittelte Seneszenz in den Inselzellkarzinomen der RIP1-Tag2 Mäusen zu induzieren [259]. Zur Induktion der Seneszenz kommt es sowohl im Rahmen der Solo-Tag-T_H1 Zell-Behandlung im protektiven Therapieansatz als auch im Rahmen der Tag-T_H1 Zell- und ICB- basierten kombinierten Immuntherapie von RIP1-Tag2 Mäusen im fortgeschrittenen Tumorstadium [273]. In dieser Dissertation sollte nun geklärt werden, ob die zusätzliche Gabe des onkolytischen Virus OncoVEX einen additiven Effekt auf die Therapieeffizienz hat. Hierzu wurden analog zu den Vorversuchen 10-11 Wochen alte RIP1-Tag2 Versuchsmäuse mit der kombinierten Viro-Immuntherapie behandelt (**4.2.1**).

Wie bereits von Brenner *et. al.* publiziert, konnte in 10 Wochen alten RIP1-Tag2 Versuchsmäusen, die mit der kombinierten Immuntherapie behandelt wurden, ein

stabiler Blutglukosewert über einen Behandlungszeitraum von 4 Wochen gemessen werden [242]. Auch in der im Rahmen dieser Promotionsarbeit durchgeführten Studie **4.2.1** war die kombinierte Immuntherapie in der Lage den rBGW in 10 Wochen alten RIP1-Tag2 Mäusen über einen Zeitraum von 4 Wochen zu stabilisieren (**Abbildung 24A**). Interessanterweise induzierte die zusätzliche Gabe des OncoVEX sechs Tage nach der ersten und sieben Tage nach der zweiten OncoVEX Applikation einen statistisch signifikanten Anstieg des rBGWs im Vergleich zum Ausgangswert (**Abbildung 24B**). Dies könnte für eine verstärkte Eradikation der Inselzellkarzinome in den RIP1-Tag2 Mäusen sprechen.

Eine erst kürzlich veröffentlichte Publikation von Gartrell *et al.* hat in einem BRAF transgenen murinem Melanom Maus Model gezeigt, dass die *i.t.* Applikation von OncoVEX unter der zusätzlichen *i.p.* Applikation von anti-PD-1 AK und des BRAF Inhibitors zur signifikanten Reduktion des Tumorumfanges und Steigerung des Überlebens führt. Versuchstiere, welche mit dieser kombinierten Immuntherapie behandelt wurden, zeigten des Weiteren einen signifikanten Anstieg der Tumorinfiltrierenden CD8⁺ T-Zellen verglichen zu Sham-behandelten Mäusen.

Zudem war die relative Anzahl der T_{Regs} im Tumor in den mit kombinierter Viro-Immuntherapie-behandelten Tieren signifikant geringer als bei den Kontrolltieren. Diese Daten implizieren, dass die zusätzliche OncoVEX-Gabe die T_{Regs}-Infiltration stark inhibiert [274].

Die im Rahmen dieser Promotionsarbeit etablierte kombinierte Viro-Immuntherapie führte vermutlich aufgrund des synergistischen Effektes der einzelnen Komponenten (2 Gy Niedrigdosis-Ganzkörperbestrahlung, Tag-T_{H1} Zellen, ICB und OncoVEX) zur signifikanten Verbesserung der Therapieeffizienz.

Die 2 Gy Niedrigdosis-Ganzkörperbestrahlung depletiert endogene Immunzellen, sodass eine „Nische“ für die anschließend verabreichten Tag-T_{H1} Zellen geschaffen wird [244]. Tag-T_{H1} Zellen aktivieren u.a. den Seneszenz-induzierenden Zellzyklus-Regulator p16^{Ink4a} in den RIP1-Tag2 Tumorzellen [242]. Aufgrund der darauffolgenden Gabe der ICB potenziert sich die T-Zell-medierte Immunantwort durch die Blockade der inhibierenden Immun-Checkpoints [275, 276]. Die abschließend verabreichten OncoVEX Viren infizieren im bereits „*inflamed*“ TME die Inselzellkarzinomzellen. Dies führt zur Replikation der OncoVEX Viren, Synthese von GM-CSF und letztendlich zur

Tumorzelllyse. Das im Rahmen der Lyse der Tumorzellen freigesetzte GM-CSF fördert zusätzlich die Anreicherung und das Wachstum von DCs [150].

In einer *in vitro* Studie wurden myeloide DCs mit T-VEC infizierten Melanom-Zelllinien 624-mel und 938-mel kokultiviert. Hierbei wurden die von T-VEC Viren infizierten Melanom-Zellen lysiert, Melanom-assoziierte Antigene freigesetzt und von den DCs des TME aufgenommen, prozessiert und präsentiert [277].

Die im Rahmen der Tumorzelllyse freigesetzten TAA und die hieraus resultierende Verstärkung der T-Zell-basierten adaptiven Immunantwort kann den zusätzlichen Anstieg des rBGWs sechs Tage nach der ersten und sieben Tage nach der zweiten OncoVEX Applikation erklären (**Abbildung 24A+B**). Diese Hypothese wird durch den Nachweis viraler DNA im Blut nach der ersten und zweiten OncoVEX Injektion bestärkt (**Abbildung 25**).

Wie bereits von Bergers *et al.* beschrieben, wurden aufgrund der vermehrten Induktion der Angiogenese rund um die Inselzellkarzinomherde dilatierte Blutgefäße nachgewiesen (**Abbildung 26A+B+C**) [161]. Die zusätzliche OncoVEX-Applikation konnte das Wachstum der Inselzellkarzinome deutlich eindämmen (**Abbildung 26D+E**).

Die OncoVEX-induzierte Reduktion des Tumorwachstums wurde bereits von *Moesta et al.* in *s.c.* A20 B-Zell Lymphom-tragenden BALB/c Versuchsmäusen mit *i.t.* OncoVEX Therapie (3×10^4 – 3×10^6 PFU/Maus) beschrieben. In diesem Versuchsansatz wurden den Versuchsmäusen A20 B-Zell-Lymphomzellen in beide Flanken inokuliert. Die dreimalige *i.t.* OncoVEX Injektion in die palpablen A20 B-Zell Lymphome erfolgte ausschließlich auf der rechten Seite und führte zur vollständigen Regression der Lymphome. Zudem wurde ein abscolpaler Effekt bei den kontralateralen A20 B-Zell-Lymphomen beobachtet. Hier kam es bei 50 % der Versuchsmäuse zur Verringerung des Tumorwachstums. Interessanterweise, zeigten die A20 B-Zell-Lymphome 168 h nach der dritten OncoVEX Applikation im TME der Tumore beider Seiten einen signifikanten Anstieg an CD8⁺ T-Zellen. Hierbei zeigte sich eine Dominanz der antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen [278]. Die Resultate dieser Studie implizieren, dass es im Rahmen der OncoVEX-induzierten Tumorlyse zur

Freisetzung von TAAs kommt, welche durch die DC-medierte Präsentation am MHC-II-Komplex Tumorantigen-spezifische CD4⁺ T-Zellen aktivieren.

Im Rahmen der immunhistochemischen Analyse der RIP1-Tag2 Inselzellkarzinome von Versuchsmäusen mit kombinierter Viro-Immuntherapie konnte eine erhöhte Anzahl an CD3⁺ T-Zellen verglichen zu den Inselzellkarzinomen der nicht mit OncoVEX behandelten Kontrollgruppe nachgewiesen werden (**Abbildung 26F-K**). Des Weiteren wurden in den Milzen der OncoVEX solotherapierten RIP1-Tag2 Versuchstiere signifikant mehr CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen verglichen mit den Milzen von Versuchsmäusen mit kombinierter Viro-Immuntherapie oder kombinierter Immuntherapie ohne OncoVEX-Gabe detektiert (**Abbildung 28A**). Diese Beobachtung impliziert, dass die T-Zellen im Rahmen der kombinierten Immuntherapie aus der Milz die Milz verlassen und in die Inselzellkarzinomen migrieren.

Schwenck *et al.* beobachteten in der Milz von RIP1-Tag2 Versuchsmäusen mit kombinierter Immuntherapie eine signifikant geringere relative Anzahl an CD4⁺- und CD8⁺ T-Zellen verglichen zu Milzen der Sham-Behandlungsgruppe [279]. Zudem zeigten Schwenck *et al.*, dass die kombinierte Immuntherapie die Aktivierung von T-Zellen fördert [279]. Somit könnte die verringerte relative Anzahl der CD3⁺ T-Zellen in der Milz als das Resultat einer T-Zellmigration zu den Inselzellkarzinomen gewertet werden.

Im Rahmen der Studien der hier vorliegenden Dissertationsschrift konnte in den Milzen der Versuchsgruppe mit kombinierter Viro-Immuntherapie verglichen zur Versuchsgruppe mit kombinierter Immuntherapie ohne OncoVEX-Gabe eine tendenziell vermehrte Ansammlung von Tumorantigen-spezifischen Tag-T_H1 Zellen detektiert werden. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant (**Abbildung 28B**).

Analog zu den Beobachtungen in **Abbildung 27A-F** zeigten Schwenck *et al.*, dass die kombinierte Immuntherapie in den Milzen der RIP1-Tag2 Versuchsmäusen eine Atrophie der weißen Pulpa mit einer Expansion der roten Pulpa induziert [279]. Zudem konnten sowohl von Schwenck *et al.* als auch im Rahmen der Studien der hier vorliegenden Arbeit eine erhöhte Anzahl von Granulozyten detektiert werden [279] (**Abbildung 27E+F**).

Des Weiteren ergaben die histopathologischen Analysen der Milzen aller Versuchsgruppen (auch ohne OncoVEX-Gabe), welche im Rahmen der Studien dieser Dissertationsschrift angefertigt wurden, eine erhöhte Hämatopoese und eine erhöhte Anzahl an Megakaryozyten. Diese Beobachtungen sind vermutlich auf die regelmäßigen retrobulbären Blutabnahmen zur Validierung der viralen DNA zurückzuführen (**Abbildung 27G+H**). Dieser Prozess ist bekannt als extramedulläre Hämatopoese und tritt vorwiegend auf, wenn größere Mengen an Erythrozyten oder Thrombozyten verbraucht werden [280]. Die vermehrte Bildung der Megakaryozyten in der Milz ist auf den gesteigerten Verbrauch von Thrombozyten zurückzuführen [281].

5.3 Einfluss der Tag-TH1 Zellen und ICB-Gabe auf die Therapieeffizienz der kombinierten Viro-Immuntherapie

Im Rahmen von weiterführenden Experimenten wurde die Therapieeffizienz einer bimodalen Viro-Immuntherapie bestehend aus OncoVEX und ICB ohne Gabe von therapeutischen Tag-TH1 Zellen bestimmt um den additiven Effekt der Tag-TH1 Zellen in den vorangegangenen Studien zu untersuchen (**4.2.2**). Unsere kombinierte Viro-Immuntherapie zeigte ohne den Einsatz von Tag-TH1 Zellen (OncoVEX + ICB) bereits 2 Tage nach OncoVEX Applikation und 5 Tage nach Therapiestart einen signifikanten Anstieg des rBGW (**Abbildung 30A+B**). Interessanterweise wurde unter OncoVEX Solotherapie ebenfalls 2 Tage nach OncoVEX Gabe ein signifikanter Anstieg des rBGW festgestellt. Dieser wurde in der Versuchsgruppe, die ausschließlich mit ICB behandelt wurden, nicht beobachtet (**Abbildung 30A+B**). Brenner *et al.* beobachteten ebenfalls einen fallenden Blutglukosewert in 10 Wochen alten RIP1-Tag2 Versuchsmäusen, welche ausschließlich mit ICB behandelt wurden. Zudem stellten Brenner *et al.* fest, dass die Kombination aus Tag-TH1 und ICB zu einer signifikant höheren p16^{Ink4a} Induktion in den Inselzellkarzinomen der RIP1-Tag2 Versuchsmäuse führt als die Solo-ICB Therapie [242]. Da die p16^{Ink4a} Induktion die Seneszenz der Inselzellkarzinomzellen einleitet und so deren Wachstum inhibiert, könnte dies den rapide sinkenden rBGW in der ICB-Solotherapie erklären. Der rasante Abfall des rBGWs in den OncoVEX-behandelten RIP1-Tag2 Versuchsmäusen könnte damit zusammen hängen, dass nach der zweiten Behandlungswoche keine Virusapplikation

mehr erfolgte (**Abbildung 30A**). Bereits 72 Stunden nach der zweiten OncoVEX Applikation kam es zu einem deutlichen Abfall der Viruslast im Blut. Die qPCR ergab zu diesem Zeitpunkt einen CT-Wert von über 40, was für eine geringe Viruslast spricht (**Abbildung 31**).

Saha *et al.* haben bereits in einer *in vivo* Studie die Effizienz einer bimodalen Viro-Immuntherapie auf die Tumorregression gezeigt: Das onkolytische Virus G47 Δ -mIL12, das dieselben Deletionen wie OncoVEX trägt, wurde einmalig *i.t.* in subkutane Glioblastome (5×10^5 PFU/Maus) in Kombination mit einer wiederholten *i.p.* Gabe von anti-PD-1 (10 mg/kg) und anti-CTLA-4 AK (5 mg/kg) den Versuchsmäusen verabreicht. Diese Kombinationstherapie steigerte das Langzeitüberleben der Versuchsmäuse um 89 % und eradizierte das Glioblastom einer Versuchsmaus vollständig [282]. Die Solotherapie mit G47 Δ -mIL12 hatte nur einen moderaten Effekt auf das Überleben der Versuchsmäuse und hemmte das Tumorwachstum nur unwesentlich [282].

In den Versuchsansätzen der hier vorliegenden Dissertationsschrift konnten im Rahmen der histopathologischen Untersuchungen der Pankreata und Milzen im Intergruppenvergleich keine Unterschiede festgestellt werden (**Abbildung 32A-F + Abbildung 33A-F**). Jedoch zeigte die immunhistochemische Analyse des Pankreas eine erhöhte Anzahl Tumor-infiltrierender CD3⁺ T-Zellen, welche auf die Kombination von OncoVEX und ICB zurückzuführen ist. Im Gegensatz hierzu konnte in den Versuchsgruppen der Solotherapien keine vermehrte Ansammlung von intratumoralen CD3⁺ T-Zellen nachgewiesen werden (**Abbildung 32G-L**). Die Analyse der Immunzellen der Milzen mittels Durchflusszytometrie zeigte eine signifikant geringere Anzahl CD3⁺ T-Zellen in den mit ICB-therapierten RIP1-Tag2 Versuchstieren (OncoVEX + ICB und ICB) verglichen mit den ausschließlich mit OncoVEX therapierten Tieren (**Abbildung 34**). Wie bereits im Rahmen der Vorstudie (**4.1.3**) beobachtet, konnten in den Milzen der mit ICB- und OncoVEX-behandelten Versuchsmäusen (ohne Tag-T_H1 Zellen) weniger CD3⁺ T-Zellen als in der OncoVEX-Solotherapiegruppen nachgewiesen werden. Lau *et al.* haben in einer *in vivo* Studie mittels Intravitalmikroskopie und Durchflusszytometrie gezeigt, dass die CD3⁺ T-Zellen unter einer kombinierten Immuntherapie von der Milz zum Tumor migrieren. In diesem Versuchsansatz wurden B78ChOva-mCherry-Melanom-tragende C57BL/6

Versuchsmäuse 13 Tage wie folgte behandelt: nach der Tumorinokulation mit adoptiv (*i.v.*) transferierten OT-I-GFP⁺ -Zellen (Kohorte 1) oder Sham (PBS; Kontrolle). Die Kohorte 2 wurde zusätzlich zu den OT-I-GFP⁺ -Zellen mit anti-PD-L1 AK und die Kohorte 3 zusätzlich mit anti-PD-L1 und CTLA-4 AK *i.v.* behandelt. Am Versuchsende (Tag 21 nach Tumorinokulation) wurden die Tumore der Versuchsmäuse mittels intravitraler Mikroskopie auf die Einwanderung von CD8⁺ T-Zellen analysiert. Es konnte hierbei eine signifikant höhere Anzahl an OT-I-GFP⁺ Zellen, peri- und intratumoral der ICB-behandelten Versuchstiere (Kohorte 2 und 3) verglichen mit den Sham-Kontrolltieren detektiert werden. Abschließend wurden die Tumore isoliert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Es wurden hierbei signifikant mehr endogene und adoptiv transferierte CD8⁺ T-Zellen in den Tumoren der ICB-behandelten Versuchsmäuse verglichen mit den Tumoren der Sham-behandelten Versuchsmäuse detektiert. Zudem war die Expression von CD44, ein Migrations-, Aktivierungs- und Effektorzell-Marker, auf den CD8⁺ T-Zellen in den mit ICB-behandelten Versuchskohorten signifikant höher als in der Sham-Kontrollgruppe. Somit konnten Lau *et al.* demonstrieren, dass die ICB-Gabe die Migration von endogenen und adoptiv-transferierten CD8⁺ T-Zellen zum Tumor fördert [283].

Dies kann die signifikant verringerte Anzahl an CD3⁺ T-Zellen in den Milzen der ICB-behandelten RIP1-Tag2 Mäuse in den Versuchsansätzen dieser Dissertationsschrift erklären. Folglich ist davon auszugehen, dass die ICB-Therapie die Auswanderung der CD3⁺ T-Zellen aus der Milz und die Einwanderung ins TME initiiert.

Interessanterweise konnte unter der Gabe der in dem Rahmen dieser Dissertationsschrift eingesetzten kombinierten Viro-Immuntherapie (OncoVEX + Tag-T_H1 + ICB) in den Milzen der Versuchsmäuse verglichen zur OncoVEX + ICB Versuchsgruppe (ohne Tag-T_H1) nur in etwa die Hälfte an CD4⁺ und CD8⁺ T Zellen nachgewiesen werden (OncoVEX + Tag-T_H1 + ICB: 7,25 % ± 1,54 % CD4⁺ T-Zellen und 0,88 ± 0,24 % CD8⁺ T-Zellen, **Abbildung 28A**; OncoVEX + ICB: 16,16 % ± 1,40 % CD3⁺ T-Zellen, **Abbildung 34**).

Somit scheint die zusätzliche Gabe der Tag-T_H1 Zellen die Auswanderung der T-Zellen aus der Milz deutlich zu fördern. Zu vermuten wäre, dass hierbei die Antigen-spezifität der Tag-T_H1 Zellen eine entscheidende Rolle spielt.

Peng *et al.* konnten durch den Einsatz von antigenspezifischen pmel-1 TCR/Thy1.1 T-Zellen und der spezifischen Blockade von PD-1 einen signifikanten Anstieg dieser T-Zellen im TME der B16/gp100-Melanom-tragenden Versuchsmäuse beobachten. Zudem verdreifachte sich die IFN- γ Expression im TME im Rahmen der Kombinationstherapie, was wiederum zur signifikanten Steigerung des durch IFN- γ -induzierten Chemokins CXCL10 führte. CXCL10 wird primär von CD11b⁺ myeloiden Zellen im TME produziert, welches maßgeblich für die Rekrutierung von CD8⁺ T-Zellen ins TME verantwortlich ist [284-287]. Im Gegensatz hierzu konnten diese Effekte im TME von IFN- γ defizitären Versuchsmäusen nicht beobachtet werden [284].

Die im Rahmen der Studien dieser Dissertationsschrift nachgewiesene gesteigerte membranäre PD-1 Expression von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in der Milz von Versuchsmäusen mit kombinierter Viro-Immuntherapie war ausschließlich auf die ICB Behandlung zurückzuführen und nicht auf die OncoVEX Behandlung (**Abbildung 35A+B**). Diese Hochregulation ist auf einen negativen Feedback-Mechanismus in der PD-1:PD-L1-Achse zurückzuführen [288, 289].

Im Weiteren wurde untersucht, welchen Einfluss die ICB Therapie auf die Therapieeffizienz der kombinierten Viro-Immuntherapie hat. Zudem sollte der Effekt der kombinierten Viro-Immuntherapie auf die CD4⁺- und CD8⁺ T-Zellverteilung und deren Aktivierung untersucht werden (**4.2.3**). In der Versuchsgruppe, die mit der kombinierten Viro-Immuntherapie behandelt wurde, konnte 5 Tage nach der OncoVEX Primäinjektion ein signifikanter Anstieg des rBGWs gemessen werden (**Abbildung 36A+B**). Die Versuchsgruppe, die anstelle von ICB mit Isotyp AK behandelt wurde, zeigte 5 Tage nach der ersten OncoVEX-Behandlung keinen signifikanten Anstieg des rBGW (**Abbildung 36A+B**).

Der fehlende Anstieg des rBGWs der mit OncoVEX + Tag-T_H1 + Isotyp-AK behandelten Versuchsgruppe kann auch auf die fehlende Auswanderung der CD8⁺ T-Zellen aus der Milz und infolgedessen die fehlende Einwanderung in das TME zurückgeführt werden. Dieses ICB-assoziierte Phänomen wurde bereits von Lau *et al.* beobachtet [283]. Dennoch konnte im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studien über den Behandlungszeitraum von 4 Wochen nur ein tendenzieller, aber nicht signifikanter Unterschied im rBGW zwischen den beiden Versuchsgruppen festgestellt werden (**Abbildung 36C**). Dies kann auf die hohen SEM der Versuchsgruppe mit

kombinierter Viro-Immuntherapie zurückgeführt werden. Denn innerhalb dieser Versuchsgruppe entwickelte ein Versuchstier Diabetes mellitus (**Abbildung 37A+B**). Detaillierte Untersuchungen dieses diabetischen RIP1-Tag2 Versuchstiers belegten die vollständige Eradikation der RIP1-Tag2 Tumorzellen (**Abbildung 37A+B**). Analog zu den Studien von Peng *et al.* [284] konnte mittels Immunhistochemie eine erhöhte Anzahl an Tumor-infiltrierenden CD3⁺ T-Zellen im TME der Inselzellkarzinome, der mit der kombinierten Viro-Immuntherapie behandelten Versuchsmäuse verglichen zur Kontrollgruppe detektiert werden (**Abbildung 38E-H**). Diese Beobachtung könnte an der gesteigerten IFN- γ Sekretion der aktivierten Tag-T_H1 Zellen und der hieraus resultierenden erhöhten Expression der Chemokine CXCL9, CXCL10, and CXCL11 liegen [284, 290]. Die Durchflusszytometrie-Analyse des Bluts der Versuchsmäuse mit kombinierter Viro-Immuntherapie ergab eine signifikant verringerte prozentuelle Anzahl an CD4⁺ T-Zellen verglichen zur Kontrollgruppe ohne ICB-Behandlung (**Abbildung 40B**).

Ein identischer Trend wurde auch in der Milz und der iLK der entsprechenden Versuchsmäuse beobachtet (**Abbildung 40A+C**). Zudem konnte in der Milz, dem Blut, den iLK und den pLK der von Versuchsmäusen mit kombinierter Viro-Immuntherapie eine tendenziell geringere relative Anzahl an CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden (**Abbildung 40A-D**). Die CD3 Immunhistochemie-Analyse und die Durchflusszytometrie-Analyse implizieren, dass die ICB-Komponente der kombinierten Viro-Immuntherapie die Auswanderung der CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen aus den sekundären lymphatischen Organen und aus dem Blut initiiert und die Einwanderung ins TME fördert. Weiterführende Analysen der Chemokin-Rezeptoren-Expression im TME der Inselzellkarzinome könnten diese Hypothese bestärken.

Interessanterweise zeigte die zusätzliche Gabe der ICB einen Anstieg der relativen Anzahl von CD25⁺ T-Zellen in der Milz, im Blut, im iLK und im pLK (**Abbildung 40E-H**).

Eine von Dodagatta-Marri *et al.* durchgeführte Studie beschreibt den möglichen Effekt einer ICB-Gabe auf FoxP3⁺CD25⁺CD4⁺T_{Regs}: Hierbei wurde die Induktion der FoxP3⁺CD25⁺CD4⁺T_{Regs} durch anti-PD-1 AK in dem orthotopen CCK168 Plattenepithelkarzinom Tumormausmodell in FVB/NJ Mäusen untersucht. Die

dreimalige anti-PD-1 AK *i.p.* Behandlung war nicht in der Lage eine signifikante Reduktion des Tumolvolumens herbeizuführen. Durch die ICB-Therapie der Versuchstiere konnten signifikant mehr FoxP3⁺CD25⁺CD4⁺T_{Regs} im TME verglichen zur Sham-behandelten Versuchsgruppe detektiert werden [291]. Die Depletion der FoxP3⁺CD25⁺CD4⁺T_{Regs} mittels anti-CD25 AK in Kombination mit der Gabe der therapeutischen anti-PD-L1 AK induzierte jedoch eine signifikante Tumorregression und führte zur Verlängerung des Überlebens der Versuchstiere im Vergleich zu der Solo-anti-PD-L1 AK Therapie-Gruppe [291]. Diese Studie konnte aufzeigen, dass die anti-PD-1 Blockade die Signaltransduktion von TGFβ-Smad3 stimuliert und somit die Produktion von TGFβ hochreguliert. TGFβ, pSmad3 und Smad4 aktivieren außerdem den Transkriptionsfaktor FoxP3, der als klassischer Biomarker der T_{Regs} bekannt ist [292-295]. Zudem konnten Dodagatta-Marri *et al.* zeigen, dass die Kombinationstherapie aus anti-PD-1 und anti-TGFβ AK die Zahl der T_{Regs} im Vergleich zur anti-PD-1 AK Solotherapie signifikant verringert, das Tumolvolumen reduziert und zudem das Überleben der Versuchsmäuse steigert [291].

Weitere Studien haben gezeigt, dass die Expression von TGFβ das Ansprechen auf eine anti-PD-L1 Therapie verschlechtert [296-298]. Interessanterweise konnten Lanlois *et al.* zeigen, dass der TGFβ Signalweg während des *angiogenic switch* in den Makrophagen und Fibroblasten von RIP1-Tag2 Versuchsmäusen hochreguliert ist [299]. Die Gabe der ICB im Rahmen der Studien dieser Dissertationsschrift könnte somit aufgrund einer potenziell erhöhten TGFβ Produktion den prozentuellen Anstieg der Anzahl der CD25⁺CD4⁺ T-Zellen in den lymphatischen Organen induzieren. Die zusätzliche Gabe von anti-TGFβ AK zur kombinierten Viro-Immuntherapie wäre eine Option, die Induktion der CD25⁺CD4⁺ T-Zellen zu supprimieren [300-302]. Es muss hierbei jedoch auch berücksichtigt werden, dass der Anstieg der relativen prozentuellen Anzahl an CD25⁺CD4⁺ T-Zellen erst vier Wochen nach Therapiestart detektiert wurde. Deshalb sollte im Rahmen von weiterführenden Studien das Verhältnis der induzierten CD25⁺CD4⁺ T-Zellen und der aktivierten CD4⁺ T-Zellen zu einem früheren Zeitpunkt, z.B. zu Beginn der Therapie evaluiert werden. Zudem sollten in diesem Zusammenhang die CD25⁺CD4⁺ T-Zellen bezüglich der Expression von FoxP3⁺ zur eindeutigen Klassifikation von FoxP3⁺CD25⁺CD4⁺T_{Regs} untersucht werden [303, 304].

Des Weiteren wurde im Rahmen dieser Dissertationsschrift eine signifikante Zunahme der prozentuellen Anzahl der Tag- T_{H1} Zellen in den Milzen, dem Blut und den pLK in mittels kombinierter Viro-Immuntherapie behandelten Versuchsmäusen detektiert (**Abbildung 40E+F+H**). Diese Tendenz wurde auch in den iLK beobachtet (**Abbildung 40G**).

Die therapeutische Blockade von PD-L1 und LAG-3 im Rahmen der kombinierten Viro-Immuntherapie führte zudem zu einer dramatischen Erhöhung der prozentuellen Anzahl an $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen im TME.

In Synergie zu den im Rahmen dieser Dissertationsschrift präsentierten Ergebnissen untersuchte eine Studie die Auswirkungen der Gabe von humanen anti-PD-L1/anti-LAG-3 AK in humanisierten PD-L1/LAG-3 MC38 tumortragenden Versuchsmäusen. Ca. 7 Tage nach der ICB Applikation konnten sowohl im Tumor als auch im Blut eine signifikant erhöhte relative Anzahl an $CD3^+CD4^+$ und $CD3^+CD8^+$ T-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe detektiert werden [305]. Des Weiteren konnte von Jiang *et al.* und Grywalska *et al.* gezeigt werden, dass die ICB-Gabe die Interaktion von APCs und T-Zellen fördern [305, 306].

Des Weiteren konnte im Rahmen der Studien dieser Dissertationsschrift eine Verdoppelung der relativen Anzahl an Tag- T_{H1} Zellen in Versuchsmäusen mit kombinierter Viro-Immuntherapie im Vergleich zur Kontrollgruppe detektiert werden (**Abbildung 40E-H**).

Dies spricht für eine durch die durch ICB Therapie begünstigte selektive Proliferation der Tag- T_{H1} Zellen [307, 308]. Zudem scheint es, dass $CD4^+$ Effektorzellen (Tag- T_{H1} Zellen) und $CD4^+CD25^+$ T-Zellen (T_{Regs}) ein homöostatisches Gleichgewicht aufrechterhalten [309]. Die ICB-induzierte Inhibition der PD-1:PD-L1 Signaltransduktion fördert die Aktivierung und Proliferation von T-Zellen [310, 311]. Zudem scheint die ICB-Therapie die Aktivierung von $CD4^+$ T-Zellen zu begünstigen (**Abbildung 40E-H**). Dies lässt sich, wie zuvor erörtert, durch die Inhibition der PD-1:PD-L1 Blockade erklären.

Azad *et al.* haben in ihrer Studie pankreatische duktale Adenokarzinomzellen *s.c.* in C57BL/6 Mäuse injiziert und nach deren Anwachsen die Tumore mit mehreren fraktionierten Bestrahlungen (2 Gy – 20 Gy) und der *i.p.* Applikation von anti-PD-L1 AK behandelt. Die Kombinationstherapie aus fraktionierter Bestrahlung (1x 12 Gy oder 5x

3 Gy) und anti-PD-L1 AK führte zur signifikanten Regression des Tumors verglichen zu den Tumoren der Kontrollgruppe. Zudem war die Kombinationstherapie in der Lage, die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 auf intratumoralen CD8⁺ T-Zellen signifikant zu erhöhen [312]. Somit ist zu folgern, dass die zusätzliche ICB Gabe die Aktivierung der T-Zellen katalysiert [46, 313]. Die ICB-induzierte T-Zell-Aktivierung konnte in den Studien, welche im Rahmen dieser Dissertationsschrift durchgeführt wurden, bestätigt werden. Die ICB-Komponente der kombinierten Viro-Immuntherapie induzierte in den sekundären lymphatischen Organen (Milz, iLK, und pLK) der Versuchsmäuse einen signifikanten Anstieg der relativen prozentuellen Anzahl an CD8⁺CD69⁺ T-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe (OncoVEX + Tag-T_H1 + Isotyp AK) (**Abbildung 40I-K**). Zudem zeigte sich in den sekundären lymphatischen Organen bedingt durch die ICB-Gabe ein leichter Anstieg der relativen prozentuellen Anzahl an CD8⁺CD25⁺ T-Zellen (**Abbildung 40I-K**).

Zusammenfassend belegen die umfangreichen *in vivo* Studien dieser Dissertationsschrift, dass jede Komponente der kombinierten Viro-Immuntherapie einen additiven Effekt auf die Therapieeffizienz der fortgeschrittenen Inselzellkarzinome hat. Nichtsdestotrotz zeigen die histopathologischen, und immunhistochemischen Untersuchungen zusammen mit den Durchflusszytometrie-Analysen nur die Situation über den Verlauf der vier-wöchigen Immuntherapie (zu verschiedenen Zeitpunkten). Die Unterschiede in der Anzahl der relevanten Immunzellen zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten können jedoch auch auf deren zeitlich unterschiedliche Immigrationsdynamik innerhalb der verschiedenen Versuchsgruppen zurückgeführt werden.

Zudem erfolgte die letzte OncoVEX-Injektion bereits zwei Wochen vor Versuchsende, weshalb in beinahe keiner RIP1-Tag2 Versuchsmaus Virus-DNA detektiert werden konnte.

Dementsprechend können die zwei OncoVEX-Gaben in der Woche 1 und 2 die Immunzellkomposition differentiell beeinflussen. Zu Versuchsende, nach einem vier-wöchigen Behandlungszyklus, konnte im Rahmen der hier vorliegenden Dissertationsschrift gezeigt werden, dass die ICB-Komponente der kombinierten Viro-Immuntherapie die prozentuelle Anzahl an Tag-T_H1 Zellen in den sekundären lymphatischen Organen signifikant erhöht und die Aktivierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-

Zellen verstärkt, wobei die CD8⁺ T-Zellen tendenziell stärker aktiviert werden (**Abbildung 40**).

Wie bereits im Rahmen mehrerer Arbeiten der Arbeitsgruppe von Prof. Martin Röcken und in dieser Dissertationsschrift gezeigt, sorgen die Tag-T_H1 Zellen für eine anhaltende anti-tumorale Immunantwort. Dies spiegelt sich in den konstanten rBGWs bzw. der daraus schlussgefolgerten Eindämmung der Tumorprogression. Die OncoVEX Applikation führt durch die selektive Tumorzelllyse zur verstärkten Eindämmung des Tumorwachstums. Die Replikation des Virus in den Tumorzellen führt zur Infektion benachbarter Tumorzellen und somit zur verstärkten Tumorzelllyse.

Das Ausmaß der OncoVEX Replikation sollte in einer weiterführenden *in vitro* Studie verifiziert werden (**4.2.4**). Die stärkste OncoVEX Replikation und GM-CSF Expression nach erfolgter *in vitro* Infektion der RIP1-Tag2 Tumorzellen zeigte sich bei einer MOI von 1. Die Untersuchung der zeitlichen Dynamik der OncoVEX Replikation zu vier Zeitpunkten (4 h, 8 h, 24 h und 48 h) zeigte die höchste Viruskonzentration 24 Stunden nach der Infektion ($1,34 \times 10^6$ PFU/ml). Die Viruskonzentration sank nach weiteren 24 Stunden wieder stark ab (**Abbildung 41A**). Im Gegensatz hierzu zeigte sich die stärkste OncoVEX-induzierte Tumorzelllyse 48 Stunden nach der Infektion. Der Nachweis der Tumorzelllyse erfolgte hierbei indirekt mittels Bestimmung der GM-CSF Expression ($13217,97 \text{ pg/ml} \pm 369,84 \text{ pg/ml}$, 48 Stunden; **Abbildung 41B**). Diese Resultate stimmen überein mit der Beobachtung eines signifikanten Anstiegs des Blutglukosewertes der RIP1-Tag2 Versuchsmäuse zwei Tage (48 Stunden) nach der OncoVEX Solotherapie (**Abbildung 30A+C**). Interessanterweise wurde gezeigt, dass die systemische Applikation von GM-CSF die Rekrutierung von Gr1⁺/CD11b⁺ myeloiden Suppressor-Zellen (*myeloid-derived suppressor cells*, MDSCs) fördert und diese MDSCs wiederum antigenspezifische T-Zellen inhibieren, sodass die T-Zell-Antwort gegen Tumorzellen radikal abnimmt [314]. Die lokale Anwesenheit von GM-CSF im TME fördert hingegen die Differenzierung von myeloiden Zellen, inhibiert die Angiogenese und verbessert die Immunantwort von antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen [314, 315]. Die GM-CSF induzierte Immunantwort zusammen mit der Virus-induzierten Tumorlyse fördern die Aufnahme von TAAs in den DCs als auch deren Prozessierung und Präsentation [153, 316, 317].

Darüber hinaus induziert das virale GM-CSF, welches ausschließlich in den Tumorzellen produziert wird, die Maturation von Makrophagen [318].

5.4 *In vivo* Visualisierung OncoVEX-infizierter Tumorzellen mittels kombiniertem ^{18}F -FHBG-PET/MRT

Wie in 1.5.1 bereits erläutert wurde, wird ^{18}F -FHBG von der HSV-1-tk phosphoryliert und akkumuliert somit nur in infizierten Tumorzellen, welche HSV-1-tk intrazellulär exprimieren [150, 319]. Gelangt nun ^{18}F -FHBG in die infizierte HSV-1-tk-exprimierende Tumorzelle, wird es unmittelbar von tk phosphoryliert und akkumuliert folglich im Zytoplasma der Tumorzellen. Diese selektive radioaktive Markierung von Tumorzellen sollte in dem folgenden Versuch zuerst *in vitro* (4.3.1) und anschließend *in vivo* (4.3.2) analysiert werden. Hierzu wurden RIP1-Tag2 Inselzellkarzinomzellen, MC38 Adenokarzinomzellen und B16 Melanomzellen mittels OncoVEX infiziert und anschließend mit ^{18}F -FHBG inkubiert. Diese *in vitro* Analysen zeigten, dass nicht das Verhältnis der Virusanzahl zur Anzahl der Tumorzellen für eine gesteigerte ^{18}F -FHBG verantwortlich ist, sondern die Einwirkzeit des Tracers (**Abbildung 42A+B**).

Eine Inkubationszeit-abhängige Steigerung der *in vitro* Akkumulation von ^{18}F -FHBG oder anderen Nucleosid-Tracern konnte von anderen Arbeitsgruppen bestätigt werden [320, 321].

Im Rahmen der Studien dieser Dissertationsschrift konnte eine signifikant gesteigerte ^{18}F -FHBG Aufnahme in OncoVEX-infizierten Tumorzellen (RIP1-Tag2 und MC38) gezeigt werden. Die in den *in vitro* Versuchen detektierte insuffiziente ^{18}F -FHBG Aufnahme in den OncoVEX-infizierten in B16-Tumorzellen ist vermutlich auf die fehlende Replikationsfähigkeit zurückzuführen. Aus diesem Grund unterscheidet sich die ^{18}F -FHBG Aufnahme in den infizierten B16 Melanomzellen nicht von Mock-infizierten B16 Melanomzellen. Es ist daher naheliegend, dass B16 Tumorzellen über eine intakte Protein Kinase R verfügen, so dass hierdurch die virale Translation inhibiert und somit die virale Replikation verhindert wird [322-324].

André *et al.* konnte im Rahmen einer *in vitro* Studie eine erhöhte Protein Kinase R Proteinexpression in B16 Melanomzellen bestätigen [325].

In einer weiteren Studie inkubierten Alauddin *et al.* MDA-MB-467 Brustkrebszellen über 72 Stunden mit HSV-1-tk. Daraufhin wurden die erfolgreich infizierten, HSV-1-tk positiven MDA-MB-467 Brustkrebszellen, für 30 – 240 min mit 37 KBq ^{18}F -FHBG inkubiert, gewaschen und die Aktivität in den Tumorzellen mittels γ -counter bestimmt. Direkt proportional zur Inkubationszeit steigerte sich die ^{18}F -FHBG-Aktivität in den Tumorzellen. In dieser Studie wurden nach einer Virus-Inkubationszeit von 60 min ca. 12.000 *counts per minute*, und nach einer Inkubationszeit von 120 min ca. 22.000 *counts per minute* in den MDA-MB-467 Brustkrebszellen detektiert [326].

Li *et al.* transduzierten mit Hilfe eines lentiviralen Vektors die cDNA für die HSV-1-tk in T47D Brustkrebszellen und inkubierten die Zellen anschließend für 0,5, 1,0 und 2,0 Stunden mit ^{18}F -FHBG. Zu allen Zeitpunkten wurde eine erhöhte Aktivität in den mit HSV-1-tk-cDNA transduzierten Zellen verglichen zu nicht-infizierten T47D Brustkrebszellen gemessen [327].

Somit konnten die im Rahmen dieser Dissertationsschrift erhobenen Resultate mit Hilfe der wissenschaftlichen Literatur bestätigt werden. Die *in vitro* Studie zeigt, dass RIP1-Tag2 Tumorzellen und MC38 Tumorzellen für weitere *in vivo* Studien zur Visualisierung von OncoVEX infizierten Tumorzellen mittels ^{18}F -FHBG PET/MRT geeignet sind und B16 Melanomzellen ungeeignet sind.

Für die folgende *in vivo* Studie zur nicht-invasiven *in vivo* Visualisierung von OncoVEX infizierten Tumorzellen wurden RIP1-Tag2 Mäuse initial bestrahlt, mit OncoVEX infiziert und 72 Stunden später mit ^{18}F -FHBG injiziert (**Abbildung 42**). Leider konnte hierbei keine Akkumulation von ^{18}F -FHBG in den OncoVEX infizierten RIP1-Tag2 Tumorzellen detektiert werden, wobei die Inselzellkarzinome mittels T₂-gewichtetem MRT sehr gut visualisiert werden konnten (**Abbildung 44**). Zur Cross-Korrelation erfolgte unmittelbar nach der ^{18}F -FHBG-PET/MRT Untersuchung eine *ex vivo* Autoradiographie-Analyse, in der ebenfalls kein erhöhtes ^{18}F -FHBG Signal in den OncoVEX infizierten RIP1-Tag2 Inselzellkarzinomen nachgewiesen werden konnte (**Abbildung 45**). Die fehlende *in vivo* ^{18}F -FHBG Anreicherung kann viele Gründe haben.

So konnten Schmid *et al.* in unbehandelten RIP1-Tag2 Mäusen in verschiedenen Tumorstadien (6 – 13 Wochen alte Versuchstiere) zeigen, dass sich die

größenprogreredienten Inselzellkarzinome gut mittels MRT darstellen und monitoren lassen. Mittels *in vivo* PET konnte jedoch keine Akkumulation von ^{18}F -FDG, 3'-[^{18}F]fluoro-3'-deoxy-thymidine (^{18}F -FLT) und ^{68}Ga -DOTA-RGD (Marker für Angiogenese) detektiert werden [241]. Mit Fokus auf die *ex vivo* Autoradiographie konnten Müller-Hermelink *et al.* wie bereits zuvor beschrieben zeigen, dass die Aufnahme von [^{125}I]Gluc-RGD in Sham-behandelten RIP1-Tag2 Versuchsmäusen 4 – 5-fach größer ist als in der Tag- $\text{T}_{\text{H}1}$ Therapiegruppe [162].

In einer weiterführenden Studie konnten Michelotti *et al.* mittels radioaktiv markiertem ^{55}Mn -Ex4 die Akkumulation von Mangan in den β -Zellen von unbehandelten RIP1-Tag2 Mäusen im fortgeschrittenen Tumorstadium visualisieren [328]. ^{55}Mn (54,94 g/mol, [329]) akkumuliert im Vergleich zu ^{18}F -FHBG (254,25 g/mol, [330]) aufgrund seines geringeren Molekulargewichts deutlich schneller in den β -Zellen der Inselzellkarzinome der RIP1-Tag2 Mäuse [331, 332].

Des Weiteren zeigten Gretz *et al.*, dass Moleküle mit kleinerem Molekulargewicht den Kortex eines Lymphknotens durch das retikuläre Netzwerk aufgrund der starken Gewebepfusion besser erreichen als Moleküle mit einem hohen Molekulargewicht [333].

Dennoch konnten einige *in vivo* Studien eine signifikante Akkumulation von ^{18}F -FHBG in tk-exprimierenden Organen oder Tumoren zeigen [334-336]. Likar *et al.* transduzierten den retroviralen Vektor HSV1-R176Qsr39tk in humane U87 Gliomazellen und inokulierten die transduzierten Gliomazellen anschließend in Nacktmäuse. Nach dem Erreichen eines Tumordurchmessers von ca. 10 mm wurde den Versuchsmäusen 7,4 MBq ^{18}F -FHBG *i.v.* appliziert. Nach einer Tracer-Anreicherungszeit von 2 Stunden wurde die PET Untersuchung durchgeführt und hierbei eine Akkumulation von ^{18}F -FHBG in den HSV1-R176Qsr39tk-exprimierenden U87 Gliomen detektiert werden [337].

In einer weiteren *in vivo* Studie konnte eine signifikant gesteigerte ^{18}F -FHBG Aufnahme in HSV-1-exprimierenden Tumoren mittels PET dargestellt werden [338]. Eissenberg *et al.* transduzierten humane T-Zellen mit einem Retrovirus, sodass diese das Protein CD34-tk75 exprimieren. 2×10^6 transduzierte Spender T-Zellen wurden anschließend *i.v.* in NOD-SCID Versuchsmäusen injiziert. 7 Tage später wurde den

NOD-SCID Versuchsmäusen ^{18}F -FHBG *i.v.* injiziert und anschließend die ^{18}F -FHBG-Aufnahme in den Tumoren mittels PET/CT visualisiert. Die Auswertung der ^{18}F -FHBG-PET-Aufnahmen dieser Studie zeigten unabhängig von der Verabreichung CD34- $\text{tk}75$ exprimierenden Spender T-Zellen eine hohe unspezifische Hintergrundaktivität im Abdomen und in den Ausscheidungsorganen der NOD-SCID Versuchsmäuse.

Eine Ausnahme bildeten CD34- tk^+ Spender T-Zellen injizierte NOD-SCID Versuchsmäuse mit Graft versus Host Erkrankung, bei denen eine erhöhte ^{18}F -FHBG-Aufnahme im Thymus gemessen werden konnte [339]. In diesem Zusammenhang wurde auch diskutiert, ob eine zu geringe Anzahl an CD34- tk^+ Spenderzellen für die insuffiziente Detektion mittels PET verantwortlich ist und deshalb das unspezifische ^{18}F -FHBG-Hintergrundsignal nicht überschritten werden konnte [339].

Somit kann die insuffiziente ^{18}F -FHBG Akkumulation in den *in vivo* Studien vermutlich auf eine zu geringe Anzahl an OncoVEX infizierten- RIP1-Tag2 Inselzellkarzinomzellen zurückgeführt werden. Trotz nachweisbarem Therapieeffekt ist 78 Stunden nach der *i.p.* OncoVEX Applikation nur noch von einer unter-schweligen Infektionsrate der Inselzellkarzinome auszugehen. Diese Hypothese sollte nun im Rahmen von weiterführenden Analysen mittels Immunhistochemie (anti- HSV-1) überprüft werden [340, 341]. Tatsächlich konnte in den in dieser Dissertationsschrift durchgeführten *in vivo* Versuchen 78 Stunden nach OncoVEX Infektion keine virale DNA in den Inselzellkarzinomen nachgewiesen werden (**Abbildung 46**). Um die Infektionsdynamik (Viruslast) zu verschiedenen Zeitpunkten zu überprüfen wurden in einem weiteren Versuchsansatz RIP1-Tag2 Versuchsmäuse mit OncoVEX infiziert und die Versuchsmäuse zu verschiedenen Zeitpunkten (4 h, 24 h und 48 h) nach OncoVEX Applikation euthanasiert und anschließend die Pankreata zur Detektion der viralen Partikel (PFU) isoliert (**4.3.3**). Bei einer initialen Applikation von 5×10^6 PFU wurden 4 h nach der Administration nur 1×10^2 PFU/ml im Pankreasgewebe nachgewiesen. 24 h und 48 h nach der OncoVEX Administration konnten keine Viruspartikel mehr nachgewiesen werden (**Abbildung 48A**).

Allerdings konnten sich die OncoVEX Viren, welche die Inselzellkarzinome der Pankreas der RIP1-Tag2 Versuchsmäuse erfolgreich infizieren konnten, in den

Tumorzellen replizieren und deren Lyse und somit die Freisetzung von GM-CSF hervorrufen [278, 342]. GM-CSF konnte 4 h, 24 h und 48 h nach OncoVEX Administration in den Pankreata der Versuchsmäuse nachgewiesen werden (**Abbildung 48B**).

Somit ist nachvollziehbar, wieso es im Rahmen der hier vorliegenden ¹⁸F-FHBG-PET/MRT *in vivo* Studien zur insuffizienten ¹⁸F-FHBG Akkumulation in den Inselzellkarzinomen der Versuchsmäuse kam.

Nichtsdestotrotz konnte in der hier vorliegenden Dissertationsschrift experimentell belegt werden, dass eine unterschwellige OncoVEX-Infektionsrate der Inselzellkarzinome in der Lage ist, einen signifikanten Anstieg des rBGW als Indiz für eine erfolgreiche Tumorzellyse herbeizuführen.

In einer weiteren Studie sollte die Anzahl Tumor-infiltrierender Immunzellen kurz vor dem Eintreten des rBGWs-*Peaks* (6 – 7 Tage nach OncoVEX Gabe; **Abbildung 24A**) in RIP1-Tag2 Versuchsmäusen mit kombinierter Viro-Immuntherapie bzw. Sham-Behandlung mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht werden.

Bereits 5 Tage nach der OncoVEX-Gabe zeigten die mit der kombinierten Viro-Immuntherapie-therapierten RIP1-Tag2 Versuchsmäuse einen signifikant höheren rBGW ($97,40 \pm 4,77$ %) verglichen zu dem rBGW der Sham- (Isotyp AK + PBS) behandelten Versuchstiere ($77,33 \pm 1,76$ %; *p = 0,0213; **Abbildung 49**). Passend hierzu konnten HSV-1-infizierte Inselzellkarzinome in den Pankreata der mit der kombinierten Viro-Immuntherapie behandelten RIP1-Tag2 Mäuse identifiziert werden (weiße Pfeile, **Abbildung 50A+B**).

Analog zur Literatur zeigen die in dieser Dissertationsschrift durchgeführten Studien, dass die systemische (*i.p.*) Behandlung mit einem onkolytischen HSV-1 zu einer erfolgreichen HSV-1-Tumor-Infektion führen kann [343].

Obwohl keine viralen Partikel in den Pankreata der Versuchsmäuse 24 h und 48 h nach *i.p.* OncoVEX Administration detektiert werden konnten, konnte 5 Tage nach der OncoVEX Injektion virale HSV-1 Partikel mittels immunfluoreszenzmikroskopischer Analyse nachgewiesen werden. Dies könnte auf die hohe Sensitivität und Spezifität der immunfluoreszenzmikroskopischen Analyse zurückgeführt werden [344-346].

Des Weiteren konnten 5 Tage nach der OncoVEX Injektion in den Inselzellkarzinomen von RIP1-Tag2 Versuchsmäusen mit kombinierter Viro-Immuntherapie CD4⁺ und

CD8⁺ T-Zellen als auch Makrophagen detektiert werden, während in den Inselzellkarzinomen von Isotyp AK-behandelten Versuchsmäusen keine Immunzellinfiltration detektiert werden konnte (**Abbildung 50AC-F**).

Die Akkumulation von CD4⁺ T Zellen, CD8⁺ T-Zellen und Makrophagen im TME der Inselzellkarzinome von RIP1-Tag2 Versuchsmäusen mit kombinierter Viro-Immuntherapie zusammen mit dem signifikanten Anstieg des rBGW sind ein Indiz für eine erfolgreiche Eindämmung des Tumorwachstums (**Abbildung 24A**).

Die Erhöhung der Anzahl Tumor-infiltrierender CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im Rahmen einer onkolytischen Virustherapie konnte in Versuchsmäusen und Tumorpatienten bereits verifiziert werden [347-350].

Somit konnte im Rahmen dieser Dissertationsschrift gezeigt werden, dass die kombinierte Viro-Immuntherapie die Einwanderung von Immunzellen ins TME initiiert und für die verstärkte Lyse von Inselzellkarzinomzellen verantwortlich ist.

5.5 Aufklärung der Wirkmechanismen einer kombinierten Immuntherapie in der ^{NFκB}Luc-Reportermaus

Wie bereits eingangs erwähnt (**1.5.2**) wird das TAA OVA in präklinischen Studien in verschiedenen Tumormodellen verwendet [166, 167, 351].

In dem folgenden Versuch sollte eine kombinierte Immuntherapie bestehend aus einer initialen 2 Gy Niedrigdosis-Ganzkörperbestrahlung, antigenspezifischen OVA-T_H1 und den Immuncheckpoint-Inhibitoren anti-PD-L1 AK und anti-LAG-3 AK in zwei verschiedenen OVA-exprimierenden Tumormausmodellen bezüglich der NFκB Aktivität der endogenen Immunzellen und des Tumorstromas im TME als auch im Knochenmark evaluiert werden. Diese nicht invasiven *in vivo* Studien wurden mittels longitudinaler nicht-invasiver *in vivo* Biolumineszenz-basierter Bildgebung durchgeführt. Die kombinierte Immuntherapie war in OVA-B16 Tumoren wirkungslos und konnte keine signifikante Reduktion des relativen Tumorumfanges herbeiführen (**Abbildung 52A**). In Einheit mit diesen Ergebnissen wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen gezeigt, dass das B16 Tumormodell nicht auf eine ICB-basierte Immuntherapie anspricht [352, 353].

Im Gegensatz hierzu konnte im OVA-MC38 Adenokarzinom-Tumormodell im Rahmen dieser Promotionsarbeit als auch von einer anderen Arbeitsgruppe gezeigt werden,

dass dieses auf eine kombinierte Checkpoint-Inhibitor-Therapie anspricht und hierdurch eine signifikante Reduktion des Tumorwachstums erzielt werden kann [178] (**Abbildung 52B**).

Die Checkpoint-Inhibitor-induzierte Tumorregression im MC38 Kolon Adenokarzinom-Tumormodell konnte bereits in mehreren weiteren Studien verifiziert werden [354-356]. Die durch die NFκB Aktivierung induzierte Expression von Luciferase führt in den ^{NFκB}Luc-Reporterermäusen zur Umsetzung von Luciferin zu Oxiluciferin und zeitgleich zur Freisetzung von Photonen welche mit optischer Bildgebung semi-quantitativ detektiert werden können (S.I.). Die NFκB-Aktivierungs-induzierte S.I. war im Knochenmark der OVA-B16 Melanom tragenden ^{NFκB}Luc-Reporterermäusen einen Tag nach der Verabreichung von OVA-T_H1 Zellen im Vergleich zu nicht-therapierten Tieren signifikant geringer (**Abbildung 53A**). Diese Therapie-assoziierte Verringerung der NFκB Aktivierung zeichnete sich auch im weiteren Verlauf der Therapie (**Abbildung 53A**).

Die Ergebnisse dieser Dissertationsschrift suggerieren, dass die konstitutive Aktivierung des NFκB Signalwegs im Knochenmark eine wichtige Rolle in der Ausbildung/Reifung von Neutrophilen Granulozyten spielt. Des Weiteren schützt die Aktivierung des NFκB Signalwegs nach deren Migration ins periphere Blut vor Apoptose [357].

NFκB ist ein zentraler Transkriptionsfaktor der zahlreiche Prozesse der angeborenen und adaptiven Immunantwort reguliert indem er die Transkription von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen steuert, welche eine essentielle Rolle in der Aktivierung und Differenzierung von Immunzellen spielen [358-362]. Es konnte gezeigt werden, dass eine konstitutive Aktivierung des NFκB Signalwegs in der frühen Entwicklung des Knochenmarks zu einem Verlust der B-Zellen führt [363]. Außerdem führt eine andauernde konstitutive Aktivierung des NFκB Signalwegs zu einer kompletten Depletion des hämatopoetischen „Stammzellpools“ und infolgedessen zu einer Fehlentwicklung des Knochenmarks mit der Folge eines prämaturnen Absterbens [364]. Somit ist die Balance zwischen der Aktivierung und der Hemmung des NFκB Signalwegs essentiell [365]. Die abnehmende S.I. im Knochenmark der behandelten OVA-B16-tragenden Versuchsmäuse impliziert eine Hemmung des NFκB Signalwegs

durch die kombinierte Immuntherapie. Dieser Trend konnte ebenfalls in OVA-B16- und (**Abbildung 53B**) OVA-MC38-tragenden Versuchstieren beobachtet werden (**Abbildung 53C**).

Zudem konnte im TME der ICB-sensitiven OVA-MC38 Tumoren im Gegensatz zum TME der ICB-resistenten OVA-B16 Tumoren infolge der kombinierten Immuntherapie eine tendenziell erhöhte S.I. im Vergleich zu Isotyp AK-behandelten Kontrollgruppe detektiert werden (**Abbildung 53D**). Dies spricht für die Aktivierung des NFκB Signalwegs im TME und impliziert die Induktion eines pro-inflammatorischen Prozesses [366-369]. Da in den Tumoren ausschließlich die Stroma Zellen und die eingewanderten endogenen Immunzellen den NFκB-luc Reporter exprimieren ist die detektierte S.I. auf die NFκB Aktivierung der residenten und infiltrierenden Immunzellen zurückzuführen und nicht auf eine NFκB Aktivierung der Tumorzellen oder der OVA-T_{H1} Zellen. Aufgrund der signifikanten Regression der OVA-MC38 Tumoren in Versuchsmäusen mit kombinierter Immuntherapie ist eine erhöhte NFκB Aktivität der Immunzellen und der residenten Zellen innerhalb des TME plausibel. Die Aktivierung der Immunzellen des TME sollte im Folgenden mittels Durchflusszytometrie bestätigt werden.

Zur Visualisierung der Verteilung von T- und B-Zellen innerhalb des TME wurde eine CD3- und B220- Immunhistochemie von OVA-B16 und OVA-MC38 Tumoren veranlasst (**4.4.3**). In den OVA-B16 Tumoren von Versuchstieren mit kombinierter Immuntherapie oder Sham-Therapie konnten vereinzelte CD3⁺ T-Zellen (**Abbildung 55I+J+M+N**) und B220⁺ B-Zellen (**Abbildung 55Q+R+U+V**) vorwiegend in der Peripherie des Tumors, jedoch vereinzelt auch im Tumorzentrum gefunden werden. In den OVA-MC38 Tumoren von Versuchsmäusen mit kombinierter Immuntherapie oder Sham-Behandlung konnte vorwiegend im Tumorrandgebiet eine verstärkte Ansammlung von CD3⁺ T- Zellen detektiert werden. Im Rahmen dieser Dissertationsschrift wurden die OVA-B16 und OVA-MC38 Tumore am Versuchsende nach der Tötung der Versuchstiere isoliert und in zwei gleichgroße Hälften zerteilt und anschließend zur Cross-Validierung mittels CD3- und B220- Immunhistochemie analysiert. Eine Hälfte wurde wie eben diskutiert zur histopathologischen und immunhistochemischen Analyse verwendet. Die andere Hälfte zur Cross-Korrelation der Immunhistochemie-Resultate via Durchflusszytometrie. Aufgrund der

Tumorheterogenität muss jedoch beachtet werden, dass sowohl die Anzahl als auch die Distribution von Immunzellen innerhalb des TME stark variieren können [370, 371]. Der signifikante Anstieg der CD4⁺ T-Zellen im OVA-B16 Tumor deutet auf die erfolgreiche Rekrutierung der Immunzellen in das TME hin [372] (**Abbildung 56A**). Trotz der verstärkten Einwanderung von CD4⁺ T-Zellen ins TME der OVA-B16 Tumore konnte kein signifikanter Unterschied in der CD69 Expression zwischen Versuchsmäusen mit kombinierter Immuntherapie verglichen zu Sham-behandelten Versuchsmäusen festgestellt werden.

Miller *et al.* konnten experimentell belegen, dass Tumor-infiltrierende CD8⁺ T-Zellen aus OVA-B16 Tumoren von Sham-behandelten eine uniforme PD-1 und Tox (Transkriptionsfaktor charakteristisch für die *T cell exhaustion*)-Expression und somit klassische Marker der *T-cell exhaustion* aufweisen [373].

Diese Beobachtung erklärt das Ausbleiben der Tumorregression in der Sham-behandelten Versuchsgruppe in dem Ansatz der hier vorliegenden Dissertationsschrift. Zudem könnten die Tumor-infiltrierenden CD4⁺ T-Zellen ebenso CD4⁺T_{Regs} sein, die eine supprimierende Wirkung auf umgebene Immunzellen ausüben [374].

Die S.I. im TME der OVA-B16 Tumoren von ^{NFκB}Luc-Reporter-mäusen beider Therapiegruppen (kombinierte Immuntherapie versus Sham-Behandlung) war am Ende des Versuchs nahezu identisch und passt auch zur nahezu identischen relativen Anzahl an CD69 exprimierenden T- und B-Zellen. Im Knochenmark deutete zwar die S.I. initial auf eine signifikant niedrigere NFκB Aktivierung hin (Tag 5 nach Tumorinokulation), jedoch zeigte die S.I. an Tag 10, dem Tag der Beendigung des Versuchs, keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen (**Abbildung 53A**). In der Durchflusszytometrie-Analyse des Knochenmarks konnte dementsprechend kein signifikanter intergruppaler Unterschied in der relativen Anzahl von T- und B-Zellen detektiert werden (**Abbildung 56B**).

Eine ähnliche Beobachtung konnte ebenfalls in der Milz gemacht werden (**Abbildung 56C**). In beiden Lymphknoten jedoch deutete die verringerte relative Anzahl der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in der Versuchsgruppe, die mit der kombinierten Immuntherapie behandelt wurde, auf die Migration der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aus dem dLK und dem kLK (**Abbildung 56D+E**). Die signifikant erhöhte relative Anzahl der CD4⁺ T-Zellen und tendenziell erhöhte Anzahl CD8⁺ T-Zellen im OVA-B16-Tumorgewebe von

^{NFκB}Luc-Reportertermäusen mit kombinierter Immuntherapie spricht für eine verstärkte Einwanderung der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen von den Lymphknoten ins TME, was auf eine systemische Rekrutierung der T-Zellen hindeutet [375-377].

Hill *et al.* konnten mittels eines Fluoreszin-Isothiozyanat (FITC)-induzierten Kontaktallergiemodells zeigen, dass 24 Stunden nach der FITC-Exposition an der rechten Flanke der Versuchsmäuse die relative Anzahl von FITC⁺ DCs im drainierenden im Gegensatz zum nicht-drainierenden kLK signifikant anstieg [378]. Im dLK wurden ca. 50 % FITC⁺ DCs detektiert. Hingegen konnten im kLK nur 3 % FITC⁺ DCs detektiert werden. Trotz der geringen relativen Anzahl antigenspezifischer FITC⁺ DCs im kLK impliziert diese Studie, dass es zur systemischen Verteilung der FITC⁺ DCs im kLK kommt [378].

Diese und weitere Studien unterstreichen die Bedeutung des abscolalen Effekts, der das Resultat einer systemischen Immunantwort ist [379-381].

So ist es auch nachvollziehbar, dass sich die OVA-T_{H1} Zellen nach der *i.p.* Applikation über das lymphatische System verteilen und antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen in den dLK und kLK aktivieren [382, 383].

Die systemische Distribution von Tag-T_{H1} Zellen nach deren *i.v.* bzw. *i.p.* Applikation haben Griesinger *et al.* detailliert analysiert. Hierbei wurden Vybrand DiD-markierte Tag-T_{H1} Zellen in RIP1-Tag2 Versuchsmäuse entweder *i.p.* oder *i.v.* verabreicht. Beide Tag-T_{H1} Zell Applikationsrouten verlängerten das Überleben der RIP1-Tag2 Versuchsmäuse gleichermaßen. Wobei die *i.v.* Applikation der Tag-T_{H1} Zellen im Vergleich zur *i.p.* Applikation die p16^{INK4}-induzierte Tumorseneszenz der Inselzellkarzinomen effizienter induzierte. Dies führte zu einer signifikanten Reduktion des Tumolvolumens in der *i.v.* Tag-T_{H1} Applikationsgruppe im Vergleich zur *i.p.* Applikation [384].

Zum Zeitpunkt des Versuchsabbruchs konnten im Rahmen der Studien dieser Dissertationsschrift im OVA-B16 Tumormodel keine Unterschiede in der CD69 Expression, als Indikator für die Aktivierung der CD4⁺ und die CD8⁺ T-Zellen in den dLK als auch in den kLK in OVA-B16 tumortragenden Mäusen mit kombinierter Immuntherapie oder Sham-Behandlung detektiert werden. Dies liegt vermutlich daran, dass es sich bei CD69 um einen sehr frühen Lymphozyten-Aktivierungsmarker

handelt, der zum späten Zeitpunkt der Untersuchung nicht mehr membranär exprimiert wird [385].

Im Gegensatz hierzu konnte in OVA-B16 tumortragenden Versuchsmäusen mit Isotyp-AK-Behandlung sowohl in den dLK als auch in den kLK eine tendenziell erhöhte relative Anzahl an CD69 exprimierenden CD19⁺ B-Zellen verglichen mit Versuchsmäusen mit kombinierter Immuntherapie detektiert werden. Dies impliziert, dass die B-Zellen am Versuchsende im kLK unter der Gabe der kombinierten Immuntherapie weniger aktiviert waren.

Die durchflusszytometrische Analyse der Immunzellen der OVA-MC38 tumortragenden Versuchsmäuse zeigte im Tumor eine tendenziell erhöhte relative Anzahl von CD8⁺ T-Zellen nach Gabe der kombinierten Immuntherapie (**Abbildung 57A**). Die erhöhte relative Anzahl an CD8⁺ T-Zellen könnte für die signifikante Reduktion des Tumorumfanges in Versuchsmäusen mit kombinierter Immuntherapie verantwortlich sein.

Des Weiteren wurde eine doppelt so hohe relative Anzahl an B-Zellen in den OVA-MC38 Tumoren der Versuchsmäuse mit kombinierter Immuntherapie verglichen zu Isotyp-AK-behandelten Versuchsmäusen detektiert (nicht signifikant, **Abbildung 57A**). In den dLK (**Abbildung 57D**) konnte zudem ein signifikanter Therapie-induzierter Anstieg der relativen Anzahl an B-Zellen in Versuchsmäusen mit kombinierter Immuntherapie detektiert werden. Diese Tendenz konnte in der Auswertung der relativen Anzahl an B-Zellen ebenfalls in den kLK beobachtet werden (**Abbildung 57E**). Somit scheinen die B-Zellen einen wichtigen Beitrag zur Therapieeffizienz im Rahmen der kombinierten Immuntherapie zu leisten. Mehrere Studien haben bereits gezeigt, dass eine anti-tumorale B-Zellantwort die T-Zell-Immunität zur Eradikation von Tumoren verstärken und selbst Tumorzellen eradizieren kann [386-388].

So haben Hynes *et al.* MC38 Kolon Adenokarzinom-tragende Versuchsmäuse mit einem anti-DR5 AK behandelt und eine signifikante Tumorregression beobachtet. DR5 ist ein Rezeptor der TNF-Familie, welcher unter Aktivierung die Apoptose in Tumorzellen einleitet. Interessanterweise konnte in B-Zell-defizienten und zugleich anti-DR5 AK-therapierten Versuchsmäusen, keine Tumorregression in MC38 tumortragenden Versuchsmäusen beobachtet werden. Somit wurde gezeigt, dass die

DR5-medierte tumorspezifische Apoptose, B-Zell-abhängig ist [389]. Zudem zeigen Albanell *et al.*, dass ein inhibierender AK gegen einen transmembranären Tyrosin-Kinase-Rezeptor (anti-HER2), bei Brustkrebspatienten, die eine Überexpression von HER-2 zeigen, anti-tumorale Mechanismen einleiten kann [390]. So reguliert das zugelassene Arzneimittel Trastuzumab die Expression von HER-2 herunter und inhibiert somit für die Tumorprogression kritische Signalwege (ras-Raf-MAPK und PI3K/Akt), wodurch der Zellzyklus blockiert wird. Darüber hinaus hemmt Trastuzumab die Angiogenese und leitet die AK-abhängige Tumorzelllyse ein [390].

Dies zeigt, dass B-Zellen neben ihrer direkten zytotoxischen Granzym-abhängigen Wirkungen auf die Tumorzellen durch die spezifische Produktion von AK eine weitere starke anti-tumorale Antwort besitzen [391]. Des Weiteren können B-Zellen mit anderen Immunzellen wie z.B. den NK-Zellen mittels AK-Bindung an membranäre Fc-Rezeptoren der NK-Zellen interagieren und somit die anti-tumorale Immunantwort und die Tumorregression verstärken [392].

Die im Rahmen der hier vorliegenden Dissertation durchgeführten Studien zeigten eine tendenziell verringerte relative Anzahl an CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in den dLK und kLK in den Versuchsmäusen mit kombinierter Immuntherapie. Dies deutet auf eine Immuntherapie-induzierte verstärkte Auswanderung der T-Zellen hin (**Abbildung 57D+E**). Obwohl kein signifikanter Unterschied in der Aktivierung der T-Zellen zwischen den Gruppen festgestellt werden konnte, wurde in den dLK und kLK von Versuchsmäusen mit kombinierter Immuntherapie eine tendenziell erhöhte membranäre CD69 Expression der T-Zellen beobachtet (**Abbildung 57D+E**). Diese Beobachtung wird durch die Erhöhung der S.I. (Biolumineszenz-Signal) in den OVA-MC38 Tumoren der ^{NFκB}Luc-Reporterermäuse mit kombinierter Immuntherapie bestärkt. Dies deutet auf eine erhöhte Aktivierung des NFκB Signalwegs in den OVA-MC38 Tumoren hin, welche auf die eingewanderten Immunzellen oder die Stromazellen, aber nicht auf die Tumore und nicht die OVA-T_H1 Zellen zurückgeführt werden kann (**Abbildung 53D**). Da die signifikanten Unterschiede in der Aktivierung des NFκB (S.I.) der OVA-MC38 tumortragenden Versuchsmäuse mit kombinierter Immuntherapie am Tag 7 nach Tumorinokulation detektiert wurden, wäre eine Durchflusszytometrie-Analyse der Tumore mit Fokus auf die Immunzellaktivität (CD69 Expression) an diesem Zeitpunkt spannend (**Abbildung 53D**). Denn die im Rahmen dieser

Dissertationsschrift durchgeführten Durchflusszytometrie-Analysen wurden erst am Tag 10, zum Zeitpunkt des Versuchsendes durchgeführt.

Interessanterweise führte die kombinierte Immuntherapie in den OVA-MC38 tumortragenden Versuchsmäusen in der Milz zu einem signifikanten Anstieg der relativen Anzahl an CD4⁺CD69⁺ und CD8⁺CD69⁺ T-Zellen verglichen zu Isotyp AK-therapierten Versuchsmäusen (**Abbildung 57C**). CD69 wird als früher Aktivierungsmarker von Immunzellen wie T-, B Zellen und Makrophagen etc. membranär exprimiert. Zudem ist die membranäre CD69 Expression ein Marker für die Zellretention [393]. Nach der Aktivierung des IFN- γ -Rezeptors auf den T-Zellen wird die membranäre Expression von CD69 hochreguliert [394]. Diese Hochregulation fördert die Internalisation und den Abbau von Sphingosine-1-Phosphat-Rezeptor-1 (S1PR1). Die aktivierten T-Zellen verlieren die Expression von CCR7 und verstärken wiederum die Expression S1PR1. Das Verhältnis der membranären CD69 Expression zur und Sphingosine-1-Phosphat (S1P) Expression bestimmt das Gleichgewicht zwischen der T-Zell-Migration und T-Zell-Retention. Der Ligand für S1PR1, S1P, wird u.a. von Endothelzellen und Erythrozyten in den Blutgefäßen produziert und ermöglicht den T-Zellen mit einer hohen membranären S1PR1-Expression die Auswanderung aus den lymphatischen Organen in die Blutgefäße [395, 396]. So ist zum Beispiel die CD69⁺ Expression residenter T-Gedächtniszellen signifikant hochreguliert [397]. Ob es sich bei den CD69⁺ T-Zellen in **Abbildung 57C** um Gedächtnis-T-Zellen oder Effektor-T-Zellen aus der Milz handelt, kann aus den erhobenen Daten nicht geschlossen werden. Denkbar wäre allerdings, dass sich im Rahmen der kombinierten Immuntherapie spezifische Gedächtniszellen in der Milz gebildet haben [398].

6. Zusammenfassung

Zur Evaluation des Wirkmechanismus der etablierten Th1-basierten kombinierten Immuntherapie wurden die additiven Effekte der einzelnen Komponenten, die initiale 2 Gy Niedrigdosis-Ganzkörperbestrahlung, die *i.p.* Applikation von Tumorantigenspezifischen Tag-TH1-Zellen und die *i.p.* Gabe von Checkpoint-inhibierenden AK (anti-PD-L1/anti-LAG-3 AK) in RIP1-Tag2 Versuchsmäusen im fortgeschrittenen Tumorstadium untersucht. Zudem wurde die Effektorfunktion der beteiligten endogenen CD8⁺ T Zellen während der kombinierten Immuntherapie mit Hilfe von *in vivo* CD8⁺ T-Zell-Depletionsexperimenten evaluiert. Eine Woche nach Start der kombinierten Immuntherapie konnte in den Versuchsmäusen ohne CD8⁺ T-Zell-Depletion ein *Peak* des rBGW beobachtet werden. Dieser rBGW Peak war bei Versuchsmäusen mit Depletion der CD8⁺ T Zellen nicht detektierbar, was auf den Tumorzell-lysierenden Effekt der CD8⁺ T Zellen hindeutet. Die additiven Effekte der einzelnen Komponenten der kombinierten Immuntherapie führten verglichen zur Sham-Behandlung zur signifikanten Verlängerung des Überlebens der Versuchsmäuse. Die Abwesenheit der CD8⁺ T-Zellen hatte hierbei keinen Einfluss auf das Überleben der Versuchsmäuse.

Zudem wurde im Rahmen dieser Dissertationsschrift die kombinierte Immuntherapie durch eine zusätzliche Komponente, der Gabe eines bereits durch die FDA und EMA zugelassenen onkolytischen Virus (OncoVEX; murine Version) ergänzt und die potenzielle Verbesserung der Therapieeffizienz eruiert. Im Rahmen dieser Studien konnte gezeigt werden, dass die additive Gabe von OncoVEX zu einem signifikant erhöhten Anstieg des rBGW, als Indiz für eine verlangsamte Tumorprogression führt. Die *in vivo*, *ex vivo* und *in vitro* Studien, welche im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, belegten die additiven Effekte der einzelnen Komponenten der kombinierten Viro-Immuntherapie (Tag-TH1 Zellen, ICB und OncoVEX). Mittels nicht invasiver *in vivo* ¹⁸F-FHBG-PET/MRT Studien, zum Nachweis von OncoVEX infizierten, HSV-1-tk exprimierenden Inselzellkarzinomen, konnte keine vermehrte ¹⁸F-FHBG Traceranreicherung in den Inselzellkarzinomen der RIP1-Tag2 Mäuse nachgewiesen werden. Wobei *in vitro* ¹⁸F-FHBG-Anreicherungs-Studien eindeutig eine vermehrte Aufnahme des Tracers ausschließlich in OncoVEX-infizierten Inselzellkarzinomen belegten. Das Scheitern des *in vivo* Nachweises der ¹⁸F-FHBG-Anreicherung mittels

PET/MRT könnte auf eine zu geringfügige HSV-1-tk-Virusreplikation in den Inselzellkarzinomen der RIP1-Tag2 Mäuse zurückzuführen sein. Trotz der vermeintlich geringen HSV-1-tk-Virusreplikation konnte kurz vor Auftreten des rBGW-Peaks in Versuchsmäusen mit kombinierter Viro-Immuntherapie eine vermehrte Ansammlung von CD4⁺-, CD8⁺ T-Zellen und Makrophagen im TME der Inselzellkarzinome nachgewiesen werden.

Der zweite Abschnitt der hier vorliegenden Dissertationsschrift hatte die Zielsetzung die Effektorfunktion von Tumorantigen-spezifischen Th1 Zellen (OVA-T_{H1}) in Kombination mit der therapeutischen Gabe von Immuncheckpoint-Inhibitoren (anti-PD-L1 AK + anti-LAG-3 AK) in den primär und sekundär lymphatischen Organen als auch im TME aufzudecken. Grundvoraussetzung für diese Studien war die Annahme, dass aktivierte Tumorantigen-spezifische T-Zellen mittels Sezernierung von proentzündlichen Zytokinen, wie TNF, die Aktivierung von NFκB in den residenten und eingewanderten endogenen Immunzellen von ^{NFκB}Luc-Reporterermäusen initiieren.

Hierzu wurden ^{NFκB}Luc-Reporterermäuse mit ICB-Therapie-resistenten OVA-B16-Melanomzellen oder ICB-Therapie-sensitiven OVA-MC38 Adenokarzinomzellen inokuliert und für 10 Tage mittels der kombinierten Immuntherapie behandelt und die Effektorfunktion der aktivierten OVA-T_{H1} Zellen mittels Biolumineszenz-basierter Bildgebung nicht invasiv *in vivo* gemonitort. Zudem wurde das Tumolvolumen der Versuchsmäuse mit kombinierter Immuntherapie oder Sham-Behandlung täglich bestimmt. Die kombinierte Immuntherapie führte ausschließlich in den Versuchsmäusen mit OVA-MC38 Adenokarzinomen zur signifikanten Tumorregression und war in Versuchsmäusen mit OVA-B16 Melanomen wirkungslos. Interessanterweise konnte in den ICB-Therapie-resistenten OVA-B16 Tumoren eine geringere Aktivierung des NFκB Signalwegs im TME von Versuchsmäusen mit kombinierter Immuntherapie verglichen zu Sham-behandelten Versuchstieren gemessen werden. *Ex vivo* Analysen konnten in den OVA-B16 Tumoren von Versuchsmäusen mit kombinierter Immuntherapie eine gesteigerte relative Anzahl an CD4⁺ T-Zellen im TME verglichen zum TME von Sham-behandelten Versuchsmäusen detektieren, wobei es zwischen den beiden Versuchskohorten bei den CD4⁺ T-Zellen keine Unterschiede in der membranären Expression von CD69 gab. Im Gegensatz hierzu konnte in den ICB-sensitiven, regressiven OVA-MC38 Tumoren von

Versuchsmäusen mit kombinierter Immuntherapie eine erhöhte NF κ B-Aktivierung mittels Biolumineszenz-basierter optischer Bildgebung erfasst werden. Am Versuchsende konnte zwischen den beiden Therapiegruppen (kombinierte Immuntherapie versus Sham) im TME kein signifikanter Unterschied in der relativen Anzahl an T-Zellen festgestellt werden.

Im Gegensatz hierzu konnte im TME, dLK und kLK von OVA-MC38 tumortragenden Versuchsmäusen mit kombinierter Immuntherapie verglichen zur Sham-Therapiegruppe eine teils signifikant erhöhte relative Anzahl an B-Zellen nachgewiesen werden. Zudem zeigten die T-Zellen in der Milz der Versuchsmäuse mit kombinierter Immuntherapie eine signifikant erhöhte membranäre Expression des Aktivierungsmarkers CD69, als Hinweis für eine erhöhte T-Zellaktivität und T-Zellretention.

Die Studien dieser Dissertationsschrift ermöglichen tiefere Einblicke in die differentiellen Effekte der einzelnen Komponenten der kombinierten (Viro)-Immuntherapie. Die Ergebnisse sind Grundvoraussetzung für ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden zellulären und molekularen Prozesse und die Translation in die Klinik.

7. Deklaration

Die eingereichte Dissertation betitelt: „Evaluation des Therapieeffekts einer kombinierten Viro-Immuntherapie auf die Tumormikroumgebung und das lymphatische System mittels multimodaler *in vivo* PET/MRT- und Biolumineszenz-basierter Bildgebung“ habe ich eigenständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich bzw. inhaltlich übernommene Textstellen sowie verwendete Graphiken oder Tabellen habe ich als solche deutlich vermerkt. Ich erkläre, dass die Richtlinien zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis der Universität Tübingen (Beschluss des Senats vom 25.05.2000) beachtet wurden. Ich versichere an Eides statt, dass diese Angaben wahr sind und dass ich nichts verschwiegen habe. Mir ist bekannt, dass die falsche Abgabe einer Versicherung an Eides mit einer Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft wird.

Dimitri Stowbur

Tübingen, den

7.1 Deklaration zum Eigenanteil

Die in dieser Dissertationsschrift dargelegte Studien wurden unter der Leitung von PD Dr. Manfred Kneilling im Institut für Präklinische Bildgebung und Radiopharmazie durchgeführt. Ich, Dimitri Stowbur, erkläre hiermit, dass die vorgelegte Dissertationsschrift auf meiner eigenen Arbeit beruht. Ausnahmen sind durch einen Hinweis als auf die jeweilige Referenz gekennzeichnet und zitiert.

Im Folgenden werden die Arbeiten, die mit freundlicher Unterstützung durch Dritte durchgeführt worden sind aufgelistet:

Das experimentelle Design der *in vivo* Studien zur kombinierten Immuntherapie in RIP1-Tag2 Versuchstieren wurde mit enger Zusammenarbeit mit Dr. Barbara Schörg und Dr. Dominik Sonanini unter der Leitung von PD Dr. Manfred Kneilling durchgeführt.

Das experimentelle Design der *in vivo* Studien zur kombinierten Viro-Immuntherapie mit dem zusätzlichen Einsatz von OncoVEX in RIP1-Tag2 Versuchsmäusen wurde mit Dr. Barbara Schörg und enger Zusammenarbeit mit unserem Kollaborationspartner der AG Lauer bestehend aus Apl. Prof. Dr. Ulrich Lauer, sowie Dr. Susanne Berchtold, Dr. Julia Beil und Irina Smirnow unter der Leitung von PD Dr. Manfred Kneilling durchgeführt.

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

Alle Immunfluoreszenzfärbungen wurden von Birgit Fehrenbacher unter der Leitung von Prof. Dr. Martin Röcken an der Universitäts-Hautklinik Tübingen durchgeführt.

Die PCR zur Bestimmung viraler DNA, die Bestimmung der Viruslast im Pankreas und die GM-CSF Konzentration im Pankreas, die Aufbereitung aller mit OncoVEX befüllten Kanülen zur Injektion in die RIP1-Tag2 Versuchsmäuse sowie die *in vitro* Analysen (*in vitro* Replikation und GM-CSF Expression in RIP1-Tag2 Tumorzellen nach OncoVEX Infektion) erfolgte in Zusammenarbeit mit der AG Lauer.

8. Publikationsverzeichnis

8.1 Publikationen in Wissenschaftlichen Journalen

P. Knopf*, **D. Stowbur***, S. H. L. Hoffmann, M. F. Fransen, B. J. Pichler, M. Kneilling. ***equally contributed**. Identification of tumor draining lymph nodes (TDLN) using a multi-modal non-invasive *in vivo* imaging approach. *Molecular Imaging and Biology*. 2023.

S. Feil, **D. Stowbur**, B. F. Schörg, W. Ehrlichmann, G. Reischl, M. Kneilling, B. J. Pichler, R. Feil. Noninvasive Detection of Smooth Muscle Cell-Derived Hot Spots to Study Atherosclerosis by PET/MRI in Mice. *Circulation Research*. 2023.

P. Knopf, **D. Stowbur**, S. H. L. Hoffmann, N. Hermann, A. Maurer, V. Bucher, M. Poxleitner, B. Tako, D. Sonanini, B. Krishnamachary, S. Sinharay, B. Fehrenbacher, I. Gonzalez-Menendez, F. Reckmann, D. Bomze, L. Flatz, D. Kramer, M. Schaller, S. Forchhammer, Z. M. Bhujwalla, L. Quintanilla-Martinez, K. Schulze-Osthoff, M. D. Pagel, M. Röcken, A. F. Martins, M. F. Fransen, B. J. Pichler, K. Ghoreschi, and M. Kneilling. Acidosis-mediated increase in IFN- γ -induced PD-L1 expression on cancer cells as an immune escape mechanism in solid tumors. *Molecular Cancer*. 2023.

8.2 Beteiligung an wissenschaftlichen Treffen

8.2.1 Mündliche Präsentationen auf Wissenschaftskonferenzen

D. Stowbur, P. Knopf, S. H. L. Hoffmann, N. Hermann, A. Maurer, V. Bucher, M. Poxleitner, B. Tako, D. Sonanini, B. Krishnamachary, S. Sinharay, B. Fehrenbacher, I. Gonzalez-Menendez, D. Kramer, M. Schaller, S. Forchhammer, Z. M. Bhujwalla, L. Quintanilla-Martinez, K. Schulze-Osthoff, M. D. Pagel, A. F. Martins, M. F. Fransen, B. J. Pichler, K. Ghoreschi, and M. Kneilling. Acidosis promotes immune escape through the IFN- γ -induced induction of PD-L1 transcription. ISID 2023, Tokyo, Japan

D. Stowbur, S. Berchtold, B. F. Schörg, J. Beil, D. Sonanini, I. González-Menéndez, R. Beck, L. Quintanilla-Martinez, B. J. Pichler, U. M. Lauer, M. Kneilling. Oncolytic virus therapy as a powerful promoter of a combined tumor antigen specific Th1 cell and immune checkpoint inhibitor-based cancer immunotherapy. Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung – ADF 2022, Virtuelles Meeting

D. Stowbur, S. Feil, B. F. Schörg, W. Ehrlichmann, G. Reischl, R. Feil, M. Kneilling, B. J. Pichler. *In vivo* monitoring of atherosclerosis by visualization of sr39tk expressing smooth muscle cells with [18F]FHBG positron emission tomography/magnetic resonance imaging (PET/MRI). World Molecular Imaging Congress – WMIC 2021, Virtuelles Meeting

D. Stowbur, S. Feil, B. F. Schörg, W. Ehrlichmann, G. Reischl, R. Feil, M. Kneilling, B. J. Cre/lox-assisted non-invasive *in vivo* tracking of vascular smooth muscle cells by positron emission tomography/magnetic resonance imaging (PET/MRI) in mice developing atherosclerosis. 16th European Molecular Imaging Meeting – EMIM 2021, Göttingen, Deutschland

D. Stowbur, S. Feil, B. F. Schörg. Imaging Immunotherapies. SFB TR 240: Platelets – molecular, cellular and systemic functions under physiological and pathological conditions 2019, Tübingen, Deutschland

8.2.2 Poster Präsentationen auf Wissenschaftskonferenzen

D. Stowbur, P. Knopf, S. H. L. Hoffmann, N. Hermann, A. Maurer, V. Bucher, M. Poxleitner, B. Tako, D. Sonanini, B. Krishnamachary, S. Sinharay, B. Fehrenbacher, I. Gonzalez-Menendez, D. Kramer, M. Schaller, S. Forchhammer, Z. M. Bhujwalla, L. Quintanilla-Martinez, K. Schulze-Osthoff, M. D. Pagel, A. F. Martins, M. F. Fransen, B. J. Pichler, K. Ghoreschi, and M. Kneilling. Acidosis promotes immune escape through the IFN- γ -induced induction of PD-L1 transcription in cancer cells. iFIT conference, Zell am See, Österreich

D. Stowbur, P. Knopf, B.F. Schörg, R. Mehling, S. Blaess, H. Carlsen, B.J. Pichler, M. Kneilling. Longitudinal noninvasive *in vivo* bioluminescence imaging (BLI) of an endogenous immune cell related increase in NF κ B activity within the tumor micro environment as a novel innovative tool to predict the efficacy of cancer immunotherapy. International Cancer Immunotherapy Conference – CICON 2022, New York, Vereinigte Staaten

D. Stowbur, P. Knopf, B.F. Schörg, R. Mehling, S. Blaess, H. Carlsen, B.J. Pichler, M. Kneilling. *In vivo* monitoring of immune cell activation and *ex vivo* characterization of the tumor microenvironment during a combined immunotherapy using bioluminescence imaging (BLI). Association of Cancer Immunotherapy – CIMT 2022, Mainz, Deutschland

D. Stowbur, S. Berchtold, B. F. Schörg, J. Beil, D. Sonanini, I. González-Menéndez, R. Beck, L. Quintanilla-Martinez, B. J. Pichler, U. M. Lauer, M. Kneilling. Oncolytic viruses as a powerful promoter of immune checkpoint inhibitors and tumor antigen specific Th1 cell-based cancer immunotherapies in pancreatic cancer. Excellence Cluster 2180 – Image-guided and Functionally Instructed Tumor Therapies – iFIT Retreat 2021, Tübingen, Deutschland

D. Stowbur, B. F. Schörg, S. Berchtold, D. Sonanini, J. Beil, I. González-Menéndez, R. Beck, L. Quintanilla-Martinez, U. M. Lauer, B. J. Pichler, M. Kneilling. Intra-peritoneal administered oncolytic viruses promote and catalyze immune checkpoint

inhibitor based immune therapies of pancreatic cancer. 14th ESMI Winter Conference
– TOPIM 2020, Les Houches, Frankreich

D. Stowbur, L. Verbruggen, E. Bentea, A. Massie. The involvement of system xc⁻ in
(healthy) brain aging. MOSA conference at the Faculty of Health, Medicine and Life
Sciences (FHML) 2018 Maastricht, Niederlande

9. Literaturverzeichnis

1. Lin, L., et al., *Incidence and death in 29 cancer groups in 2017 and trend analysis from 1990 to 2017 from the Global Burden of Disease Study*. J Hematol Oncol, 2019. 12(1): p. 96.
2. Chaplin, D.D., *Overview of the immune response*. J Allergy Clin Immunol, 2010. 125(2 Suppl 2): p. S3-23.
3. Günther, J. and H.M. Seyfert, *The first line of defence: insights into mechanisms and relevance of phagocytosis in epithelial cells*. Semin Immunopathol, 2018. 40(6): p. 555-565.
4. Peng, Y., et al., *Innate and adaptive immune response to apoptotic cells*. J Autoimmun, 2007. 29(4): p. 303-9.
5. Yu, J.C., et al., *Innate Immunity of Neonates and Infants*. Frontiers in Immunology, 2018. 9(1759).
6. Turvey, S.E. and D.H. Broide, *Innate immunity*. J Allergy Clin Immunol, 2010. 125(2 Suppl 2): p. S24-32.
7. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen Recognition and Innate Immunity*. Cell, 2006. 124(4): p. 783-801.
8. Kawai, T. and S. Akira, *Signaling to NF- κ B by Toll-like receptors*. Trends in Molecular Medicine, 2007. 13(11): p. 460-469.
9. Sun, S.C., J.H. Chang, and J. Jin, *Regulation of nuclear factor- κ B in autoimmunity*. Trends Immunol, 2013. 34(6): p. 282-9.
10. Nishikori, M., *Classical and Alternative NF- κ B Activation Pathways and Their Roles in Lymphoid Malignancies*. Journal of Clinical and Experimental Hematopathology, 2005. 45(1): p. 15-24.
11. Tam, W.F. and R. Sen, *IkappaB family members function by different mechanisms*. J Biol Chem, 2001. 276(11): p. 7701-4.
12. Brown, K.D., E. Claudio, and U. Siebenlist, *The roles of the classical and alternative nuclear factor-kappaB pathways: potential implications for autoimmunity and rheumatoid arthritis*. Arthritis research & therapy, 2008. 10(4): p. 212-212.
13. Yu, H., et al., *Targeting NF- κ B pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study*. Signal Transduct Target Ther, 2020. 5(1): p. 209.
14. Kawai, T. and S. Akira, *Signaling to NF- κ B by Toll-like receptors*. Trends in Molecular Medicine, 2007. 13(11): p. 460-469.
15. Kumar, H., T. Kawai, and S. Akira, *Toll-like receptors and innate immunity*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. 388(4): p. 621-5.
16. Xayarath, B. and N.E. Freitag, *When being alone is enough: noncanonical functions of canonical bacterial quorum-sensing systems*. Future Microbiol, 2016. 11(11): p. 1447-1459.
17. Johannessen, M., et al., *Bacterial interference with canonical NF κ B signalling*. Microbiology (Reading), 2013. 159(Pt 10): p. 2001-2013.
18. Bondeson, J., et al., *Defining therapeutic targets by using adenovirus: blocking NF-kappaB inhibits both inflammatory and destructive mechanisms in rheumatoid synovium but spares anti-inflammatory mediators*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(10): p. 5668-73.
19. Foxwell, B., et al., *Efficient adenoviral infection with IkappaB alpha reveals that macrophage tumor necrosis factor alpha production in rheumatoid arthritis is NF-kappaB dependent*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(14): p. 8211-5.
20. Brown, K.D., E. Claudio, and U. Siebenlist, *The roles of the classical and alternative nuclear factor-kappaB pathways: potential implications for autoimmunity and rheumatoid arthritis*. Arthritis Res Ther, 2008. 10(4): p. 212.
21. Liao, G., et al., *Regulation of the NF-kappaB-inducing kinase by tumor necrosis factor receptor-associated factor 3-induced degradation*. J Biol Chem, 2004. 279(25): p. 26243-50.

22. Sanjo, H., et al., *Allosteric regulation of the ubiquitin:NIK and ubiquitin:TRAF3 E3 ligases by the lymphotoxin-beta receptor*. J Biol Chem, 2010. 285(22): p. 17148-55.
23. Liao, G., et al., *Regulation of the NF- κ B-inducing Kinase by Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor 3-induced Degradation**. Journal of Biological Chemistry, 2004. 279(25): p. 26243-26250.
24. Senftleben, U., et al., *Activation by IKK α of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway*. Science, 2001. 293(5534): p. 1495-9.
25. Hayden, M.S. and S. Ghosh, *Shared principles in NF-kappaB signaling*. Cell, 2008. 132(3): p. 344-62.
26. Sun, S.C., *Non-canonical NF- κ B signaling pathway*. Cell Res, 2011. 21(1): p. 71-85.
27. Gerondakis, S. and U. Siebenlist, *Roles of the NF-kappaB pathway in lymphocyte development and function*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. 2(5): p. a000182.
28. Boehm, T. and J.B. Swann, *Thymus involution and regeneration: two sides of the same coin?* Nat Rev Immunol, 2013. 13(11): p. 831-8.
29. Doyle, S.L., et al., *Nuclear factor κ B2 p52 protein has a role in antiviral immunity through I κ B kinase epsilon-dependent induction of Sp1 protein and interleukin 15*. J Biol Chem, 2013. 288(35): p. 25066-25075.
30. Campbell, K.J. and N.D. Perkins, *Regulation of NF-kappaB function*. Biochem Soc Symp, 2006(73): p. 165-80.
31. Shakhov, A.N., et al., *Kappa B-type enhancers are involved in lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha gene in primary macrophages*. J Exp Med, 1990. 171(1): p. 35-47.
32. Bonilla, F.A. and H.C. Oettgen, *Adaptive immunity*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2010. 125(2, Supplement 2): p. S33-S40.
33. Murphy, K. and C. Weaver, *[Not Available]*. Janeway Immunologie. 2018 Apr 23:517-80. doi: 10.1007/978-3-662-56004-4_10.
34. Yan, F., et al., *Thymic function in the regulation of T cells, and molecular mechanisms underlying the modulation of cytokines and stress signaling (Review)*. Mol Med Rep, 2017. 16(5): p. 7175-7184.
35. Im, M., et al., *Comparative quantitative analysis of cluster of differentiation 45 antigen expression on lymphocyte subsets*. Korean J Lab Med, 2011. 31(3): p. 148-53.
36. *CLUSTER OF DIFFERENTIATION (CD) ANTIGENS*. Immunology Guidebook, 2004. 6: p. 50027-3.
37. Dong, D., et al., *Structural basis of assembly of the human T cell receptor-CD3 complex*. Nature, 2019. 573(7775): p. 546-552.
38. Myers, C.D., *Role of B cell antigen processing and presentation in the humoral immune response*. Faseb j, 1991. 5(11): p. 2547-53.
39. Théry, C. and S. Amigorena, *The cell biology of antigen presentation in dendritic cells*. Curr Opin Immunol, 2001. 13(1): p. 45-51.
40. Blanco, P., et al., *Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases*. Cytokine Growth Factor Rev, 2008. 19(1): p. 41-52.
41. Feng, M., et al., *Regulation of the Migration of Distinct Dendritic Cell Subsets*. 2021. 9.
42. Rescigno, M., et al., *Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways*. J Exp Med, 1998. 188(11): p. 2175-80.
43. Riol-Blanco, L., et al., *The chemokine receptor CCR7 activates in dendritic cells two signaling modules that independently regulate chemotaxis and migratory speed*. J Immunol, 2005. 174(7): p. 4070-80.
44. Martín-Fontecha, A., A. Lanzavecchia, and F. Sallusto, *Dendritic cell migration to peripheral lymph nodes*. Handb Exp Pharmacol, 2009(188): p. 31-49.
45. Esensten, J.H., et al., *CD28 Costimulation: From Mechanism to Therapy*. Immunity, 2016. 44(5): p. 973-88.

46. Smith-Garvin, J.E., G.A. Koretzky, and M.S. Jordan, *T cell activation*. *Annu Rev Immunol*, 2009. 27: p. 591-619.
47. Bradley, L.M., D.K. Dalton, and M. Croft, *A direct role for IFN-gamma in regulation of Th1 cell development*. *J Immunol*, 1996. 157(4): p. 1350-8.
48. Way, S.S., et al., *IL-12 and type-I IFN synergize for IFN-gamma production by CD4 T cells, whereas neither are required for IFN-gamma production by CD8 T cells after Listeria monocytogenes infection*. *J Immunol*, 2007. 178(7): p. 4498-505.
49. Cote-Sierra, J., et al., *Interleukin 2 plays a central role in Th2 differentiation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(11): p. 3880-5.
50. Smith, K.M., et al., *Th1 and Th2 CD4+ T cells provide help for B cell clonal expansion and antibody synthesis in a similar manner in vivo*. *J Immunol*, 2000. 165(6): p. 3136-44.
51. Upasani, V., I. Rodenhuis-Zybert, and T. Cantaert, *Antibody-independent functions of B cells during viral infections*. *PLOS Pathogens*, 2021. 17(7): p. e1009708.
52. Browne, E.P., *Regulation of B-cell responses by Toll-like receptors*. *Immunology*, 2012. 136(4): p. 370-9.
53. Chevalier, N., et al., *CXCR5 expressing human central memory CD4 T cells and their relevance for humoral immune responses*. *J Immunol*, 2011. 186(10): p. 5556-68.
54. Nera, K.P., M.K. Kyläniemi, and O. Lassila, *Regulation of B Cell to Plasma Cell Transition within the Follicular B Cell Response*. *Scandinavian Journal of Immunology*, 2015. 82(3): p. 225-234.
55. Coffey, F., B. Alabyev, and T. Manser, *Initial clonal expansion of germinal center B cells takes place at the perimeter of follicles*. *Immunity*, 2009. 30(4): p. 599-609.
56. Stebegg, M., et al., *Regulation of the Germinal Center Response*. 2018. 9.
57. Kurosaki, T., K. Kometani, and W. Ise, *Memory B cells*. *Nature Reviews Immunology*, 2015. 15(3): p. 149-159.
58. Neefjes, J.J. and F. Momburg, *Cell biology of antigen presentation*. *Curr Opin Immunol*, 1993. 5(1): p. 27-34.
59. Melief, C.J.M., *Mini-review: Regulation of cytotoxic T lymphocyte responses by dendritic cells: peaceful coexistence of cross-priming and direct priming?* 2003. 33(10): p. 2645-2654.
60. Sigal, L.J., *Activation of CD8 T Lymphocytes during Viral Infections*. *Encyclopedia of Immunobiology*. 2016:286-90. doi: 10.1016/B978-0-12-374279-7.14009-3. Epub 2016 May 9.
61. Wang, B., et al., *Multiple paths for activation of naive CD8+ T cells: CD4-independent help*. *J Immunol*, 2001. 167(3): p. 1283-9.
62. Curtsinger, J.M., et al., *Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ T cells*. *J Immunol*, 1999. 162(6): p. 3256-62.
63. Bhat, P., et al., *Interferon-γ derived from cytotoxic lymphocytes directly enhances their motility and cytotoxicity*. *Cell Death Dis*, 2017. 8(6): p. e2836.
64. Prilliman, K.R., et al., *Cutting Edge: A Crucial Role for B7-CD28 in Transmitting T Help from APC to CTL*. *The Journal of Immunology*, 2002. 169(8): p. 4094.
65. Schoenberger, S.P., et al., *T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions*. *Nature*, 1998. 393(6684): p. 480-483.
66. Pardo, J.n., et al., *Apoptotic pathways are selectively activated by granzyme A and/or granzyme B in CTL-mediated target cell lysis*. *Journal of Cell Biology*, 2004. 167(3): p. 457-468.
67. Kaech, S.M., E.J. Wherry, and R. Ahmed, *Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development*. *Nature Reviews Immunology*, 2002. 2(4): p. 251-262.
68. Cicchese, J.M., et al., *Dynamic balance of pro- and anti-inflammatory signals controls disease and limits pathology*. 2018. 285(1): p. 147-167.
69. Sakaguchi, S., et al., *Regulatory T Cells and Immune Tolerance*. *Cell*, 2008. 133(5): p. 775-787.
70. Moon, B.-I., T.H. Kim, and J.-Y. Seoh, *Functional Modulation of Regulatory T Cells by IL-2*. *PLOS ONE*, 2015. 10(11): p. e0141864.

71. Couper, K.N., D.G. Blount, and E.M. Riley, *IL-10: the master regulator of immunity to infection*. J Immunol, 2008. 180(9): p. 5771-7.
72. Kühn, R., et al., *Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis*. Cell, 1993. 75(2): p. 263-74.
73. Kang, N., et al., *Inhibition of allogeneic cytotoxic T cell (CD8+) proliferation via polymer-induced Treg (CD4+) cells*. Acta Biomaterialia, 2017. 57: p. 146-155.
74. Zhang, H., et al., *Regulatory mechanisms of immune checkpoints PD-L1 and CTLA-4 in cancer*. J Exp Clin Cancer Res, 2021. 40(1): p. 184.
75. Schijns, V., et al., *Rational Vaccine Design in Times of Emerging Diseases: The Critical Choices of Immunological Correlates of Protection, Vaccine Antigen and Immunomodulation*. Pharmaceutics, 2021. 13(4).
76. Funes, S.C., et al., *Immune checkpoints and the regulation of tolerogenicity in dendritic cells: Implications for autoimmunity and immunotherapy*. Autoimmun Rev, 2019. 18(4): p. 359-368.
77. Neumann, K., et al., *The co-inhibitory molecule PD-L1 contributes to regulatory T cell-mediated protection in murine crescentic glomerulonephritis*. Scientific Reports, 2019. 9(1): p. 2038.
78. Wang, L., et al., *Programmed death 1 ligand signaling regulates the generation of adaptive Foxp3+CD4+ regulatory T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(27): p. 9331-6.
79. Ai, L., A. Xu, and J. Xu, *Roles of PD-1/PD-L1 Pathway: Signaling, Cancer, and Beyond*. Adv Exp Med Biol, 2020. 1248: p. 33-59.
80. Bardhan, K., T. Anagnostou, and V.A. Boussiotis, *The PD1:PD-L1/2 Pathway from Discovery to Clinical Implementation*. Front Immunol, 2016. 7: p. 550.
81. Goldberg, M.V. and C.G. Drake, *LAG-3 in Cancer Immunotherapy*. Curr Top Microbiol Immunol, 2011. 344: p. 269-78.
82. Huard, B., et al., *CD4/major histocompatibility complex class II interaction analyzed with CD4- and lymphocyte activation gene-3 (LAG-3)-Ig fusion proteins*. Eur J Immunol, 1995. 25(9): p. 2718-21.
83. Yang, Z.Z., et al., *Expression of LAG-3 defines exhaustion of intratumoral PD-1(+) T cells and correlates with poor outcome in follicular lymphoma*. Oncotarget, 2017. 8(37): p. 61425-61439.
84. Blank, C.U., et al., *Defining 'T cell exhaustion'*. Nature Reviews Immunology, 2019. 19(11): p. 665-674.
85. Wherry, E.J., *T cell exhaustion*. Nature Immunology, 2011. 12(6): p. 492-499.
86. Mitchison, T.J. and E.D. Salmon, *Mitosis: a history of division*. Nat Cell Biol, 2001. 3(1): p. E17-21.
87. Scholey, J.M., I. Brust-Mascher, and A. Mogilner, *Cell division*. Nature, 2003. 422(6933): p. 746-752.
88. Loidl, A. and P. Loidl, *Oncogene- and tumor-suppressor gene-related proteins in plants and fungi*. Crit Rev Oncog, 1996. 7(1-2): p. 49-64.
89. Schafer, K.A., *The cell cycle: a review*. Vet Pathol, 1998. 35(6): p. 461-78.
90. Nasim, A. and M.A. Hannan, *Induction of mutations by chemicals and gamma rays in mutants of yeast refractory to UV-mutagenesis*. Can J Genet Cytol, 1977. 19(2): p. 323-30.
91. Kodym, A. and R. Afza, *Physical and chemical mutagenesis*. Methods Mol Biol, 2003. 236: p. 189-204.
92. Robinson, H.L., *Retroviruses and cancer*. Rev Infect Dis, 1982. 4(5): p. 1015-25.
93. Lukačičinová, M., S. Novak, and T. Paixão, *Stress-induced mutagenesis: Stress diversity facilitates the persistence of mutator genes*. PLoS Comput Biol, 2017. 13(7): p. e1005609.
94. Sherr, C.J. and F. McCormick, *The RB and p53 pathways in cancer*. Cancer Cell, 2002. 2(2): p. 103-112.
95. Lohmann, D., *Retinoblastoma*. Adv Exp Med Biol, 2010. 685: p. 220-7.
96. Donehower, L.A., et al., *Integrated Analysis of TP53 Gene and Pathway Alterations in The Cancer Genome Atlas*. Cell Reports, 2019. 28(5): p. 1370-1384.e5.

97. Giaccia, A.J. and M.B. Kastan, *The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals*. *Genes Dev*, 1998. 12(19): p. 2973-83.
98. Levine, A.J., *p53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division*. *Cell*, 1997. 88(3): p. 323-331.
99. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The Hallmarks of Cancer*. *Cell*, 2000. 100(1): p. 57-70.
100. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. *Cell*, 2011. 144(5): p. 646-74.
101. Hanahan, D., *Hallmarks of Cancer: New Dimensions*. *Cancer Discov*, 2022. 12(1): p. 31-46.
102. Pardoll, D.M., *The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy*. *Nat Rev Cancer*, 2012. 12(4): p. 252-64.
103. Zheng, Y., Y.C. Fang, and J. Li, *PD-L1 expression levels on tumor cells affect their immunosuppressive activity*. *Oncol Lett*, 2019. 18(5): p. 5399-5407.
104. El-Kenawi, A. and B. Ruffell, *Inflammation, ROS, and Mutagenesis*. *Cancer Cell*, 2017. 32(6): p. 727-729.
105. Gounaris, E., et al., *T-regulatory cells shift from a protective anti-inflammatory to a cancer-promoting proinflammatory phenotype in polyposis*. *Cancer Res*, 2009. 69(13): p. 5490-7.
106. Hanahan, D., *Hallmarks of Cancer: New Dimensions*. *Cancer Discovery*, 2022. 12(1): p. 31-46.
107. Jeyapalan, J.C. and J.M. Sedivy, *Cellular senescence and organismal aging*. *Mech Ageing Dev*, 2008. 129(7-8): p. 467-74.
108. Da Silva-Álvarez, S. and M. Collado, *Cellular Senescence*, in *Encyclopedia of Cell Biology*, R.A. Bradshaw and P.D. Stahl, Editors. 2016, Academic Press: Waltham. p. 511-517.
109. Herranz, N. and J. Gil, *Mechanisms and functions of cellular senescence*. *J Clin Invest*, 2018. 128(4): p. 1238-1246.
110. Ewald, J.A., et al., *Therapy-induced senescence in cancer*. *J Natl Cancer Inst*, 2010. 102(20): p. 1536-46.
111. Prasanna, P.G., et al., *Therapy-Induced Senescence: Opportunities to Improve Anticancer Therapy*. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 2021. 113(10): p. 1285-1298.
112. Perkins, D.W., et al., *Therapy-induced senescence in normal tissue promotes breast cancer metastasis*. *bioRxiv*, 2020: p. 2020.10.17.343590.
113. Saleh, T., L. Tyutyunyk-Massey, and D.A. Gewirtz, *Tumor Cell Escape from Therapy-Induced Senescence as a Model of Disease Recurrence after Dormancy*. *Cancer Research*, 2019. 79(6): p. 1044-1046.
114. Wang, B., J. Kohli, and M. Demaria, *Senescent Cells in Cancer Therapy: Friends or Foes?* *Trends in Cancer*, 2020. 6(10): p. 838-857.
115. Kawaguchi, K., et al., *Cellular senescence promotes cancer metastasis by enhancing soluble E-cadherin production*. *iScience*, 2021. 24(9): p. 103022-103022.
116. Baker, D.J., et al., *Naturally occurring p16Ink4a-positive cells shorten healthy lifespan*. *Nature*, 2016. 530(7589): p. 184-189.
117. Hérin, M., et al., *Production of stable cytolytic T-cell clones directed against autologous human melanoma*. *Int J Cancer*, 1987. 39(3): p. 390-6.
118. Muul, L.M., et al., *Identification of specific cytolytic immune responses against autologous tumor in humans bearing malignant melanoma*. *J Immunol*, 1987. 138(3): p. 989-95.
119. van der Bruggen, P., et al., *A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma*. *Science*, 1991. 254(5038): p. 1643-7.
120. Boon, T., et al., *Tumor antigens recognized by T lymphocytes*. *Annu Rev Immunol*, 1994. 12: p. 337-65.
121. Kawakami, Y., et al., *Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(9): p. 3515-9.

122. Andersen, R., et al., *Long-Lasting Complete Responses in Patients with Metastatic Melanoma after Adoptive Cell Therapy with Tumor-Infiltrating Lymphocytes and an Attenuated IL2 Regimen*. Clin Cancer Res, 2016. 22(15): p. 3734-45.
123. Kogan, A.J. and M. Haren, *Translating cancer trial endpoints into the language of managed care*. Biotechnol Healthc, 2008. 5(1): p. 22-35.
124. Rosenberg, S.A., et al., *Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report*. N Engl J Med, 1988. 319(25): p. 1676-80.
125. Dudley, M.E., et al., *Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma*. J Clin Oncol, 2005. 23(10): p. 2346-57.
126. Itzhaki, O., et al., *Establishment and large-scale expansion of minimally cultured "young" tumor infiltrating lymphocytes for adoptive transfer therapy*. J Immunother, 2011. 34(2): p. 212-20.
127. Radvanyi, L.G., et al., *Specific lymphocyte subsets predict response to adoptive cell therapy using expanded autologous tumor-infiltrating lymphocytes in metastatic melanoma patients*. Clin Cancer Res, 2012. 18(24): p. 6758-70.
128. Morgan, R.A., et al., *Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes*. Science, 2006. 314(5796): p. 126-9.
129. Johnson, L.A., et al., *Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen*. Blood, 2009. 114(3): p. 535-46.
130. Robbins, P.F., et al., *Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1*. J Clin Oncol, 2011. 29(7): p. 917-24.
131. Rapoport, A.P., et al., *NY-ESO-1-specific TCR-engineered T cells mediate sustained antigen-specific antitumor effects in myeloma*. Nat Med, 2015. 21(8): p. 914-921.
132. Met, Ö., et al., *Principles of adoptive T cell therapy in cancer*. Seminars in Immunopathology, 2019. 41(1): p. 49-58.
133. Ishida, Y., et al., *Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death*. Embo j, 1992. 11(11): p. 3887-95.
134. Hurwitz, A.A., et al., *Combination Immunotherapy of Primary Prostate Cancer in a Transgenic Mouse Model Using CTLA-4 Blockade*. Cancer Research, 2000. 60(9): p. 2444-2448.
135. Hosseini, A., et al., *CTLA-4: From mechanism to autoimmune therapy*. Int Immunopharmacol, 2020. 80: p. 106221.
136. Rowshanravan, B., N. Halliday, and D.M. Sansom, *CTLA-4: a moving target in immunotherapy*. Blood, 2018. 131(1): p. 58-67.
137. Lipson, E.J. and C.G. Drake, *Ipilimumab: an anti-CTLA-4 antibody for metastatic melanoma*. Clin Cancer Res, 2011. 17(22): p. 6958-62.
138. Lee, J., et al., *Reinvigorating Exhausted T Cells by Blockade of the PD-1 Pathway*. For Immunopathol Dis Therap, 2015. 6(1-2): p. 7-17.
139. Veluswamy, P. and D. Bruder, *PD-1/PD-L1 pathway inhibition to restore effector functions in exhausted CD8 + T cells: chances, limitations and potential risks*. Translational Cancer Research, 2018: p. S530-S537.
140. Fehrenbacher, L., et al., *Atezolizumab versus docetaxel for patients with previously treated non-small-cell lung cancer (POPLAR): a multicentre, open-label, phase 2 randomised controlled trial*. Lancet, 2016. 387(10030): p. 1837-46.
141. Schmid, P., et al., *Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer*. N Engl J Med, 2018. 379(22): p. 2108-2121.
142. Faivre-Finn, C., et al., *Four-Year Survival With Durvalumab After Chemoradiotherapy in Stage III NSCLC-an Update From the PACIFIC Trial*. J Thorac Oncol, 2021. 16(5): p. 860-867.

143. Erck, A. and J.B. Aragon-Ching, *Maintenance avelumab for metastatic urothelial cancer: a new standard of care*. *Cancer Biol Ther*, 2020. 21(12): p. 1095-1096.
144. Grosso, J.F., et al., *LAG-3 regulates CD8⁺ T cell accumulation and effector function in murine self- and tumor-tolerance systems*. *J Clin Invest*, 2007. 117(11): p. 3383-92.
145. Matsuzaki, J., et al., *Tumor-infiltrating NY-ESO-1-specific CD8⁺ T cells are negatively regulated by LAG-3 and PD-1 in human ovarian cancer*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010. 107(17): p. 7875-7880.
146. Carlo, E.D., et al., *Immunological mechanisms elicited at the tumour site by lymphocyte activation gene-3 (LAG-3) versus IL-12: sharing a common Th1 anti-tumour immune pathway*. *The Journal of Pathology*, 2005. 205(1): p. 82-91.
147. Tawbi, H.A., et al., *Relatlimab and Nivolumab versus Nivolumab in Untreated Advanced Melanoma*. *N Engl J Med*, 2022. 386(1): p. 24-34.
148. Soh, J., et al., *Perioperative Therapy for Non-Small Cell Lung Cancer with Immune Checkpoint Inhibitors*. *Cancers (Basel)*, 2021. 13(16).
149. Desnoyer, A., et al., *Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship of therapeutic monoclonal antibodies used in oncology: Part 2, immune checkpoint inhibitor antibodies*. *European Journal of Cancer*, 2020. 128: p. 119-128.
150. Kohlhapp, F.J. and H.L. Kaufman, *Molecular Pathways: Mechanism of Action for Talimogene Laherparepvec, a New Oncolytic Virus Immunotherapy*. *Clin Cancer Res*, 2016. 22(5): p. 1048-54.
151. Killock, D., *T-VEC oncolytic viral therapy shows promise in melanoma*. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2015. 12(8): p. 438-438.
152. Harrington, K.J., et al., *Clinical development of talimogene laherparepvec (T-VEC): a modified herpes simplex virus type-1-derived oncolytic immunotherapy*. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2015. 15(12): p. 1389-403.
153. Conry, R.M., et al., *Talimogene laherparepvec: First in class oncolytic virotherapy*. *Hum Vaccin Immunother*, 2018. 14(4): p. 839-846.
154. Kelly, C.M., et al., *Objective Response Rate Among Patients With Locally Advanced or Metastatic Sarcoma Treated With Talimogene Laherparepvec in Combination With Pembrolizumab: A Phase 2 Clinical Trial*. *JAMA Oncol*, 2020. 6(3): p. 402-408.
155. Hanahan, D., *Heritable formation of pancreatic beta-cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes*. *Nature*, 1985. 315(6015): p. 115-22.
156. Bill, R. and G. Christofori, *The Rip1Tag2 Transgenic Mouse Model*, in *Tumor Angiogenesis Assays: Methods and Protocols*, D. Ribatti, Editor. 2016, Springer New York: New York, NY. p. 151-161.
157. Bill, R. and G. Christofori, *The Rip1Tag2 Transgenic Mouse Model*. *Methods Mol Biol*, 2016. 1464: p. 151-161.
158. Eklund, L., M. Bry, and K. Alitalo, *Mouse models for studying angiogenesis and lymphangiogenesis in cancer*. *Molecular Oncology*, 2013. 7(2): p. 259-282.
159. Singh, M., et al., *Anti-VEGF antibody therapy does not promote metastasis in genetically engineered mouse tumour models*. *The Journal of Pathology*, 2012. 227(4): p. 417-430.
160. Schmid, A., et al., *Non-invasive Monitoring of Pancreatic Tumor Progression in the RIP1-Tag2 Mouse by Magnetic Resonance Imaging*. *Molecular imaging and biology : MIB : the official publication of the Academy of Molecular Imaging*, 2012. 15.
161. Bergers, G., et al., *Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice*. *Science*, 1999. 284(5415): p. 808-12.
162. Müller-Hermelink, N., et al., *TNFR1 signaling and IFN-gamma signaling determine whether T cells induce tumor dormancy or promote multistage carcinogenesis*. *Cancer Cell*, 2008. 13(6): p. 507-18.

163. Braumuller, H., et al., *T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence*. *Nature*, 2013. 494(7437): p. 361-5.
164. Croguennec, T., et al., *Simple rapid procedure for preparation of large quantities of ovalbumin*. *J Agric Food Chem*, 2000. 48(10): p. 4883-9.
165. Huntington, J.A. and P.E. Stein, *Structure and properties of ovalbumin*. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 2001. 756(1-2): p. 189-98.
166. Enamorado, M., et al., *Enhanced anti-tumour immunity requires the interplay between resident and circulating memory CD8+ T cells*. *Nature Communications*, 2017. 8(1): p. 16073.
167. Vianello, F., et al., *Murine B16 melanomas expressing high levels of the chemokine stromal-derived factor-1/CXCL12 induce tumor-specific T cell chemorepulsion and escape from immune control*. *J Immunol*, 2006. 176(5): p. 2902-14.
168. Engelhardt, J.J., et al., *Marginating dendritic cells of the tumor microenvironment cross-present tumor antigens and stably engage tumor-specific T cells*. *Cancer Cell*, 2012. 21(3): p. 402-17.
169. Kukutsch, N.A., et al., *Formation and Kinetics of MHC Class I-Ovalbumin Peptide Complexes on Immature and Mature Murine Dendritic Cells*. *Journal of Investigative Dermatology*, 2000. 115(3): p. 449-453.
170. Weigelin, B., et al., *Cytotoxic T cells are able to efficiently eliminate cancer cells by additive cytotoxicity*. *Nature Communications*, 2021. 12(1): p. 5217.
171. Dani, A., et al., *The pathway for MHCII-mediated presentation of endogenous proteins involves peptide transport to the endo-lysosomal compartment*. *J Cell Sci*, 2004. 117(Pt 18): p. 4219-30.
172. Qi, L. and S. Ostrand-Rosenberg, *MHC Class II Presentation of Endogenous Tumor Antigen by Cellular Vaccines Depends on the Endocytic Pathway but not H2-M*. 2000. 1(2): p. 152-160.
173. Henry, J.Y., et al., *Enhanced cross-priming of naive CD8+ T cells by dendritic cells treated by the IMiDs® immunomodulatory compounds lenalidomide and pomalidomide*. *Immunology*, 2013. 139(3): p. 377-385.
174. Lugade, A.A., et al., *Local Radiation Therapy of B16 Melanoma Tumors Increases the Generation of Tumor Antigen-Specific Effector Cells That Traffic to the Tumor*. *The Journal of Immunology*, 2005. 174(12): p. 7516-7523.
175. Kaluza, K.M., et al., *Adoptive T cell therapy promotes the emergence of genomically altered tumor escape variants*. *International Journal of Cancer*, 2012. 131(4): p. 844-854.
176. Mattes, J., et al., *Immunotherapy of Cytotoxic T Cell-resistant Tumors by T Helper 2 Cells: An Eotaxin and STAT6-dependent Process*. *Journal of Experimental Medicine*, 2003. 197(3): p. 387-393.
177. Ciraolo, E., et al., *Simultaneous Genetic Ablation of PD-1, LAG-3, and TIM-3 in CD8 T Cells Delays Tumor Growth and Improves Survival Outcome*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022. 23(6): p. 3207.
178. Aoyama, S., et al., *Checkpoint blockade accelerates a novel switch from an NKT-driven TNF α response toward a T cell driven IFN- γ response within the tumor microenvironment*. *J Immunother Cancer*, 2021. 9(6).
179. Beyrend, G., et al., *PD-L1 blockade engages tumor-infiltrating lymphocytes to co-express targetable activating and inhibitory receptors*. *J Immunother Cancer*, 2019. 7(1): p. 217.
180. Juneja, V.R., et al., *PD-L1 on tumor cells is sufficient for immune evasion in immunogenic tumors and inhibits CD8 T cell cytotoxicity*. *Journal of Experimental Medicine*, 2017. 214(4): p. 895-904.
181. Babic, R.R., et al., *120 YEARS SINCE THE DISCOVERY OF X-RAYS*. *Med Pregl*, 2016. 69(9-10): p. 323-330.
182. Pirovano, G., et al., *Optical Imaging Modalities: Principles and Applications in Preclinical Research and Clinical Settings*. *Journal of Nuclear Medicine*, 2020. 61(10): p. 1419.

183. Dirac, P.A.M. and R.H. Fowler, *The quantum theory of the electron*. Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character, 1928. 117(778): p. 610-624.
184. Anderson, C.D., *The Positive Electron*. Physical Review, 1933. 43(6): p. 491-494.
185. Welsh, J.S., *Beta Decay in Science and Medicine*. 2007. 30(4): p. 437-439.
186. Saha, G., *Physics and Radiobiology of Nuclear Medicine*. 2013. 1-356.
187. *Positron Emission Tomography: Basic Science and Clinical Practice*. 2005. 26(9): p. 2429-2429.
188. Beuthien-Baumann, B., *PET-Basics*. Der Radiologe, 2018. 58(5): p. 487-500.
189. Schlemmer, H.P., et al., *Simultaneous MR/PET imaging of the human brain: feasibility study*. Radiology, 2008. 248(3): p. 1028-35.
190. Cherry, S.R. and M. Dahlbom, *PET: Physics, Instrumentation, and Scanners*, in *PET: Physics, Instrumentation, and Scanners*, S.R. Cherry, M. Dahlbom, and M.E. Phelps, Editors. 2006, Springer New York: New York, NY. p. 1-117.
191. Langner, J., *Development of a Parallel Computing Optimized Head Movement Correction Method in Positron Emission Tomography*. 2003.
192. Zatcepin, A. and S.I. Ziegler, *Detectors in positron emission tomography*. Zeitschrift für Medizinische Physik, 2022.
193. Kitsmiller, V.J., C. Campbell, and T.D. O'Sullivan, *Optimizing sensitivity and dynamic range of silicon photomultipliers for frequency-domain near infrared spectroscopy*. Biomed Opt Express, 2020. 11(9): p. 5373-5387.
194. Cheng, X., et al., *Field-programable-gate-array-based distributed coincidence processor for high count-rate online positron emission tomography coincidence data acquisition*. Phys Med Biol, 2021. 66(5): p. 055009.
195. Zaidi, H. and M.L. Montandon, *Scatter Compensation Techniques in PET*. PET Clin, 2007. 2(2): p. 219-34.
196. Cherry, S.R. and S.S. Gambhir, *Use of positron emission tomography in animal research*. Ilar j, 2001. 42(3): p. 219-32.
197. Hirvonen, J., et al., *Measurement of striatal and thalamic dopamine D2 receptor binding with 11C-raclopride*. Nucl Med Commun, 2003. 24(12): p. 1207-14.
198. Bom, M.J., et al., *Prognostic value of [15O]H₂O positron emission tomography-derived global and regional myocardial perfusion*. Eur Heart J Cardiovasc Imaging, 2020. 21(7): p. 777-786.
199. Almuhaideb, A., N. Papathanasiou, and J. Bomanji, *18F-FDG PET/CT imaging in oncology*. Ann Saudi Med, 2011. 31(1): p. 3-13.
200. Traenkle, B., et al., *Single-Domain Antibodies for Targeting, Detection, and In Vivo Imaging of Human CD4+ Cells*. Frontiers in Immunology, 2021. 12.
201. Saha, P., *Basics of PET Imaging*. 2016.
202. Loft, M., et al., *⁶⁴Cu-DOTATATE PET in Patients with Neuroendocrine Neoplasms: Prospective, Head-to-Head Comparison of Imaging at 1 Hour and 3 Hours After Injection*. 2021. 62(1): p. 73-80.
203. Răileanu, I., et al., *[18F FDG PET-Applications in Oncology]*. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi, 2002. 106(1): p. 14-23.
204. Chételat, G., et al., *Amyloid-PET and (18)F-FDG-PET in the diagnostic investigation of Alzheimer's disease and other dementias*. Lancet Neurol, 2020. 19(11): p. 951-962.
205. Feng, H., et al., *Nuclear Imaging of Glucose Metabolism: Beyond (18)F-FDG*. Contrast Media Mol Imaging, 2019. 2019: p. 7954854.
206. Peppicelli, S., et al., *FDG uptake in cancer: a continuing debate*. Theranostics, 2020. 10(7): p. 2944-2948.
207. Bouter, C., et al., *18F-FDG-PET Detects Drastic Changes in Brain Metabolism in the Tg4-42 Model of Alzheimer's Disease*. Frontiers in Aging Neuroscience, 2019. 10.

208. Yaghoubi, S., et al., *Human pharmacokinetic and dosimetry studies of [(18)F]FHBG: a reporter probe for imaging herpes simplex virus type-1 thymidine kinase reporter gene expression*. J Nucl Med, 2001. 42(8): p. 1225-34.
209. Thunemann, M., et al., *Cre/lox-assisted non-invasive in vivo tracking of specific cell populations by positron emission tomography*. Nat Commun, 2017. 8(1): p. 444.
210. Bloch, F., W.W. Hansen, and M. Packard, *The Nuclear Induction Experiment*. Physical Review, 1946. 70(7-8): p. 474-485.
211. Purcell, E.M., H.C. Torrey, and R.V. Pound, *Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid*. Physical Review, 1946. 69(1-2): p. 37-38.
212. Ai, T., et al., *A historical overview of magnetic resonance imaging, focusing on technological innovations*. Invest Radiol, 2012. 47(12): p. 725-41.
213. Baliyan, V., et al., *Diffusion weighted imaging: Technique and applications*. World J Radiol, 2016. 8(9): p. 785-798.
214. Dreher, C., et al., *Chemical exchange saturation transfer (CEST) signal intensity at 7T MRI of WHO IV° gliomas is dependent on the anatomic location*. J Magn Reson Imaging, 2019. 49(3): p. 777-785.
215. Jahng, G.H., et al., *Perfusion magnetic resonance imaging: a comprehensive update on principles and techniques*. Korean J Radiol, 2014. 15(5): p. 554-77.
216. Dodziuk, H., M. Jaszuński, and W. Schilf, *1H and 13C NMR chemical shifts and spin-spin coupling constants in trans- and cis-decalins*. Magn Reson Chem, 2005. 43(8): p. 639-46.
217. Currie, S., et al., *Understanding MRI: basic MR physics for physicians*. Postgrad Med J, 2013. 89(1050): p. 209-23.
218. Kimmich, R., *Principle, Purpose and Pitfalls of Field-cycling NMR Relaxometry*, in *Field-cycling NMR Relaxometry: Instrumentation, Model Theories and Applications*, R. Kimmich, Editor. 2018, The Royal Society of Chemistry. p. 0.
219. Wielpütz, M. and H.U. Kauczor, *MRI of the lung: state of the art*. Diagn Interv Radiol, 2012. 18(4): p. 344-53.
220. Gilligan, L.A., et al., *Magnetic resonance imaging T1 relaxation times for the liver, pancreas and spleen in healthy children at 1.5 and 3 tesla*. Pediatr Radiol, 2019. 49(8): p. 1018-1024.
221. Satter, A. and G. Iqbal, *Fundamentals of fluid flow through porous media*. 2016. p. 155-169.
222. Grover, V.P., et al., *Magnetic Resonance Imaging: Principles and Techniques: Lessons for Clinicians*. J Clin Exp Hepatol, 2015. 5(3): p. 246-55.
223. van Geuns, R.-J.M., et al., *Basic principles of magnetic resonance imaging*. Progress in Cardiovascular Diseases, 1999. 42(2): p. 149-156.
224. Tsai, S.-R. and M.R. Hamblin, *Biological effects and medical applications of infrared radiation*. Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology, 2017. 170: p. 197-207.
225. Maverakis, E., et al., *Light, including ultraviolet*. J Autoimmun, 2010. 34(3): p. J247-57.
226. Ntziachristos, V., et al., *Looking and listening to light: the evolution of whole-body photonic imaging*. Nature Biotechnology, 2005. 23(3): p. 313-320.
227. Zheng, J., et al., *Quantitative analysis of cell tracing by in vivo imaging system*. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2010. 30(4): p. 541-5.
228. Thorne, N., J. Inglese, and D.S. Auld, *Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology*. Chemistry & biology, 2010. 17(6): p. 646-657.
229. Cheng, Y.Y. and Y.J. Liu, *Luciferin Regeneration in Firefly Bioluminescence via Proton-Transfer-Facilitated Hydrolysis, Condensation and Chiral Inversion*. Chemphyschem, 2019. 20(13): p. 1719-1727.
230. Southern, M.M., P.E. Brown, and A. Hall, *Luciferases as reporter genes*. Methods Mol Biol, 2006. 323: p. 293-305.

231. Sanderson, M.J., et al., *Fluorescence microscopy*. Cold Spring Harbor protocols, 2014. 2014(10): p. pdb.top071795-pdb.top071795.
232. Coutu, D.L. and T. Schroeder, *Probing cellular processes by long-term live imaging – historic problems and current solutions*. Journal of Cell Science, 2013. 126(17): p. 3805-3815.
233. Soboleski, M.R., J. Oaks, and W.P. Halford, *Green fluorescent protein is a quantitative reporter of gene expression in individual eukaryotic cells*. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 2005. 19(3): p. 440-442.
234. Egeter, O., et al., *Eradication of disseminated lymphomas with CpG-DNA activated T helper type 1 cells from nontransgenic mice*. Cancer Res, 2000. 60(6): p. 1515-20.
235. Dunn, T.B., *Normal and pathologic anatomy of the reticular tissue in laboratory mice, with a classification and discussion of neoplasms*. Journal of the National Cancer Institute, 1954. 14(6): p. 1281-1433.
236. Kulis, M., et al., *Type B CpG oligodeoxynucleotides induce Th1 responses to peanut antigens: modulation of sensitization and utility in a truncated immunotherapy regimen in mice*. Mol Nutr Food Res, 2013. 57(5): p. 906-15.
237. Silva-Filho, J.L., C. Caruso-Neves, and A.A.S. Pinheiro, *IL-4: an important cytokine in determining the fate of T cells*. Biophys Rev, 2014. 6(1): p. 111-118.
238. Crawley, J.B., et al., *T Cell Proliferation in Response to Interleukins 2 and 7 Requires p38MAP Kinase Activation**. Journal of Biological Chemistry, 1997. 272(23): p. 15023-15027.
239. Carlsen, H., et al., *In vivo imaging of NF-kappa B activity*. J Immunol, 2002. 168(3): p. 1441-6.
240. Braumüller, H., et al., *T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence*. Nature, 2013. 494(7437): p. 361-365.
241. Schmid, A., et al., *Non-invasive monitoring of pancreatic tumor progression in the RIP1-Tag2 mouse by magnetic resonance imaging*. Mol Imaging Biol, 2013. 15(2): p. 186-93.
242. Brenner, E., et al., *Cancer immune control needs senescence induction by interferon-dependent cell cycle regulator pathways in tumours*. Nat Commun, 2020. 11(1): p. 1335.
243. Wang, G., et al., *An engineered oncolytic virus expressing PD-L1 inhibitors activates tumor neoantigen-specific T cell responses*. Nature Communications, 2020. 11(1): p. 1395.
244. Sonanini, D., et al., *Low-dose total body irradiation facilitates antitumoral Th1 immune responses*. Theranostics, 2021. 11(16): p. 7700-7714.
245. Maimela, N.R., S. Liu, and Y. Zhang, *Fates of CD8+ T cells in Tumor Microenvironment*. Comput Struct Biotechnol J, 2019. 17: p. 1-13.
246. Osińska, I., K. Popko, and U. Demkow, *Perforin: an important player in immune response*. Cent Eur J Immunol, 2014. 39(1): p. 109-15.
247. Cullen, S.P., M. Brunet, and S.J. Martin, *Granzymes in cancer and immunity*. Cell Death & Differentiation, 2010. 17(4): p. 616-623.
248. Raskov, H., et al., *Cytotoxic CD8+ T cells in cancer and cancer immunotherapy*. British Journal of Cancer, 2021. 124(2): p. 359-367.
249. Jiang, X., et al., *Adoptive CD8(+) T cell therapy against cancer: Challenges and opportunities*. Cancer Lett, 2019. 462: p. 23-32.
250. Baitsch, L., et al., *Exhaustion of tumor-specific CD8+ T cells in metastases from melanoma patients*. J Clin Invest, 2011. 121(6): p. 2350-60.
251. Sun, J.C. and M.J. Bevan, *Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help*. Science, 2003. 300(5617): p. 339-42.
252. Janssen, E.M., et al., *CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes*. Nature, 2003. 421(6925): p. 852-6.
253. Shedlock, D.J. and H. Shen, *Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory*. Science, 2003. 300(5617): p. 337-9.

254. Eisenberg, R. and A. Choudhury, *CD4 T cells must be present during B cell development for B cells to respond to a T-dependent foreign antigen (45.19)*. 2011. 186(1 Supplement): p. 45.19-45.19.
255. Aloulou, M. and N. Fazilleau, *Regulation of B cell responses by distinct populations of CD4 T cells*. Biomedical Journal, 2019. 42(4): p. 243-251.
256. Thomas, W.D. and P. Hersey, *TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces apoptosis in Fas ligand-resistant melanoma cells and mediates CD4 T cell killing of target cells*. J Immunol, 1998. 161(5): p. 2195-200.
257. Schattner, E.J., et al., *CD4+ T-cell induction of Fas-mediated apoptosis in Burkitt's lymphoma B cells*. Blood, 1996. 88(4): p. 1375-82.
258. Cohen, S.B., et al., *CXCR3-Dependent CD4+ T Cells Are Required to Activate Inflammatory Monocytes for Defense against Intestinal Infection*. PLOS Pathogens, 2013. 9(10): p. e1003706.
259. Braumüller, H., et al., *T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence*. Nature, 2013. 494(7437): p. 361-5.
260. Konishi, H., et al., *Astrocytic phagocytosis is a compensatory mechanism for microglial dysfunction*. The EMBO Journal, 2020. 39(22): p. e104464.
261. Takeuchi, A. and T. Saito, *CD4 CTL, a Cytotoxic Subset of CD4+ T Cells, Their Differentiation and Function*. 2017. 8.
262. Knudson, C.J., et al., *Mechanisms of Antiviral Cytotoxic CD4 T Cell Differentiation*. J Virol, 2021. 95(19): p. e0056621.
263. Rundqvist, H., et al., *Cytotoxic T-cells mediate exercise-induced reductions in tumor growth*. eLife, 2020. 9: p. e59996.
264. Laheurte, C., et al., *Distinct prognostic value of circulating anti-telomerase CD4+ Th1 immunity and exhausted PD-1+/TIM-3+ T cells in lung cancer*. British Journal of Cancer, 2019. 121(5): p. 405-416.
265. Fridman, W.H., et al., *The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome*. Nature Reviews Cancer, 2012. 12(4): p. 298-306.
266. Geyer, M.B., et al., *Enhanced survival during experimental Listeria monocytogenes sepsis in neonatal mice prophylactically treated with Th1 and macrophage immunoregulatory cytokines and mediators*. Pediatr Infect Dis J, 2014. 33(12): p. e330-7.
267. Oshi, M., et al., *CD8 T Cell Score as a Prognostic Biomarker for Triple Negative Breast Cancer*. Int J Mol Sci, 2020. 21(18).
268. Jackaman, C., et al., *CD8(+) cytotoxic T cell responses to dominant tumor-associated antigens are profoundly weakened by aging yet subdominant responses retain functionality and expand in response to chemotherapy*. Oncoimmunology, 2019. 8(4): p. e1564452.
269. Braeckel-Budimir, N.V., et al., *Combinatorial immunotherapy induces tumor-infiltrating CD8⁺ T cells with distinct functional, migratory, and stem-like properties*. 2021. 9(12): p. e003614.
270. Xiao, Z., M.F. Mescher, and S.C. Jameson, *Detuning CD8 T cells: down-regulation of CD8 expression, tetramer binding, and response during CTL activation*. J Exp Med, 2007. 204(11): p. 2667-77.
271. Grishkan, I.V., et al., *Helper T cells down-regulate CD4 expression upon chronic stimulation giving rise to double-negative T cells*. Cell Immunol, 2013. 284(1-2): p. 68-74.
272. Bracci, L., et al., *Cyclophosphamide Enhances the Antitumor Efficacy of Adoptively Transferred Immune Cells through the Induction of Cytokine Expression, B-Cell and T-Cell Homeostatic Proliferation, and Specific Tumor Infiltration*. Clinical Cancer Research, 2007. 13(2): p. 644-653.
273. Brenner, E., et al., *Cancer immune control needs senescence induction by interferon-dependent cell cycle regulator pathways in tumours*. Nature Communications, 2020. 11(1): p. 1335.

274. Gartrell, R.D., et al., *Combination immunotherapy including OncoVEXmGMCSF creates a favorable tumor immune micro-environment in transgenic BRAF murine melanoma*. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2022.
275. Lichtenegger, F.S., et al., *Targeting LAG-3 and PD-1 to Enhance T Cell Activation by Antigen-Presenting Cells*. 2018. 9.
276. Deng, R., et al., *Preclinical pharmacokinetics, pharmacodynamics, tissue distribution, and tumor penetration of anti-PD-L1 monoclonal antibody, an immune checkpoint inhibitor*. *MAbs*, 2016. 8(3): p. 593-603.
277. Tijtgat, J., et al., *Unraveling the Effects of a Talimogene Laherparepvec (T-VEC)-Induced Tumor Oncolysate on Myeloid Dendritic Cells*. *Front Immunol*, 2021. 12: p. 733506.
278. Moesta, A.K., et al., *Local Delivery of OncoVEX(mGM-CSF) Generates Systemic Antitumor Immune Responses Enhanced by Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein Blockade*. *Clin Cancer Res*, 2017. 23(20): p. 6190-6202.
279. Schwenck, J., et al., *Cancer immunotherapy is accompanied by distinct metabolic patterns in primary and secondary lymphoid organs observed by non-invasive in vivo (18)F-FDG-PET*. *Theranostics*, 2020. 10(2): p. 925-937.
280. Cenariu, D., et al., *Extramedullary Hematopoiesis of the Liver and Spleen*. *J Clin Med*, 2021. 10(24).
281. Deutsch, V.R. and A. Tomer, *Megakaryocyte development and platelet production*. *Br J Haematol*, 2006. 134(5): p. 453-66.
282. Saha, D., R.L. Martuza, and S.D. Rabkin, *Macrophage Polarization Contributes to Glioblastoma Eradication by Combination Immunovirotherapy and Immune Checkpoint Blockade*. *Cancer Cell*, 2017. 32(2): p. 253-267.e5.
283. Lau, D., et al., *Intravital Imaging of Adoptive T-Cell Morphology, Mobility and Trafficking Following Immune Checkpoint Inhibition in a Mouse Melanoma Model*. *Front Immunol*, 2020. 11: p. 1514.
284. Peng, W., et al., *PD-1 blockade enhances T-cell migration to tumors by elevating IFN- γ inducible chemokines*. *Cancer Res*, 2012. 72(20): p. 5209-18.
285. Christensen, J.E., et al., *CXCL10 is the key ligand for CXCR3 on CD8+ effector T cells involved in immune surveillance of the lymphocytic choriomeningitis virus-infected central nervous system*. *J Immunol*, 2006. 176(7): p. 4235-43.
286. Reschke, R., et al., *Immune cell and tumor cell-derived CXCL10 is indicative of immunotherapy response in metastatic melanoma*. 2021. 9(9): p. e003521.
287. Eissler, N., et al., *Regulation of myeloid cells by activated T cells determines the efficacy of PD-1 blockade*. *Oncoimmunology*, 2016. 5(12): p. e1232222.
288. Han, Y., D. Liu, and L. Li, *PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer*. *Am J Cancer Res*, 2020. 10(3): p. 727-742.
289. Ribas, A. and S. Hu-Lieskovan, *What does PD-L1 positive or negative mean?* *J Exp Med*, 2016. 213(13): p. 2835-2840.
290. Nolz, J.C., *Molecular mechanisms of CD8(+) T cell trafficking and localization*. *Cell Mol Life Sci*, 2015. 72(13): p. 2461-73.
291. Dodagatta-Marri, E., et al., *α -PD-1 therapy elevates Treg/Th balance and increases tumor cell pSmad3 that are both targeted by α -TGF β antibody to promote durable rejection and immunity in squamous cell carcinomas*. 2019. 7(1): p. 62.
292. Tone, Y., et al., *Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer*. *Nat Immunol*, 2008. 9(2): p. 194-202.
293. Luo, X., et al., *Cutting edge: TGF-beta-induced expression of Foxp3 in T cells is mediated through inactivation of ERK*. *J Immunol*, 2008. 180(5): p. 2757-61.
294. Schlenner, S.M., et al., *Smad3 binding to the foxp3 enhancer is dispensable for the development of regulatory T cells with the exception of the gut*. *J Exp Med*, 2012. 209(9): p. 1529-35.

295. Zhang, H., et al., *TGF- β 1/Smad2/3/Foxp3 signaling is required for chronic stress-induced immune suppression*. *J Neuroimmunol*, 2018. 314: p. 30-41.
296. Mariathasan, S., et al., *TGF β attenuates tumour response to PD-L1 blockade by contributing to exclusion of T cells*. *Nature*, 2018. 554(7693): p. 544-548.
297. Ni, Y., et al., *High TGF- β signature predicts immunotherapy resistance in gynecologic cancer patients treated with immune checkpoint inhibition*. *npj Precision Oncology*, 2021. 5(1): p. 101.
298. Martin, C.J., et al., *Selective inhibition of TGF β 1 activation overcomes primary resistance to checkpoint blockade therapy by altering tumor immune landscape*. 2020. 12(536): p. eaay8456.
299. Langlois, B., et al., *AngioMatrix, a signature of the tumor angiogenic switch-specific matrisome, correlates with poor prognosis for glioma and colorectal cancer patients*. *Oncotarget*, 2014. 5(21): p. 10529-45.
300. Bai, X., et al., *Blocking TGF- β Signaling To Enhance The Efficacy Of Immune Checkpoint Inhibitor*. *Onco Targets Ther*, 2019. 12: p. 9527-9538.
301. Ganesh, K. and J. Massagué, *TGF- β Inhibition and Immunotherapy: Checkmate*. *Immunity*, 2018. 48(4): p. 626-628.
302. Kim, B.-G., et al., *Novel therapies emerging in oncology to target the TGF- β pathway*. *Journal of Hematology & Oncology*, 2021. 14(1): p. 55.
303. Rudensky, A.Y., *Regulatory T cells and Foxp3*. *Immunol Rev*, 2011. 241(1): p. 260-8.
304. Li, Z., et al., *FOXP3+ regulatory T cells and their functional regulation*. *Cellular & Molecular Immunology*, 2015. 12(5): p. 558-565.
305. Jiang, H., et al., *PD-L1/LAG-3 bispecific antibody enhances tumor-specific immunity*. *Oncoimmunology*, 2021. 10(1): p. 1943180.
306. Grywalska, E., et al., *Immune-checkpoint inhibitors for combating T-cell dysfunction in cancer*. *Onco Targets Ther*, 2018. 11: p. 6505-6524.
307. Wang, H. and L.D. Wang, *Spacing out dual checkpoint inhibition improves antigen-specific T cell manufacture*. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*, 2023. 28: p. 27.
308. Klein, S., et al., *PD-L1 Checkpoint Inhibition Narrows the Antigen-Specific T Cell Receptor Repertoire in Chronic Lymphocytic Choriomeningitis Virus Infection*. *J Virol*, 2020. 94(18).
309. Wong, H.S., et al., *A local regulatory T cell feedback circuit maintains immune homeostasis by pruning self-activated T cells*. *Cell*, 2021. 184(15): p. 3981-3997.e22.
310. Patsoukis, N., D. Sari, and V.A. Boussiotis, *PD-1 inhibits T cell proliferation by upregulating p27 and p15 and suppressing Cdc25A*. *Cell Cycle*, 2012. 11(23): p. 4305-9.
311. Roberts, A., et al., *Ex vivo modelling of PD-1/PD-L1 immune checkpoint blockade under acute, chronic, and exhaustion-like conditions of T-cell stimulation*. *Scientific Reports*, 2021. 11(1): p. 4030.
312. Azad, A., et al., *PD-L1 blockade enhances response of pancreatic ductal adenocarcinoma to radiotherapy*. 2017. 9(2): p. 167-180.
313. Derosiers, N., et al., *Sweet Immune Checkpoint Targets to Enhance T Cell Therapy*. *The Journal of Immunology*, 2022. 208(2): p. 278-285.
314. Serafini, P., et al., *High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells*. *Cancer Res*, 2004. 64(17): p. 6337-43.
315. Kumar, A., et al., *GM-CSF: A Double-Edged Sword in Cancer Immunotherapy*. 2022. 13.
316. Yan, W.L., et al., *Recent progress in GM-CSF-based cancer immunotherapy*. *Immunotherapy*, 2017. 9(4): p. 347-360.
317. van de Laar, L., P.J. Coffey, and A.M. Woltman, *Regulation of dendritic cell development by GM-CSF: molecular control and implications for immune homeostasis and therapy*. *Blood*, 2012. 119(15): p. 3383-3393.

318. 272. *Oncolytic Adenovirus Expressing Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) for Treatment of Cancer*. *Molecular Therapy*, 2009. 17: p. S106-S107.
319. Watanabe, D. and F. Goshima, *Oncolytic Virotherapy by HSV*. *Adv Exp Med Biol*, 2018. 1045: p. 63-84.
320. Bennett, J.J., et al., *Positron emission tomography imaging for herpes virus infection: Implications for oncolytic viral treatments of cancer*. *Nature Medicine*, 2001. 7(7): p. 859-863.
321. Tjuvajev, J.G., et al., *Comparison of radiolabeled nucleoside probes (FIAU, FHBG, and FHPG) for PET imaging of HSV1-tk gene expression*. *J Nucl Med*, 2002. 43(8): p. 1072-83.
322. Fernandes, J., *Oncogenes: The Passport for Viral Oncolysis Through PKR Inhibition*. *Biomark Cancer*, 2016. 8: p. 101-10.
323. Bommarreddy, P.K., et al., *Talimogene Laherparepvec (T-VEC) and Other Oncolytic Viruses for the Treatment of Melanoma*. *Am J Clin Dermatol*, 2017. 18(1): p. 1-15.
324. He, B., M. Gross, and B. Roizman, *The gamma(1)34.5 protein of herpes simplex virus 1 complexes with protein phosphatase 1alpha to dephosphorylate the alpha subunit of the eukaryotic translation initiation factor 2 and preclude the shutoff of protein synthesis by double-stranded RNA-activated protein kinase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(3): p. 843-8.
325. André, N.D., et al., *Intratatumoral injection of PKR shRNA expressing plasmid inhibits B16-F10 melanoma growth* *Corrigendum in /10.3892/or.2018.6646*. *Oncol Rep*, 2014. 32(5): p. 2267-2273.
326. Alauddin, M.M., et al., *Direct comparison of radiolabeled probes FMAU, FHBG, and FHPG as PET imaging agents for HSV1-tk expression in a human breast cancer model*. *Mol Imaging*, 2004. 3(2): p. 76-84.
327. Li, X., et al., *(18)F-FHBG PET-CT Reporter Gene Imaging of Adoptive CIK Cell Transfer Immunotherapy for Breast Cancer in a Mouse Model*. *Onco Targets Ther*, 2020. 13: p. 11659-11668.
328. Michelotti, F.C., et al., *PET/MRI enables simultaneous in vivo quantification of β -cell mass and function*. *Theranostics*, 2020. 10(1): p. 398-410.
329. Information, N.C.f.B. *PubChem Compound Summary for CID 23930, Manganese*. 2023; Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Manganese>.
330. Information, N.C.f.B. *PubChem Compound Summary for CID 135398526, 9-(4-(18F)Fluoro-3-(hydroxymethyl)butyl)guanine*. 2023; Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/135398526>.
331. Ding, X., et al., *Exendin-4, a glucagon-like protein-1 (GLP-1) receptor agonist, reverses hepatic steatosis in ob/ob mice*. *Hepatology*, 2006. 43(1): p. 173-81.
332. Alauddin, M.M. and P.S. Conti, *Synthesis and preliminary evaluation of 9-(4-[18F]-fluoro-3-hydroxymethylbutyl)guanine ([18F]FHBG): a new potential imaging agent for viral infection and gene therapy using PET*. *Nucl Med Biol*, 1998. 25(3): p. 175-80.
333. Gretz, J.E., et al., *Lymph-Borne Chemokines and Other Low Molecular Weight Molecules Reach High Endothelial Venules via Specialized Conduits While a Functional Barrier Limits Access to the Lymphocyte Microenvironments in Lymph Node Cortex*. *Journal of Experimental Medicine*, 2000. 192(10): p. 1425-1440.
334. Wargocka-Matuszewska, W., et al., *Molecular imaging of myogenic stem/progenitor cells with [18F]-FHBG PET/CT system in SCID mice model of post-infarction heart*. *Scientific Reports*, 2021. 11(1): p. 19825.
335. Muñoz-Álvarez, K.A., et al., *PET imaging of oncolytic VSV expressing the mutant HSV-1 thymidine kinase transgene in a preclinical HCC rat model*. *Mol Ther*, 2015. 23(4): p. 728-36.
336. Kuruppu, D., et al., *Positron Emission Tomography of Herpes Simplex Virus 1 Oncolysis*. *Cancer Research*, 2007. 67(7): p. 3295-3300.

337. Likar, Y., et al., *PET imaging of HSV1-tk mutants with acquired specificity toward pyrimidine- and acycloguanosine-based radiotracers*. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2009. 36(8): p. 1273-82.
338. Wang, Z., et al., *Design of a functional cyclic HSV1-TK reporter and its application to PET imaging of apoptosis*. Nature Protocols, 2015. 10(5): p. 807-821.
339. Eissenberg, L.G., et al., *[(18)F]FHBG PET/CT Imaging of CD34-TK75 Transduced Donor T Cells in Relapsed Allogeneic Stem Cell Transplant Patients: Safety and Feasibility*. Mol Ther, 2015. 23(6): p. 1110-1122.
340. Lloyd, J., et al., *Characterization of polyclonal antibodies to Herpes Simplex Virus types 1 and 2*. J Histotechnol, 2019. 42(4): p. 202-214.
341. Oumarou Hama, H., et al., *Immunohistochemical diagnosis of human infectious diseases: a review*. Diagn Pathol, 2022. 17(1): p. 17.
342. Estrada, J., et al., *OncoVEX^{mGM-CSF} expands tumor antigen-specific CD8⁺ T-cell response in preclinical models*. 2023. 11(5): p. e006374.
343. Goshima, F., et al., *Oncolytic viral therapy with a combination of HF10, a herpes simplex virus type 1 variant and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for murine ovarian cancer*. Int J Cancer, 2014. 134(12): p. 2865-77.
344. Lam, A.H., et al., *In-House Immunofluorescence Assay for Detection of SARS-CoV-2 Antigens in Cells from Nasopharyngeal Swabs as a Diagnostic Method for COVID-19*. Diagnostics (Basel), 2021. 11(12).
345. Fulton, R.E. and P.J. Middleton, *Immunofluorescence in diagnosis of measles infections in children*. J Pediatr, 1975. 86(1): p. 17-22.
346. Mandal, S., et al., *Confocal fluorescence microscopy: An ultra-sensitive tool used to evaluate intracellular antiretroviral nano-drug delivery in HeLa cells*. AIP Adv, 2015. 5(8): p. 084803.
347. Uche, I.K., et al., *Novel Oncolytic Herpes Simplex Virus 1 VC2 Promotes Long-Lasting, Systemic Anti-melanoma Tumor Immune Responses and Increased Survival in an Immunocompetent B16F10-Derived Mouse Melanoma Model*. J Virol, 2021. 95(3).
348. Ribas, A., et al., *Oncolytic Virotherapy Promotes Intratumoral T Cell Infiltration and Improves Anti-PD-1 Immunotherapy*. Cell, 2017. 170(6): p. 1109-1119.e10.
349. Grimes, J.M., et al., *Oncolytic Viral Therapy Mediates its Effectiveness by Inducing and Enhancing CD4 cytotoxic T-cells*. The Journal of Immunology, 2022. 208(1_Supplement): p. 66.13-66.13.
350. Oelkrug, C. and J.M. Ramage, *Enhancement of T cell recruitment and infiltration into tumours*. Clinical and Experimental Immunology, 2014. 178(1): p. 1-8.
351. Chamoto, K., et al., *Potentiation of tumor eradication by adoptive immunotherapy with T-cell receptor gene-transduced T-helper type 1 cells*. Cancer Res, 2004. 64(1): p. 386-90.
352. Cai, L., et al., *Robust immune response stimulated by in situ injection of CpG/αOX40/cGAMP in αPD-1-resistant malignancy*. Cancer Immunology, Immunotherapy, 2022. 71(7): p. 1597-1609.
353. van Elsas, A., A.A. Hurwitz, and J.P. Allison, *Combination immunotherapy of B16 melanoma using anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-producing vaccines induces rejection of subcutaneous and metastatic tumors accompanied by autoimmune depigmentation*. J Exp Med, 1999. 190(3): p. 355-66.
354. Wang, J., et al., *323 Immunogenic syngeneic model MC38-OVA for the preclinical evaluation of immune evasion and checkpoint blockade*. 2021. 9(Suppl 2): p. A348-A348.
355. Bernardo, M., et al., *An experimental model of anti-PD-1 resistance exhibits activation of TGFβ and Notch pathways and is sensitive to local mRNA immunotherapy*. Oncoimmunology, 2021. 10(1): p. 1881268.
356. Allen, S.D., et al., *Immune checkpoint inhibition in syngeneic mouse cancer models by a silicasome nanocarrier delivering a GSK3 inhibitor*. Biomaterials, 2021. 269: p. 120635.

357. Bottero, V., S. Withoff, and I.M. Verma, *NF- κ B and the regulation of hematopoiesis*. *Cell Death & Differentiation*, 2006. 13(5): p. 785-797.
358. Liu, T., et al., *NF- κ B signaling in inflammation*. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2017. 2(1): p. 17023.
359. Martins, G.R., et al., *Proinflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines Mediated by NF- κ B Factor as Prognostic Markers in Mammary Tumors*. *Mediators of Inflammation*, 2016. 2016: p. 9512743.
360. Oh, H. and S. Ghosh, *NF- κ B: roles and regulation in different CD4(+) T-cell subsets*. *Immunol Rev*, 2013. 252(1): p. 41-51.
361. Hövelmeyer, N., M. Schmidt-Supprian, and C. Ohnmacht, *NF- κ B in control of regulatory T cell development, identity, and function*. *Journal of Molecular Medicine*, 2022. 100(7): p. 985-995.
362. Visekruna, A., A. Volkov, and U. Steinhoff, *A Key Role for NF- κ B Transcription Factor c-Rel in T-Lymphocyte-Differentiation and Effector Functions*. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012. 2012: p. 239368.
363. Paun, A., E. Claudio, and U.K. Siebenlist, *Constitutive activation of NF- κ B during early bone marrow development results in loss of B cells at the pro-B-cell stage*. *Blood Advances*, 2021. 5(3): p. 745-755.
364. Nakagawa, M.M. and C.V. Rathinam, *Constitutive Activation of the Canonical NF- κ B Pathway Leads to Bone Marrow Failure and Induction of Erythroid Signature in Hematopoietic Stem Cells*. *Cell Rep*, 2018. 25(8): p. 2094-2109.e4.
365. Luo, J.L., H. Kamata, and M. Karin, *IKK/NF- κ B signaling: balancing life and death--a new approach to cancer therapy*. *J Clin Invest*, 2005. 115(10): p. 2625-32.
366. Liu, T., et al., *NF- κ B signaling in inflammation*. *Signal Transduct Target Ther*, 2017. 2: p. 17023-.
367. Zhang, T., et al., *NF- κ B signaling in inflammation and cancer*. *MedComm (2020)*, 2021. 2(4): p. 618-653.
368. Xia, Y., S. Shen, and I.M. Verma, *NF- κ B, an active player in human cancers*. *Cancer Immunol Res*, 2014. 2(9): p. 823-30.
369. Lowe, J.M., et al., *p53 and NF- κ B coregulate proinflammatory gene responses in human macrophages*. *Cancer Res*, 2014. 74(8): p. 2182-92.
370. Obeid, J.M., et al., *The heterogeneity of tumor-infiltrating CD8+ T cells in metastatic melanoma distorts their quantification: how to manage heterogeneity?* *Melanoma Res*, 2017. 27(3): p. 211-217.
371. Biswas, A. and S. De, *Drivers of dynamic intratumor heterogeneity and phenotypic plasticity*. 2021. 320(5): p. C750-C760.
372. Corthay, A., et al., *Primary Antitumor Immune Response Mediated by CD4+ T Cells*. *Immunity*, 2005. 22(3): p. 371-383.
373. Miller, B.C., et al., *Subsets of exhausted CD8(+) T cells differentially mediate tumor control and respond to checkpoint blockade*. *Nat Immunol*, 2019. 20(3): p. 326-336.
374. Cao, X., *Regulatory T cells and immune tolerance to tumors*. *Immunol Res*, 2010. 46(1-3): p. 79-93.
375. Seyfizadeh, N., et al., *Migration of dendritic cells to the lymph nodes and its enhancement to drive anti-tumor responses*. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2016. 107: p. 100-110.
376. Francis, D.M., et al., *Blockade of immune checkpoints in lymph nodes through locoregional delivery augments cancer immunotherapy*. *Sci Transl Med*, 2020. 12(563).
377. Masopust, D. and J.M. Schenkel, *The integration of T cell migration, differentiation and function*. *Nature Reviews Immunology*, 2013. 13(5): p. 309-320.
378. Hill, S., et al., *Systemic migration of dendritic cells during contact sensitization*. *Immunology*, 1990. 71(2): p. 277-81.

379. Ngwa, W., et al., *Using immunotherapy to boost the abscopal effect*. Nat Rev Cancer, 2018. 18(5): p. 313-322.
380. Nabrinsky, E., J. Macklis, and J. Bitran, *A Review of the Abscopal Effect in the Era of Immunotherapy*. Cureus, 2022. 14(9): p. e29620.
381. Liu, Y., et al., *Abscopal effect of radiotherapy combined with immune checkpoint inhibitors*. Journal of Hematology & Oncology, 2018. 11(1): p. 104.
382. Whitmire, J.K., J.T. Tan, and J.L. Whitton, *Interferon- γ acts directly on CD8+ T cells to increase their abundance during virus infection*. Journal of Experimental Medicine, 2005. 201(7): p. 1053-1059.
383. Phares, T.W., et al., *CD4 T cells promote CD8 T cell immunity at the priming and effector site during viral encephalitis*. J Virol, 2012. 86(5): p. 2416-27.
384. Griessinger, C.M., et al., *The administration route of tumor-antigen-specific T-helper cells differentially modulates the tumor microenvironment and senescence*. Carcinogenesis, 2019. 40(2): p. 289-302.
385. Radulovic, K., et al., *The Early Activation Marker CD69 Regulates the Expression of Chemokines and CD4 T Cell Accumulation in Intestine*. PLOS ONE, 2013. 8(6): p. e65413.
386. Fremd, C., et al., *B cell-regulated immune responses in tumor models and cancer patients*. Oncoimmunology, 2013. 2(7): p. e25443.
387. Tao, H., et al., *Antitumor effector B cells directly kill tumor cells via the Fas/FasL pathway and are regulated by IL-10*. Eur J Immunol, 2015. 45(4): p. 999-1009.
388. Sarvaria, A., J.A. Madrigal, and A. Saudemont, *B cell regulation in cancer and anti-tumor immunity*. Cellular & Molecular Immunology, 2017. 14(8): p. 662-674.
389. Haynes, N.M., et al., *CD11c⁺ Dendritic Cells and B Cells Contribute to the Tumoricidal Activity of Anti-DR5 Antibody Therapy in Established Tumors*. 2010. 185(1): p. 532-541.
390. Albanell, J., et al., *Mechanism of action of anti-HER2 monoclonal antibodies: scientific update on trastuzumab and 2C4*. Adv Exp Med Biol, 2003. 532: p. 253-68.
391. Hagn, M., et al., *Human B cells differentiate into granzyme B-secreting cytotoxic B lymphocytes upon incomplete T-cell help*. Immunol Cell Biol, 2012. 90(4): p. 457-67.
392. Cooley, S., et al., *Natural killer cell cytotoxicity of breast cancer targets is enhanced by two distinct mechanisms of antibody-dependent cellular cytotoxicity against LFA-3 and HER2/neu*. Exp Hematol, 1999. 27(10): p. 1533-41.
393. Cibrián, D. and F. Sánchez-Madrid, *CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper*. Eur J Immunol, 2017. 47(6): p. 946-953.
394. Bankovich, A.J., L.R. Shiow, and J.G. Cyster, *CD69 suppresses sphingosine 1-phosphate receptor-1 (S1P1) function through interaction with membrane helix 4*. J Biol Chem, 2010. 285(29): p. 22328-37.
395. Spiegel, S. and S. Milstien, *The outs and the ins of sphingosine-1-phosphate in immunity*. Nat Rev Immunol, 2011. 11(6): p. 403-15.
396. Shiow, L.R., et al., *CD69 acts downstream of interferon-alpha/beta to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs*. Nature, 2006. 440(7083): p. 540-4.
397. Mackay, L.K., et al., *Cutting edge: CD69 interference with sphingosine-1-phosphate receptor function regulates peripheral T cell retention*. J Immunol, 2015. 194(5): p. 2059-63.
398. Siracusa, F., et al., *Maintenance of CD8(+) memory T lymphocytes in the spleen but not in the bone marrow is dependent on proliferation*. Eur J Immunol, 2017. 47(11): p. 1900-1905.