

Aus der  
Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen  
Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik  
(Schwerpunkt: Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie und Onkologie)

**Molekulare Analyse des intratumoralen Immunkompartments  
nach  
immuntherapeutischer Kombinationstherapie aus  
tumorgerichtetem IL-12 und  
lokaler Radiotherapie  
im Rhabdomyosarkom im Tiermodel**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Oehme, Moritz Philipp**

**2020**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. K. Schilbach-Stückle

2. Berichterstatter: Professor Dr. G. Jung

Tag der Disputation: 03.12.2020

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Rhabdomyosarkom .....	1
1.2	Immunsystem, Tumormunologie und Krebsimmuntherapie .....	2
1.2.1	Hämatopoese und das zelluläre Immunsystem.....	2
1.2.1.1	T-Lymphozyten, ihre Entwicklung und Funktion.....	4
1.2.1.1.1	$\alpha\beta$ T-Zellen.....	11
1.2.1.1.2	$\gamma\delta$ T-Zellen.....	16
1.2.1.2	NK-Zellen, ihre Entwicklung und Funktion .....	19
1.2.2	Tumormunologie und Krebsimmuntherapie .....	23
1.2.3	NHS-IL12, lokale Radiotherapie und Kombinationstherapie ...	31
1.3	NSG-Mäuse und RMS A204.....	32
1.4	Zielsetzung der Arbeit.....	34
2	Material und Methoden.....	36
2.1	Versuchstiere, Tumore und Materialien .....	36
2.1.1	Versuchstiere und RMS A204.....	36
2.1.2	Materialien.....	39
2.1.3	Molekularbiologische Kits zur cDNA-Synthese.....	42
2.1.4	Materialien für PCR und Fragmentlängenanalyse („Spectratyping“).....	43
2.2	Methoden .....	44
2.2.1	Versuchsaufbau.....	44
2.2.2	Histologie und Immunhistochemie.....	47
2.2.3	Molekularbiologische Methoden.....	48

2.2.3.1	RNA-Isolation.....	48
2.2.3.2	cDNA-Synthese .....	49
2.2.3.3	PCR-Primer .....	50
2.2.3.4	RT-PCR .....	51
2.2.3.5	Nested PCR und Multiplex PCR .....	53
2.2.3.6	Fragmentlängenanalyse (TCR- und KIR-Spectratyping) .....	54
2.2.3.6.1	TCRV $\alpha$ -Spectratyping.....	56
2.2.3.6.2	TCRV $\gamma$ - und $\delta$ -Spectratyping .....	56
2.2.3.6.3	KIR-Spectratyping.....	57
3	Ergebnisse .....	58
3.1	Tumorregression und verbessertes Überleben nach T-Zellinfiltration und Myogener Enddifferenzierung der Tumore durch Kombinationstherapie bestehend aus lokaler Bestrahlung und NHS-IL12 Gabe .....	58
3.1.1	Relative TumorgroÙe und Survivalanalyse in Abhängigkeit von der Behandlungsgruppe.....	58
3.1.2	Histologische und immunhistochemische Untersuchung der Tumore.....	64
3.2	Induktion einer breiten Immunantwort auf T-Zell und NK-Zell-Ebene nach Behandlung mit Kombinationstherapie .....	68
3.2.1	NK-Zellrezeptorgene werden durch alle Kontroll- und Therapiegruppen hindurch homogen exprimiert .....	68
3.2.2	Kombinationstherapie induziert breitestes TCRV $\alpha$ -Repertoire mit höchsten Peaks und systemisch nachweisbaren Klonen.....	70
3.2.3	TCRV $\gamma$ - und $\delta$ -Repertoire indifferent zwischen Behandlungs-	

	gruppen mit größter klonaler Breite in Tumoren von kombiniert therapierten Mäusen.....	108
	3.2.4 Induktion der deutlichsten Immunantwort nach Kombinations- therapie.....	113
4	Diskussion.....	115
5	Zusammenfassung.....	127
6	Literaturverzeichnis.....	129
7	Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift.....	155
8	Veröffentlichung.....	157

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	alpha
Abb.	Abbildung
ADCC	antibody-dependent cellular cytotoxicity
$\beta$	beta
bp	Basenpaar
$\gamma$	gamma
C	constant
CD	Cluster of Differentiation
CLP	common lymphoid progenitor
CMP	common myeloid progenitor
CTx	Chemotherapie
$\delta$	delta
D	Diversity
DC	Dendritische Zelle
DN	Doppelt Negative Thymozyten
DNA-PK	DNA-abhängige Proteinkinase
DP	Doppelt Positive Thymozyten
DNA	Deoxyribonucleic Acid
cDNA	complementary Deoxyribonucleic Acid
CDR	complementarity-determining region
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4
ETP	Early t-cell progenitor
FAM	Fluorescein amidite
FasL	Fas-Ligand
Foxp3	Forkhead-Box-Protein P3b
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
Gy	Gray
HSC	hematopoetic stem cell
HLA-DR	Human Leukocyte Antigen –Antigen D Related
ICB	Immune checkpoint blockade
ICD	Immunogenic Cell Death
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IEL	Intraepitheliale Lymphozyten
IFN	Interferon
ILL	Innate like Lymphocyte
IL	Interleukin(e)
iNKT	invariant natural killer T cell
IR	Irradiation
J	joining
KG	Kontrollgruppe(n)
KIR	Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor

## Abkürzungsverzeichnis

---

LT- $\alpha/\beta$	Lymphotoxin alpha/beta
MCSF	Macrophage stimulating factor
MDSC	Myeloid-derived Suppressor Cells
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIP	macrophage inflammatory protein
$\mu$ l	Mikroliter
ml	Milliliter
mM	millimolar
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
MPP	multipotent progenitor
NCR	natürlicher Zytotoxizitätsrezeptor
NKG2D	Aktivierender lectin-like Rezeptor, ursprünglich in NK-Zellen identifiziert
NKR	NK-Zell-Rezeptor
NSG	NOD scid gamma
NSCLC	Non Small-Cell Lung Cancer
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PD-1	Programmed cell death Protein 1
RAG	Recombination Activating Genes
RMS	Rhabdomyosarkom
RNA	Ribonucleic Acid
ROR $\gamma$ t	RAR-related orphan receptor gamma two
RTx	Radiotherapie
NHS76	Bezeichnung eines nacktes-Histon bindenden monoklonalen Antikörpers
pmol	piko-Mol
pT $\alpha$	prä- T alpha-Kette
RANTES	regulated-on-activation, normal T-cell-expressed and –secreted beta chemokine
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
Scid	Severe combined Immunodeficiency
SLT	Secondary Lymphoid Tissue
SP	Single Positive, einfach positive Thymozyten
Taq	Thermus aquaticus
TCR	T-Zell-Rezeptor
TCRV	V-Segment des T-Zell-Rezeptor Genlokus
T-bet	T-box-expressed in T-cells
TdT	Terminal deoxynucleotidyl Transferase
TME	Tumormicroenvironment
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR-1	Tumornekrosefaktor-Rezeptor Typ 1
tRNA	Transporter Ribonucleic Acid
ULBP	UL16-Binding Protein
V	variable
Vrgl.	Vergleich

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Modelle der Hämatopoese.....	3
Abb.1.2: T-Zellreifung im Thymus und Differenzierung der stadienassoziierten Oberflächenmarker.....	7
Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Genumlagerung der TCR $\alpha$ - und $\beta$ -Genloci .....	10
Abb. 1.4: Cancer Immunoediting .....	27
Abb. 1.5 Cancer-Immunity cycle.....	29
Abb. 1.6: Exemplarische lang-fristige Tumorthherapie .....	30
Abb.2.1.: Studiendesign .....	37
Abb. 2.2: Tumorextraktio und Gruppierung. ....	45
Abb. 2.4: Exemplarisches PCR-Programm im Thermocycler .....	52
Abb. 2.5: Schema einer Nested PCR .....	53
Abb. 2.6: Schematische Darstellung des Spectratyping .....	55
Abb. 2.7: Thermocyclerprogramm zur Denaturierung .....	56
Abb. 3.1: Tumorwachstum.....	60
Abb. 3.2: Tumorwachstum (Tag 15).....	62
Abb. 3.3: Tumorgrößespezifische Survivalanalyse .....	63
Abb. 3.4.: Histologie und Immunhistochemie .....	65
Abb 3.5.: Quantitatives Scoring der Histologie und Immunhistochemie .....	66
Abb 3.6.: Relative TumorgroÙe und Gesamtüberleben in Abhängigkeit von T-Zellinfiltration .....	67
Abb 3.7: Exemplarische Darstellung des KIR-Spectratyping von infiltrierenden NK-Zellen aus Tumoren unterschiedlicher Therapiegruppen. ....	69
Abb 3.8: Homogene Expression der NK-Zellrezeptorgene durch alle Therapiegruppen hindurch .....	70
Abb 3.9: Exemplarische Darstellung des TCRV $\alpha$ -Spectratyping eines Tumors aus der Kontrollgruppe (I1) und eines Tumors einer Maus, welche die Kombinationstherapie erhalten hatte (III5) .....	72

## Abbildungsverzeichnis

---

Abb. 3.10 Expressionsniveau und –Breite TCRV $\alpha$ -Segment 1-1 und 1-2    7 ..	74
Abb. 3.11: Expressionsniveau und –Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 2    11.....	75
Abb. 3.12: Expressionsniveau und –Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 3    16 .....	76
Abb. 3.13: Expressionsniveau und –Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 4    20 .....	77
Abb. 3.14: Expressionsniveau und –Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 5    15 .....	78
Abb. 3.15: Expressionsniveau und –Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 6    5 .....	79
Abb. 3.16: Expressionsniveau und –Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 8-1 und 8-3    1B.....	80
Abb. 3.17: Expressionsniveau und –Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 8-4 und 8-6    1A.....	81
Abb. 3.18: Expressionsniveau und –Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 9-2    22.....	82
Abb. 3.19: Expressionsniveau und –Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 10    24.....	83
Abb. 3.20: Expressionsniveau und –Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 12-1, 12-2 und 12-3    2 .....	84
Abb. 3.21: Expressionsniveau und –Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 13-1 und 13-2    8 .....	85
Abb. 3.22: Expressionsniveau und –Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 14DV4    6 ..	86
Abb 3.23: Expressionsniveau und –Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 16    9 .....	87
Abb. 3.24: Expressionsniveau und –Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 17    3 .....	88
Abb. 3.25: Expressionsniveau und –Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 19    12 .....	89
Abb. 3.26: Expressionsniveau und –Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 20    30.....	90
Abb. 3.27: Expressionsniveau und –Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 21    23.....	91
Abb. 3.28: Expressionsniveau und –Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 22    13.....	92
Abb. 3.29: Expressionsniveau und –Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 23DV6    17	93
Abb. 3.30: Expressionsniveau und –Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 24    18.....	94
Abb. 3.31: Expressionsniveau und –Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 25    32.....	95
Abb. 3.32: Expressionsniveau und –Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 26-2    4A ...	96
Abb. 3.33: Expressionsniveau und –Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 26-2    4B ...	97
Abb. 3.34: Expressionsniveau und –Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 27    10.....	98
Abb. 3.35: Expressionsniveau und –Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 29DV5    21	99
Abb. 3.36: Expressionsniveau und –Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 30    29.....	100
Abb. 3.37: Expressionsniveau und –Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 34    26.....	101

## Abbildungsverzeichnis

---

Abb. 3.38: Expressionsniveau und –Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 35    25 ....	102
Abb. 3.39: Expressionsniveau und –Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 36DV7 25    28 .....	103
Abb. 3.40: Expressionsniveau und –Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 38-1 38-2DV    14 .....	104
Abb. 3.41: Expressionsniveau und –Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 39    27 .....	105
Abb. 3.42: Expressionsniveau und –Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 40    31 .....	106
Abb. 3.43: Expressionsniveau und –Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 41    19 .....	107
Abb 3.44: Exemplarische Darstellung des TCRV $\gamma$ - und $\delta$ -Spectratyping bei Tumoren von Mäusen unterschiedlicher Therapiegruppen. ....	108
Abb 3.45: Darstellung des V $\delta$ -Repertoires für die TCRV $\delta$ -Segmente 1-4 .....	110
Abb 3.46: Darstellung des V $\delta$ -Repertoires für die TCRV $\delta$ -Segmente 5-8 .....	111
Abb 3.47: Darstellung der V $\gamma$ -Repertoires für die TCRV $\gamma$ -Segmente 2-4, 3, 5, 8 und 9 .....	112
Abb. 3.48: Exprimierte NK-Zellrezeptorgene, TCRV $\alpha$ - und TCRV $\delta\gamma$ -Repertoires .....	114

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Glas, Plastik, Laborzubehör .....	39
Tabelle 2: Stammlösungen und Chemikalien .....	40
Tabelle 3: Geräte .....	41
Tabelle 4: Computersoftware.....	42
Tabelle 5: Molekularbiologische Kits zur cDNA-Synthese .....	42
Tabelle 6: Enzyme .....	43
Tabelle 7: Untersuchte TCR- und KIR-Segmente.....	46
Tabelle 8: Mastermixe zur cDNA-Synthese von 20 µl Endvolumen.....	50
Tabelle 9: Verwendete Thermocyclerprogramme für cDNA-Synthese.....	50
Tabelle 10: Verwendete PCR-Primer.....	51
Tabelle 11: Exemplarische Darstellung PCR-Mix .....	52
Tabelle 12: Exemplarischer Multiplex-PCR-Ansatz für Detektion von NKp44, NKp46, CD226 .....	54
Tabelle 13: PCR-Produkt-Vorbereitung für Sequenziergerät .....	55

# 1 Einleitung

## 1.1 Rhabdomyosarkom

Das Rhabdomyosarkom (RMS) ist ein hochmaligner Weichteiltumor vornehmlich des Kindesalters. Es macht 5 % aller Tumore im Lebensalter von 0 bis 18 Jahren aus. Wie bei allen Sarkomen handelt es sich beim RMS um eine Neoplasie mesenchymalen Ursprungs. Das RMS im Speziellen leitet sich von dem Mesenchym entstammenden Muskelstammzellen ab. Histopathologisch treten embryonale, alveoläre und pleomorphe (oder auch anaplastische) RMS auf, welche sich in Wachstumsmuster und Differenzierung unterscheiden. Der pleomorphe Typ wird vorwiegend bei Erwachsenen, der embryonale Typ vor allem bei Kleinkindern gefunden. Hauptlokalisation für die Manifestation des RMS sind Kopf, Extremitäten, Urogenitaltrakt und Hals. Metastasierung und Rezidive sind möglich. Das mittlere 5-Jahres-Überleben variiert zwischen 35 % und 95 %, wobei die Prognose neben anderem von Lokalisation und klinischem Stadium des Tumors abhängt.<sup>1 2</sup> Beim metastasierten RMS liegt die Heilungschance bei unter 20 %.<sup>3</sup>

Die multimodale Therapie des kindlichen Rhabdomyosarkoms (RMS) ist mit den etablierten Werkzeugen der chirurgischen Resektion, neoadjuvanter oder adjuvanter Radio-/Chemotherapie (RTx, CTx) nach wie vor unbefriedigend. Eine Tumorkontrolle bleibt schwierig.<sup>4 5 6</sup> Bei kompletter primärer Resektion liegt das 5-Jahres-Überleben bei 90 %, bei mikroskopischen Residuen um 80 %, bei makroskopischen Residuen um 70 %.<sup>7 8</sup> Ob ein Ansprechen des Patienten auf Induktions-Chemotherapie eine Verbesserung des Outcome bedeutet, ist fraglich.<sup>9,10</sup> Trotz verbessertem Verständnis der Biologie des RMS, ist die multimodale Therapie die derzeit beste Alternative.<sup>3</sup> Insgesamt bleibt die Prognose dieser Erkrankung ungünstig.<sup>11</sup>

Wie bei Neoplasien anderer Entitäten, zum Beispiel beim metastasierten Melanom, Prostata-, Ovarialtumoren, NSCLC und dem Glioblastom, subklinisch

und klinisch gezeigt, präsentiert sich die Immuntherapie als vielversprechende Alternative.<sup>12,13,14(p),15–17</sup> Erste Ansätze in der Immuntherapie des kindlichen RMS sind wenig wirksam, wobei die Daten derzeit noch limitiert sind.<sup>18,19</sup> Es konnte jedoch gezeigt werden, dass eine IL-12-Immuntherapie in Kombination mit IL-2 oder lokaler Bestrahlung *in vivo* und *in vitro* zu Tumorkontrolle des RMS führen können.<sup>20,21</sup>

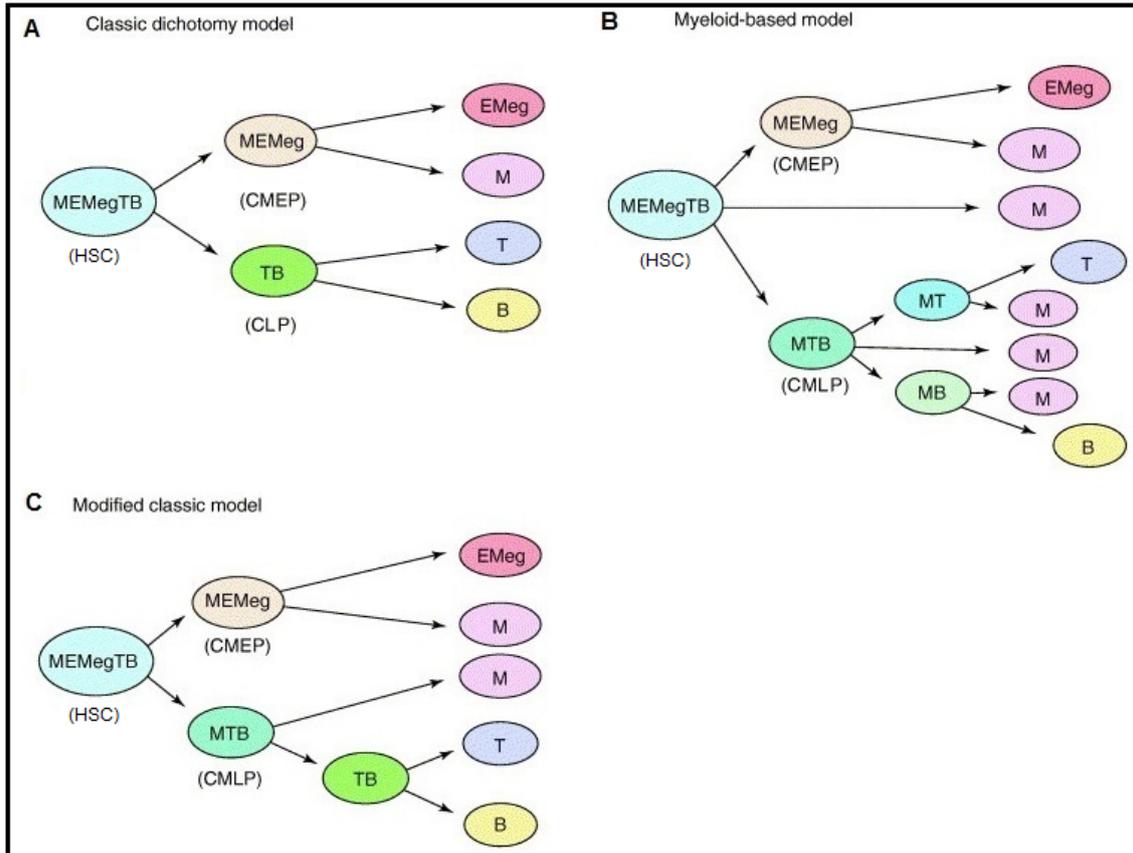
Die hier durchgeführte Arbeit zeigt und diskutiert das nach einer Kombinationstherapie aus Immuntherapie (NHS-IL12) und lokaler Radiatio ausgebildete Immunrepertoire an T-Lymphozyten und NK-Zellen.

## 1.2 Immunsystem, Tumorimmunologie und Krebsimmuntherapie

### 1.2.1 Hämatopoese und das zelluläre Immunsystem

Als Hämatopoese wird die Ausbildung der Zellen des menschlichen Blutes bezeichnet, ebenso die der Vorläuferzellen des zellulären Immunsystems. Ursprung all dieser Zellen und den ihnen vorangehenden Zelllinien ist die typischerweise CD34<sup>+</sup> hämatopoetische Stammzelle (HSC). Diese differenziert nach der klassisch dichotomen Vorstellung über Multipotente Progenitoren (MPPs) entweder zu Common Myeloid Progenitoren (CMPs/CMEPs) oder Common Lymphoid Progenitoren (CLPs) aus. Die CMPs sind Vorläufer sowohl für die Granulozyten Monozyten Progenitoren (GMPs), aus denen Granulozyten und Monozyten hervorgehen, als auch für die Megakaryozyten Erythrozyten Progenitoren (MEPs), aus denen sich Thrombozyten und Erythrozyten entwickeln. Common Lymphoid Progenitoren (CLPs) sind Vorläufer der T- und B-Lymphozyten sowie der natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). (s. Abb 1.1(A)). Neben diesem klassischen Modell der Hämatopoese nach Abramson (1977) wurden über die Jahre weitere vorgestellt und diskutiert. (s. Abb 1.1)

# Einleitung



**Abb. 1.1: Modelle der Hämatopoese.**

A: Klassisches Modell nach Abramson (1977). B: Myeloid-basiertes Modell nach Katsura und Kawamoto (2001). Auch nach einer ersten Aufspaltung der Population der HSC in eine lymphoide und myeloide Linie persistiert das myeloide Potential in der lymphoiden Linie. C: Modifiziertes klassisches Modell nach Jacobson (2005). Bereits auf Knochenmarkebene konnte ein gemeinsamer myeloidlymphoider Progenitor (CMLP) gefunden werden. Einordnung zwischen HSC und CLP. M: Myeloid. E: Erythroid. Meg: Megakaryoid. T: T-Lymphozyten. B: B-Lymphozyten. TB: T- u B-Zell-lymphoid. HSC: Hämatopoetische Stammzelle. C: Common L: Lymphoid. P: Progenitor. Übernommen von Kawamoto et al <sup>22</sup>.

Das zelluläre Immunsystem besteht neben den Lymphozyten aus neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten, Monozyten und Makrophagen, Mastzellen und dendritischen Zellen. Die Zellen der myeloiden Linie, sowie die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) sind Teil der angeborenen Immunantwort. Alle weiteren Zellen der lymphatischen Linie sind der adaptiven Immunantwort zuzuordnen. <sup>23</sup> Physiologisch eng mit dem zellulären Immunsystem verknüpft ist das humorale Immunsystem, bestehend aus Antikörpern, Komplementsystem und Interleukinen. Neben der Erkennung und Bekämpfung viraler, bakterieller oder parasitärer Infektionen von extrakorporal, ist dieses System auch dazu in der Lage entartete körpereigene Zellen zu detektieren und zu beeinflussen. <sup>24</sup> Die Lymphozyten lassen sich in vier Subpopulationen aufteilen: die B-Zellen, die

$\alpha\beta$  T-Zellen, die  $\gamma\delta$  T-Zellen und die NK-Zellen.

### 1.2.1.1 T-Lymphozyten, ihre Entwicklung und Funktion

T-Lymphozyten bilden T-Zell-Rezeptoren (TCR) aus entweder einer  $\alpha$ -Kette kombiniert mit einer  $\beta$ -Kette oder einer  $\gamma$ -Kette kombiniert mit einer  $\delta$ -Kette aus. Anhand dessen werden zwei T-Zelllinien unterschieden.

$\alpha\beta$  T-Zellen sind nach Aktivierung durch ihr spezifisches Antigen in ihren Effektorfunktionen als  $CD8^+$  zytotoxische T-Zellen (CTLs) oder als  $CD4^+$  T-Helfer-Zellen, die mit weiteren Leukozyten wie B-Lymphozyten oder Monozyten kommunizieren, Teil der adaptiven Immunantwort.  $\gamma\delta$  T-Zellen fungieren vornehmlich als Teil der primären Immunantwort. Sie machen den weitaus kleineren Anteil der insgesamt zirkulierenden T-Zellen aus.<sup>25-27</sup>

Bis die T-Zelle diese Funktionen als reifer, kompetenter T-Lymphozyt ausführen kann, durchläuft sie einen komplexen Entwicklungs- und Reifeprozess durch mehrere Kompartimente: Knochenmark, Thymus und sekundäre lymphatische Organe. Die Stadien dieses Prozesses lassen sich je nach Expression bestimmter Oberflächenmarker differenzieren. (s. Abb 1.2 (B))

Erster Progenitor des T-Lymphozyten ist die HSC im Knochenmark. Nach der weiteren Entwicklung zu MPPs lassen sich diese unter anderem anhand der Expression des Stammzellmarkers Fms-related tyrosine kinase (FLT3), auch CD135, weiter unterscheiden. Ist die CD135-Expression hochreguliert, ordnet man diesen MPPs ein lymphoides Potential zu. Es wird von lymphoid multipotent progenitors (LMPPs) gesprochen.<sup>28,29</sup> LMPPs differenzieren zu CLPs aus, dem Vorläufer der T- und B-Lymphozyten sowie der NK-Zellen. Im Gegensatz zu den CMPs ist diese Zelllinie  $CD127^+$ . LMPPs und CLPs verlassen das Knochenmark und gelangen als T-Zell-Vorläufer über die Blutbahn zum Thymus.<sup>28 30</sup>

Der Thymus ist ein primäres lymphatisches Organ und liegt im vorderen oberen Mediastinum. Er bietet durch ein Grundgerüst retikulär angeordneter Epithelzellen, dem Thymusstroma, und ein spezielles Zytokinprofil ein besonderes Milieu für die Entwicklung der hoch diversen und zugleich selbst-

toleranten T-Lymphozyten.<sup>31,32</sup> Die T-Zell-Vorläufer treten in der kortikomedullären Junktionszone aus postkapillären Venolen aus dem Gefäßsystem in den Thymus über. Von dort aus migrieren sie im Laufe ihrer Entwicklung zunächst in die subkapsuläre Zone, um schliesslich wieder zum Thymusmark zurückzukehren. (s. Abb.1.2 (A))<sup>33-35</sup>

Die T-Zellreifung findet im Thymus in zwei wesentlichen Phasen statt. Die frühe Phase, die in der subkapsulären Cortexzone des Thymus abläuft, lässt antigenunabhängig in einer ersten sogenannten  $\beta$ -Selektion T-Zellen-Vorläufer mit prä-TCR oder  $\gamma\delta$ -TCR proliferieren.<sup>36</sup> In der späten Phase, die in der Medulla des Thymus stattfindet, wird der durch Genumlagerung (Rearrangement) entstandene endgültige TCR Antigen-abhängig und MHC-restringiert zweifach geprüft: Durch Positiv- und Negativselektion. Dieser komplexe Reifeprozess mit drei Selektionspunkten, an denen über weitere Proliferation und Differenzierung oder Apoptose der Vorläuferzelle entschieden wird, gewährleistet zweierlei Eigenschaften des reifen T-Lymphozyten: Durch wiederholte Genumlagerung kann eine hohe Diversität des TCR erreicht werden. Durch Apoptose derjenigen Vorläuferzellen, welche zu stark autoreaktiv an Selbst-MHC-Antigene binden, entsteht Selbsttoleranz.<sup>37</sup> Lediglich 10-30 % der gebildeten TCR werden diesen Anforderungen gerecht.<sup>38</sup>

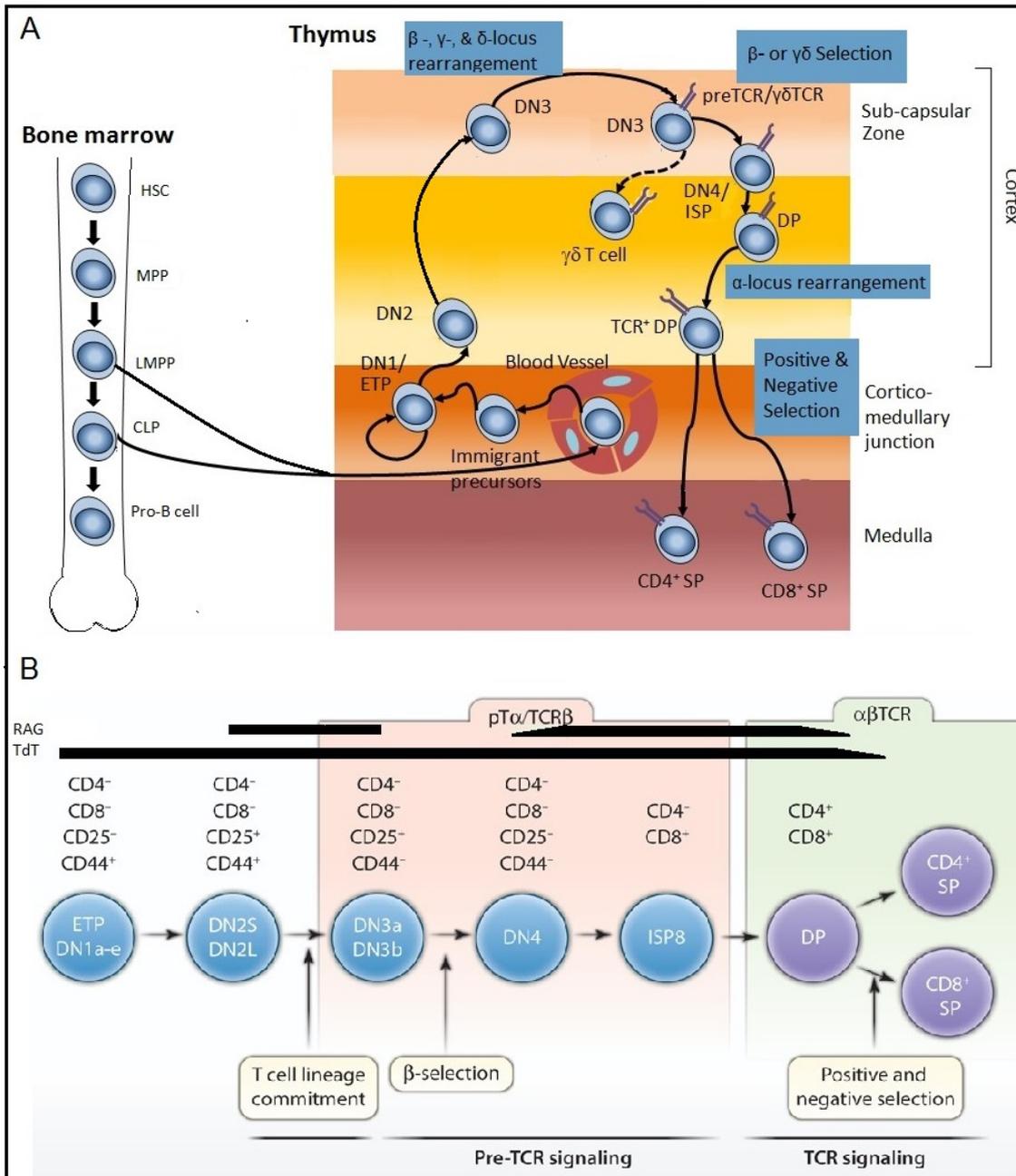
Tritt der T-Zell-Vorläufer in der kortikomedullären Junktionszone in den Thymus über ist er  $CD4^{neg}$  sowie  $CD8^{neg}$ , ergo doppelt negativ (DN). In diesem Abschnitt wird zur Verdeutlichung der CD-Evolution der T-Lymphozyten von  $CDx^{neg/pos}$  gesprochen, im weiteren Verlauf wird die sonst gebräuchliche Schreibweise  $CDx^{-/+}$  verwendet. Die zu T-Lymphozyten heranreifenden T-Zell-Vorläufer werden während ihrer Reifung im Thymus auch Thymozyten genannt. Die Fraktion der DN-Thymozyten wird weiterhin in 4 Subpopulationen aufgeteilt: DN1 bis DN4. Sie weist die größte Dynamik in Bezug auf Veränderungen der Oberflächenmarker auf.<sup>28</sup>(s. Abb. 1.2) DN1-Thymozyten, auch Early T-cell progenitors genannt (ETPs), differenzieren über die Expression von CD25 zu DN2-Thymozyten. Diese weisen noch sowohl ein T-lymphoides als auch ein myeloides Potential auf.<sup>28,39</sup> Während der Migration des Thymozyten gen subkortikaler Zone des Cortex, legt der DN3-Thymozyt dieses myeloide Potential ab, die CD44 Expression wird

herunterreguliert und es findet intensive Genumlagerung der  $\beta$ -,  $\gamma$ -, und  $\delta$ -Genloci statt. Die Zellen sind nun T-Zell-Linien restringiert (t-cell lineage commitment). Es wird diskutiert, ob dieses commitment intrathymisch Notch-Signal vermittelt ist, oder ob schon präthymisch T-Zelllinien-restringierte Progenitoren über Notch Überlebens- und Proliferationssignale erhalten. <sup>40-42</sup>

DN3-Thymozyten müssen in der subkapsulären Zone des Cortex der  $\beta$ -Selektion standhalten, um weiter zu reifen zu können. Hat der Thymozyt an diesem Punkt eine funktionsfähige  $\beta$ -Kette exprimiert, kann sich diese mit der invarianten prä- $\alpha$ -T-Zell-Kette (pT $\alpha$ ) zum präTCR verbinden und der Thymozyt so das Signal zur weiteren Differenzierung zu DN4/ISP-Thymozyten und zur Proliferation erhalten.

<sup>36</sup>So wie die DN2-Thymozyten Umlagerungen der  $\beta$ -Ketten erfahren, findet auch eine vielfache Umlagerung der  $\gamma$ - und  $\delta$ -Ketten statt, die bei den DN3-Thymozyten endgültige  $\gamma\delta$ -TCRs bilden. Werden diese selektiert, verlassen sie den Thymus schon an diesem Punkt als reife  $\gamma\delta$  T-Zellen.<sup>27,43</sup> Wenn auch abschließend ungeklärt wird derzeit die Theorie der Signalstärke (signal strength, signaling potential) als Erklärung dafür diskutiert, warum ein kleiner Anteil der Gesamthymozyten statt nach der  $\beta$ -Selektion über das Stadium der DN4/ISP und DP zu SP  $\alpha\beta$  T-Zellen zu differenzieren schon hier als TCR $\gamma\delta^{\text{pos}}$  Zellen selektiert wird. Demnach bildet der DN3-Thymozyt nach zeitgleichem Rearrangement der  $\beta$ -,  $\gamma$ -, und  $\delta$ -Genloci entweder einen präTCR oder einen definitiven TCR aus  $\gamma$ - und  $\delta$ -Ketten aus. Der  $\gamma\delta$  TCR vermittelt bei Aktivierung ein relativ starkes Signal, welches die entsprechenden Thymozyten proliferieren und den Thymus als reife naive  $\gamma\delta$  T-Zellen verlassen lässt. Der präTCR vermittelt ein relativ schwaches Signal, welches die entsprechenden Thymozyten proliferieren und zu DN4/ISP-Thymozyten differenzieren lässt. Die Signalstärke wird dabei durch Stabilität und Expressionsniveau des TCR-Komplexes bestimmt. <sup>44-46</sup>

# Einleitung



**Abb.1.2: T-Zellreifung im Thymus und Differenzierung der stadienassoziierten Oberflächenmarker.**

(A) Schematische Darstellung der T-Zellreifung und Thymozytenmigration zum und durch den Thymus. (B) Überblick zur stadienassoziierten Differenzierung der Thymozyten nach Oberflächenmarkern sowie Aktivitätsphasen der Gensegment umlagernden Enzyme RAG, TdT. CLP: Common lymphoid progenitor, DN: Double Negative, DP: Double Positive, ETP: Early t-cell progenitor, HSC: Hematopoetic stem cell, ISP: Immature single positive, LMPP: Lymphoid multipotent progenitor, MPP: Multipotent Progenitor, RAG: Recombination activation genes, SP: Single positive, TdT: Terminal deoxynucleotidyl Transferase, TCR: T-cell receptor. Übernommen und modifiziert nach Michael Litt et al (A), Elizabeth Fayard et al (B).<sup>28,47</sup>

Hat der Thymozyt bei funktionsfähigem präTCR das Signal zur Proliferation erhalten, beginnen im jetzt CD25<sup>neg</sup> DN4-Thymozyten die Umlagerungen des  $\alpha$ -Ketten-Genlocus. Über ein Stadium der immature CD8 single positive cells (ISP) differenzieren die T-Zell-Vorläufer zu CD4<sup>pos</sup> CD8<sup>pos</sup> doppelt positiven (DP) Thymozyten. Es finden nun intensive Umlagerungen des TCR $\alpha$ -Genlocus statt, bis eine Positivselektion des Thymozyten stattfindet, oder durch Neglekt die Apoptose eintritt.<sup>37,48</sup>

Vorwiegend in der Thymusmedulla finden die Positiv- und Negativselektion der DP-Thymozyten statt. Positiv selektiert werden jene Thymozyten deren TCR mit mittlerer Affinität (mit Co-Rezeptor CD4) Major Histocompatibility Complex II (MHC) oder (mit Co-Rezeptor CD8) MHC I erkennen. Wird der TCR des T-Zell-Vorläufers nicht durch einen MHC-Autoantigenkomplex aktiviert, wird die Apoptose des Thymozyten eingeleitet. Ebenso werden diejenigen DP Zellen exkludiert, welche im Rahmen der Negativ-Selektion mit zu großer Affinität an MHC-Autoantigenkomplexe binden. Von ihnen geht die Gefahr der Autoreaktivität aus. An diesen diffizilen Eliminationsprozessen sind neben den Thymusepithelzellen vor allem bei der Negativselektion professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC) des Knochenmarks beteiligt.<sup>37,38,49,50</sup>

Die positiv selektierten und bei der Negativselektion nicht deletierten Thymozyten differenzieren schließlich zu CD4<sup>pos</sup> oder CD8<sup>pos</sup> einfach positiven (SP) naiven  $\alpha\beta$  T-Zellen aus und verlassen den Thymus gen sekundäre lymphatische Organe.<sup>28</sup>

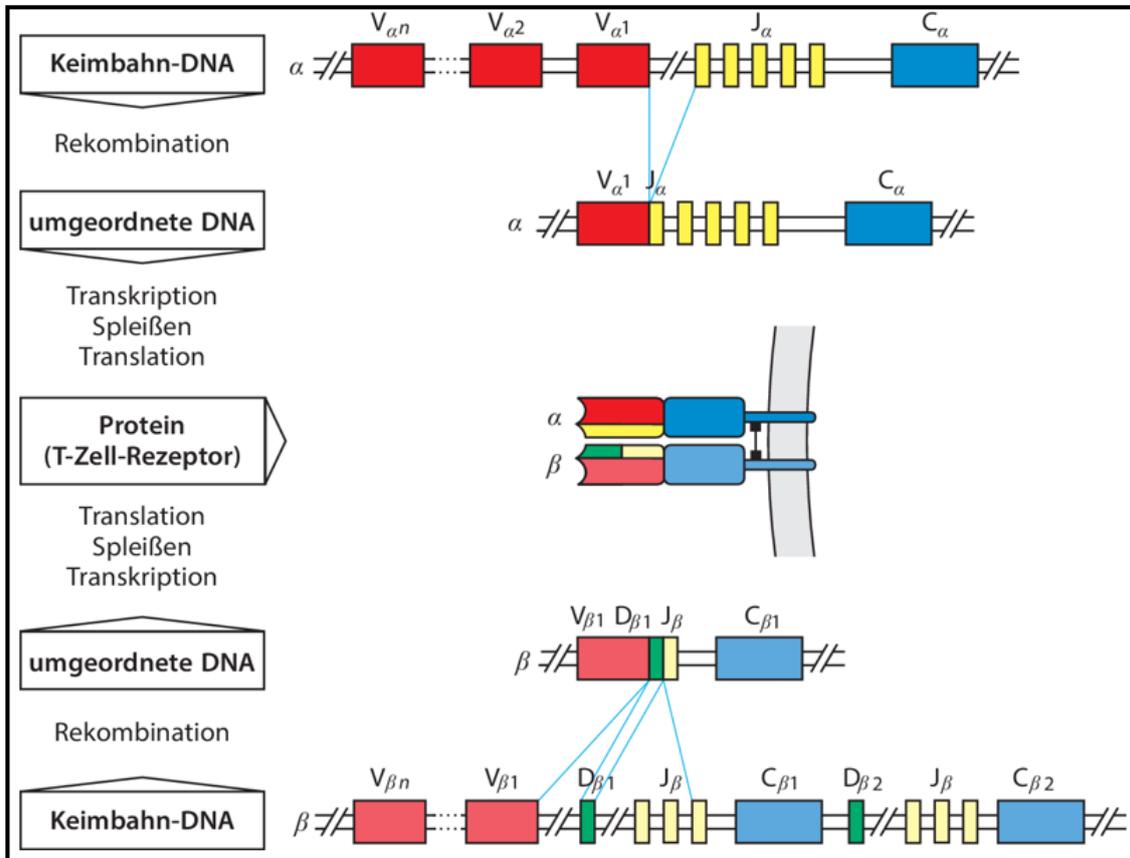
Um die besprochene hohe Rezeptordiversität zu erreichen, werden die TCR-Gen-Segmente mehrfach umgelagert:  $\beta$ -,  $\gamma$ -, und  $\delta$ -Genloci vor der  $\beta$ -Selektion, der  $\alpha$ -Genlocus im DP Stadium. Dieser Prozess wird auch T-Zell-Rezeptor-Gen Rearrangement genannt. Wesentlich an diesem Prozess beteiligte Enzyme sind der „Recombination Activation Genes“ (RAG-1/-2) Enzymkomplex sowie die Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT).<sup>51</sup> (s. Abb. 1.2. B)

Die Genloci ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) des TCR sind jeweils in Segmenten (V, D, J, C) organisiert. (s. Abb 1.3.) Die Segmente der VDJ-Region machen den variablen Anteil der finalen Kette aus. Die C-Region ist konstant.

Der TCR $\alpha$ -Genlocus ist in 70-80 V-Segmenten, 61 J-Segmenten und einem C-Segment, der  $\beta$ -Genlocus in 52 V-Segmenten und zwei getrennten Clustern mit je einem D-Segment und einem C-Segment und dazwischen gelagert einmal sechs und einmal sieben J-Segmenten organisiert.(s.Abb. 1.3.) Durch somatische Rekombination und Verbindung der einzelnen Segmente durch N- und P-Nukleotide entsteht je Genlocus ein funktionelles Exon. Die Gesamtvielfalt der so zufällig entstehenden TCR aus den transkribierten funktionellen Exonen des  $\alpha$ - und  $\beta$ -Lokus liegt bei  $\sim 10^{18}$  Varianten.<sup>38</sup> Die Genloci für  $\gamma$ - und  $\delta$ -Ketten sind ähnlich organisiert, wobei der Aufbau des  $\gamma$ -Genlocus mit dem des  $\beta$ -Genlocus vergleichbar ist, wenn auch ohne D-Segmente. Der TCR $\delta$ -Locus liegt innerhalb des TCR $\alpha$ -Locus zwischen den  $V_{\alpha}$ - und  $J_{\alpha}$ -Segmenten verstreut.  $\gamma$ -, und  $\delta$ -Locus codieren weniger V-Segmente als die homologen  $\alpha$ -, und  $\beta$ -Loci. [ $V_{\gamma} \times 12$ ], [ $J_{\gamma} \times 3$ ], [ $C_{\gamma 1}$ ], [ $J_{\gamma} \times 2$ ], [ $C_{\gamma 2}$ ] und [ $V_{\delta} \times 8$ ], [ $D_{\delta} \times 3$ ], [ $J_{\delta} \times 4$ ], [ $C_{\delta 1}$ ], [ $J_{\delta} \times 6$ ], [ $C_{\delta 2}$ ]. (Vgl.Abb. 1.3).<sup>52,53</sup> Eine weitere Besonderheit des TCR $\delta$ -Locus ist die Tatsache, dass fünf der  $V_{\delta}$ -Segmente mit denen des  $V_{\alpha}$ -Lokus identisch sind und für beide verwendet werden können.<sup>38,54</sup> Es wird angenommen, dass  $\gamma$ -, und  $\delta$ -Locus trotz der geringeren Segmentanzahl durch junktionale Variabilität und Organisation der drei  $D_{\delta}$ -Gensegmente vor zwei Clustern mit  $J_{\delta}$ -Segmenten TCR mit ähnlicher oder sogar größerer Gesamtvielfalt generieren.<sup>55</sup>

In Betrachtung der Tertiärstruktur des letztlich aus den besprochenen funktionellen Exons generierten TCRs lassen sich auf Proteinebene drei complementarity-defining regions (CDR) erkennen. CDR1 und CDR2 sind peripher, CDR3 im antigenbindenden Zentrum des TCR gelagert. Dieser Anordnung entsprechend sind die MHC-Molekül-bindenden CDR1 und CDR2 weniger variabel als die sogenannte hypervariable CDR3, welche das jeweils potentielle Antigen binden können muss. Die hohe Diversität dieser dritten CDR ist durch die große junktionale Variabilität im Bereich der V-, D- und J-Gensegmente bedingt sowie durch die zufällig häufige und beliebige Insertion von Nukleotiden zwischen die rearrangierte Variable Region und D Region durch die TdT. Die nichtkeimbahnkodierten N Nukleotide tragen wesentlich zur Diversität der TCRs bei. Kommt es im Zuge einer Immunantwort zur T-Zellaktivierung lässt sich deren TCR-Repertoire und mögliche klonale

Expansion mittels CDR3-Fragmentlängenanalyse (Spectratyping) abschätzen.  
52,56



**Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Genumlagerung der TCRα- und β-Genloci**  
Schema der V(D)J-Rekombination der TCRα- und β-Genloci und Prozessierung zum αβ-TCR.  
Übernommen aus Janeway Immunologie.<sup>54</sup>

### 1.2.1.1.1 $\alpha\beta$ T-Zellen

TCR $\alpha\beta^+$  Zellen machen mit 95 % den Großteil der zirkulierenden T-Lymphozyten aus. Ihr reifer Phänotyp ist entweder Corezeptor CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup>. Haben diese T-Zellen den Thymus verlassen, migrieren Sie als reife, naive Zellen in sekundäre lymphatische Organe. Binden Sie dort mit ihrem TCR an ihr komplementäres durch APC über MHC präsentiertes Antigen und erhalten sie die notwendige CD28 Costimulation, kommt es zur Aktivierung und Differenzierung.

$\alpha\beta$  T-Zellen differenzieren zu verschiedenen Subpopulationen unterschiedlicher Effektorzellen aus.

Das zum Zeitpunkt der Aktivierung der naiven T-Zelle vorherrschende Zytokinmilieu gibt vor, entlang welcher Effektorwege sich die T-Zellen differenzieren. Einen dieser Effektorwege eingeschlagen, zeichnet sich die ausdifferenzierte T-Effektor-Zelle durch ein individuelles Profil exprimierter Oberflächenmoleküle und sezernierter Zytokine aus. Innerhalb der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten lassen sich die Subpopulationen der T-Helfer-Zellen (T<sub>H</sub>), T<sub>H1</sub>, T<sub>H2</sub> und T<sub>H17</sub>, und regulatorischen T-Zellen (T<sub>reg</sub>) mit jeweils individuellen Effektorfunktionen unterscheiden. T<sub>H</sub>-Zellen werden über an MHC II gebundene Antigene beziehungsweise Antigenfragmente aktiviert.<sup>57</sup>

T<sub>H1</sub>-Zellen entstehen, wenn naive T-Lymphozyten in einem Milieu aktiviert werden, in dem IL-12 und IFN $\gamma$  vorherrschen. Sie wirken als Mediatoren einer zellulär vermittelten Immunantwort und proinflammatorisch. T<sub>H1</sub>-Zellen rekrutieren Makrophagen (über CXCL2, TNF $\alpha$  und LT- $\beta$ ), costimulieren diese bei bakteriellen intravesikulären Infektionen über IFN $\gamma$  und CD40-Ligand oder töten über Fas-Ligand (FasL) oder LT- $\alpha$  (TNF $\beta$ ) chronisch infizierte Makrophagen. Das, durch T<sub>H1</sub>-Zellen über den Transkriptionsfaktor T-bet vermittelt, in großen Mengen sezernierte IFN $\gamma$  (T-bet aktiviert auch die Rezeptorexpression von IL-12) bedingt MHC I- und MHC II-Induktion, NK-Zellaktivierung und T<sub>H2</sub>-Zellhemmung und ist in der Lage Virusreplikation zu supprimieren.<sup>58</sup> B-Zellen werden durch T<sub>H1</sub>-Zellen zur Synthese opsonisierender IgGs und zum Klassenwechsel angeregt; dies geschieht allerdings weniger stark als durch T<sub>H2</sub>-Zellen. Über IL-2

lösen T<sub>H</sub>1-Zellen T-Zellproliferation, über IL-3 und den Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF) gemeinsam mit T<sub>H</sub>2-Zellen die Synthese von Monozyten, Granulozyten und dendritischen Zellen (DCs) im Knochenmark aus. Permanente IL-12-Verfügbarkeit begünstigt auch nach primärer Aktivierung eine effiziente T<sub>H</sub>1-Antwort über weitere Proliferation und Differenzierung der T<sub>H</sub>1-Zellen.<sup>59,60</sup>

Das Entstehen von T<sub>H</sub>2-Zellen wird durch ein IL-4-dominiertes Zytokinmilieu begünstigt. Sie vermitteln eine humorale Immunantwort. Über die GATA-3 aktivierte Sekretion von IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13 und das Oberflächenmolekül CD40-Ligand werden B-Zellaktivierung, Isotopenwechsel (IgG und IgE), Hemmung der Makrophagenaktivierung sowie Mastzellwachstum vermittelt.<sup>61</sup> Das durch T<sub>H</sub>2-Zellen sezernierte IL-10 blockiert die Zytokinfreisetzung durch Makrophagen und hemmt T<sub>H</sub>1-Zellen.<sup>59</sup>

Die jüngst beschriebene Subpopulation der T<sub>H</sub>17-Zellen entwickelt sich in der Frühphase einer Infektion aus naiven T-Zellen, gewährleistet das Zytokinmilieu bei Aktivierung eine Stimulation durch IL-6, TGF- $\beta$ , allerdings nicht IL-12 und IL-4. Sie exprimieren den IL-23-Rezeptor, den Chemokinrezeptor CCR6 und den lineage marker CD161 und sezernieren IL-17 und IL-6, aber kein IFN $\gamma$ . So stimulieren T<sub>H</sub>17-Zellen eine akute Entzündungsreaktion und rekrutieren neutrophile Granulozyten zum Infektfokus. So wie T<sub>H</sub>1-Zellen eines permanenten IL-12-Angebots bedürfen, ist für T<sub>H</sub>17-Zellen IL-23 erforderlich, welches (gemeinsam mit IL-6 und TGF- $\beta$ ) den Transkriptionsfaktor ROR $\gamma$ t exprimieren lässt. ROR $\gamma$ t legt die Differenzierung der T-Zelle auf die T<sub>H</sub>17-Zelllinie fest und induziert CD161-Expression. Schlägt das Zytokinmilieu allerdings in ein IL-12- und IFN $\gamma$ -dominiertes um, kann es zur Repolarisierung naiver T<sub>H</sub>17-Zellen in T<sub>H</sub>1-Zellen kommen.<sup>62–65</sup>

Eine weitere Subpopulation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen sind die T<sub>reg</sub>-Zellen, welche überschießende Immunantworten sowie Autoimmunreaktionen verhindern. Diese subsumieren unter sich die natürlichen regulatorischen T-Zellen und die

heterogene Gruppe der adaptiven regulatorischen T-Zellen. Natürliche T<sub>reg</sub>-Zellen erfahren schon im Thymus eine Vorprägung. Sie bedürfen zur Ausbildung ihrer Effektorfunktionen eines TGF- $\beta$  dominierten Zytokinmilieus bei gleichzeitiger Pathogen-, IL-12, IL-6- und IFN $\gamma$ -Abwesenheit. Sie sind CD25<sup>+</sup>, exprimieren den Transkriptionsfaktor Foxp3, und supprimieren die T-Zellantwort über die Sekretion der inhibitorischen Zytokine TGF- $\beta$  und IL-10 und exprimierte Oberflächenmoleküle. Die adaptiven regulatorischen T-Zellen differenzieren sich in der Peripherie unter Einfluss von IL-10 aus naiven CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten. Untergruppen der adaptiven T<sub>reg</sub>-Zellen sind sogenannte T<sub>H3</sub>-Zellen sowie T<sub>R1</sub>-Zellen. Zuletzt wurden weitere beschrieben, welche über unterschiedliche Mechanismen supprimierende Effektorfunktionen ausüben. T<sub>H3</sub>-Zellen sind im Immunsystem der Mucosae zu finden und sezernieren IL-10, IL-4 und TGF- $\beta$ , worin sie sich von den T<sub>R1</sub>-Zellen entscheiden, welche kein IL-4 freisetzen.<sup>38,66,67</sup>

Naive CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten entwickeln sich bei Kontakt mit ihrem komplementären an MHC I gebundenen Antigen (Fremd- oder Eigenpeptid) und den nötigen Costimuli zu zytotoxischen T-Zellen (CTLs). Über mehrere Mechanismen sind CTLs effizient in der Lage bei infizierten und entarteten Zellen, sowie zur Beendigung einer Immunantwort bei aktivierten Lymphozyten, die Apoptose herbeizuführen. Auf Grund ihres immensen zytotoxischen Potenzials und zur Vermeidung von Kollateralschäden an körpereigenen Zellen, ist die CTL-Aktivierung aus CD8<sup>+</sup> T-Zellen komplexer organisiert als die der CD4<sup>+</sup> T-Zellen. APC selbst können in bestimmten Fällen (z.B. virusinfizierte APC) CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten über Costimulation (zur IL-2 vermittelten Autostimulation) aktivieren und ihre Differenzierung und Proliferation herbeiführen. Häufig aber bedarf es einer zusätzlichen Bindung einer CD4<sup>+</sup> T-Zellen über ein verwandtes MHC II präsentiertes Antigen an derselben APC um CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu aktivieren. APC werden über das CD40 Signal der CD4<sup>+</sup>-Zelle, stimuliert B7-Moleküle zu exprimieren, welche CD8<sup>+</sup> direkt costimulieren. Auch die zusätzliche IL-2-Sekretion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen trägt zur Aktivierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei.<sup>68</sup> Kommt es zur Aktivierung und Ausdifferenzierung einer CTL, sind ihre vielfältigen zytotoxischen Effektorfunktionen auf Grund präformierter zytotoxischer Granula

schnell verfügbar. Diese Granula beinhalten Perforin, Granzyme und Granulysin. Perforin scheint, nicht wie angenommen durch Porenbildung, sondern durch Komplexbildung die Zellmembran für Granzyme durchgängig zu machen, welche über Caspasen-Aktivierung Apoptose zu induzieren. Weitere Möglichkeiten der CTL Apoptose in Zielzellen auszulösen besteht, wie schon bei den  $T_{H1}$ -Zellen beschrieben, in der Expression des Fas-Liganden.  $LT-\alpha$ ,  $TNF-\alpha$ , können über den Tumornekrosefaktor-Rezeptor Typ 1 (TNFR-1) auf der Zielzelle apoptotisch wirken. Das CTL-sezernierte  $IFN\gamma$  hemmt Virusreplikation und rekrutiert und aktiviert gemeinsam mit  $TNF-\alpha$  Makrophagen.<sup>69-71</sup>

T-Effektorzellen der  $CD4^+$ - wie auch der  $CD8^+$ -Subpopulationen können Gedächtniszellen (memory cells) bilden: sogenannte  $CCR7^-$  Effektor-Gedächtniszellen ( $T_{EM}$ ). Im lymphatischen System ohne Antigenkontakt differenzierte  $CCR7^+$  Gedächtniszellen werden zentrale Gedächtniszellen ( $T_{CM}$ ) genannt. Beide Gruppen von Gedächtniszellen sind in sich in Bezug auf exprimierte Oberflächemoleküle heterogen. Wobei  $T_{CM}$  weder der  $T_{H1}$ - oder  $T_{H2}$ -Linie zugeordnet werden, entsprechen  $CCR5^+$   $T_{EM}$  in ihrem Chemokinrezeptorrepertoire  $T_{H1}$ -Zellen,  $CCR4^+$   $T_{EM}$  den  $T_{H2}$ -Zellen. Haben sich nach primärer adaptiver Immunantwort gegen ein bestimmtes Antigen  $T_{EM}$  gebildet (Immunität des Organismus), werden diese im Falle der sekundären oder weiteren Reaktion schnell reaktiviert, differenzieren und proliferieren erneut zu Effektorzellen und sezernieren  $IFN\gamma$ , IL-4 und IL-5. Es kommt zu keiner erneuten Aktivierung naiver T-Lymphozyten.<sup>38,72</sup>

Wie oben beschrieben interagieren T-Zellen auf unterschiedliche Weise mit Makrophagen. Auch für deren Aktivierung und Ausdifferenzierung sind das vorherrschende Zytokinmilieu und die dominierende Effektorzellen entscheidend. Myeloide Vorläufer, die Monozyten, wandern in periphere Gewebe ein und differenzieren dort zu Makrophagen aus. In ihrer Effektorfunktion setzen sie sich mit Pathogenen auseinander, modulieren als APC die adaptive Immunantwort, regulieren die Entzündungsreaktion und tragen zur Wundheilung bei<sup>73,74</sup>.

Nach dem klassischen Paradigma lassen sich zwei Makrophagen-Phänotypen

mit weiteren Subpopulationen unterscheiden: M1 und M2.<sup>75</sup>

Dominieren IFN $\gamma$ , Lipopolysachharide (LPS) und GM-CSF, polarisieren diese Makrophagen in Richtung des M1-Phänotyps. M1-Makrophagen sezernieren IL-1-beta, TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-18 und IL-23 und begünstigen so eine proinflammatorische T<sub>H</sub>1-Immunantwort.<sup>73</sup>

Die Polarisierung in Richtung des M2-Phänotyps kann in mehreren Immunkontexten ausgelöst werden und produziert eine Vielzahl heterogener M2-Untergruppen.<sup>76</sup> Auslösend für eine Aktivierung können Parasiten- oder Pilzinfektionen, der macrophage colony stimulating factor (MCSF), IL-4, IL-6, IL-10, IL-13 oder IL-1R sein. Typische Effektormoleküle von M2-Makrophagen sind IL-10 und TGF $\beta$ . So wird dieser Makrophagesubpopulation ein anti-inflammatorischer Einfluss in Richtung einer T<sub>H</sub>2-Immunantwort zugeschrieben.<sup>77</sup>

Neben Wundheilung und der Vermittlung allergischer Inflammation konnte auch gezeigt werden, dass M2-Makrophagen als Reservoir für bestimmte phagozytierte Pathogene fungieren und Tumorwachstum unterstützen.<sup>76,78</sup>

Zuletzt konnte gezeigt werden, dass Makrophagen *in vitro* dazu fähig sind ihre Polarisierung umzukehren und abhängig vom vorherrschenden Milieu zu M1- oder M2-Makrophagen zu repolarisieren.<sup>79</sup> Das bipolare Modell bildet vermutlich nicht die eigentliche Vielfalt des Differenzierungsspektrums der Makrophagen ab.<sup>74,80</sup>

Handelt es sich beim vorherrschenden Milieu um einen soliden Tumor, können infiltrierende Ly-6C<sup>high</sup> Monozyten zu sogenannten Tumor assoziierten Makrophagen (TAM) ausdifferenzieren.<sup>81</sup> TAMs subsumieren mehrere heterogene Makrophagesubpopulationen unter sich, wobei diese sich entsprechend des Zytokinprofils des tumor microenvironments differenzieren und sowohl einen M1- also auch M2-ähnlichen Phänotyp annehmen können.<sup>82</sup> M2-ähnliche TAMs vermitteln Tumorangio-genese, Stromastrukturierung und Immunsuppression und sind mit einer schlechten Prognose assoziiert.<sup>83</sup> Gelingt es, TAMs vorwiegend in Richtung des M1-ähnlichen Phänotyps zu (re-)polarisieren, ist dies mit einer besseren Prognose verbunden. M1-Makrophagen vermitteln eine tumorgerichtete T<sub>H</sub>1-Immunantwort und bedingen Tumorabstoßung.<sup>84</sup>

### 1.2.1.1.2 $\gamma\delta$ T-Zellen

$\gamma\delta$  T-Zellen unterscheiden sich phänotypisch (überwiegend  $CD4^-$  und  $CD8^-$  doppelt negative, nur 20 % der Fälle  $CD8^+$  Corezeptorexpression, Spezifität der TCRs ist weitgehend invariant durch idente TCRs, und erkennen stressregulierte Selbstantigene), in ihrem anatomischen Einsatzort sowie in ihrer Funktion von  $\alpha\beta$  T-Zellen. Etwa 1-10 % der im peripheren Blut detektierbaren  $CD3^+$  Zellen sind  $\gamma\delta$  T-Zellen. Die bisher bekannten Aufgabenfelder dieser T-Zelllinie liegen in der Immunregulation, Wundheilung, Tumorüberwachung und der Kommunikation zwischen angeborener (innate Immunity) und adaptiver Immunantwort (adaptive Immunity) als Innate like Lymphocytes (ILL).<sup>38,85,86</sup>

Neben der in Kapitel 1.2.2.1 und Abb.1.2 gezeigten thymischen Entwicklung der  $\gamma\delta$  T-Zellen wird eine intraepitheliale Entwicklung diskutiert. Hämatopoetische Vorläufer würden demnach direkt im mucosa-assoziierten lymphatischen System in crypto patches einwandern und dort zu  $TCRV\delta 1^+$  intraepithelialen Lymphozyten (IELs) reifen.<sup>85</sup>

$TCR\gamma\delta^+$  T-Zellen sind im Gegensatz zu  $TCR\alpha\beta^+$  Zellen nicht MHC-restringiert und weisen hauptsächlich einen  $CD4^-/CD8^-$ , doppelt negativen, Phänotyp auf, wobei eine geringe Fraktion der Zellen  $CD4^+$  oder  $CD8^+$  ist. In Bezug auf die Spezifität der  $\gamma\delta$ -TCR und die anatomische Nische lassen sich drei Subpopulationen innerhalb  $\gamma\delta$  T-Zellen unterscheiden: eine in der Peripherie zirkulierende Gruppe, welche  $TCRV\gamma 9$  und  $TCRV\delta 2$  koexprimiert, eine Gruppe welche intraepithelial angesiedelt ist und  $TCRV\delta 1$  mit einer variablen  $TCRV\gamma$ -Kette koexprimiert, und eine Gruppe, welche in der Leber und bei chronischen viralen Infekten vermehrt im Blut zu detektieren ist. Diese Gruppe bildet einen TCR aus einer  $TCRV\delta 3$ -Kette mit einer variablen  $TCRV\gamma$ -Kette.<sup>85,87</sup> Trotz der geringeren Anzahl rekombinierbarer Segmente im  $TCR\gamma$ - und  $TCR\delta$ -Genlocus im Vergleich zu  $TCR\alpha\beta^+$  Zellen ist vor allem bei der Gruppe  $V\gamma 9/V\delta 2$  T-Lymphozyten eine hohe Rezeptordiversität zu finden. Dies ist durch die große junktionale Variabilität dieser Loci zu erklären. (s. 1.2.2.1)

Die Effektorfunktionen der  $\gamma\delta$  T-Zellen sind sehr heterogen. In puncto

Zytokinresektion, zytotoxischem Potential und Immunregulation ähneln diese den  $\alpha\beta$  T-Zellen. Sowohl ein proinflammatorisches  $T_H1$ -Zellen-assoziiertes Zytokinprofil (IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$ ) als auch ein  $T_H2$ -Zellen-assoziiertes (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10) sind möglich.<sup>88,89</sup> In der Frühphase nach der Aktivierung werden vor allem die proinflammatorischen und Makrophagen-rekrutierenden Zytokine IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  sezerniert.<sup>86</sup>

$V_\gamma9/V_\delta2$  T-Lymphozyten werden bei bakteriellen, viralen und parasitären Infektionen aktiviert. Sie exprimieren die Chemokinrezeptoren CCR1 und CCR5 und können so schnell zum Infektionsort rekrutiert werden. Zusätzlich sind sie selbst dazu in der Lage, Chemokine wie RANTES und macrophage inflammatory protein (MIP) zu sezernieren.<sup>90,91</sup>  $V_\gamma9/V_\delta2$  T-Zellen können Perforin/Granzym-abhängig Apoptose induzieren, triggern die DC-Reifung, rekrutieren Makrophagen und unterstützen die B-Zell-Differenzierung und Isotopenwechsel. Wie auch  $V_\delta1$  T-Zellen exprimieren  $V_\gamma9/V_\delta2$  T-Lymphozyten den Fas-Liganden und können so Zielzellen lysieren.<sup>85,92</sup> Weiterhin sind  $V_\gamma9/V_\delta2$  T-Lymphozyten dazu in der Lage, als professionelle APC  $CD4^+$  oder  $CD8^+$   $\alpha\beta$  T-Zellen zu stimulieren. Nach Aktivierung und Entwicklung entlang dieses Effektorweges können sie Antigene prozessieren und präsentieren und exprimieren APC-ähnliche Muster costimulierender Oberflächenmoleküle (HLA-DR<sup>+</sup> (ein MHC II- Rezeptor), CD40<sup>+</sup>, CD80<sup>+</sup>, CD86<sup>+</sup>).<sup>93-95</sup>

Die Effektorfunktionen der TCR $V_\delta1$ -Subpopulation, Großteil der intraepitheliale Lymphozyten (IEL), liegen vor allem in der Regulation der Epithelhomöostase. Wundheilung und Fibrogenese werden über die Sekretion von keratinocyte growth factor (KGF), Insuline-like growth factor 1 (IGF-1), Fibroblast growth factor 9 (FGF-9) und connective tissue growth factor (CTGF) vermittelt. Maligne oder infizierte Epithelzellen, welche Selbst- oder Fremd-Antigen präsentieren, werden durch IEL detektiert und Perforin/Granzym-abhängig oder über den Fas-Liganden vernichtet. Über die Sekretion von antimicrobial peptides (AMP) sind IEL antimikrobiell wirksam, können über den Chemokinrezeptor CCR6 chemotaktisch zu einem Infektfokus rekrutiert werden und wirken über die Sekretion von TGF- $\beta$  immunregulatorisch.<sup>96,97</sup>

Kommt es zur Aktivierung von  $V_\delta3$  T-Zellen, können diese HLA-DR, CD56,

CD161 und NKG2D exprimieren. Unter IL-2 Stimulation sind sie in der Lage  $T_H1$ ,  $T_H2$  und  $T_H17$  ähnliche Zytokinprofile zu sezernieren und APC-Zellen zu stimulieren.<sup>85,87</sup>

Da  $TCR\gamma\delta^+$  T-Zellen nicht wie  $TCR\alpha\beta^+$  Zellen MHC-restringiert mit Corezeptor CD4 (MHC II) oder CD8 (MHC I) Antigene binden, werden mehrere MHC-unabhängige Wege der Antigenerkennung diskutiert.

So erkennen  $V\gamma9/V\delta2$  T-Zellen Phosphoantigene, Metabolite des Mevalonat-Stoffwechsels pathogener Bakterien, jedoch nicht direkt sondern durch phosphoantigenmedierte Konformationsänderung der Liganden BTN3A1.<sup>98</sup>

$V\delta1$ -T-Zellen können MHC I verwandte Moleküle (MICA/MICB) binden, welche stressinduziert von Epithelzellen exprimiert werden. MICA ist auch Ligand des auf NK-Zellen,  $\gamma\delta$  T-Zellen und  $\alpha\beta$  T-Zellen zu findenden aktivierenden NKG2D-Rezeptors. NKG2D-Liganden wie MICA und das ebenfalls MHC I verwandte UL16-Binding Protein (ULBP) werden häufig auf neoplastischen Zellen exprimiert, was den NKG2D-Rezeptor zu einem wichtigen Werkzeug zur Tumorerkennung und -kontrolle macht. Auch CD1-Antigene und Hitzeschokproteine (HSP) können von  $\gamma\delta$  T-Zellen erkannt werden.<sup>99</sup>

<sup>92(p1),100,101,102(p2),103</sup>

Insgesamt scheint die Antigenerkennung durch  $\gamma\delta$  T-Zellen damit polyspezifisch zu sein, maßgeblich durch Erkennung von stressregulierten Selbstantigenen geprägt und vom Charakter her eher regulierend im Bezug auf Induktion und Gestaltung der adaptiven Immunantwort.<sup>58 99</sup>

Das Potenzial der  $\gamma\delta$  T-Zelllinie in der Tumorüberwachung konnte in mehreren Kontexten gezeigt werden. So wirken  $\gamma\delta$  T-Zellen *in vitro* zytotoxisch gegenüber Kolon-, Nierenzell- und Pankreaskarzinomen sowie auch bei Plasmozytomen, Lymphomen, Leukämien und dem Neuroblastom.<sup>104 105–107</sup>

Nach Pamidronatgabe konnte auch bei bestimmten Osteosarkom- und Myelomlinien sowie bei Lungen-, Blasen- und Nierentumoren  $\gamma\delta$  T-Zell induzierte Zytotoxizität festgestellt werden.<sup>108</sup>

$\gamma\delta$  T-Zellen sezernieren eine Vielzahl an Zytokinen und exprimieren

Oberflächenmoleküle, welche auf den Tumor und sein Microenvironment einwirken. <sup>109</sup> IFN $\gamma$  nimmt dabei eine zentrale Rolle ein, indem es neben der Makrophagenrekrutierung und –aktivierung Tumorzellen direkt in ihrem Wachstum hemmt und deren Angiogenese behindert. <sup>85</sup>

### 1.2.1.2 NK-Zellen, ihre Entwicklung und Funktion

NK-Zellen bilden keine durch Genumlagerung entstandenen antigenspezifischen Rezeptoren wie die T- und B-Lymphozyten und werden deshalb dem angeborenen Immunsystem zugeordnet. Hier aber nehmen sie eine differenzierte Position mit elaborierten Erkennungsmechanismen von Fremd und Eigen ein. <sup>110–112</sup> Wenn auch phylogenetisch älter und vermeintlich rudimentärer als T- und B-Zellen, sind NK-Zellen entscheidend an der immunologischen Kontrolle von Infektionen und Neoplasien beteiligt. <sup>113,114</sup> Nach Aktivierung sezernieren NK-Zellen innerhalb kurzer Zeit große Mengen IFN $\gamma$  und lysieren entartete oder infizierte Zellen, ähnlich den CD8<sup>+</sup> CTL, über die Freisetzung zytotoxischer Granula.

NK-Zellen entwickeln sich von der CD34<sup>+</sup> HSC ausgehend über einen gemeinsamen Progenitor mit T-, B-Zellen und DCs, dem CLP, zur reifen NK-Zelle. <sup>115</sup> (s. 1.2.1) Neben dem Knochenmark scheinen auch sekundäre lymphatische Organe wie das gut associated lymphatic tissue (GALT) Stationen des Reifungsprozess der NK-Zellen zu sein. <sup>116</sup>

NK-Zellen präsentieren sich in zwei wesentlichen phänotypischen Subpopulationen. CD56<sup>bright</sup> Zellen mit der Fähigkeit zur Zytokinsekretion, nicht aber zur Zytolyse, machen in sekundären lymphatischen Geweben (SLT) den Großteil der NK-Zellen aus. Im Blut sind vor allem CD56<sup>dim</sup> Zellen zu finden, welche auch zur spontanen Zytolyse von Zielzellen in der Lage sind. Es wird diskutiert, ob sich CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen in SLT zu CD56<sup>dim</sup> ausdifferenzieren. <sup>117,118(p56)</sup>

Der phänotypische Prototyp der NK-Zellen ist CD3<sup>neg</sup>CD56<sup>+</sup> NKp46<sup>+</sup>. Wie bei den T-Zellen sind verschiedene phänotypische und funktionelle Ausdifferenzierungen

möglich, wie unter anderem an CD56- und CD16-Expression zu sehen. <sup>113,119</sup>

Um aktiviert zu werden, benötigen die NK-Zellen ein Zytokinmilieu dominiert durch Interferone und Zytokine der Makrophagen (IFN $\alpha$ , IFN $\beta$  und den NK-Zell aktivierenden Faktor IL-12). Ist IL-12 permanent verfügbar, fällt die NK-Zell-Antwort um ein vielfaches verstärkt aus. Um große Mengen IFN $\gamma$  sezernieren zu können, bedarf es der Stimulation der CD56<sup>bright</sup> NK-Zelle durch IL-12 in Kombination mit einem weiteren Stimulus wie IL-2, IL-15 oder IL-18 oder über einen aktivierenden NK-Zell-Rezeptor wie NKG2D. Ähnlich den Aktivierungsmechanismen der CTLs, müssen mehrere Bedingungen erfüllt sein, damit eine CD56<sup>dim</sup> NK-Zelle ihr immenses zytotoxisches Potential ausüben kann. Neben der Abwesenheit inhibierender MHC I-Moleküle, ist das Gesamtequilibrium aktivierender und inhibierender Signale an einer NK-Zelle für ihre Aktivierung entscheidend. <sup>113,120,121</sup>

Diese Signale werden über verschiedene Rezeptoren heterogener Gruppen transduziert. Innerhalb dieser Gruppen gibt es sowohl inhibitorische als auch aktivierende Rezeptoren, wobei das Zusammenspiel aller noch nicht verstanden worden ist.

Zur Erkennung von untypischen MHC Ib-Komplexen (HLA-E) nutzt die NK-Zelle ein Heterodimer aus CD94 und einem NKG2-Molekül. Diese beiden entstammen dem sogenannten NK-Rezeptorkomplex (NKC) Gencluster, welcher Gene für sogenannte Killerzellen-лектinähnliche-Rezeptoren (KLR) beinhaltet. Zu den KLR wird auch der aktivierende Rezeptor NKR-P1A (CD161) gezählt. Im zweiten großen Cluster, dem Leukozytenrezeptorenkomplex (LRC), liegen unter anderem Gene für die Killerzellen-immunglobulinähnlichen-Rezeptoren (KIR), welche typische MHC Ia-Komplexe (HLA-A, HLA-B, HLA-C) erkennen, und solche für den natürlichen Zytotoxizitätsrezeptor (NCR) NKp46. Die weiteren NCR-Gene NKp30 und NKp44 sind im HLA-Komplex codiert. Das aktivierende Molekül DNAM-1 (CD226) gehört wie auch die KIR zur Immunglobulin-Superfamilie. <sup>38,122</sup> Wichtige inhibierende Rezeptoren sind die MHC Ia und MHC Ib erkennenden KIR-DL-Rezeptoren und die Heterodimere CD94/NKG2A oder CD94/NKG2C, welche bei Bindung eine Aktivierung der NK-Zelle verhindern. <sup>123</sup>

Nach der missing-self theory, werden NK-Zellen, dann aktiviert, wenn Zielzellen nicht mehr in der Lage sind, durch Infektion oder Entartung, die Liganden für diese inhibierenden Rezeptoren zu exprimieren. Ergänzend erläutert die induced-self theory, dass beschädigte Zellen Liganden exprimieren, welche von aktivierenden Rezeptoren der NK-Zellen erkannt werden.<sup>113,121,124,125</sup> Letztlich entscheidend für die NK-Zell-Aktivierung oder –Inhibierung ist das Gleichgewicht aktivierender und inhibierender Signale.<sup>126</sup>

Wichtige aktivierende NK-Zell-Rezeptoren sind die NCRs NKp30, NKp44 und NKp46, sowie die KLR NKG2D und NKG2E.<sup>127</sup> Während die Liganden für die NCR weitestgehend unbekannt sind, bindet der auch auf Makrophagen und  $\gamma\delta$  T-Zellen sowie CTL vorhandene NKG2D stressinduziert exprimierte MHC I-ähnliche Moleküle.<sup>103</sup> (s.1.2.2.1.2). CD226 vermittelt nach Bindung von CD112 oder CD155 ein aktivierendes Signal<sup>128</sup>. CD16, ein in großem Maße auf CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen exprimierter FcIIIa-Rezeptor, bindet den Fc-Teil obsonisierender IgG-Antikörper.<sup>129</sup> Ein weiterer aktivierender NK-Zell-Rezeptor ist der NKR-P1A (CD161) aus der Gruppe der KLR, welcher an zelleigene non-MHC Moleküle (Lectin-like transcript 1, LLT-1) bindet. Er scheint für die Aktivierung und Induktion von NK-Zell-Zytotoxizität eine Rolle zu spielen.<sup>123,130</sup> NKR-P1A findet sich als lineage-marker auch auf T<sub>H</sub>17-Lymphozyten.<sup>65</sup>

Sind NK-Zellen einmal aktiviert, sind sie innerhalb von Minuten dazu in der Lage, massiv zur Immunantwort beizutragen. Weder Vorstimulation noch Proliferation sind nötig, damit NK-Zellen ihre zytolytische und immunmodulatorische Wirkung entfalten können. Effektormoleküle sind in präformierten Vesikeln gespeichert (Ready-to-go-state).<sup>126</sup>

Ihre zytolytische Effektorfunktion üben NK-Zellen, ähnlich den CD8<sup>+</sup> CTLs, über Freisetzung von Granzym und Perforin enthaltende Granula sowie über die Expression des Fas-Liganden aus. Immunmodulatorisch wirken aktivierte NK-Zellen über die schnelle Sekretion großer Mengen IFN $\gamma$ , welches in der Lage ist das Immunsystem in Richtung einer proinflammatorischen T<sub>H</sub>1-Antwort zu polarisieren. Zu dieser Polarisierung trägt bei, dass aktivierte CXCR3<sup>+</sup> NK-Zellen in Lymphknoten einwandern und so über IFN $\gamma$ -Sekretion das Priming von T<sub>H</sub>1-Lymphozyten begünstigen. T<sub>H</sub>1-Zellen wiederum rekrutieren und aktivieren

Makrophagen über Sekretion von GM-CSF und TNF- $\alpha$ . IFN $\gamma$  sorgt außerdem für die Hochregulation von MHC I und MHC II, was nicht-beschädigte Zellen vor der NK-Zell vermittelten Zytolyse schützt.<sup>38,114,120,131</sup> Insgesamt überbrücken die NK-Zellen innate und adaptive Immunantwort, indem sie früh und polyspezifisch aktiviert werden können, das Immunsystem in Richtung T<sub>H</sub>1-Antwort polarisieren und komplementär zu den CTL die Zellen lysieren, welche keine MHC-I-Moleküle exprimieren.<sup>113</sup>

Wenn auch derzeit noch nicht ausreichend verstanden, bieten NK-Zellen über ihre polyspezifischen Erkennungsmechanismen ein großes Potential zur Tumorüberwachung und –kontrolle sowie für das Verständnis von Tumorevasion. So konnte gezeigt werden, dass chemisch induzierte Fibrosarkome unter IL-12 Therapie über den NKG2D-Pathway verhindert werden können und, dass im weiteren Verlauf dieses Pathways TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  eine wichtige Rolle spielen.<sup>113,132</sup> Dass NKG2D eine wichtige Rolle in der Tumorüberwachung einnimmt, lässt sich auch an der Vielfalt der Mechanismen erkennen, mit denen Tumore der Erkennung durch NKG2D zu entgehen versuchen. So setzt ein Mechanismus der Immunescape die Immunantwort über zwei Pathways herab: Epitheliale Tumore sind dazu fähig mit MICA/MICB

NKG2D-Liganden zu sezernieren (sogenanntes Antigenshedding). Einerseits kommt es so zu einer Herunterregulation der NKG2D-Expression durch adaptive T-Zellen und innate NK-Zellen, welche diese tumorsezernierten Antigene binden. Andererseits stimulieren die sezernierten NKG2D-Liganden NKG2D<sup>+</sup> immunsupprimierende T-Zellen, welche die Immunantwort über TGF- $\beta$ -Sekretion eindämmen.<sup>113,133,134(p30)</sup>

Auch über CD226 vermittelte Adhäsion und Aktivierung konnte *in vitro* bei mehreren Tumorzelllinien (metastasiertes Neuroblastom, hämatopetische und epitheliale Tumorentitäten) NK-Zell und CTL vermittelt Tumorkontrolle über Zytolyse erreicht werden.<sup>135–138</sup> Nachdem der murine CD226-Ligand (Tage-4) gefunden worden war, konnte auch *in vivo* CD226 vermittelte Tumorabstoßung gezeigt werden, sofern die Tumorzellen Tage-4<sup>+</sup> waren.<sup>135,139</sup>

Eine weitere antitumoröse Wirkung der NK-Zellen wird über deren Oberflächenmarker CD16 vermittelt. Bindet CD16 an den F<sub>c</sub>-Teil eines tumorzell-

opsonisierenden Antikörpers kommt es zur Perforin/Granzym abhängigen sogenannten antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). Es konnte gezeigt werden, dass NK-Zell-vermittelte ADCC eine wichtige Komponente der *in vivo* Antitumoraktivität gegen Rituximab- und Trastuzumabbehandelte Lymphom- und Mammakarzinomzellen ist.<sup>129,131</sup>

Die Rolle der NK-Zellen als Antitumor-Effektorzellen konnte eindrücklich durch Velardi et al gezeigt werden.<sup>140</sup> So wurden nach vorangegangenen Experimenten in murinen Modellen Patienten mit Akuter Myeloischer Leukämie (AML) bewusst mit haploidenten T-Zell-depletierten Stammzellen transplantiert. Es konnte ein für das Patientenüberleben signifikanter NK-Zell vermittelter Graft-versus-Leukämie-Effekt festgestellt werden.<sup>140</sup> Zurückgeführt wurde dieser auf das Mismatch der Empfänger-MHC I-Moleküle und des Spenders inhibitorischer KIRs.<sup>141</sup> Wie oben besprochen waren an diesen Prozessen notwendigerweise auch NCR, NKG2D und weitere aktivierende Rezeptoren beteiligt.<sup>121,142</sup> Interessanterweise wurden bei diesen Fällen kaum oder keine Graft-versus-Host-Diseases (GVHD) festgestellt, was neben der geringen transplantierten T-Zell-Menge unter anderem durch die Tötung der Empfänger DCs durch Donatoren-NK-Zellen das ausbleibende T-Zell-Priming begründet werden kann.<sup>143</sup>

### 1.2.2 Tumorimmunologie und Krebsimmuntherapie

Das Immunsystem ist eine gut organisierte Kriegsmaschine, die wie oben beschrieben über eine Vielzahl von angeborenen und adaptiven Mechanismen dazu in der Lage ist, neben Pathogeneradizierung auch Tumorabstoßung und -regression zu vermitteln.<sup>144</sup> Können Tumorzellen diesen Mechanismen über Immunoediting entgehen, kann der Tumor nicht mehr kontrolliert werden. Ein zunehmend besseres Verständnis dieser Evasionsstrategien und molekularbiologische Techniken haben zur Entwicklung aussichtsreicher multimodaler Krebsimmuntherapien geführt.

Das erste Konzept zum Verständnis der Immunogenität von Tumoren und der

Antitumorwirkung des Immunsystems war die Immunsurveillance-Hypothese nach Burnet und Thomas.<sup>145,146</sup> Es gelang jedoch nicht diese Hypothese mit Daten zu untermauern. Das Gebiet wurde zunächst verlassen. Später zeigten Versuche mit Knock-out-Mäusen jedoch, dass ein Wirt mit defizienten NK-Zellen,  $\alpha\beta$  oder  $\gamma\delta$  T-Zellen, IL-12, Perforin oder IFN $\gamma$  eine höhere Anfälligkeit zeigt, Tumore zu entwickeln.<sup>147–150</sup> Das Modell der Immunsurveillance wurde wieder aufgegriffen und konnte über Erkenntnisse aus Studien mit nach Transplantationen immunsupprimierten Patienten auf den Menschen übertragen werden.<sup>151</sup> Im Wissen, dass sich Tumore trotz Immunsurveillance auch in immunkompetenten Individuen bilden, wurde das Konzept um die sogenannten „Three Es“ des Immunoediting erweitert (Elimination, Equilibrium und Escape). Tumore und Immunsystem prägen einander. Das Immunsystem detektiert und zerstört Tumorzellen, die Tumorantigene präsentieren (**E**limination). Selektionsdruck und genetische Instabilität lassen Tumorzellen entstehen und überleben, die nicht detektierbar sind, das Immunsystem supprimieren oder andere Wege finden, dem Immunsystem zu entgehen (**E**quilibrium). Die Tumorimmunogenität nimmt ab. Die Evasionsmechanismen des Tumors nehmen zu. Der so durch das Immunsystem geformte Tumor (und vice versa) kann nicht mehr kontrolliert werden und breitet sich aus (**E**scape).<sup>145,152</sup> (s. Abbildung 1.4)

Diese Vorgänge laufen ab im Tumormicroenvironment (TME) bestehend aus Tumorzellen, Immunzellen, Gefäßen, Fibroblasten, Extrazellulärmatrix (EZM) und Signalmolekülen. Das tumorinfiltrierende Immunkompartiment wird Immuncontexture genannt und ist charakterisiert durch dessen Lokalisation, Dichte, Organisation und funktionelle Orientierung.<sup>153</sup> Die Zusammensetzung von intratumoralen Immunkompartiment und TME sind von entscheidender Bedeutung für das klinische Outcome des Tumorpatienten. Sie bieten Angriffspunkte und Marker für eine effiziente multimodale Krebsimmuntherapie.<sup>154</sup> So konnte durch Galon gezeigt werden, dass die Präsenz von Markern einer T<sub>H</sub>1-Polarisierung (z.B. IFN $\gamma$  und T-bet) und CTLs im tumorinfiltrierenden Immunkompartiment statistisch mit einer besseren Prognose für Patienten mit kolorektalem Karzinom (CRC) korreliert sind. Im Vergleich zur UICC-TNM-

Klassifikation für das CRC wiesen Typ, Dichte und Lokalisation von Immunzellen einen höheren prognostischen Wert auf, was die Forderung nach Implementierung des Immunoscores als Teil des Tumorstaging nach sich zog.<sup>24,154,155</sup> Fridman et al. konnten diese Erkenntnisse auf Tumore weiterer Entitäten übertragen (u.a. der Ovarien, Blase, Brust, Prostata und der Kopf-Hals-Region).<sup>154</sup>

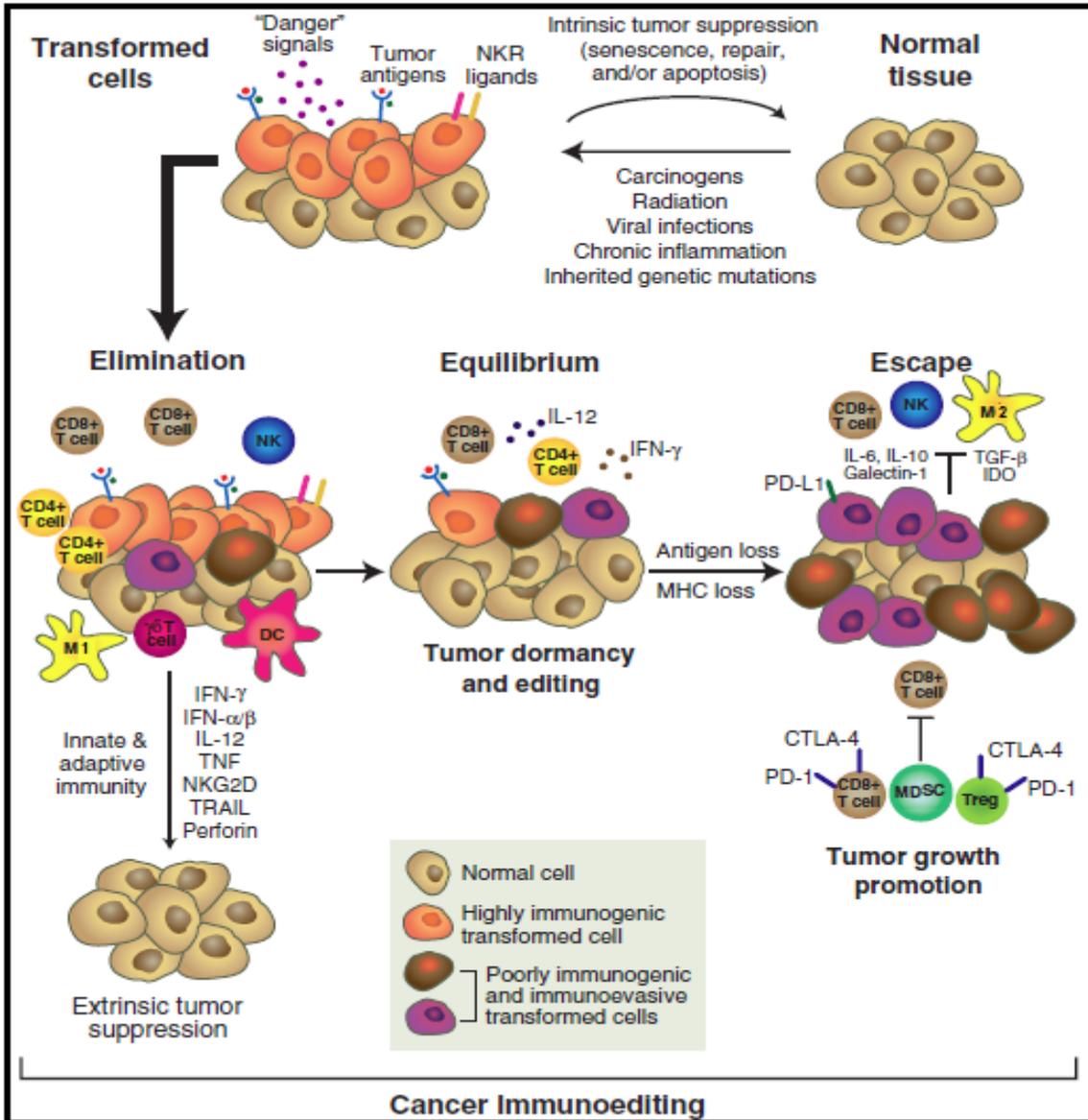
Während der Karzinogenese durchläuft das tumorinfiltrierende Immunkompartiment durch Immunoediting eine Veränderung – von einer tumorverhindernden zu einer tumorfördernden Wirkung.<sup>156</sup>

In der prämaligen Phase eines Tumors dominiert eine T<sub>H</sub>1-polarisierte proinflammatorische Immunantwort. Angeborene und adaptive Mechanismen kontrollieren gemeinsam den Tumor. Tumorantigene induzieren klonale Expansion der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, Stresssignale (z.B. MICA, MICB) entarteter Zellen aktivieren Zellen der angeborenen Immunität wie NK-Zellen über NKG2D und es finden sich infiltrierende  $\gamma\delta$  T-Zellen. Tumorzellen werden über IFN $\gamma$  und TNF- $\alpha$  in ihrem Zellzyklus arretiert und über CTLs lysiert. Deren Sekretion wird über das vorherrschende IL-12 vermittelt, welches von M1-Makrophagen sezerniert wird.<sup>24,144,157</sup> CTLs werden als Haupt-Antitumor Immunzelle angesehen, vor allem wenn sie mit hoher Affinität MHC I-präsentierte Tumorantigene erkennen und Tumorzellen über Perforin und Granzym B lysieren können.<sup>155,158,159</sup> Jenseits dieser rabinischen Methode liegt die Antitumorrelevanz der CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>1-Zelle in ihrer Fähigkeit, IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  vermittelt Zellzyklusarrest und Seneszenz in Tumorzellen zu induzieren.<sup>21,160–163</sup> (s. Abb 1.4) T-Zell-Priming und -Differenzierung finden nach Fridman et al. in lokalen Lymphknoten und den Tertiary lymphoid structures (TLS) des TME statt. Die Dichte der TLS und darin vorhandene reife DCs sind mit einer guten Prognose in NSCLC assoziiert.<sup>24,164</sup> Können in dieser Phase nicht alle neoplastischen Zellen eliminiert werden, stellt sich die Phase des Equilibriums ein. Vor allem die Zellen der adaptiven Immunität (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>) und Zytokine wie IL-12 und IFN $\gamma$  halten den Tumor in Schach, liefern gleichzeitig aber den Selektionsdruck, welcher bei zunehmender genetischer Instabilität Tumorzellen

entstehen und überleben lässt, die nicht mehr kontrolliert werden können und immunevasiv werden.<sup>144,165</sup> (s. Abbildung 1.4) Der Tumor entzieht sich über mannigfaltige Escapemechanismen dem Kontrollapparat Immunsystem und beginnt diesen für sich selbst zu nutzen (hijacking of host physiological processes).<sup>145,155,166,167</sup> (s. Abb 1.4 und 1.5)

Der Übergang eines prämaligen in-situ Tumors hin zum invasiven Wachstum ist gekennzeichnet durch den Switch von einer  $T_H1/M1$ -dominierten zu einer nicht- $T_H1$ -geprägten (meist durch  $T_H2$ ) und von M2-Makrophagen beeinflussten Immunlandschaft im TME. Das lokale Zytokinmilieu verschiebt sich. Zytotoxische Antitumoraktivität vermittelnde Zytokine wie IL-12, IFN $\gamma$  und TNF- $\alpha$  nehmen ab, immunsupprimierende und tumorfördernde wie IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, IL-13 TGF- $\beta$ , Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO), VEGF nehmen zu. (s. Abb 1.4 und 1.5A) An diesem Switch scheint wesentlich die durch den Tumor an sich oder externe Faktoren (virale Infektion, z.B. EBV) verursachte chronische Inflammation beteiligt zu sein, welche das intratumorale Immunkompartiment hin zur Vermittlung von Gewebemöiostase und in eine das Tumorstwachstum fördernde Richtung polarisiert.<sup>24,155,156,168–170</sup>

Es entstehen und überleben Tumorzellen mit geringer Immunogenität (Verlust von MHC-Molekülen und Tumorantigenen). Tumorzytokine rekrutieren supprimierende myeloide Zellen (MDSCs) und  $T_{reg}$  in das TME. Tumorzellen exprimieren Liganden für supprimierende T-Zell-Rezeptoren PD-1 und CTLA-4. NK-Zellen werden anerg durch Herunterregulation aktivierender Rezeptoren wie NKp30 und CD226. VEGF vermittelt Tumorangiogenese und im Zusammenspiel mit IL-6 Inhibition der DC-Reifung sowie Beförderung der Makrophagenreifung (M2-Phänotyp) aus Monozyten.<sup>24,144,171–175</sup>

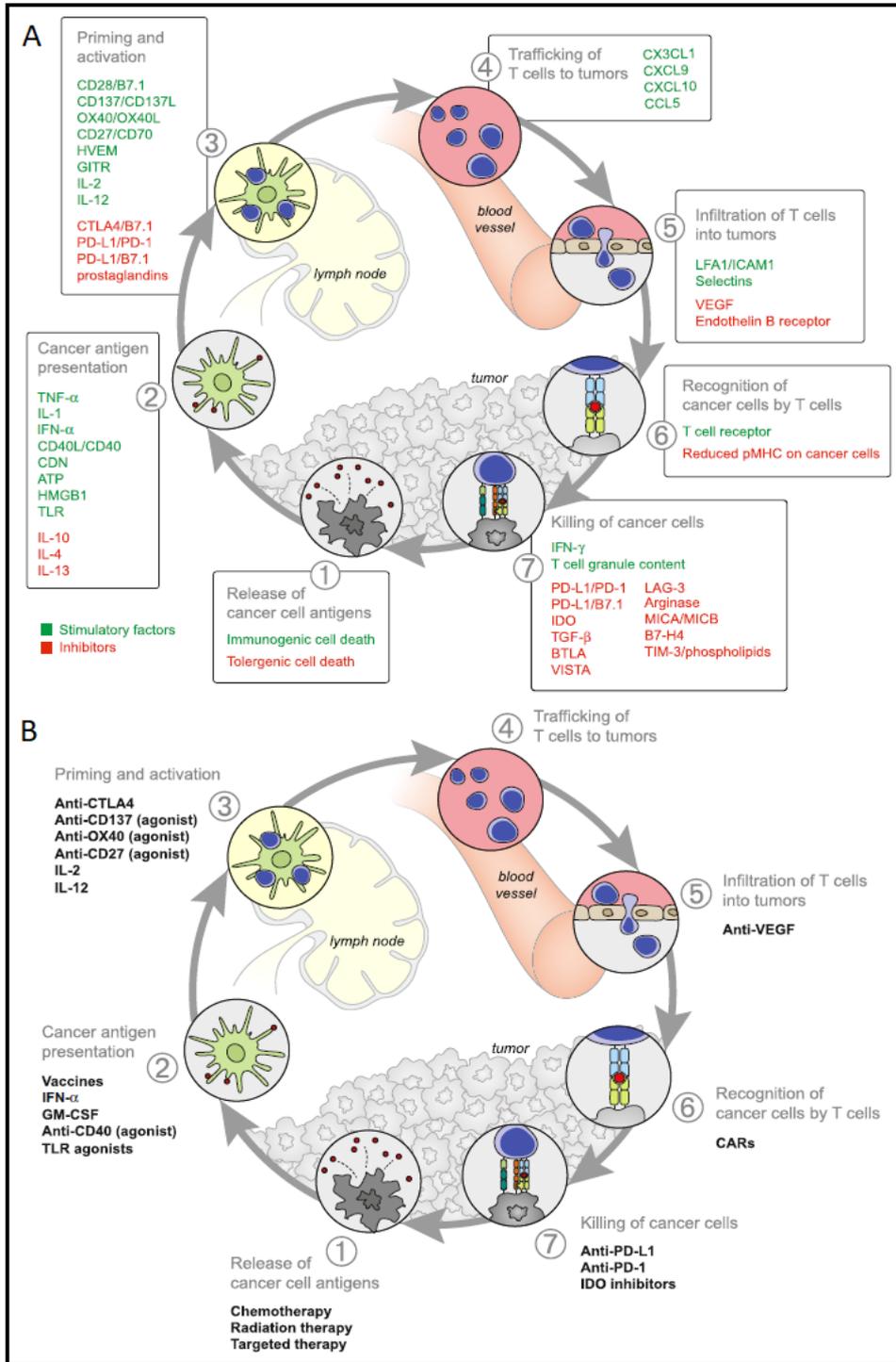


**Abb. 1.4: Cancer Immunoediting**

Exemplarische Darstellung des sich während der Karzinogenese verändernden tumorinfiltrierende Immunkompartiment. CTLA-4: cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4, IDO: Indolamin-2,3-Dioxygenase, MDSC: Myeloid-derived Suppressor Cells, PD-1: Programmed cell death protein 1, TRAIL: TNF Related Apoptosis Inducing Ligand. Adaptiert nach Schreiber et al.<sup>144</sup>

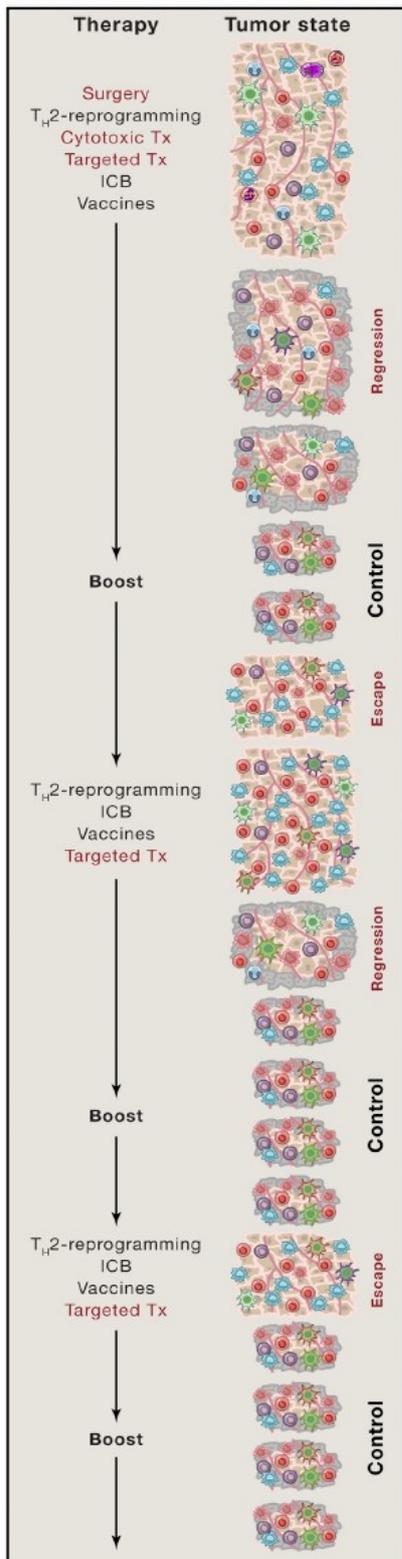
Die beschriebenen Mechanismen und Abläufe im intratumoralen Immunkompartiment unterliegen nicht unbedingt diesem monodirektionalen Verlauf. In Abhängigkeit von Tumorentität, Immunstatus und externen Faktoren, wie auch Immuntherapien, findet stets ein Feintuning des intratumoralen Immunkompartiments statt, welches das Tumorwachstum sowohl befördern als auch zur Tumorkontrolle oder –eliminierung bedingen kann.<sup>144</sup>

Die Kenntnis über Beschaffenheit und prognostischen Wert des tumorinfiltrierenden Immunkompartiments zeigen viele potenzielle Ansatzpunkte für Krebsimmuntherapien auf, wie in der zyklischen Darstellung zur Tumorummunität nach Chen et al zu sehen.<sup>176</sup> (s. Abb. 1.5 A und B). So haben sich mehrere neuartige Immuntherapien etablieren können, andere zeigen *in vivo* vielversprechende Resultate: beispielsweise Monoklonale Tumor-Antikörper wie der CD20-Antikörper Rituximab oder der ERBB2-Antikörper Trastuzumab; ebenso der VEGF Antikörper Bevacizumab. Zytokin-therapien mit IL-2 oder IL-12. T-Zell orientierte Therapien mit adoptivem Zelltransfer von mit Chimeric Antigen Receptors (CAR) ausgestatteten autologen T-Zellen oder Krebsimpfstoffe wie das MAGE-A3-Vaxin. Oder aber auch die für die Melanomtherapie zugelassenen Checkpointinhibitoren, die auf PD-1 (Ipilimumab) und CTLA-4 (Nivolumab) abzielen.<sup>12,21,177-182</sup> Eine weitere onkolytisch und durch Heraufregulation von MHC I-Molekülen T-Zell stimulierende Therapie metastasierter Melanome ist die gezielte Infektion der Tumorzellen durch ein modifiziertes Herpes-simplex-virus Typ 1 (Tamilogen laherparepvec).<sup>183</sup> (s. Abb. 1.5 B)



**Abb. 1.5 Cancer-Immunity cycle**

(A) Entstehung von Antitumor-Immunität und diese stimulierende (grün) und inhibierende (rot) Faktoren im TME. (B) Ansatzpunkte immuntherapeutisch Antitumor-Immunität zu stimulieren. CDN: cyclic dinucleotide, HMGB1: high-mobility group protein B1, TLR: Toll-like receptor, HVEM: herpes virus entry mediator, GITR: glucocorticoid-induced TNFR family-related gene, CXCL/CCL: chemokine motif ligands, LFA1: lymphocyte function-associated antigen-1, ICAM1: intracellular adhesion molecule 1, BTLA: B and T-lymphocyte attenuator, VISTA: V-domain Ig suppressor of T cell activation, LAG-3: lymphocyte-activation gene 3 protein: MIC: MHC class I polypeptide-related sequence protein, TIM-3: T cell immunoglobulin domain and mucin domain-3. Übernommen nach Chen und Mellmann.<sup>176</sup>



**Abb. 1.6: Exemplarische langfristige Tumorthherapie**

Tx: Therapie, ICB: Immune checkpointblockade. Übernommen nach Palucka und Coussens (2016) <sup>155</sup>

Letztlich deutet ein intratumorales Immunkompartiment charakterisiert durch hohe T-Zell-Dichte, insbesondere T<sub>H</sub>1 und zytotoxische T<sub>EM</sub>, sowie eine geringe Dichte von Indikatoren von Inflammation und Angiogenese auf ein gutes Ansprechen einer Krebstherapie und eine dauerhaft verbesserte Prognose für den Patienten hin. Um dies zu erreichen, bietet sich eine Kombination mehrerer therapeutischer Ansätze an. Je nach Entität der Neoplasie können diese Ansätze auch klassische Mittel wie operative Resektion, CTx und RTx enthalten, um das tumorinfiltrierende Immunkompartiment entscheidend zu formen – zur Induktion einer adaptiven Immunität. <sup>24,153,184–187</sup>

Wie durch Gatenby nach mathematischer Betrachtung der Evolutionsdynamik von Tumoren postuliert, muss nachhaltig erfolgreiche Tumorthherapie nicht komplette Tumor-eradizierung (mit der Gefahr der Tumoradoaptation durch Immunoediting) zum Ziel haben. Vielversprechender scheint ein wie in Abb. 1.6 nach Palucka und Coussens dargestelltes intermittierendes Vorgehen (multimodal, Tumor- und therapiemarker-orientiert) zur langfristigen Kontrolle eines persistenten Tumors (Gatenby: „To survive cancer, live with it!“). <sup>155,188–190</sup>

Das in dieser Arbeit betrachtete intratumorale Immunkompartiment entstand nach einer Kombinationsbehandlung durch lokale Radiotherapie und systemische Gabe eines tumorausgerichteten IL-12-Fusionsmoleküls.

### 1.2.3 NHS-IL12, lokale Radiotherapie und Kombinationstherapie

Humanes IL-12 nimmt bei der Vermittlung von angeborener und adaptiver Immunantwort eine Schlüsselrolle ein und kann Tumorregression induzieren.<sup>21,182,191–193</sup> Es ist dazu in der Lage, ein intratumorales Immunkompartiment in Richtung einer T<sub>H</sub>1-Antwort zu (re-)polarisieren: Es vermittelt T-Zell-Priming und NK-DC Zell-Zellkommunikation sowie Proliferation und verstärkte zytolytische Aktivität beider Zellreihen. IL-12 rekonvertiert T<sub>H</sub>17-Zellen und T<sub>reg</sub> zu T<sub>H</sub>1-Zellen sowie auch Makrophagen zum M1-Phänotyp.<sup>64,193–195</sup>

Auf molekularer Ebene hemmt IL-12 die TGF- $\beta$  abhängigen Induktion von ROR $\gamma$ t und Foxp3<sup>195</sup>. IL-12 regt T<sub>H</sub>1- und NK-Zellen zur massiven IFN $\gamma$ -Produktion an, was die MHC I- und MHC II-Expression und in Makrophagen die Sekretion der anti-angiogenetischen Chemokine CXCL9 und CXCL10 induziert.<sup>196–198</sup> Es konnte gezeigt werden, dass über IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  bei RMS *in vivo* nicht nur Seneszenz sondern auch myogene Differenzierung induziert wird. Diese Erkenntnisse konnten *in vitro* auch auf Glioblastom-, Neuroblastom-, CRC-, Brustkrebszellreihen sowie auf Zellen eines hepatozellulären Karzinoms übertragen werden.<sup>21,160,161</sup>

Das große Potential exogener IL-12 Applikation in der Krebsimmuntherapie war lange Zeit durch deren dosisbedingte systemische Toxizität limitiert.<sup>199,200</sup> In der Folge wurde IL-12 mit dem Antikörper NHS76 fusioniert, welcher an nackte Histone/DNA bindet. Diese treten auf in einem hypoxischen Tumor, der seine eigene Angiogenese überwachsen hat und zu Teilen nekrotisiert. In Form dieses Fusionsmoleküls NHS-IL12 kann IL-12 mit guter intratumoraler Bioverfügbarkeit und geringer systemischer Toxizität appliziert werden.<sup>196,201,202</sup>

Eine Möglichkeit, gezielt Nekrose in einem Tumor zu induzieren und somit die intratumorale IL-12-Verfügbarkeit noch zu verbessern, besteht in der Anwendung lokaler Radiotherapie<sup>20,203</sup>.

Wie in 1.2.2 beschrieben und Abb.1.5B und Abb. 1.6 zu sehen, scheint eine individuelle Kombination multimodaler Therapieansätze zur langfristigen Tumorkontrolle aussichtsreich. Wenn sich auch der alleinige Einsatz von Immuntherapie bei gewissen Tumorentitäten (Melanome, NSCLC) wirksam gezeigt hat, präsentiert sich ein multimodaler Ansatz der Therapien kombiniert,

die immunogenen Zelltod (ICD) vermitteln (RTx, CTx, tumorgerichtete zytotoxische Antikörper), vielversprechend, auch Tumorerkrankungen weiterer Entitäten effizient therapieren zu können.<sup>181,204–207</sup>

RTx (allein) ist hocheffizient darin, vorübergehend lokale Tumorkontrolle zu vermitteln, vor allem im Frühstadium. Neben dem direkt zytotoxischen Potential gezielt lokaler Bestrahlung, hat lokale RTx eine immunogene Wirkung.<sup>208</sup> RTx verursacht ICD, eine immunstimulierende Form des Zelltods, welche angeborene und adaptive Immunantwort induziert.<sup>209,210</sup> Auf diese Weise eliminierte Tumorzellen setzen sogenannte Damage associated patterns (DAMP) frei, welche von DC aufgenommen und T-Zellen präsentiert werden können.<sup>208,211,212</sup> Auch etablierte Tumore können so (vorübergehend) wieder immunogen werden. Tumorzellen exprimieren verstärkt MHC I, Tumorantigene und FAS/CD95.<sup>213–215</sup> Es entsteht ein zytotoxisch inflammatorisches Immunkompartiment mit gesteigerter T-Effektorzellfunktion, die in Richtung des T<sub>H</sub>1 Phänotyps polarisiert ist, charakterisiert durch ein Zytokinmilieu von IL-2, IL-12 und IFN $\gamma$ .<sup>208,216,217</sup> Die Induktion einer derartigen Immunantwort liefert eine mögliche Erklärung dafür, dass lokale Bestrahlung Tumorregression auch an nicht-bestrahlten entfernteren Orten der Tumormanifestation verursachen kann. Dieses Phänomen wird Abscopaler Effekt genannt.<sup>208,218–221</sup>

Die Synergie-Effekte bei Kombination einer Immuntherapie mit NHS-IL12 und lokaler RTx sind bidirektional: Immuntherapie befördert Abscopale Effekte außerhalb des Bestrahlungsfelds, lokale RTx setzt Tumorantigene und andere immunogene Muster frei, wandelt TME und Immuncontexture in eine gegen den Tumor wirkenden Richtung und erhöht die intratumorale Verfügbarkeit von NHS-IL12.<sup>208,222</sup>

### 1.3 NSG-Mäuse und RMS A204

Um die menschliche Hämatopoese und das humane Immunsystem und deren Manipulationen durch Krankheit und Therapie gezielt zu erforschen, werden

heute humanisierte Mausmodelle verwendet. 2005 wurde der bisher immundefizienteste Mausstamm NSG (NOD.Cg-PrkdcscidII2rgtm1Wjl/SzJ) durch Shultz et al. entwickelt.<sup>223</sup> Die dieser Arbeit zu Grunde liegenden Versuche wurden mit NSG-Mäusen durchgeführt. Eine Vielzahl genetischer Modifikationen macht diesen Mausstamm sehr geeignet als Rezipient von Xeno-Transplantaten sowohl für Tumore/Leukämien als auch Stammzellen und Immunzellen, letztlich damit auch die Etablierung einer humanen Hämatopoese und eines menschlichen Immunsystems. Die Null-Mutation der IL-2R $\gamma$ -Kette, die Bestandteil mehrerer für die Differenzierung hämatopoetischer Zellreihen obligatorischer Zytokinrezeptoren ist, wie die für die Signalwege von IL-2, IL-4, IL-7, IL-15 und IL-21<sup>224</sup>, verhindert damit die NK-Zell-Differenzierung, die Entwicklung von T- und B-Zellen und damit auch die Abstoßung humaner Zellen, was wiederum die Etablierung einer humanen Hämatopoese vereinfacht.<sup>225</sup> Von der Non-obese diabetic (NOD-Maus) Linie NOD/ShiLtJ abstammend, weist das Genom der NSG-Maus Defekte auf, die die angeborenen Immunität affektieren. DCs sind eingeschränkt funktionsfähig, Makrophagen in ihrer Aktivität gestört und kein Komplementsystem vorhanden.<sup>226</sup> Dazu besteht ein Polymorphismus des Sirpa-Gens, welcher das Knochenmark als Nische für die Kolonisierung durch HSC empfänglicher macht.<sup>227</sup> Eine weitere Mutation im homologen Gen zum humanen PRKDC-Gen macht dieses funktionslos und schaltet die adaptive Immunität praktisch aus.<sup>228</sup> Dieses Gen kodiert für eine DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK), welche für DNA-Strang-Reparaturaufgaben während der V(D)J-Rekombination der B- und T-Zellen zuständig ist. Dieser Defekt sorgt für eine stark verminderte Anzahl funktionsfähiger B- und T-Lymphozyten und wird als severe combined immunodeficiency (scid) oder Prkdcscid bezeichnet.<sup>228,229</sup>

In der RMS-Forschung stehen derzeit 30 humane RMS-Zellreihen zur Verfügung, die sich in Herkunft, Karyotyp und histologischen Merkmalen unterscheiden.<sup>230</sup> Die für diese Arbeit eingesetzte Tumorentität ist die RMS-Zelllinie A204 (im American Type Culture Collection (ATCC) Katalog als HTB28 gelistet). Diese Zelllinie eines embryonalen RMS wurde 1973 aus dem Tumor eines 1-jährigen

Mädchens etabliert. Die histologische Morphologie des A204 wird als epithelartig mit Bildung einschichtiger Zellverbände beschrieben. In Nacktmäuse inokuliert bildet diese Zellreihe kleine maligne Tumore mit der Entität eines human embryonalen RMS. In der virologischen Untersuchung (PCR) zeigen sich die Zellen EBV-, HBV-, HCV-, HHV-8-, HIV- und HTLV-I/II-negativ.<sup>231,232</sup>

### 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Rhabdomyosarkompatienten sehen sich häufig einer schlechten Prognose gegenüber. Etablierte Maßnahmen wie Radiochemotherapie und chirurgische Tumoresektion erreichen selten langfristige Tumorkontrolle. RMS-Therapien mit tumorgerichtetem NHS-IL12 allein und in Kombination mit lokaler Radiotherapie haben Tumorkontrolle *in vivo* und *in vitro* über Induktion von Seneszenz, myogener Differenzierung und Abscopale Effekte erreichen können.

Diese Arbeit setzt sich zum Ziel, das im Rahmen einer Kombinationstherapie aus systemischer Applikation von NHS-IL12 und lokaler Radiotherapie entstandene tumorinfiltrierende Immunkompartiment histologisch, immunhistochemisch und molekularbiologisch zu untersuchen. Insbesondere im Fokus standen hierbei die phänotypische Charakterisierung intratumoraler T-Zellkompartimente und NK-Zellen in Abhängigkeit von Kombinationstherapie mit ipsilateraler lokaler oder contralateraler Bestrahlung.

Dabei sollten folgende Fragen geklärt werden:

Wie sieht das intratumoral induzierte Immunkompartiment in den Therapiegruppen versus nicht therapierter Gruppe aus?

- Welcher T-Zellsubtyp (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>) infiltriert vornehmlich den Tumor?
- Weisen die T-Zellkompartimente (αβ, und γδ-T Zellen) ein breites TCR-Repertoire auf?
- Kann die klonale Expansion bestimmter T-Zell-Rezeptor-Familien festgestellt werden?

- Induziert die multimodale Therapie systemisch nachweisbare Klone und ermöglicht damit potentiell Abscopale Effekte?
- Sind die aktivierenden NK-Zell Rezeptoren NKp30, NKp44, NKp46, NKG2D, NKG2E, CD226 nachweisbar und lassen damit auf ein aktiviertes antitumoral aktives NK-Zellkompartiment schließen?
- Können intratumoral CD161 und damit indirekt T<sub>H</sub>17-Kompartimente nachgewiesen werden, die wie gezeigt durch IL-12 in einen T<sub>H</sub>1 antitumoralen Phänotyp gepolt werden?
- Lassen sich Äquivalente zytotoxischer Aktivität (Granzym B<sup>+</sup>) nachweisen?

Wie sieht der Tumor makroskopisch/mikroskopisch in den Therapiegruppen versus nicht therapierter Gruppe aus?

- Wo gibt es Anhalte für Tumorregression?
- Wo kann myogene Differenzierung (Desmin<sup>+</sup>) als Konsequenz T<sub>H</sub>1-zytokininduzierter Seneszens nachgewiesen werden?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Versuchstiere, Tumore und Materialien

#### 2.1.1 Versuchstiere und RMS A204

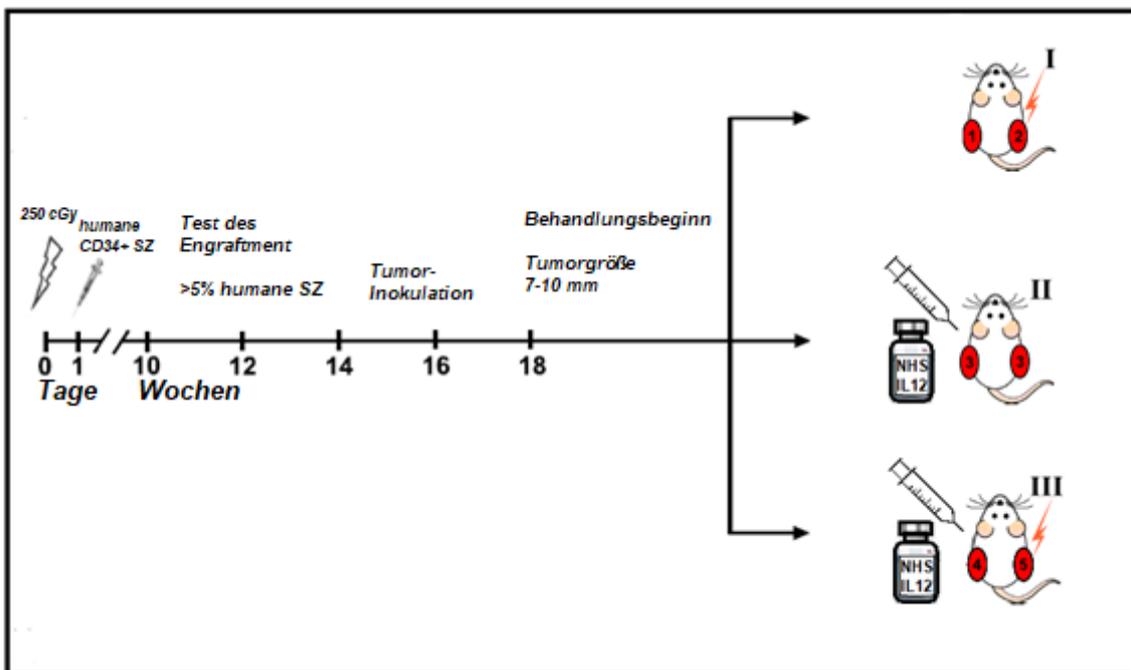
Bei dem letztlich für diese Arbeit untersuchten Tumormaterial handelte es sich um insgesamt 10 Tumore und deren Tumorbett. Alle Tierexperimente dieser Studie waren durch das Regierungspräsidium Tübingen genehmigt und kontrolliert worden (Nr. K6/11).

Nach dem von Schilbach et al verwendeten Protokoll waren humanisierte NSG Mäuse (JAX mouse NOD.Cg-Prkdcscidll2rgtm1Wjl/SzJ; Jackson Laboratory, USA) 2014 unter pathogen-freien Bedingungen in der Tierforschungsabteilung des Universitätsklinikums für Kinder und Jugendmedizin Tübingen behandelt worden.<sup>21</sup> Diese waren im Alter von sechs bis acht Wochen mit 2,5 Gy sublethal ganzkörperbestrahlt und in der Folge mit  $10^6$  humanen CD34 positiven und CD3 negativen Stammzellen intravenös transplantiert worden, um eine Humanisierung der Hämatopoese zu erreichen. Diese Stammzellen entstammten durch G-CSF stimulierten Spendern mit HLA-Mismatch zu RMS-A204. Nach 12 Wochen mit wöchentlicher Fc-IL-7 (Merck, Deutschland) Injektion war das Ansprechen der Mäuse auf die Stammzelltransplantation mittels Durchflusszytometrie des peripheren Blutes überprüft worden. Im Speziellen wurden das CD3 und CD45 Repertoire und somit die Präsenz humaner T-Zellen geprüft.

Tiere mit einem erfolgten Engraftment von mindestens 5% (also einem humanen Anteil an Zellen der Hämatopoese von mindestens 5%) wurden in die Studie eingeschlossen. (s. Abb. 1)

Den eingeschlossenen Tieren waren nun in beide Oberschenkel der Hinterläufe subkutan  $10^6$  Rhabdomyosarkomzellen der Zelllinie RMS A204 (ATCC®, Manassas, USA, ATCC®-Nummer: HTB-82) injiziert worden. Die Behandlung

war bei einer Tumorgröße (entscheidend die Größe des größeren der beiden Tumore) von 7-11 mm begonnen worden. Die Behandlung der Tiere hatte in drei Behandlungsgruppen stattgefunden. In die Behandlungsgruppe I wurden Mäuse mit unilateraler lokaler Radiotherapie einer der beiden Tumore, in die Behandlungsgruppe II Mäuse mit alleiniger systemischer intravenöser Applikation von NHS-IL12 und in die Behandlungsgruppe III solche mit unilaterale Radiotherapie in Kombination mit systemischer Applikation von NHS-IL-12 eingeschlossen (s. Abb2.1).



**Abb.2.1.: Studiendesign**

Behandlungsgruppen. I: unilaterale lokale Radiotherapie. II: Alleinige NH-IL12-Therapie. III: Kombinationstherapie aus unilateraler Radiotherapie und systemischer NHS-IL12-Therapie. Adaptiert nach Eckert et al.<sup>20</sup>

Für die lokale Radiotherapie war ein Linearbeschleuniger (Elekta Oncology Systems®, Crawley, UK) mit einer Einzeldosis von 8,0 Gy und mit 6 MV Photonen verwendet worden unter inhalativer Anästhesie mit Isofluran (Abbott, Wiesbaden, Deutschland) und Abschirmung des restlichen Mausekörpers mit Blei.

In Orientierung an der Behandlungsgruppe III, welche lokale Radiotherapie in Kombination mit der systemischen NHS-IL12 Applikation erhalten hatte, war zwei bis drei Tage nach der Bestrahlung beginnend wöchentlich in dieser und in der Behandlungsgruppe II mit alleiniger systemischer Interleukinbehandlung

NHS-IL12 (20 µl/100 µl PBS) intravenös appliziert worden.

Nachdem alle zwei bis drei Tage die Tumordurchmesser gemessen worden waren, euthanasierte man gemäß den Leitlinien der Abbruchkriterien im vom Regierungspräsidium genehmigten Tierversuchsantrag alle Tiere, deren Tumor eine Größe von 15 mm überschritten hatte. Ebenso wurden jene Tiere euthanasiert, bei denen die Tumore unter der Behandlung auf einen Durchmesser von 3 mm geschrumpft waren, um Tumorgewebe für die folgenden Untersuchungen gewinnen zu können. Dafür wurden die exzidierten Tumore für die Histologie formalinfixiert, für die molekularbiologische Analyse in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.<sup>20</sup>

## 2.1.2 Materialien

Tabelle 1: Glas, Plastik, Laborzubehör

<b>Glas, Plastik, Laborzubehör</b>	<b>Markenname und Hersteller</b>
Aluminiumabdeckfolie (10 m x 30 cm x 0,015 mm)	Papstar, Kall, Deutschland
Diverse Glaswaren	Schott Duran ® Schott, Mainz, Deutschland
Einmalhandschuhe	Kimberley-Clark®, Irving, Texas, USA Abena®, Oberderdingen, Deutschland
Mikroreaktionsgefäße (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikrotiterplatten	MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems®, California, USA
Mikrotiterplattenabdeckung	MicroAmp® 96-Well Full Plate Cover Applied Biosystems®, California, USA
Oberflächendesinfektionsmittel & -tücher	Descosept AF, Dr. Schumacher GmbH Malsfeld, Deutschland Tapira®, Heidenheim, Deutschland
Parafilm	Bemis, Oshkosh, USA
PCR-Reaktionsgefäße	Thermo-Strips™ PEQLAB, Erlangen Deutschland
Pipettenspitzen (2µl, 10µl, 20µl, 100µl, 200µl) mit und ohne Filter	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Wasserfeste Pigmentliner, diverse Farben	Staedtler Mars GmbH, Nürnberg, Deutschland

Tabelle 2: Stammlösungen und Chemikalien

<b>Stammlösung, Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
DEPC-behandeltes Wasser	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Desoxynucleotidtriphosphate	GeneAmp® dNTPs, Applied Biosystems, California, USA
Ethanol absolut	Merck, Darmstadt, Deutschland
Formamid	Hi-Di™ Formamide, Applied Biosystems®, California, USA
Längenstandard für Spectratyping	GeneScan™ – 600 LIZ® Size Standard, Applied Biosystems, California, USA
Lysepuffer	Lyse RLT, Qiagen, Hilden, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Phosphate Bufferd Saline (PBS)	Universitätsapotheke, Tübingen, Deutschland

Tabelle 3: Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Markenname und Hersteller</b>
Crushed-Ice-Gerät	Scotsman, Vernon Hills, USA
Drucker	Laserjet 1320 tn, HP, Palo Alto, USA
Kühlgeräte/-schränke (8°C, -20°C, -80°C)	Liebherr Medline, Liebherr Premium Nofrost, Forma Scientific -86 C
Mikroskop	CX40, Olympus Europa, Hamburg, Deutschland
PC für Spectratyping	Optiplex 745, Dell, Round Rock, USA
PCR Thermocycler	Gene AMP® PCR System 9700, Applied Biosystems, Foster City, USA
Pipettierhilfen (2 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich
Spektralphotometer	NanoDrop ND-2000 PEQLAB, BiotechnologiesGmbH, Erlangen, Deutschland
Schredder/Homogenisator	
Sequenziergerät für Spectratyping	3130 xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, USA
Sicherheitswerkbank	HERAsafe™ Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland
Vortexmischer	REAX top Heidolph, Nürnberg, Deutschland
Zentrifugen Minizentrifuge Thermozentrifuge	Mikro 22 R, Rotixa 50 RS, Rotanta 46 RSC Hettich, Tuttlingen, Deutschland Scientific MyFuge™ Mini C1008, Benchmark Inc., Edison, USA Biofuge fresco, Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland

Tabelle 4: Computersoftware

Software	Hersteller
3130 xl Genetic Analyzer Data Collect 3.0	Applied Biosystems, Foster City, USA
Adobe Acrobat Reader	Adobe Systems, Mountain View, USA
Gene Mapper 4.0 / 5.0	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Microsoft Office 2013: Word, Excel	Microsoft, Redmond, USA
NanoDrop 2000/2000c software	PEQLAB, Biotechnologies GmbH, Erlangen, Deutschland
PDF24 Editor	www.pdf24.org, www.cutepdf-editor.com

### 2.1.3 Molekularbiologische Kits zur cDNA-Synthese

Tabelle 5: Molekularbiologische Kits zur cDNA-Synthese

Molekularbiologisches Kit	Markenname und Hersteller
Kit zur RNA-Isolation	RNeasy® Mini Plus Kit Qiagen, Hilden, Deutschland
Kit zur cDNA-Synthese	Super Script® III First-Strand Synthesis SuperMix, Invitrogen, Groningen, Niederlande

### 2.1.4 Materialien für PCR und Fragmentlängenanalyse („Spectratyping“)

Die für die PCRs verwendeten Forward- und Reverse-Primer sowie Primer mit FAM-Markierung (fluorescein amidite) wurden aus etablierten Methoden vorangegangener Studien übernommen. Sie wurden über MWG Biotech AG/Eurofins (Ebersberg, Deutschland) als Lyophilisat bezogen, in DEPC-Wasser zu 20 pmol/µl aliquotiert und bei -20°C gelagert. Die exakten Primersequenzen können an folgender Stelle nachgefragt werden:

Prof. Dr. Karin Schilbach, Abteilung I: Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie/Onkologie, Hoppe-Seyler-Straße 1, 72076 Tübingen,

Tel. 07071 29-84084

Tabelle 6: Enzyme

<b>Enzyme</b>	<b>Hersteller</b>
Gold Taq (inkl. PCR 10xbuffer, 25 mM MgCl <sub>2</sub> )	AmpliTaq® Gold DNA Polymerase, Applied Biosystems, California, USA
Taq-Polymerase (inkl. PCR10xbuffer, 50 mM MgCl <sub>2</sub> )	Taq DNA Polymerase, Invitrogen, Groningen, Niederlande

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Versuchsaufbau

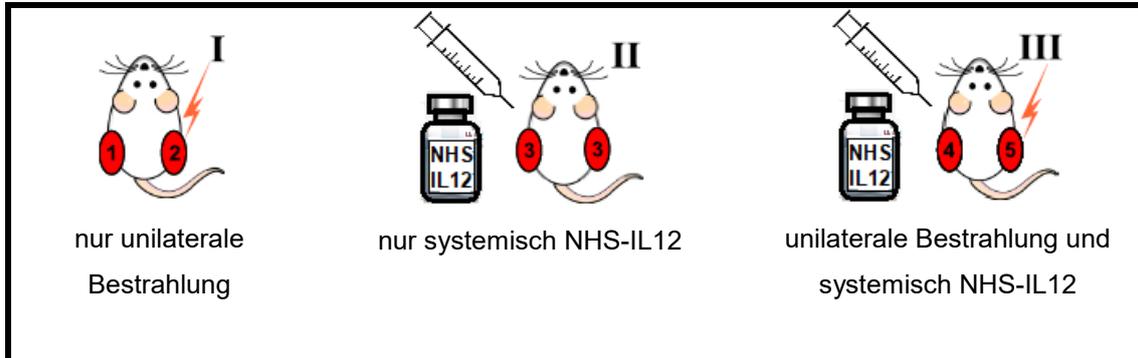
Für die Survivalanalyse waren die Mäuse gemäß des Studiendesigns (s. Abb. 2.1.) in den 3 Behandlungsgruppen betrachtet und ihr Survival nach der Kaplan-Meier-Methode ausgewertet worden. Tiere, die starben oder frühzeitig euthanasiert werden mussten, da die ihnen inokulierten Tumore unter der Behandlung so stark schrumpften, dass sie nicht hätten untersucht werden können, wurden aus der Analyse ausgeschlossen, um ein Tumorgröße-spezifisches Überleben betrachten zu können.

Für die Betrachtung der relativen Tumorgröße waren die den Mäusen inokulierten Tumore gemäß ihrer Therapie in fünf Gruppen aufgeteilt und im Verlauf alle zwei bis drei Tage und an Tag 15 (+/- 2) mittels eines digitalen Messschiebers vermessen worden (s. Abb. 2.1). Das Tumolvolumen war gemäß  $V_T = a \cdot b \cdot d \cdot \pi / 6$  bestimmt worden ( $a$ ,  $b$  und  $d$  der *Tumurlänge*, *-breite* und *-tiefe* entsprechend).

In die letztlich für diese Arbeit durchgeführte molekularbiologische Analyse wurden die Tumore von insgesamt 5 Mäusen einbezogen. Von diesen hatten zwei Mäuse unilateral Radiotherapie, eine Maus systemisch NHS-IL12 und zwei Mäuse die Kombinationstherapie aus unilateraler Radiotherapie und systemischer NHS-IL12 Applikation erhalten. Da allen Mäusen bilateral Rhabdomyosarkome inokuliert worden waren, konnten 10 Tumore gewonnen werden, die wiederum entsprechend ihrer Therapie gruppiert wurden. Zwei Tumore waren ipsilateral lediglich bestrahlt worden, zwei Tumore hatten eine indirekte Therapie durch Bestrahlung des kontralateralen Tumors erhalten. Diese werden im Folgenden als Kontrollgruppe (KG) betrachtet. Zwei Tumore waren systemisch mit NHS-IL12 behandelt worden. Zwei Tumore hatten die Kombinationstherapie aus lokaler Radiotherapie und Interleukintherapie erhalten und zwei Tumore hatten systemisch NHS-IL12 erhalten, wobei der kontralateral gesetzte Tumor bestrahlt worden war.

Der beschriebene Versuchsaufbau sowie Teile der hier gezeigten Daten sind in „Tumor-targeted IL-12 combined with local irradiation leads to systemic tumor

control via abscopal effects in vivo“ durch Eckert, Jelas, Oehme et al. besprochen worden.<sup>20</sup>



**Abb. 2.2: Tumorextraktio und Gruppierung.**

Zwei Mäusen der Gruppe I (KG) wurden je ein Tumor ohne direkte Therapie aber mit kontralateraler lokaler Bestrahlung (1) sowie je ein ipsilateral bestrahlter Tumor (2) entnommen. Aus der Maus der Gruppe II wurden zwei Tumore (3) mit systemischer Behandlung mit NHS-IL12 extrahiert. Den beiden Mäusen der Gruppe III wurden je ein Tumor mit systemischer NHS-IL12-Behandlung und kontralateraler lokaler Bestrahlung (4) sowie je ein Tumor mit Kombinationstherapie aus systemischer NHS-IL12-Behandlung und ipsilateraler lokaler Bestrahlung (5) entnommen.

Die Tumore wurden lysiert, aus ihnen RNA isoliert (2.2.3.1 RNA-Isolation) und in cDNA umgeschrieben (2.2.3.2 cDNA-Synthese). Die eigentliche molekularbiologische Analyse bestand in der Untersuchung der aus dieser cDNA mittels PCR amplifizierten Segmente der TCRV $\alpha$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ - Regionen sowie der amplifizierten KIR-Segmente durch Fragmentlängenanalyse („Sprectratyping“) (2.2.3.4 Fragmentlängenanalyse (TCR- und KIR-Sprectratyping)).

Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Detektion der in Tabelle 7 aufgeführten Segmente der V $\alpha$ -Familie (TRAV-Segmente), der V $\gamma$ -Familie, der V $\delta$ -Familie sowie der KIRs. So konnten die in Abhängigkeit von der jeweiligen Behandlung der Tumore entstandenen TCR- und KIR-Repertoires gezeigt werden.

Tabelle 7: Untersuchte TCR- und KIR-Segmente

TCRV $\alpha$    TRAV-Segment		TCRV $\gamma$ - Segment	TCRV $\delta$ - Segment	KIR- Segment
7    1-1 1-2	23    21	V $\gamma$ 2-4	V $\delta$ 1	NKG2D
11    2	13    22	V $\gamma$ 3	V $\delta$ 2	NKG2E
16    3	17    23DV6	V $\gamma$ 5	V $\delta$ 3	Nkp30
20    4	18    24	V $\gamma$ 8	V $\delta$ 4	Nkp44
15    5	32    25	V $\gamma$ 9	V $\delta$ 5	Nkp46
5    6	4A    26-2		V $\delta$ 6	CD226
1B    8-1 8-3	4B    26-2		V $\delta$ 7	CD161
1A    8-4 8-6	10    27		V $\delta$ 8	
22    9-2	21    29DV5			
24    10	29    30			
2    12-1 12- 2 12-3	26    34			
8    13-1 13- 2	25    35			
6    14DV4	28    36DV7 25			
9    16	14    38-1 38- 2DV8			
3    17	27    39			
12    19	31    40			
30    20	19    41			

Neben der molekularbiologischen Analyse wurden zuvor für die histologische Untersuchung in Formalin konservierte Tumore den entsprechenden oben beschriebenen Behandlungsgruppen zugeordnet, in Paraffin eingebettet, (immunhistochemisch) angefärbt und (semiquantitativ) mikroskopisch untersucht (2.2.2 Histologie und Immunhistochemie).

Hier lag der Fokus auf dem immunhistochemischen Nachweis von CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen sowie dem Nachweis von Desmin und Granzym B. Diese Betrachtung fand wiederum unter Berücksichtigung der den Tumoren widerfahrenen Behandlung statt.<sup>20</sup>

### 2.2.2 Histologie und Immunhistochemie

Die Färbungen der Schnitte wurden nach zuvor beschriebenen Protokollen durchgeführt.<sup>21</sup> Die verwendeten Protokolle und Antikörper können an folgender Stelle nachgefragt werden:

Prof. Dr. Karin Schilbach, Abteilung I: Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie/Onkologie, Hoppe-Seyler-Straße 1, 72076 Tübingen,

Tel. 07071 29-84084

Die Auswertung der Schnitte erfolgte nach deren Scan mit NanoZoomer (Hamatsu Photonics K.K., Hamatsu) mit NDP.view (Hamatsu Photonics K.K., Hamatsu) entsprechend dem IHC Quickscore ( $Q=I*P$ ),  $I \triangleq Intensity$  und  $P \triangleq positive\ cells$ , aufsteigend von 0 bis 3 (none, low, moderate, strong).

### 2.2.3 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.3.1 RNA-Isolation

Das zuvor bei -80 °C eingelagerte Tumormaterial wurde je Tumor zu maximal 30 mg in PBS-Puffer und DEPC-Wasser mechanisch homogenisiert/geschreddert und in 600 µl RLT-Puffer und β-Mercaptoethanol (10 µl/1 ml RLT-Puffer) suspendiert. Die RNA-Isolation wurde gemäß den Herstellerangaben mit dem RNeasy® Mini Plus Kit von Qiagen durchgeführt. Für alle Pipettierschritte wurde mit gestopften Pipettenspitzen gearbeitet. Allen in den folgenden Schritten genannten Zentrifugationszeiten gingen 20 Sekunden Vorlaufzeit der Zentrifuge voraus, um zu gewährleisten, dass die Zentrifuge die nötige unten genannten Umdrehungen pro Minute (rpm) zu erreicht.

- Das mechanisch in RLT-Puffer und in β-Mercaptoethanol homogenisierte Tumormaterial wurde in einem 2 ml Eppie zentrifugiert, um die großen Schwebeteilchen zu pelletieren.
- Der Überstand wurde in die gDNA Eliminator spin column (befand sich in 2 ml Sammelröhrchen (Eppie)) überführt und für 30 s bei 14 000 rpm zentrifugiert. So konnte die genomische DNA entfernt werden. Die spin column wurde verworfen.
- Der im Sammelgefäß entstandene Durchfluss wurde mit 600 µl 70 % Ethanol (entsprechend der dem Tumormaterial zugegebenen Menge an RLT-Puffer in der Probearbeitung der RNA-Isolation) durch Pipettieren durchmischt.
- 700 µl dieser Lösung wurden in ein RNeasy Mini spin column (befand sich in 2 ml Sammelröhrchen) überführt und für 15 s bei 14 000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen.
- Die spin column wurde mit 700 µl RW1-Puffer gewaschen und für 15 s bei 14 000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen.
- Die Säule wurden mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen und für 15 s bei 14 000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen.
- Die Säule wurde danach ohne weitere Zugabe von Reagenzien bei

maximaler speed zentrifugiert, um die Membran der spin column zu trocknen.

- Die spin column wurde dann in ein neues 1,5 ml Eppie überführt und 30-50  $\mu$ l RNA-se freies Wasser auf die Membran der spin column pipettiert. Das gesamte Gefäß wurde bei 14 000 rpm zentrifugiert. Das Eluat enthält die isolierten RNA. Die spin column wurde verworfen und das Gefäß mit isolierter RNA bis zur weiteren Nutzung bei  $-80^{\circ}$  C gelagert.

Die Quantität und Qualität der isolierten RNA wurde mittels der Absorptionskoeffizienten bei 260 nm ( $A_{260}$ ) und 280 nm ( $A_{280}$ ) und deren Quotient  $A_{260}/A_{280}$  spektralphotometrisch gemessen.

### 2.2.3.2 cDNA-Synthese

Die Synthese der cDNA aus isolierter RNA erfolgte mit dem Super Script® III First-Strand Synthesis Super Mix nach Angaben des Herstellers. Die Zielsetzung dieser Methode ist die Synthese der komplementären DNA zur zuvor isolierten RNA mittels reverser Transkription. In einem ersten Schritt wurden nach Denaturierung Oligo(dT)-Primer mit der RNA hybridisiert (Mastermix I), um eine Matrize für die reverse Transkriptase zu schaffen, die in einem zweiten Schritt (der eigentlichen cDNA-Synthese unter Zugabe von Mastermix II) entlang dieser Matrize komplementär zur RNA einen DNA-Strang synthetisiert. Beide Schritte fanden im Thermocycler Gene AMP® PCR System 9700 statt.

Tabelle 8: Mastermixe zur cDNA-Synthese von 20 µl Endvolumen

<b>Mastermix I:</b>	<b>Mastermix II:</b>
<b>RNA-Primerhybridisierung</b>	<b>cDNA-Synthese</b>
(0,1 pg bis max.) 5,0 µl RNA	10,0 µl 2x First-Strand Reaction Mix
1,0 µl Oligo(dT)-Primer (0,5µg/µl)	2,0 µl SuperScript III / RNaseOUT Enzyme Mix
1,0 µl Annealing-Buffer	

Tabelle 9: Verwendete Thermocyclerprogramme für cDNA-Synthese

<b>Thermocyclerprogramm I</b>	<b>Thermocyclerprogramm II</b>
<b>Denaturierung</b>	<b>cDNA-Synthese</b>
5 min bei 65°C	50 min bei 50°C
Lagerung auf Eis für 2 Min.	5 min bei 95°C

Die jeweils aus dem Tumormaterial synthetisierten cDNA-Proben wurden bis zur Verwendung bei -20°C eingelagert.

### 2.2.3.3 PCR-Primer

Die in den folgenden PCR-Verfahren verwendeten Primer wurden so gewählt, dass spezifisch die in Tabelle 7 genannten TCR- und KIR-Segmente amplifiziert wurden. Die Primersequenzen zur Untersuchung der TCRV $\alpha$ -Segmente entstammten den Publikationen von Han et al.<sup>233</sup> Die der TCRV $\gamma$ - und  $\delta$ -Segmente wurden wie bei Déchanet et al. verwendet.<sup>234</sup> In Tabelle 10 sind exemplarisch die durch Prof. Dr. Karin Schilbach und Kollegen designten verwendeten Primersequenzen der KIR-Segmente aufgezeigt. Alle weiteren Primersequenzen können bei Prof. Dr. Karin Schilbach in Erfahrung gebracht werden (s. 2.1.4).

Tabelle 10: Verwendete PCR-Primer

KIR-Segment	Primer-Sequenz	Amplikon (bp)
NKG2D (forward)	5`-GATTCCTCTCTGCGGTAGAC -3`	266
NKG2D (reverse)	5`-GCACTCCATATTGCTACCAT -3`	
NKG2E (forward)	5`-GCCTGTGCTTCAAAGAACTCTTCT-3`	232
NKG2E (reverse)	5`-CACACTGGTCTGATATAAGTCCACG-3`	
NKp30 (forward)	5`-TCTTGATCATGGTCCATCCA-3`	198
NKp30 (reverse)	5`-TGAACTCTGGGGTTCCATTC-3`	
NKp44 (forward)	5`-CCTACACCCACTGCTACTGCTGCT-3`	496-502
NKp44 (reverse)	5`-GATGTAGATGAGACTCAG-3`	
NKp46 (forward)	5`-GGCAGAATCTGAGCGATGTCTT-3`	145
NKp46 (reverse)	5`-GCTTTTCCTTTGGAACCATGAA-3`	
CD226 (forward)	5`-CGAGAACATGTCTCTAGAATGTGT-3`	252
CD226 (reverse)	5`-GGGTAAGTGTAAGAGAGCAGG-3`	
CD161 (forward)	5`-CACAGACTCAGGCCAGAAAGT-3`	313
CD161 (reverse)	5`-GTTATTCCAAGGGTTGACAGT-3`	

#### 2.2.3.4 RT-PCR

Zur Untersuchung der Genexpression der in Tabelle 7 genannten TCR- und KIR-Segmente in T-Zellen, NK-Zellen und Monozyten des Tumormaterials wurde die isolierte mRNA (s.2.2.3.1) mittels RT-PCR und den entsprechenden Primern amplifiziert. Die RT-PCR basiert auf der aus dem Tumormaterial gewonnenen cDNA (s.2.2.3.2). Hierfür wurden je nach Gen(-segment) PCR-Mix und Thermocycler-Programm angepasst und in Abhängigkeit von der Amplikonlänge, eine nested oder semi-nested bzw. Multiplex-PCR verwendet. In nachfolgender Tabelle und Abbildung sind ein exemplarischer PCR-Mix und ein exemplarisches Thermocyclerprogramm dargestellt.

Tabelle 11: Exemplarische Darstellung PCR-Mix

Komponente	Volumen
10x Puffer	2,0-2,5 $\mu$ l
50mM MgCl <sub>2</sub>	0,75-1,5 $\mu$ l
dNTPs	0,2-0,5 $\mu$ l
cDNA	0,5-1,0 $\mu$ l
Forward-Primer (20 pmol/ $\mu$ l)	0,5-1,0 $\mu$ l
Reverse-Primer (20 pmol/ $\mu$ l)	0,5-1,0 $\mu$ l
Gold-TaqPolymerase / TaqPolymerase	12,5 $\mu$ l / 0,25-0,3 $\mu$ l
ad 20 $\mu$ l / 25 $\mu$ l H <sub>2</sub> O	

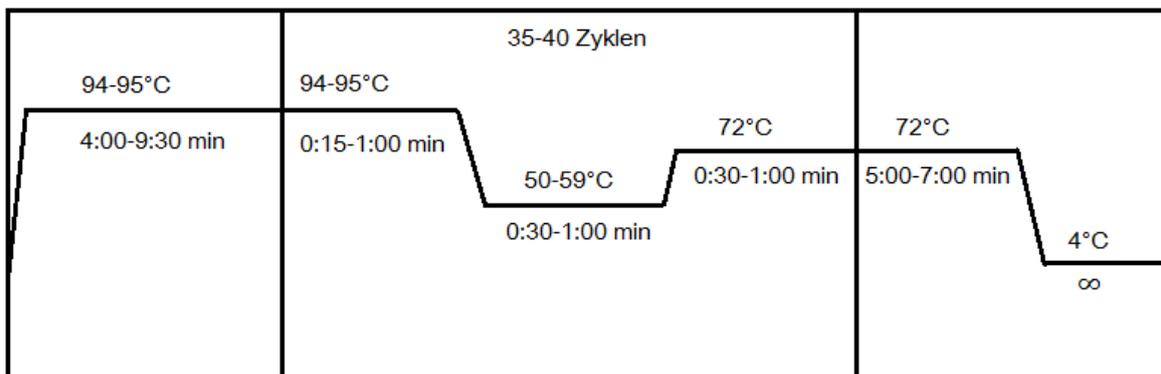
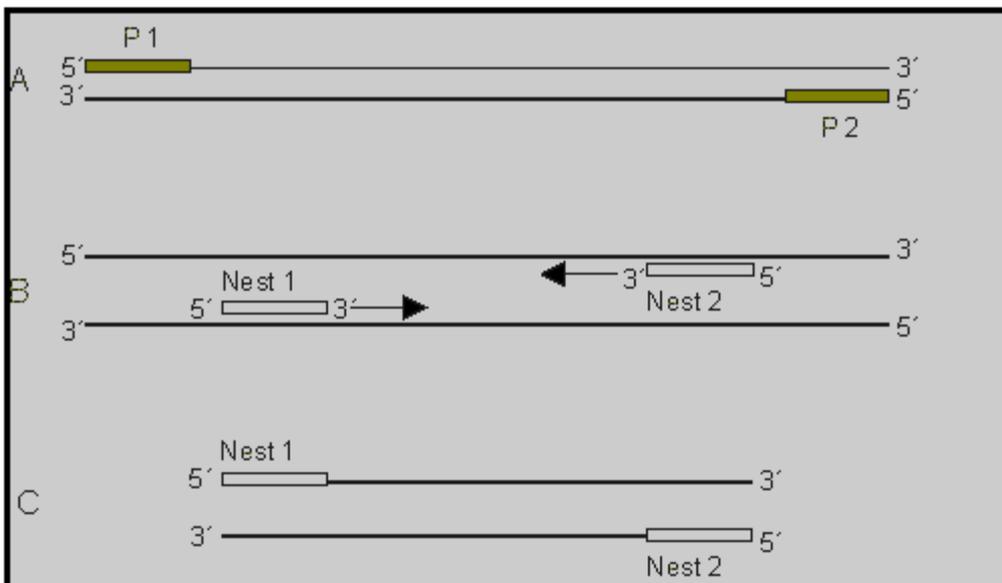


Abb. 2.4: Exemplarisches PCR-Programm im Thermocycler

### 2.2.3.5 Nested PCR und Multiplex PCR

Für die Amplifikation der TCRV $\alpha$ ,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Transkripte wurde mit nested bzw. seminested PCR-Verfahren gearbeitet. Zielsetzung dieser Methode ist die hochspezifischere Anreicherung des gesuchten Amplikons. Wie in Abbildung 2.5 dargestellt bedient man sich bei der nested (=verschachtelt) PCR einer nachgeschalteten zweiten PCR-Runde und eines weiteren Primersets, welches jeweils weiter upstream in Richtung 3'-Ende mit der Matrizen-DNA, dem PCR-Produkt der ersten PCR-Runde, hybridisiert. Die Wahrscheinlichkeit für das erneute Auftreten unerwünschter Primer-Bindung innerhalb der PCR-Produkte der ersten PCR-Runde ist hinreichend gering. Lediglich das erwünschte PCR-Produkt kann so hochspezifisch angereichert werden. Wird nun bei der zweiten PCR-Runde lediglich einer der beiden Primer des Primersets der ersten PCR-Runde durch einen nested Primer ersetzt, in unserem Falle der Reverse-Primer, spricht man von einer semi-nested PCR. Für die spätere Detektion der Amplikons wurden an dieser Stelle FAM-markierte Reverse-Primer verwendet.



**Abb. 2.5: Schema einer Nested PCR**

P1: Primer 1, P2: Primer 2. Übernommen von Labor Gärtner.<sup>235</sup>

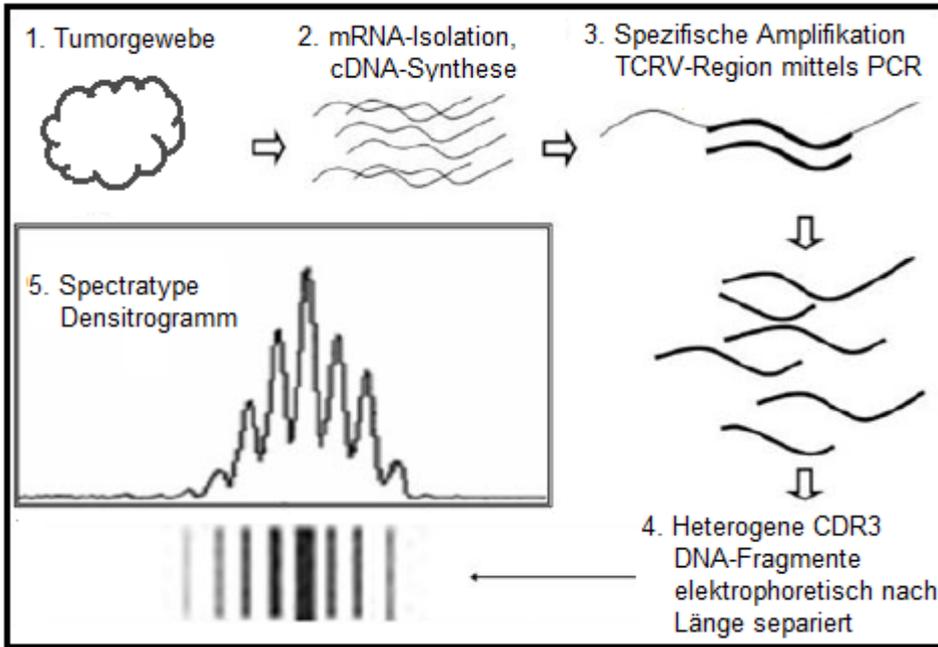
Multiplex-PCR-Verfahren wurden für die Amplifikation der TCRV $\alpha$ - und KIR-Transkripte verwendet. Vor dem Hintergrund, dass wie in Tabelle 7 gezeigt eine große Anzahl verschiedener Gen-Segmente auf Genexpression hin untersucht wurde, diente diese Methode der effektiven Nutzung des Template-Materials. Statt nur ein Primerpaar in einer PCR-Reaktion zu verwenden, werden bei der Multiplex-PCR mehrere Primerpaare in einen PCR-Ansatz gegeben. So können innerhalb einer PCR-Reaktion mehrere verschiedene Amplikons angereichert werden. Voraussetzung für dieses Verfahren ist, dass die Oligonukleotid-Primer auf Interaktionen untereinander geprüft werden, Gen-Segmente nicht überlappen und die Amplikons für die spezifische Detektion verschiedene Fragmentlängen aufweisen. So konnten 2-3 verschiedene TCRV $\alpha$ - bzw. KIR-Transkripte in einer PCR-Reaktion amplifiziert werden.

Tabelle 12: Exemplarischer Multiplex-PCR-Ansatz für Detektion von NKp44, NKp46, CD226

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>
Gold Taq	12,5 $\mu$ l
cDNA	0,5 $\mu$ l
Primer-Mix (3x je Forward- und Reverse-primer 0,5 $\mu$ l, 20 pmol/ $\mu$ l)	3 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	9 $\mu$ l

### 2.2.3.6 Fragmentlängenanalyse (TCR- und KIR-Spectratyping)

Die Untersuchung der Genexpression der TCRV $\alpha$ ,  $\gamma$ - und  $\delta$ - und KIR-Gene/Gensegmente wurde mittels PCR-basierter Fragmentlängenanalyse im ABI 3130 xl Genetic Analyzer durchgeführt. Die zuvor spezifisch amplifizierten und durch FAM-Label fluoresceinmarkierten Fragmente konnten so über ihre Länge und Fluoreszenzeigenschaften gelelektrophoretisch aufgetrennt und detektiert werden.



**Abb. 2.6: Schematische Darstellung des Spectratyping**

(1) Dem Versuchstier wird Tumorgewebe entnommen und mechanisch zerkleinert, (2) aus Tumorgewebe die mRNA isoliert, (3) an dieser wird cDNA synthetisiert und diese entsprechend der zu untersuchenden TCRV-Familie mit spezifischen Primern amplifiziert (TCRV $\alpha$ , - $\gamma$ - und  $\delta$ ). (4) Es entstehen heterogene, die CDR3-Region umfassende DNA-Fragmente, die elektrophoretisch ihrer Länge nach sortiert werden. (5) Die Menge an Material der einzelnen Banden wird schließlich mittels Densometrie quantifiziert. „Fragmentlängenanalyse“. Adaptiert und übersetzt nach Kepler et al.<sup>236</sup>

Tabelle 13 und Abbildung 2.7 zeigen die Probenvorbereitung zur Fragmentanalyse im Sequenziergerät.

Tabelle 13: PCR-Produkt-Vorbereitung für Sequenziergerät

Komponente	Volumen
PCR Produkt 1:10 verdünnt	1,0 $\mu$ l
Formamid	13,5 $\mu$ l
GeneScan™ – 600 LIZ® Size Standard	0,5 $\mu$ l

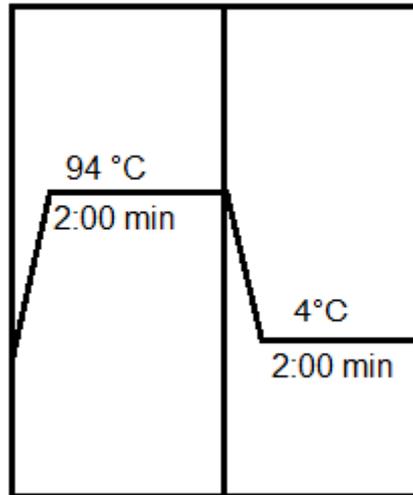


Abb. 2.7: Thermocyclerprogramm zur Denaturierung

Anschließend erfolgte die Lagerung der Probe auf Eis für mindestens zwei Minuten, um sie dann auf eine Mikrotiterplatte zu pipettieren.

#### 2.2.3.6.1 TCRV $\alpha$ -Spectratyping

Die TCRV $\alpha$ -Segmente wurden mittels TCRV $\alpha$ -Segment spezifischem Forward- sowie zwei Reverse-Primern des TCR $\alpha$ -Segments in semi-nested RT-PCR amplifiziert. Der erste Reverse-Primer diente der Amplifikation des PCR-Produktes, der zweite Reverse-Primer war mit FAM markiert und ermöglichte, nach der zweiten PCR, die Detektion des Amplikons im ABI 3130 xl Genetic Analyzer. Die PCR-Bedingungen und eingesetzte Primer wurden von Han et al. übernommen.<sup>233</sup>

#### 2.2.3.6.2 TCRV $\gamma$ - und $\delta$ -Spectratyping

Auch die TCRV $\gamma$ - und  $\delta$ -Ketten wurden durch jeweils einen TCRV $\gamma/\delta$ -Segment spezifischen Forward- und zwei Reverse-Primer des TCR $\gamma/\delta$ -Segments in semi-nested RT-PCR amplifiziert. Die PCR-Bedingungen und eingesetzte Primer entstammten dem bei Annik Lim verwendeten Protokoll, aber auch aus dem Design von Prof. Dr. Karin Schilbach.<sup>234</sup>

### 2.2.3.6.3 KIR-Spectratyping

Die KIR-Segmente, im Speziellen für diese Arbeit NKR- und NCR-Segmente, wurden durch Gen-Lokus spezifische Forward- und Reverse-Primer mittels RT-PCR amplifiziert. Die eingesetzten Primer waren von Prof. Dr. Karin Schilbach und Kollegen designed worden. Die PCR-Bedingungen waren wie zuvor bei Chen et al. verwendet worden. <sup>237</sup>

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Tumorregression und verbessertes Überleben nach T-Zellinfiltration und Myogener Enddifferenzierung der Tumore durch Kombinationstherapie bestehend aus lokaler Bestrahlung und NHS-IL12 Gabe

Nachdem die Versuchstiere wie in 2.1.1 und 2.2.1 beschrieben gruppiert, behandelt und betrachtet wurden, folgte die Auswertung der relative TumorgroÙe, des tumorspezifischen Überlebens, sowie histologische Marker.

#### 3.1.1 Relative TumorgroÙe und Survivalanalyse in Abhängigkeit von der Behandlungsgruppe

Wir betrachteten das Wachstum der inokulierten Tumore in Relation zur AusgangstumorgroÙe am Tag des Therapiebeginns. Wir verglichen zum einen den relativen Wachstumsverlauf über einen Zeitraum von 25 Tagen nach Therapiebeginn (s.Abb 3.1), zum anderen die relative TumorgroÙe an Tag 15 nach Therapiebeginn (s.Abb 3.2).

Die unbestrahlten Tumore der unilateral radiotherapierten Tiere (I1) sowie die Tumore der nur mit NHS-IL12 systemisch behandelten Tiere (II3) wuchsen über den Beobachtungszeitraum von 25 Tagen unkontrolliert. Einen ähnlichen Wachstumsverlauf zeigten die radiotherapierten Tumore der unilateral bestrahlten Mäuse (I2). Fünf der sechs derart behandelten Tumore (I2) wuchsen stetig. Ganz anders bei den ipsilateral bestrahlten Tumoren der Mäuse, welche kombiniert mit lokaler Radiotherapie und systemisch mit NHS-IL12 therapiert worden waren (III5). Hier nahm die TumorgroÙe bei zwei von sechs Tumoren ab und blieb bei den weiteren vier über mindestens sieben Tage stabil. Die nicht

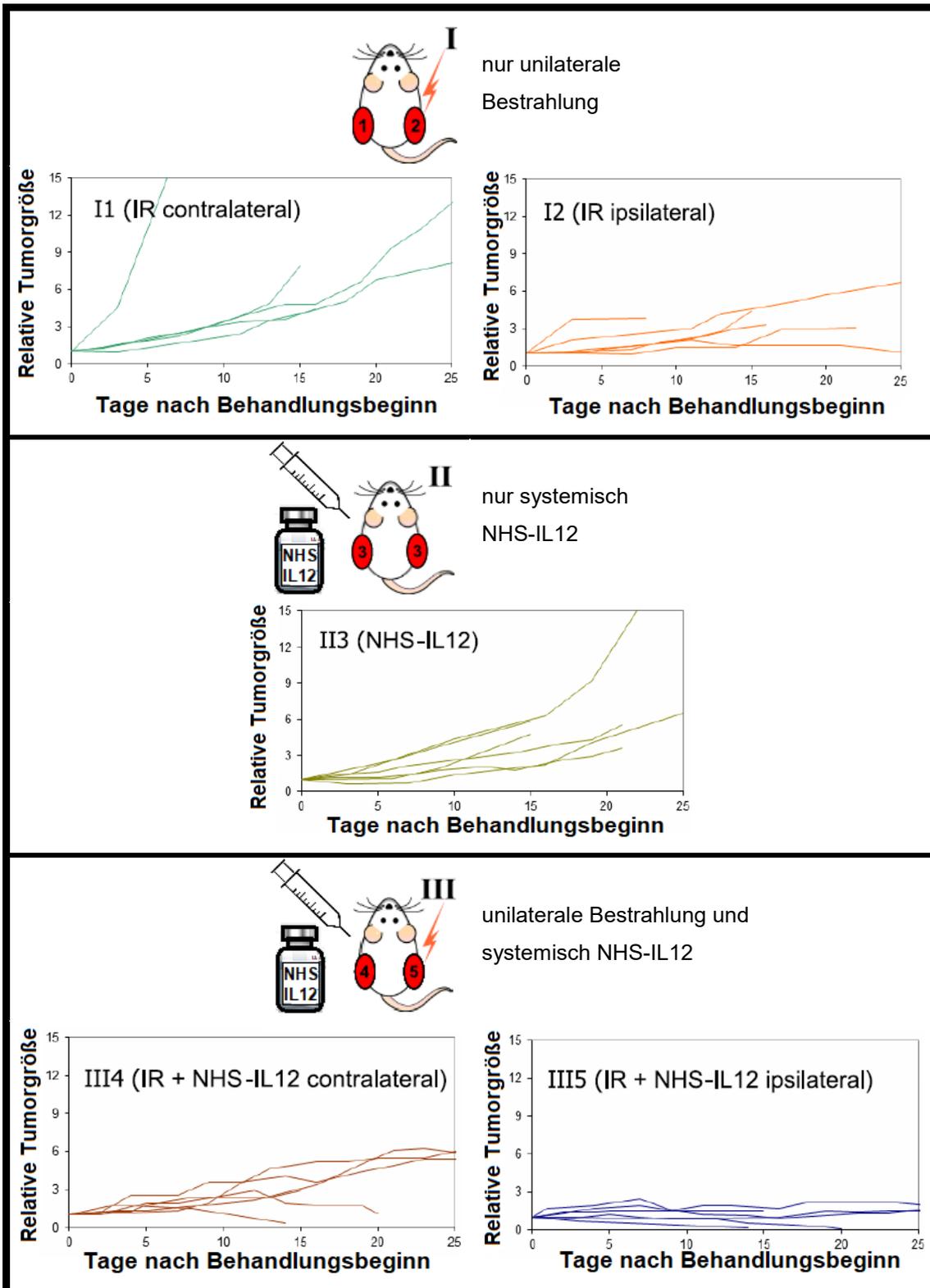
## Ergebnisse

---

bestrahlten Tumore der Tiere, welche die Kombinationstherapie erhalten hatten (III4), wuchsen sehr unterschiedlich.

Die zwei Tumore, welche schrumpfende ipsilateral bestrahlte Counterparts hatten, schrumpften ebenfalls – allerdings mit einer Verzögerung von acht Tagen bei einem und zwölf Tagen Verzögerung bei einem anderen Tumor. Drei weitere der Tumore kombiniert lokal radiotherapierter und systemisch mit NHS-IL12 behandelte Mäuse, welche nicht bestrahlt worden waren, wuchsen kontinuierlich, wenn auch langsamer. Ein derart behandelte Tumor wurde in seinem Wachstum ab Tag zwölf arretiert. (s.Abb 3.1)

# Ergebnisse

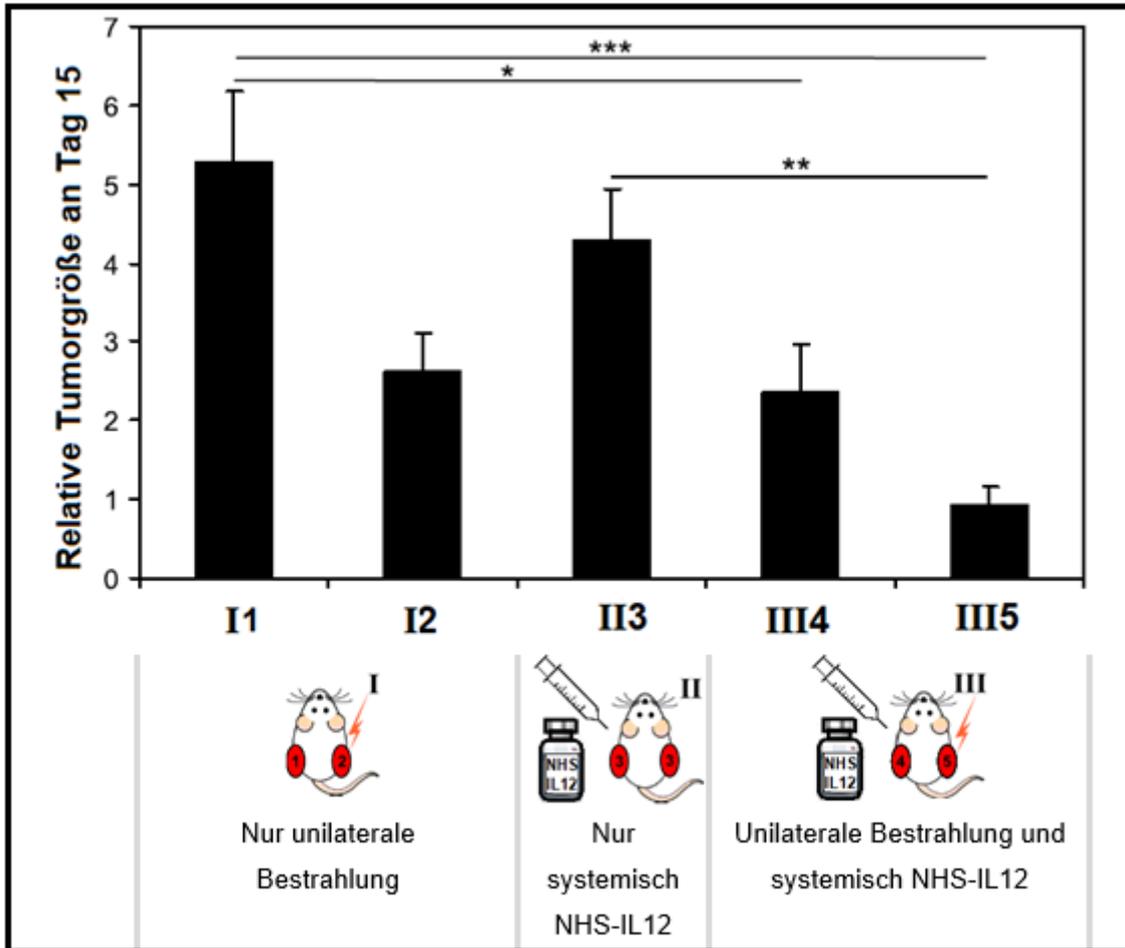


**Abb. 3.1: Tumorwachstum**

Tumore der KG (I) zeigten ein schnelles Wachstum. Ipsilaterale Radiatio konnte einen von sechs Tumoren kontrollieren. Systemische NHS-IL12-Therapie allein (II) verlangsamte das Tumorwachstum. Nach Kombinationstherapie bei contralateraler Radatio verlangsamtes bzw. arretiertes Wachstum, bei ipsilateraler Radatio Tumorkontrolle (III).

Bei Betrachtung der relativen TumorgroÙe an Tag 15 nach Therapiebeginn zeigte sich die Kombinationstherapie signifikant wirksamer. (s.Abb. 3.2) Die TumorgroÙe wurde in Relation zur AusgangstumorgroÙe am Tag des Therapiebeginns bewertet. Im Vergleich der Tumore der nur unilateral bestrahlten Mäuse untereinander (I1 und I2) lieÙ sich kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die TumorgroÙe erkennen. Ebenso zeigte sich im Vergleich der Tumore von lediglich mit NHS-IL12 behandelten Mäusen (II3) und denen der Kontrollgruppe (I1) kein signifikanter Unterschied in der relativen TumorgroÙe an Tag 15. Die Tumore der kombiniert therapierten Tiere verhielten sich anders. Die Kombinationstherapie verhinderte signifikant das Wachstum der ipsilateral radiotherapierten Tumore (III5). Auch bei den unbestrahlten Tumoren der kombiniert therapierten Tiere (III4) war die relative TumorgroÙe an Tag 15 signifikant geringer. Ein signifikanter Unterschied war auch zwischen den ipsilateral radiotherapierten Tumoren der Mäuse mit Zustand nach Kombinationstherapie (III5) und den Tumoren der alleinig mit NHS-IL12 behandelten Tiere (II3) zu sehen. (s. Abb. 3.2 )

## Ergebnisse

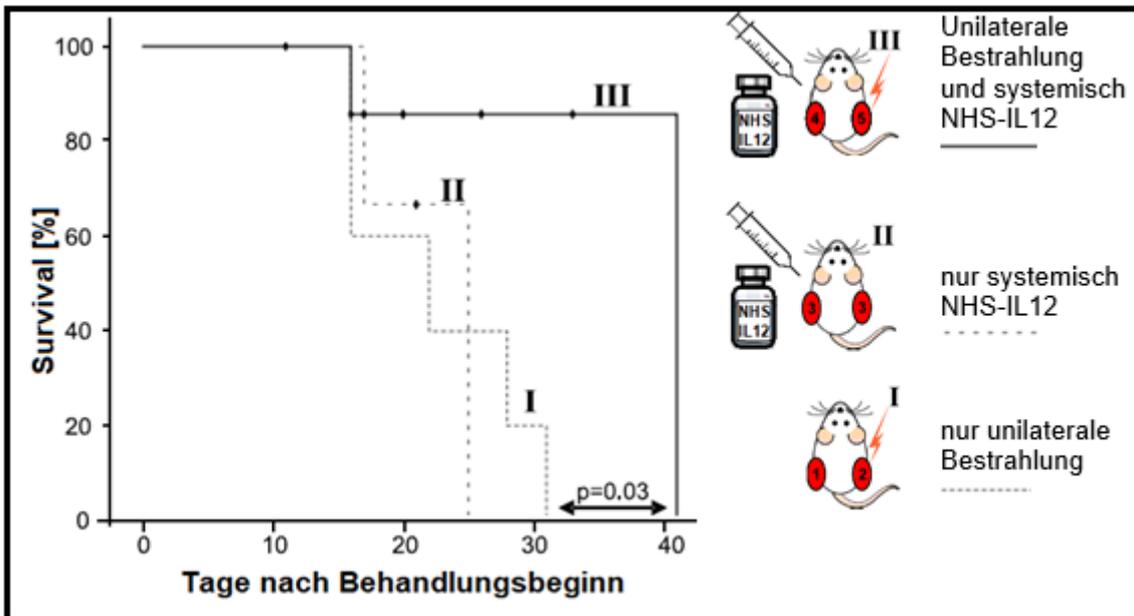


**Abb. 3.2: Tumorwachstum (Tag 15)**

Die relative Tumorgroesse an Tag 15 nach Therapiebeginn unterschied sich signifikant zwischen nichtbestrahlten Tumoren (I1) der nur unilateral radiotherapierten Mäusen und den bestrahlten sowie unbestrahlten Tumoren (III4 und III5) von Mäusen, welche die Kombinationstherapie erhalten hatten. Signifikante Unterschiede bzgl. der Tumorgroesse an Tag 15 waren ebenfalls zwischen Tumoren nur systemisch mit NHS-IL12 therapeutierter Mäusen (II3) und den lokal bestrahlten Tumoren kombiniert therapeutierter Mäusen (III5) zu sehen.

## Ergebnisse

In Bezug auf das tumorgrößenpezifische Überleben ließ sich ein signifikant längeres Überleben der kombiniert therapierten Tiere (III) gegenüber den Tieren aus den monotherapierten Gruppen (I und II) zeigen. Im Vergleich der Gruppen der monotherapierten Tiere untereinander unterschied sich das Überleben nicht signifikant. (s. Abb. 3.3).



**Abb. 3.3: Tumorgrößenpezifische Survivalanalyse**

Mäuse, welche die Kombinationstherapie erhalten hatten, zeigten ein signifikant längeres Überleben als Mäuse, welche nur unilateral radiotherapiert oder nur systemisch mit NHS-IL12 behandelt worden waren

### 3.1.2 Histologische und immunhistochemische Untersuchung der Tumore

Die histologische und immunhistochemische Analyse diente zur Bewertung der Tumore in Hinsicht auf ihre Immunzell-Infiltration (CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, NK-Zellen), auf den Phänotyp der infiltrierenden Immunzellen (Granzym B<sup>+</sup> tumorlytisch) und auf eine potentiell induzierte Seneszens mit nachfolgender Differenzierung der Tumore durch das von Immunzellen sezernierten TNF $\alpha$ /IFN $\gamma$ , sichtbar durch den Marker Desmin. Die histologisch ausgewerteten Abschnitte wurden je nach Signalstärke nach IHC-Score von 0 bis 3 bewertet (none, low, moderate, high staining). (s.a. 2.2.2) In Tumoren der mit unimodaler Therapie behandelten Tiere (I1, I2 und I3) waren abgesehen von einem ipsilateral bestrahlten Tumor kaum T-Zell-Infiltrate nachweisbar. Ganz anders die Tumore der Tiere, die Kombinationstherapie erhalten hatten. Hier fanden sich prominente T-Zellkompartimente sowohl in ipsilateral als auch in contralateral bestrahlten Tumoren (III4 und III5). In diesen mit Kombinationstherapie behandelten Tumoren fanden sich neben CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen auch Zytotoxine nachgewiesen durch die Expression von Granzym B und Perforin, was auf Aktivierung und eine CTL-Differenzierung des Immunkompartiments hinweist. Von übergeordneter Bedeutung für die Aussage des Studiendesigns ist jedoch, dass die Kombinationstherapie in den betreffenden Tumoren zur Expression des Markers Desmin führte, ein Protein, das von reifer quergestreifter Muskulatur exprimiert wird. Dieser Zellmarker enddifferenzierter Myozyten steht für die Entstehung quergestreifter Muskelzellverbände und weist hier auf die Enddifferenzierung quergestreifter Muskulatur aus undifferenzierten RMS-Zellen hin. Histologisch ließen sich nach Kombinationstherapie zudem mehrkernige myogene Synzytien und quergestreiftes Muskelgewebe erkennen. (s. Abb. 3.4 und Abb. 3.5) .

# Ergebnisse

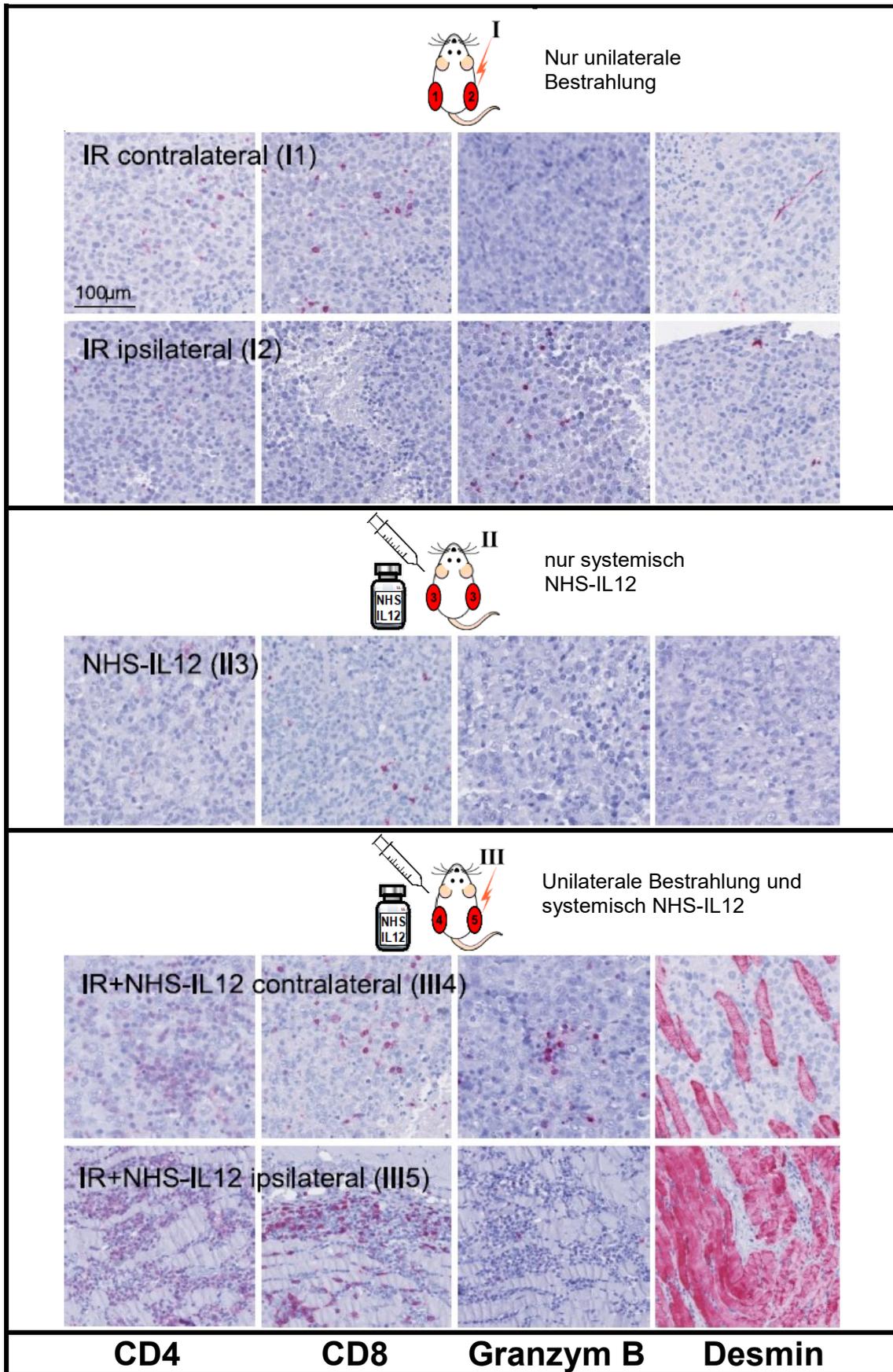
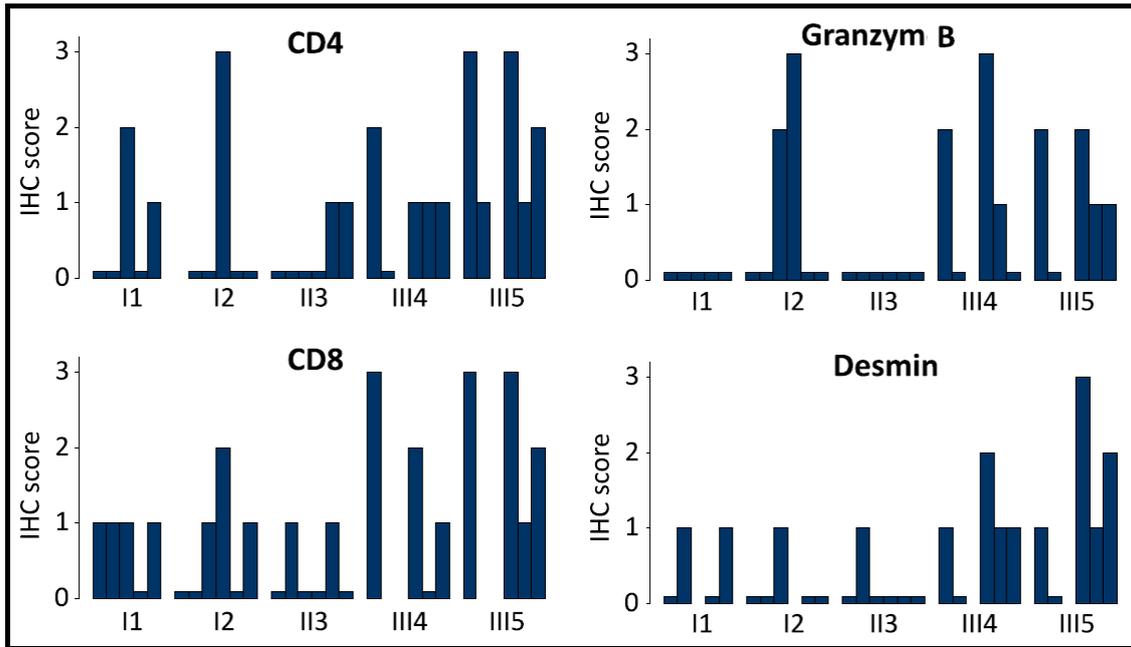


Abb. 3.4.: Histologie und Immunhistochemie (s.a. 20)

## Ergebnisse

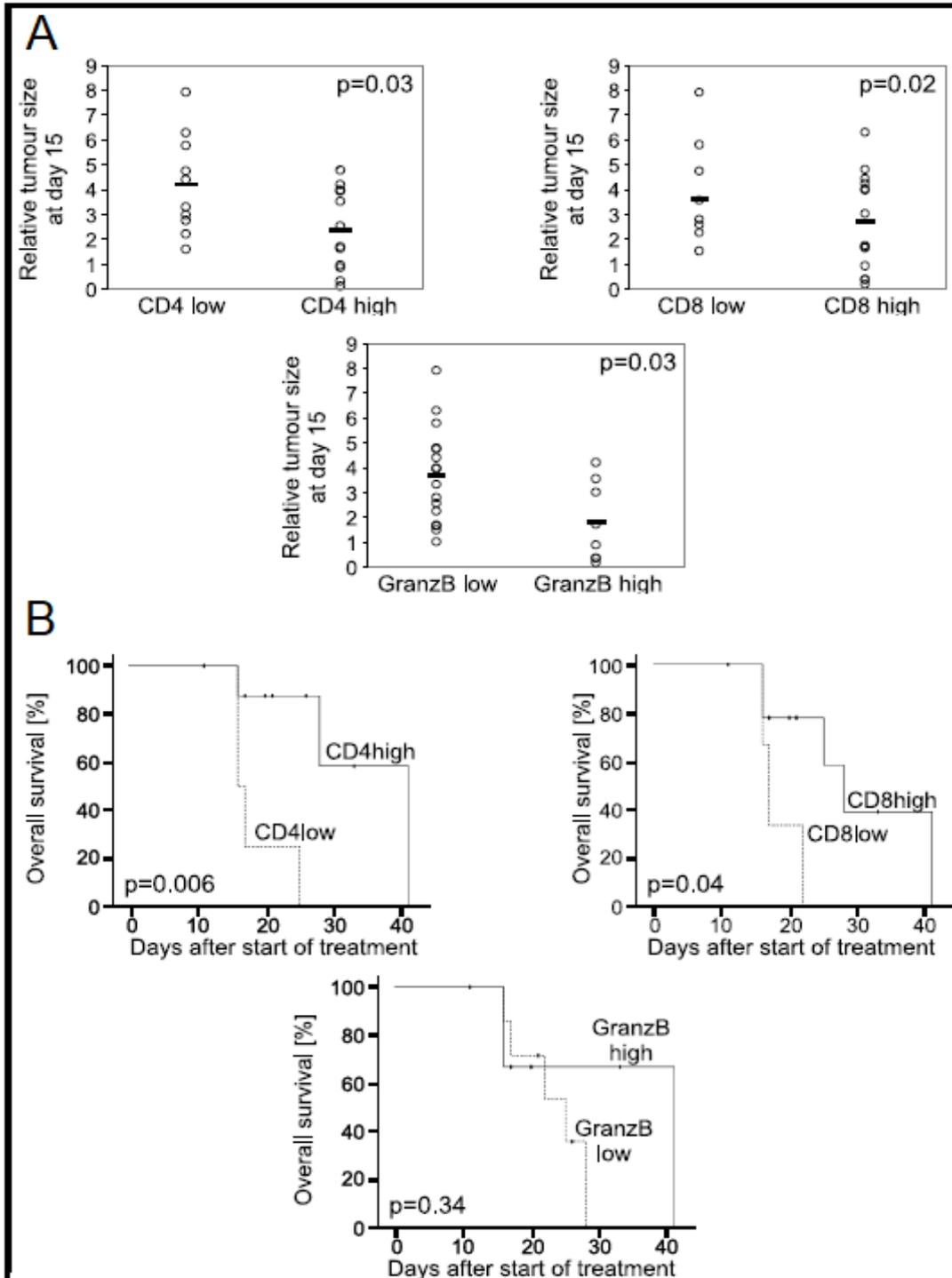


**Abb 3.5.: Quantitatives Scoring der Histologie und Immunhistochemie**

Verstärkte T-Zell-Infiltration und -Aktivierung (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und Granzym B<sup>+</sup>) lässt sich in durch lokale Bestrahlung und NHS-IL12 kombiniert therapierten Tumoren (III5) erkennen. Areale Desmin<sup>+</sup> myogener Entdifferenzierung waren nur in Tumoren nach Kombinationstherapie (III4/III5) zu sehen. Bei Tieren, welche NHS-IL12 und lokale Bestrahlung erhalten hatten (III), zeigten sich, wenn der ipsilateral bestrahlte Tumor (III5) massive Immuninfiltrate aufwies, auch beim contralateralen Tumor (III4) T-Zell-Infiltrate. Im Gegensatz dazu wiesen die Tumore der nur lokal radiotherapierten Mäuse (I2) contralateral (I1) kaum Immuninfiltrate auf. (s.a. <sup>20</sup>)

Bei Betrachtung der relativen Tumorgroße an Tag 15 sowie des Gesamtüberlebens in Abhängigkeit von T-Zell-Infiltration und tumorlytischem Phänotyp zeigt sich eine weitestgehend negative Korrelation. Eine starke Infiltration durch CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie Aktivierung und Differenzierung zu CTL (Granzym B<sup>+</sup>) korrelierte signifikant mit geringerem Tumolvolumen.

(s. Abb. 3.6) Für die Analyse des Gesamtüberlebens wurden jeweils die IHC-Scores des Tumors mit dem höheren Nachweis für dieses Tier verwendet. Signifikant verlängert war das overall survival bei Tieren mit starker intratumoraler T-Zell-Infiltration (CD4 high, CD8 high) gegenüber Tieren mit geringer intratumoraler T-Zell-Infiltration (CD4 low, CD8 low). Für Granzym B ließ sich keine Korrelation zwischen starkem Zytotoxin-Nachweis (Granzym B high) und dem Gesamtüberleben zeigen. (s. Abb. 3.6 )



**Abb 3.6.: Relative TumorgroÙe und Gesamtüberleben in Abhängigkeit von T-Zellinfiltration**

Die relative TumorgroÙe an Tag 15 ist bei Tumoren mit hoher T-Zell-Infiltration und –Aktivierung (CD4 high, CD8 high, GranzB high) signifikant geringer (A). Zur Betrachtung des Gesamtüberlebens in Abhängigkeit von T-Zell Infiltration und GranzymB wurden jeweils die IHC-Scores des Tumors mit dem höheren Nachweis für dieses Tier verwendet. Signifikant verlängert ist das Über bei Tieren mit starker T-Zell-Infiltration (CD4 high, CD8 high). Für Granzym B lässt sich keine signifikante Korrelation zeigen. (s.a. <sup>20</sup>)

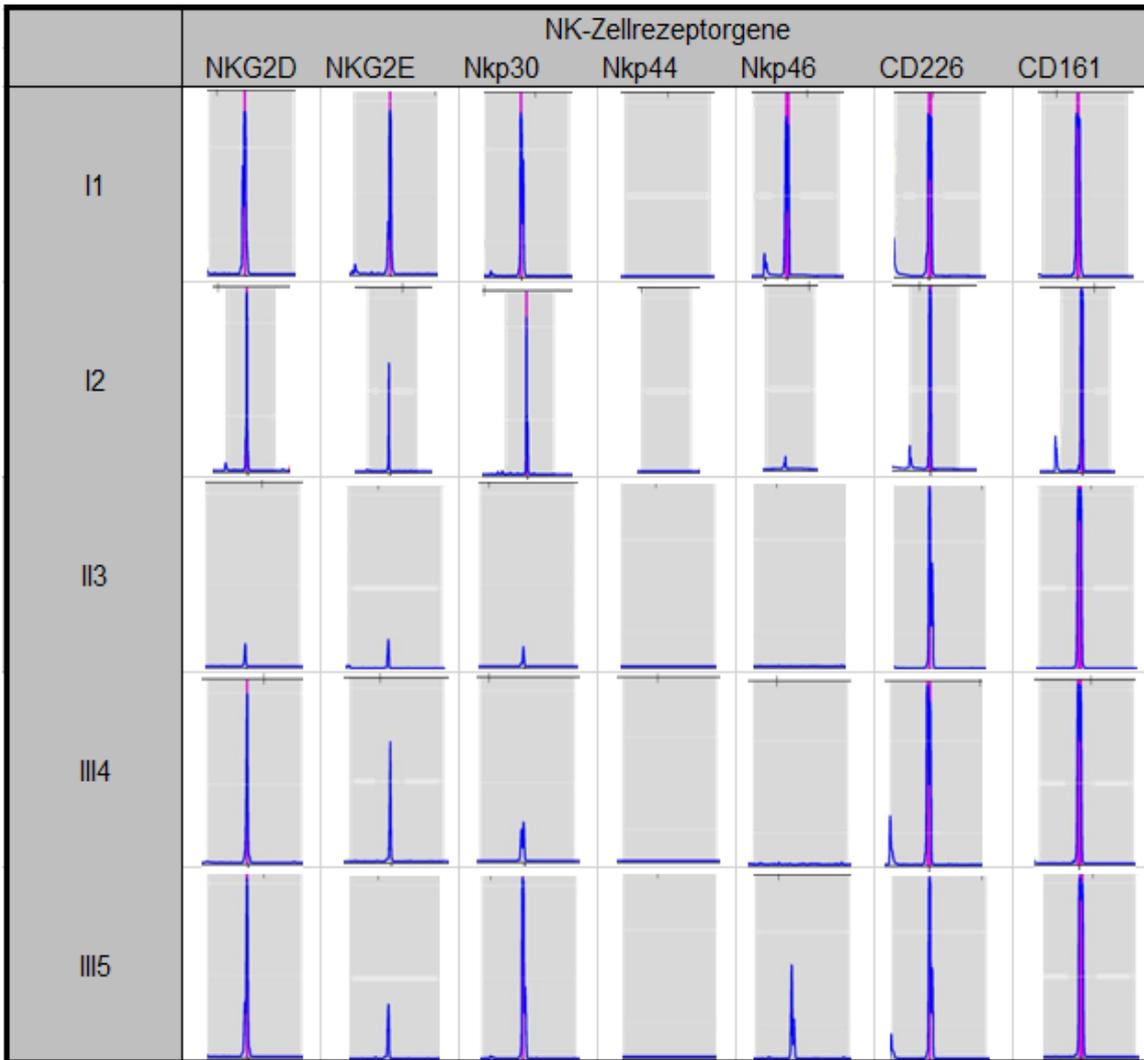
## 3.2 Induktion einer breiten Immunantwort auf T-Zell und NK-Zell-Ebene nach Behandlung mit Kombinationstherapie

Nachdem die Versuchstiere wie in 2.1.1 und 2.2.1 beschrieben gruppiert, behandelt und betrachtet worden waren, untersuchten wir die Rezeptor-Repertoires intratumoraler NK-Zellen,  $\alpha\beta$  T-Lymphozyten und  $\gamma\delta$  T-Zellen.

### 3.2.1 NK-Zellrezeptorgene werden durch alle Kontroll- und Therapiegruppen hindurch homogen exprimiert

Sowohl die aktivierende NK-Zellrezeptorgene wie NKG2D, NKG2E, NKp30, Nkp44, NKp46 und CD226 als auch CD161 als lineage marker für intratumorale  $T_H17$ -Zellen wurden in Tumoren aller Therapiegruppen homogen exprimiert. Das Rezeptorrepertoire intratumoraler NK-Zellen weist auf deren Aktivierung und lytisches Potential hin. Der gezeigte NK-Zell-Phänotyp mit Hochregulation aktivierender Rezeptoren setzt eine hohe IL-12-Verfügbarkeit voraus. Die durch alle Therapiegruppen hindurch ebenfalls exprimierten CD161-Rezeptorgene weisen auf durch  $T_H17$ -Zellen produziertes IL-17 hin. Diese T-Zellsubpopulation kann durch IL-12-Präsenz in  $T_H1$ -Lymphozyten repolarisiert werden. Auffallenderweise wurde Nkp44 in keinem der Tumore nachgewiesen. (s.a. Abb. 3.6 und 3.7) Nkp44 ist ein NCR, der in der Zellmembran aktivierter NK-Zellen zu finden ist, und bei Bindung eine weitere Aktivierung der NK-Zelle mit lytischer Zerstörung der erkannten Zelle vermittelt. Wie bei den weiteren NCR NKp30 und NKp46 sind die durch Nkp44 erkannten Zielstrukturen noch nicht charakterisiert. Nkp44 wird eine Rolle in der nicht MHC-restringierten Tumorzelllyse zugeschrieben. Neben NK-Zellen exprimiert auch eine  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulation Nkp44. (s.a. 1.2.2.2)

## Ergebnisse



**Abb 3.7: Exemplarische Darstellung des KIR-Spectratyping von infiltrierenden NK-Zellen aus Tumoren unterschiedlicher Therapiegruppen.**

I1: Contralateral bestrahlter Tumor ohne NHS-IL12. I2: Ipsilateral bestrahlter Tumor ohne NHS-IL12. II3: Nur systemisch NHS-IL12. III4: Cotralateral bestrahlter Tumor mit NHS-IL12. III5: Ipsilateral bestrahlter Tumor mit NHS-IL12.

Im Gegensatz zu den durch Neukombination mehrerer Gensegmente entstandenen hochindividuellen TCRs, sind NK-Zell-Rezeptoren germline encoded und das Ergebnis der Expression jeweils eines definierten Genlokus. Wird ein Genlokus exprimiert, entsteht durch Transkription eine einzige mRNA in multiplen Kopien, die sich wie in Abb. 3.7 zu sehen über einen einzelnen deutlichen Peak nachweisen lassen. Die KIR-Typedaten lassen daher nicht nur eine binäre Aussage sondern auch eine semiquantitative Aussage zu (s. Abb 3.7, vgl. Expression des Genlokus für Nkp46 in Tumoren der Therapiegruppen I1 und III5, nicht aber II3), da die Höhe der Expression eines NK-Zellrezeptorgens

## Ergebnisse

mit dem im KIR-Typing gezeigten Integral des Peaks (Fläche und Höhe) korreliert.

	I1		I2		II3		III4		III5	
	Maus 314	Maus 378	Maus 314	Maus 378	Maus 348		Maus 363	Maus 337	Maus 363	Maus 337
NKG2D	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
NKG2E	o	o	o	o	o		o	o	o	o
Nkp30	o	o	o	o	o		o	o	o	o
Nkp44										
Nkp46	o		o	o	o		o		o	
CD 226	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
CD161	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o

o Expression des Genlokus

**Abb 3.8: Homogene Expression der NK-Zellrezeptorgene durch alle Therapiegruppen hindurch**

In keinem der Tumore konnte die Expression von Nkp44 detektiert werden. I1: Contralateral bestrahlter Tumor ohne NHS-IL12. I2: Ipsilateral bestrahlter Tumor ohne NHS-IL12. II3: Nur systemisch NHS-IL12. III4: Cotralateral bestrahlter Tumor mit NHS-IL12. III5: Ipsilateral bestrahlter Tumor mit NHS-IL12.

### 3.2.2 Kombinationstherapie induziert breitesten TCRV $\alpha$ -Repertoire mit höchsten Peaks und systemisch nachweisbaren Klonen

Wir untersuchten mittels Spectratyping das TCRV $\alpha$ -Repertoire tumor-infiltrierender  $\alpha\beta$  T-Lymphozyten. So konnten für die einzelnen TCRV $\alpha$ -Segmente Expressionsniveau und klonale Breite bzw. mögliche klonale Expansion in Abhängigkeit von der Therapie analysiert werden. Die Nachweisgrenze für Peaks im Spectratyping für TCRV $\alpha$ -Segmente liegt bei einer Peakhöhe von 30 ht.

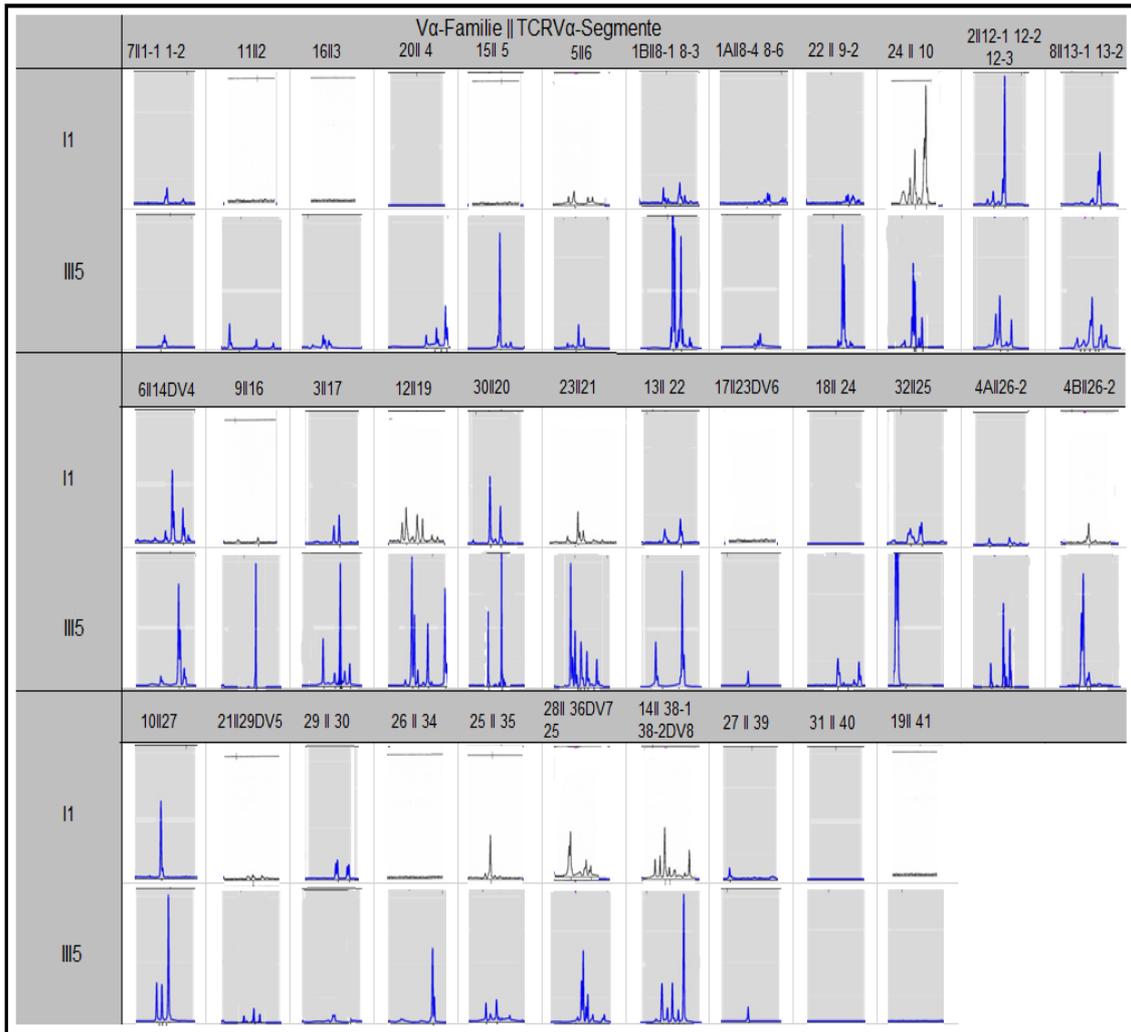
Stellt sich im Spectratyping ein Peak prominent dar (Single Peak), lässt das auf die Proliferation eines T-Zellklons schließen, für dessen TCR dieses TCRV $\alpha$ -Segment exprimiert wurde. Es ist am ehesten zur (mono-)klonalen Expansion dieses T-Zell-Klones durch antigenspezifischen Aktivierung gekommen. (s. exemplarisch Abb. 3.23)

Zeigen sich mehrere Peaks für ein Segment (pseudo-gaußsche Verteilung), weist dies auf einen polyklonalen Charakter der  $\alpha\beta$  T-Zellpopulation hin. Dies ist vor allem bei antigenunabhängigen Expansionen typisch, wie sie beispielsweise

durch Zytokine in Kombination mit Mitogenen hervorgerufen werden können. (s. exemplarisch Abb. 3.19)

Lassen sich im Spectratyping in beiden Tumoren einer Maus korrespondierende Peaks in Bezug auf Fragmentlänge und Klonalität finden, könnte dies auf eine systemische klonale Expansion eines  $\alpha\beta$  T-Zell-Klons mit dieser betreffenden TCRV $\alpha$ -Kette hinweisen. Die Induktion eines systemischen Klons wird als ein Teil der immunologischen Grundlage Abscopaler Effekte diskutiert. Abscopale Effekte können nach lokaler Bestrahlung auftreten. Es kann dabei zu Tumoregression oder Seneszenzinduktion auch an nicht-bestrahlten, entfernteren Tumormanifestationsorten kommen. (s.1.2.3 und exemplarisch Abb.3.31, 3.33)

## Ergebnisse



**Abb 3.9: Exemplarische Darstellung des TCRV $\alpha$ -Spectratyping eines Tumors aus der Kontrollgruppe (I1) und eines Tumors einer Maus, welche die Kombinationstherapie erhalten hatte (III5)**

Das jeweilige  $\alpha$ -Repertoire in den analysierten Tumoren unterschied sich in Abhängigkeit von der Therapie teilweise deutlich. In den Tumoren der unilateral bestrahlten Mäuse (I1, I2) zeigten sich sowohl ipsilateral als auch contralateral multiple Peaks und einzelne Single Peaks geringen Expressionsniveaus für die jeweils untersuchte  $\alpha$ -Kette. (s. z.B. Abb. 3.11, 3.12, 3.14, 3.16, 3.30) Bemerkenswerterweise waren sowohl quasi-gaußsche Expressionen als auch Single Peaks in nicht bestrahlten Tumoren (I1) häufiger und deutlicher zu detektieren. (s. Abb. 3.14., 3.16, 3.17) Außerdem fanden sich korrespondierende Peaks, passend zu einer systemischen klonalen Expansion, bei einigen der untersuchten TCRV $\alpha$ -Segmente. (s.a. Abb. 3.21, 3.26) Wenn auch mit Peaks geringerer Intensität und seltener als in den untersuchten Tumoren kombiniert

therapierter Mäuse, induzierte hier lokale Radiotherapie die Expansion systemischer Klone. Für das TCRV $\alpha$ -Segment 20 || 30 konnte bei je einem Tier der Therapiegruppe I und III ein korrespondierender Single Peak in beiden Tumoren gezeigt werden. (s. Abb. 3.26) In den Tumoren allein systemisch mit NHS-IL12 behandelter Mäusen (II3) ließen sich kaum Single Peaks oder polyklonale Expression finden. NHS-IL12 allein induzierte weder eine besonders breite noch besonders intensive  $\alpha\beta^+$ T-Zell-Antwort. (s.a. 3.12, 3.13) Diese Antwort fiel in den Tumoren kombiniert radiotherapierter und systemisch mit NHS-IL12 behandelte Tiere (III5, III6) am intensivsten aus. Neben polyklonalen Peaks induzierte diese Therapie die meisten Single Peaks mit den höchsten Expressionsniveaus. (s. z.B. Abb. 3.11, 3.16, 3.18, 3.19) In Tumoren dieser Therapiegruppe ließen sich weiterhin für bestimmte V $\alpha$ -Segmente korrespondierende Peaks in ipsilateral und contralateral bestrahlten Tumoren desselben Tieres zeigen, welche auf eine systemische Expansion eines TCR $\alpha\beta^+$ -Klons hinweisen könnte. (s.a. z.B. Abb. 3.10, 3.11, 3.15, 3.18, 3.19, 3.23, 3.26, 3.31) Denkbar wäre auch eine polyklonale, jedoch längen- und TRAV-familienrestringierte T-Zell Antwort. Die Induktion systemisch nachweisbarer Klone ließ sich hier nach multimodaler Kombination von lokaler Radiotherapie und systemischer NHS-IL12-Gabe am deutlichsten sehen. Auch vermindertes Tumorstadium bzw. sogar Tumorstadiumsregression und Seneszenzinduktion im Sinne Abscopaler Effekte waren bei den Tumoren der Tiere, welche Kombinationstherapie erhalten hatten, am häufigsten. (vgl. 3.1.1 und 3.1.2)

# Ergebnisse

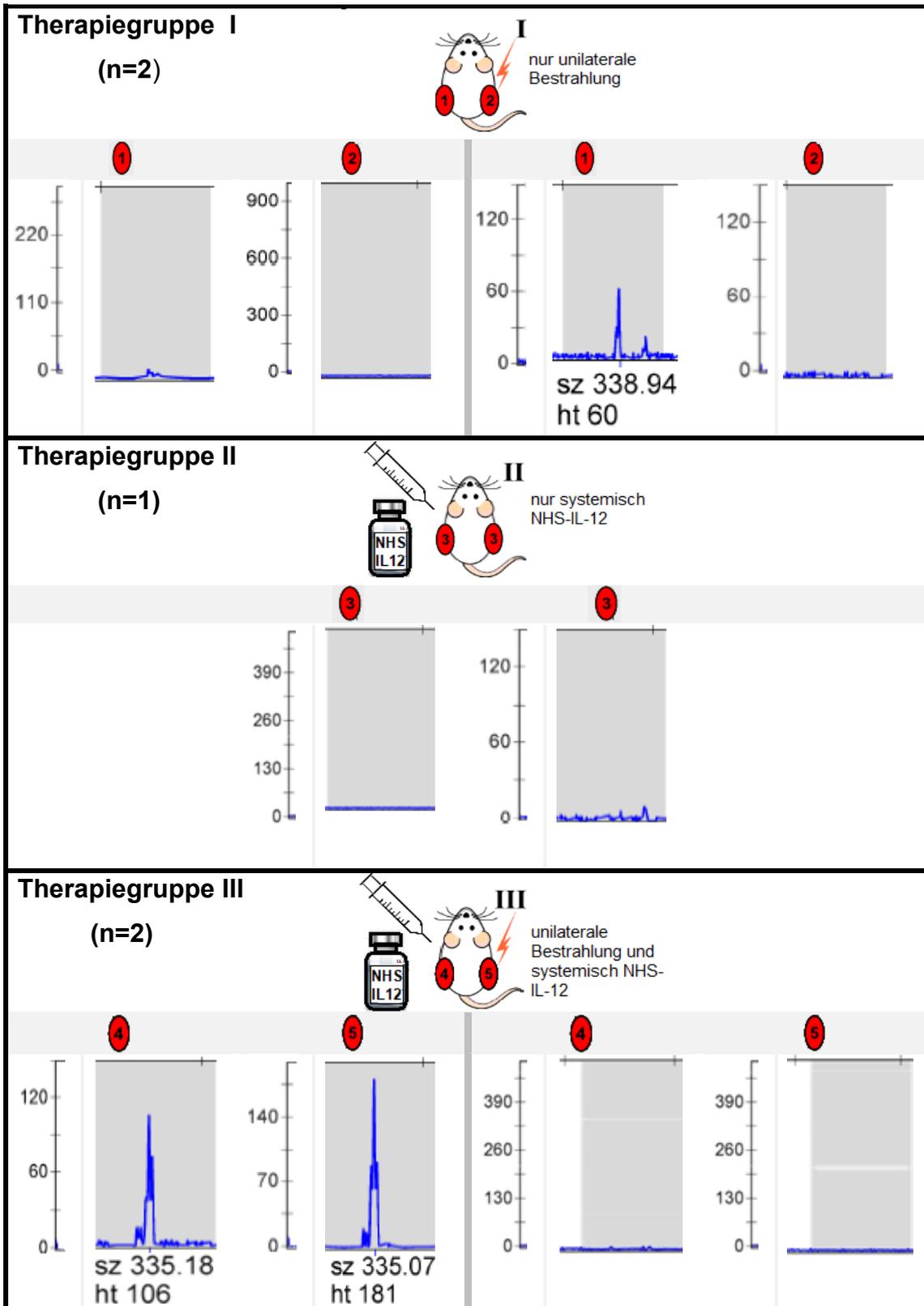
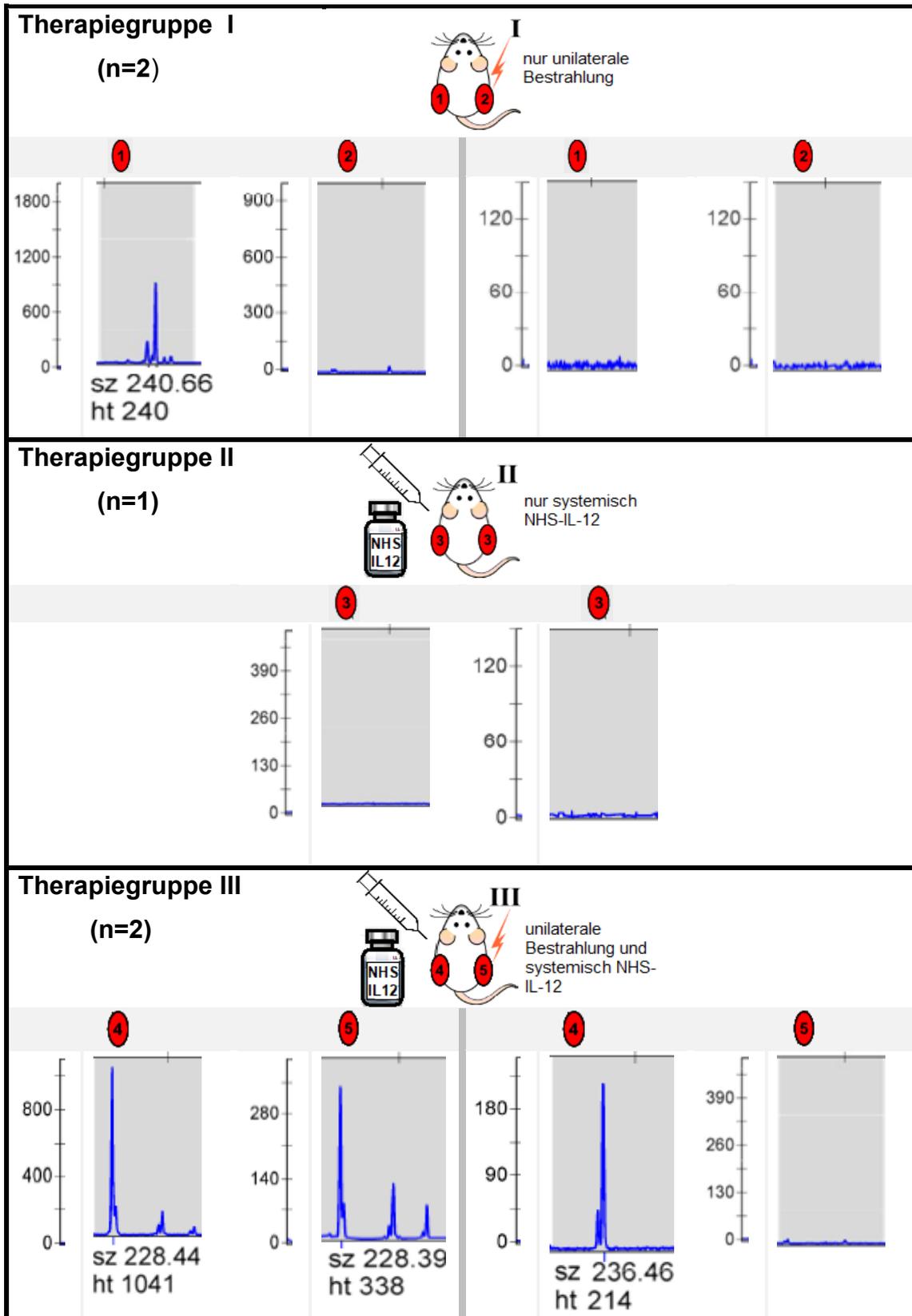


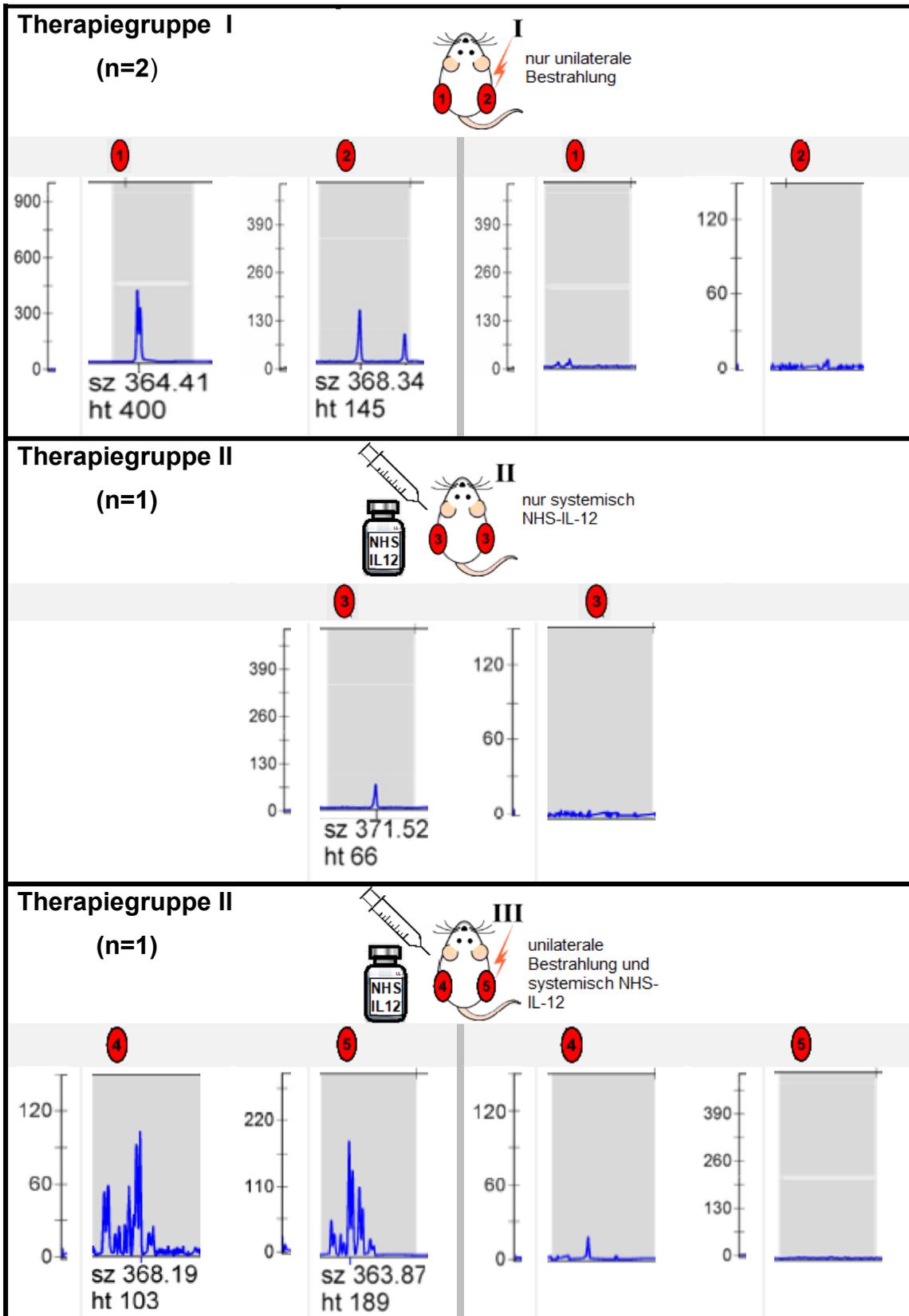
Abb. 3.10 Expressionsniveau und -Breite TCRV $\alpha$ -Segment 1-1 und 1-2 || 7  
 Korrespondierende Single Peaks in Tumoren eines kombiniert therapierten Tieres.

# Ergebnisse



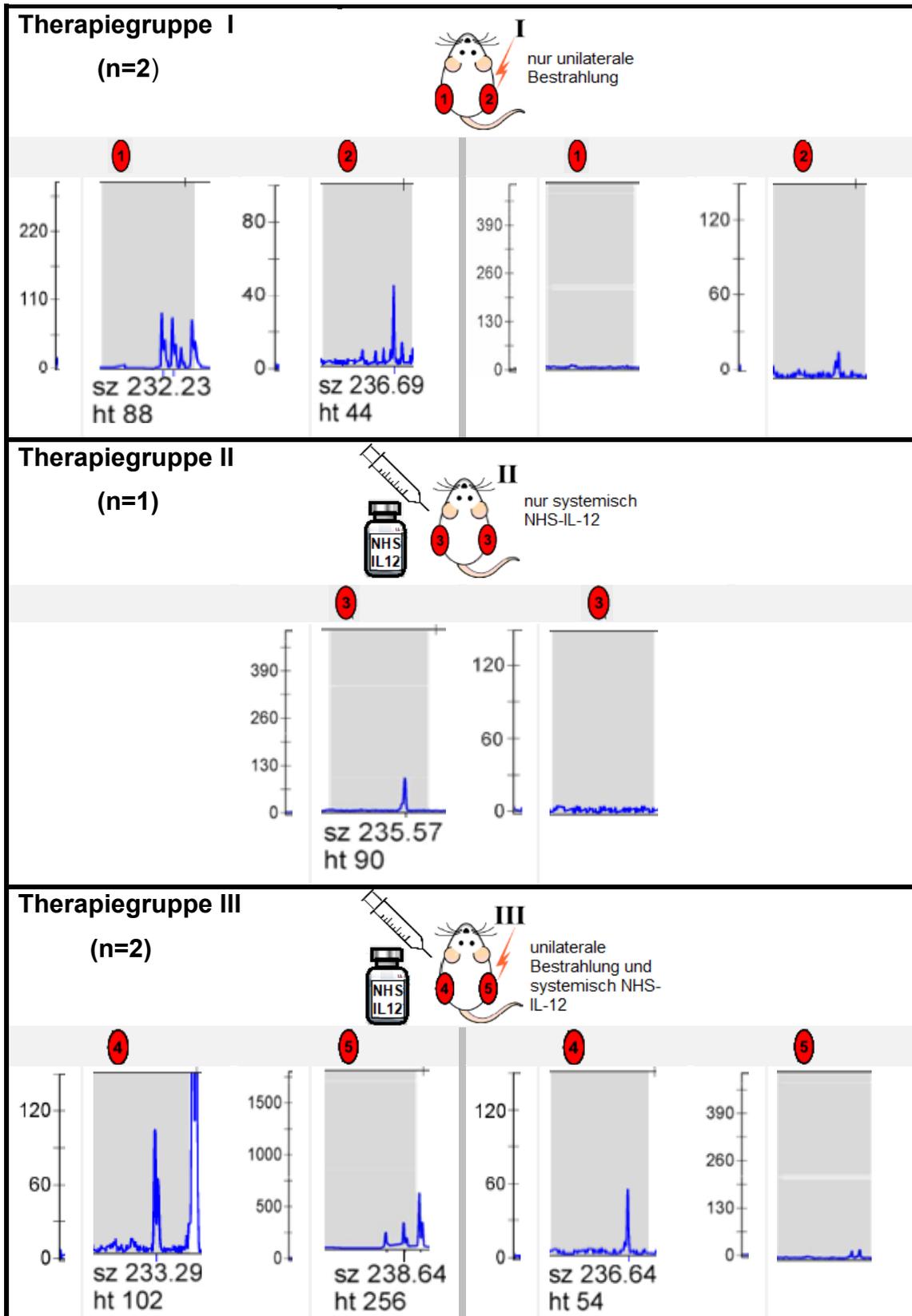
**Abb. 3.11: Expressionsniveau und -Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 2 || 11**  
In einem unbestrahlten Tumor einer unilateral bestrahlten Maus deutliche, polyklonale Expression. Korrespondierende Single Peaks in Tumoren eines kombiniert therapierten Tieres.

# Ergebnisse



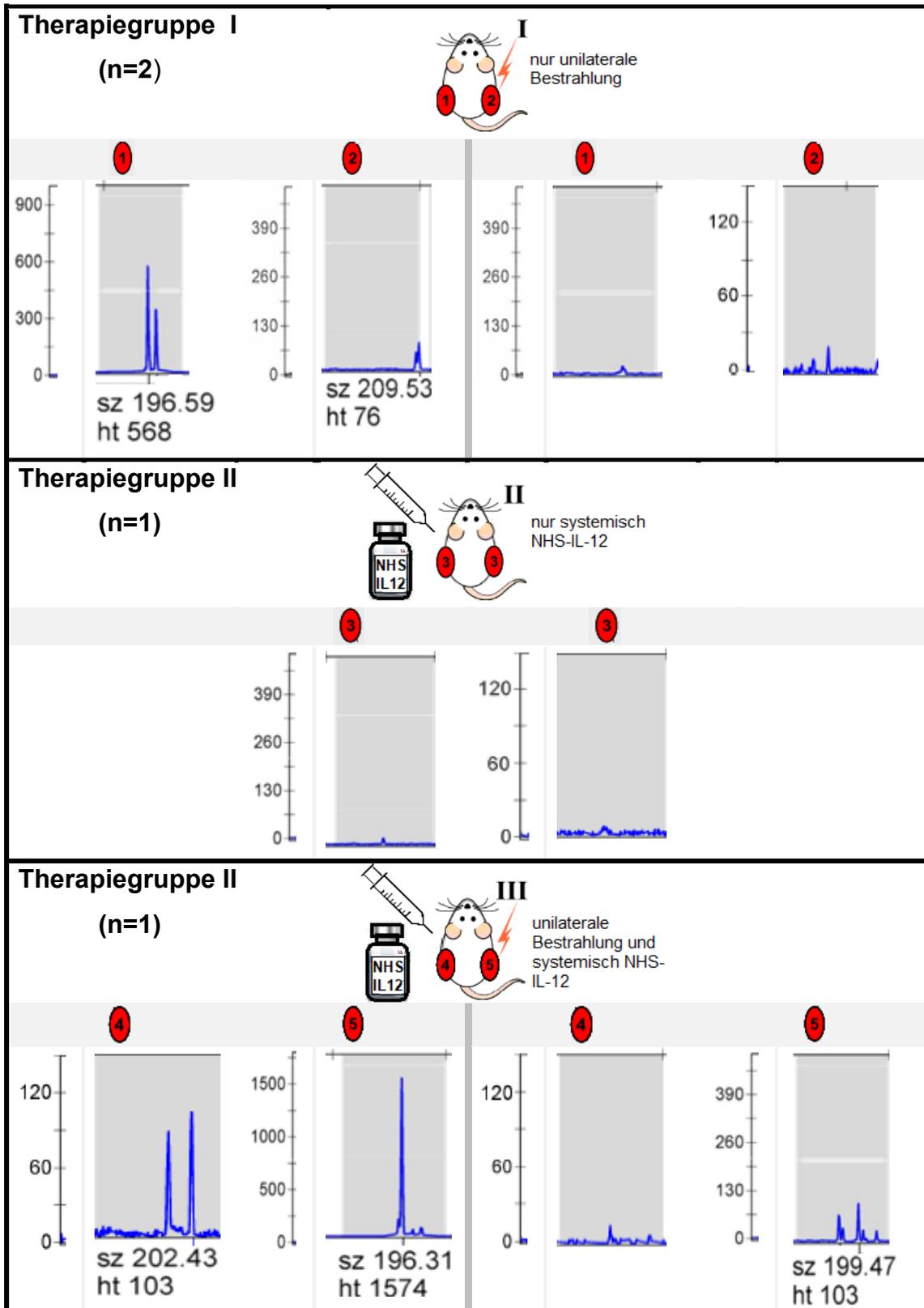
**Abb. 3.12: Expressionsniveau und -Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 3 || 16**  
 Deutliche Single Peaks in einem nur unilateral radiotherapierten Tier. Unspezifische polyklonale Peaks in Tumoren eines kombiniert therapierten Tieres.

# Ergebnisse



**Abb. 3.13: Expressionsniveau und -Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 4 || 20**  
 Stärkste polyklonale Expression bei Tumoren eines Tieres nach Kombinationstherapie.

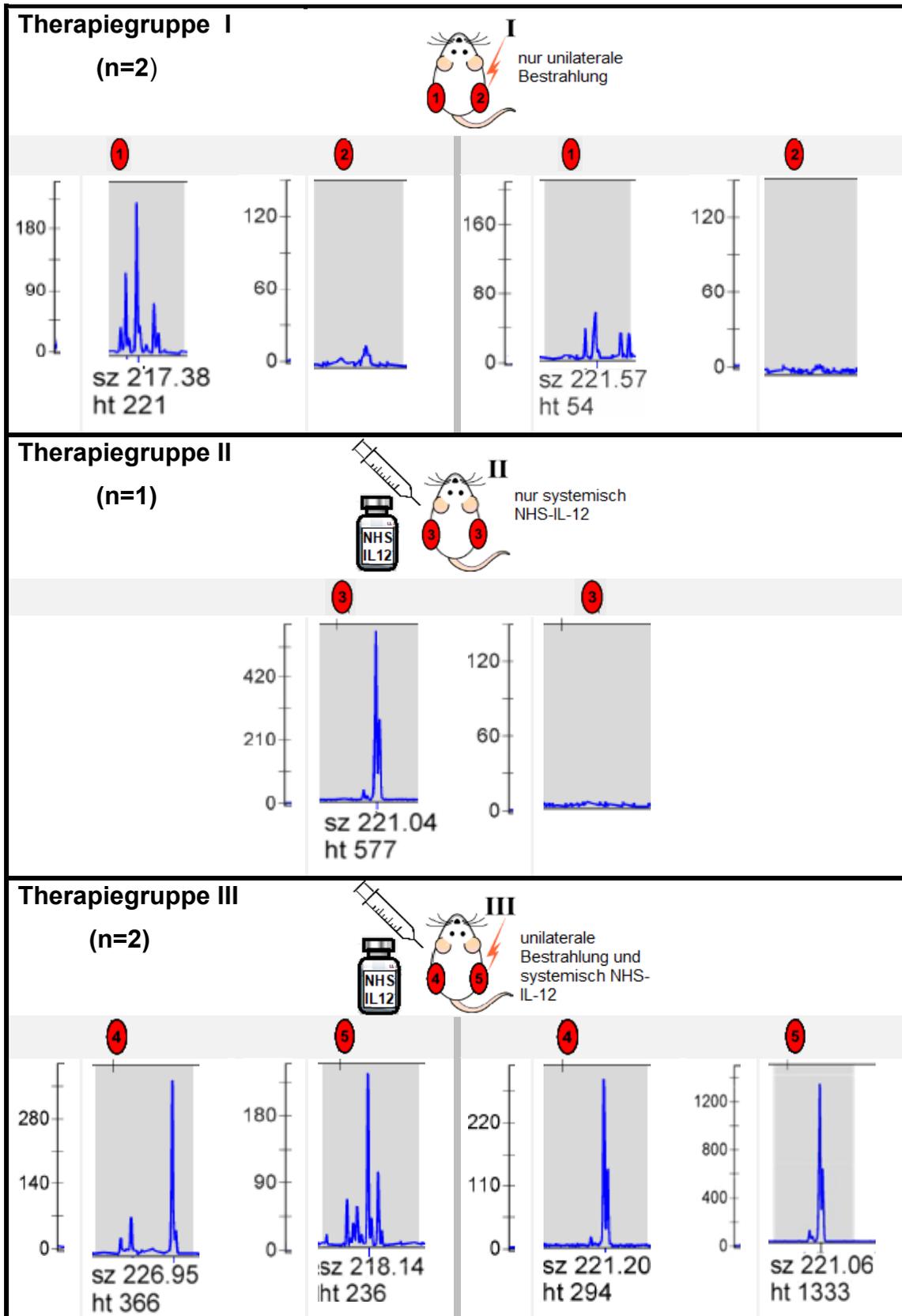
# Ergebnisse



**Abb. 3.14: Expressionsniveau und -Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 5 || 15**

Ein deutlicher Single Peak könnte auf eine klonale Expansion in einem ipsilateral radiotherapierten Tumor der Kombinationstherapiegruppe hindeuten.

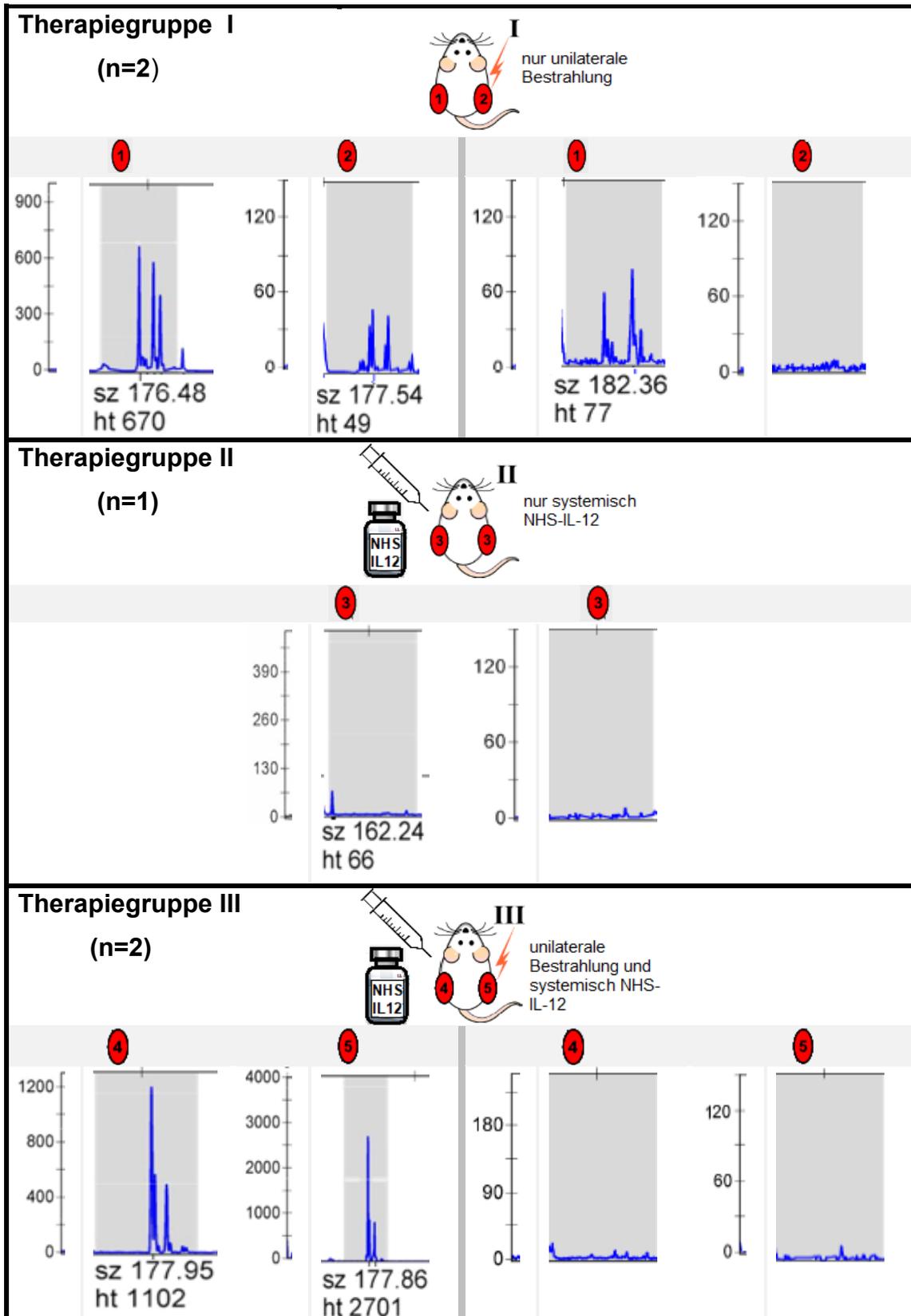
# Ergebnisse



**Abb. 3.15: Expressionsniveau und -Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 6 || 5**

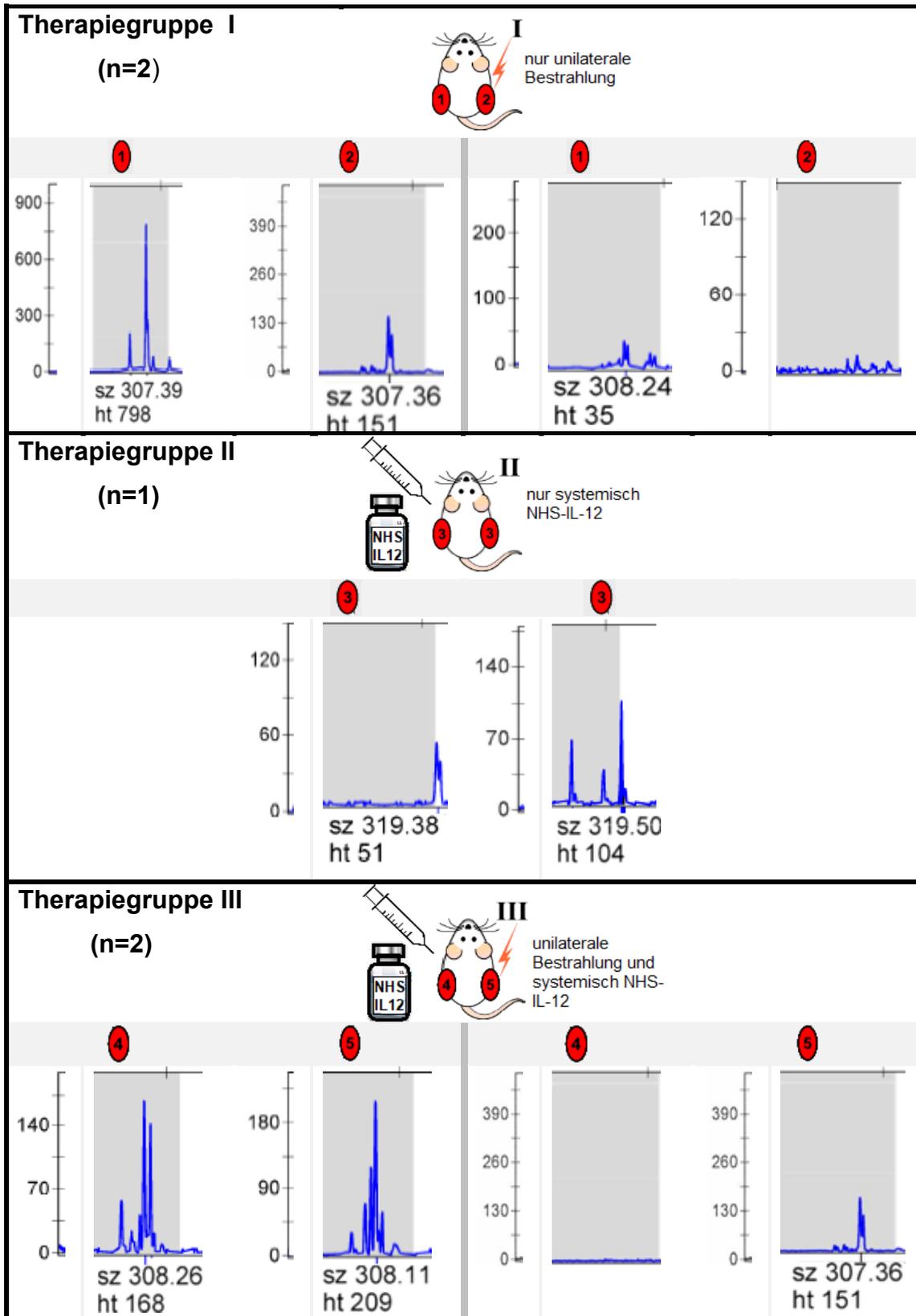
Höchster Single Peak in einem kombiniert therapierten Tumor. Korrespondierender Peak im contralateralen Tumor desselben Tieres.

# Ergebnisse



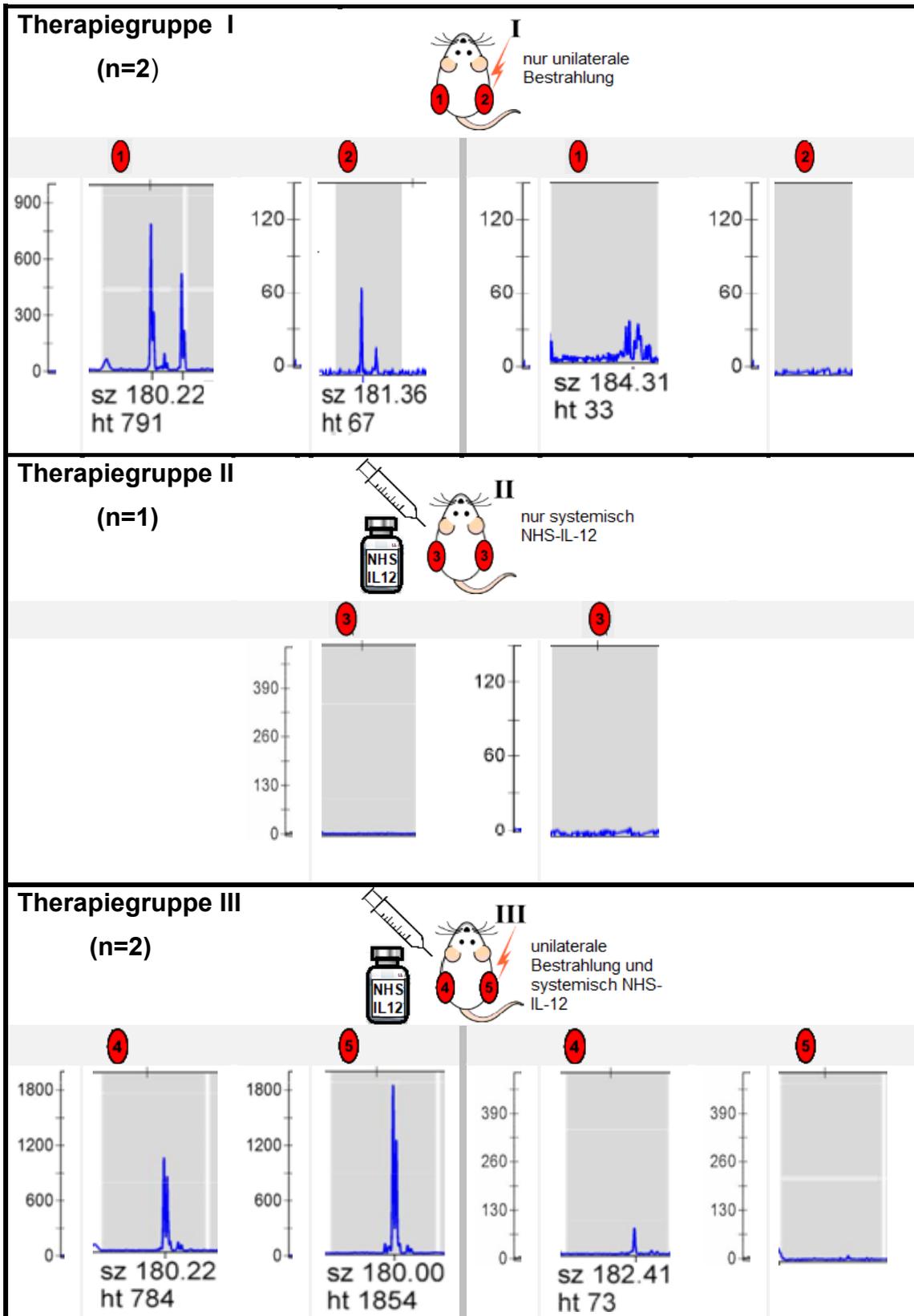
**Abb. 3.16: Expressionsniveau und -Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 8-1 und 8-3 || 1B**  
 Deutliche, korrespondierende Peaks konnten in Tumoren einer kombiniert therapierten Maus detektiert werden. Polyklonale Peaks bei nur unilateral bestrahlten Tieren.

# Ergebnisse



**Abb. 3.17: Expressionsniveau und -Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 8-4 und 8-6 || 1A**  
 Ein Tumor einer lediglich unilateral bestrahlten Maus zeigt das höchste Expressionsniveau.

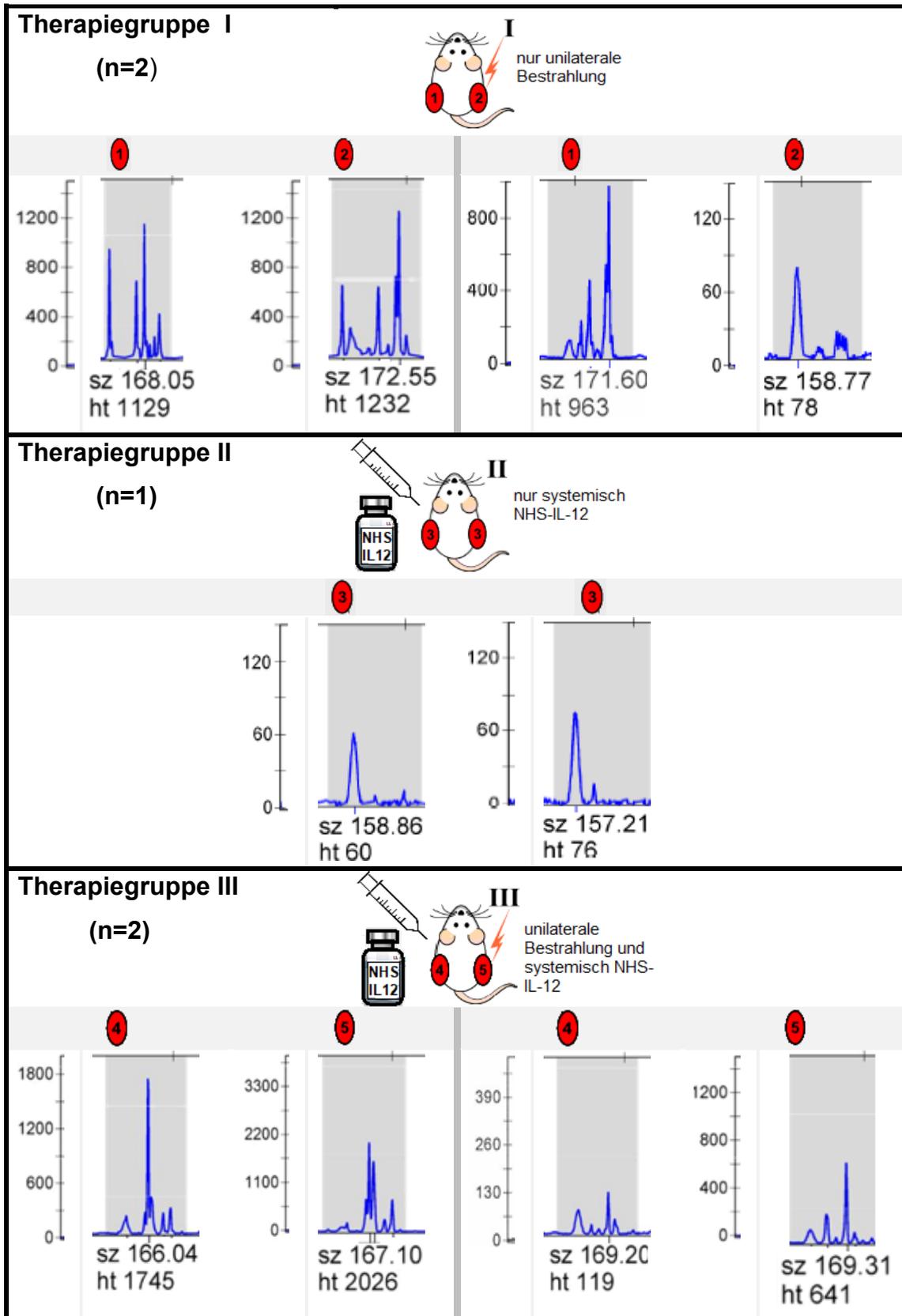
# Ergebnisse



**Abb. 3.18: Expressionsniveau und -Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 9-2 || 22**

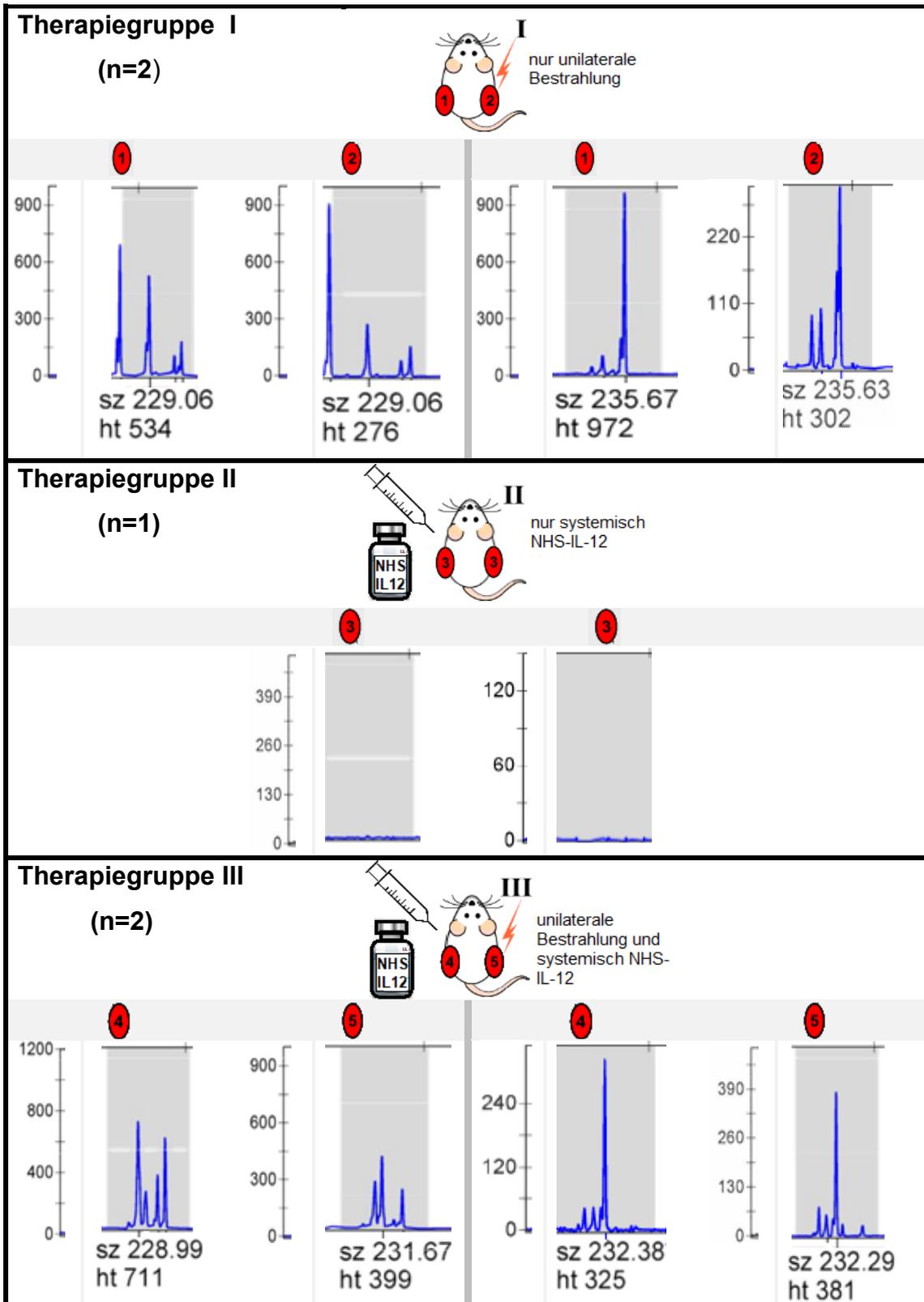
Detektion korrespondierender Peaks bei einer Maus nach Kombinationstherapie mit deutlicherer Expression im ipsilateral bestrahlten Tumor.

# Ergebnisse



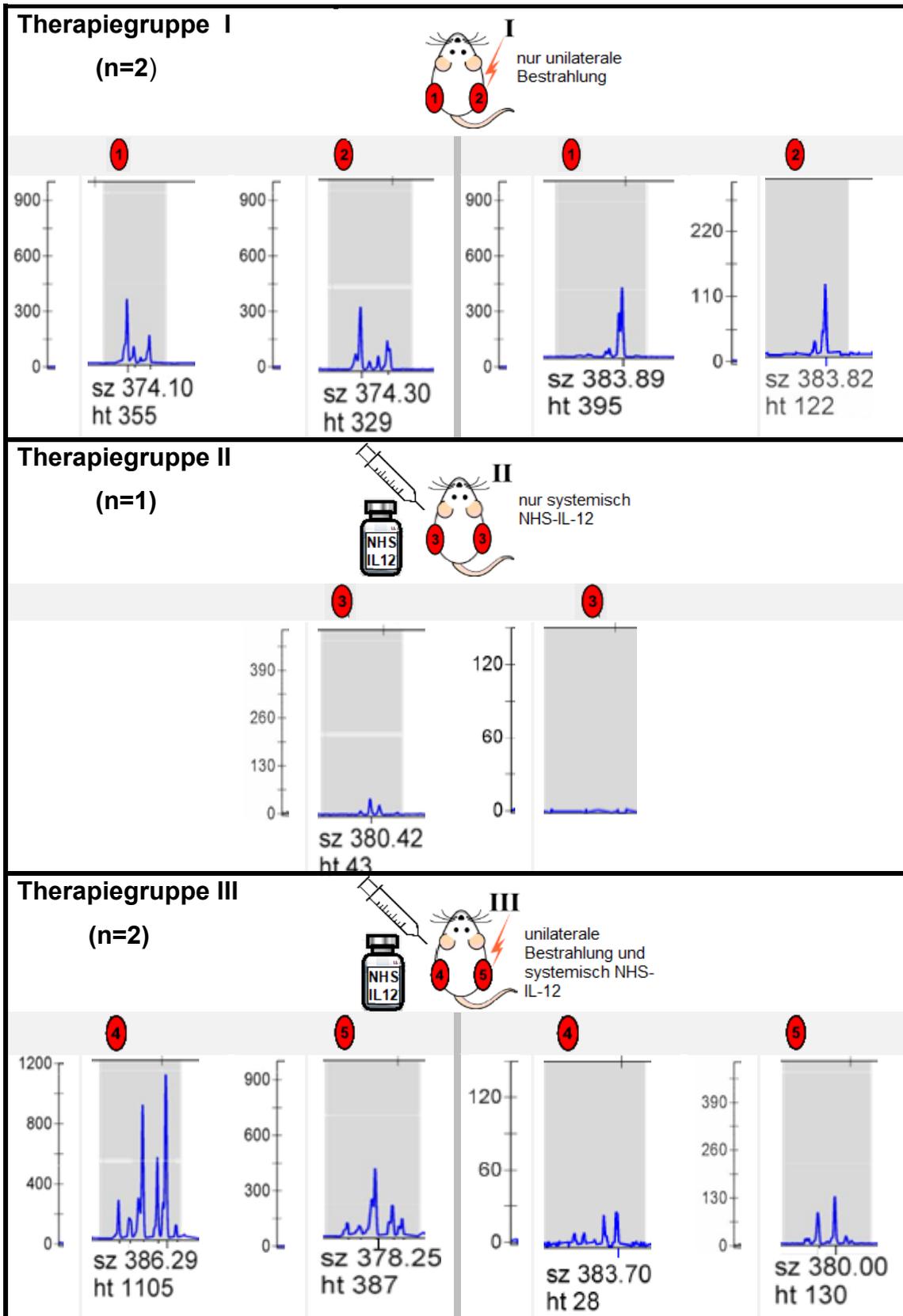
**Abb. 3.19: Expressionsniveau und -Breite von TCRα-Segment 10 || 24**  
 Polyklonale Peaks nach unilateraler Bestrahlung, Deutlichste, ebenfalls multiple Peaks in Tumoren kombiniert therapierter Tiere. Deutliche Eichpeaks in Tumoren nach NHS-IL12-Therapie.

# Ergebnisse



**Abb. 3.20: Expressionsniveau und -Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 12-1, 12-2 und 12-3 || 2**  
Single Peak mit höchster Intensität und korrespondierenden Peaks nach unilateraler Radiatio (I).  
Hingegen multiple Peaks mit breiter Expression nach Kombinationstherapie.

# Ergebnisse



**Abb. 3.21: Expressionsniveau und -Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 13-1 und 13-2 || 8**  
 Detektion korrespondierender Peaks in Tumoren lediglich unilateral bestrahlter Tiere. Intensivere polyklonale Peaks nach Kombinationstherapie.

# Ergebnisse

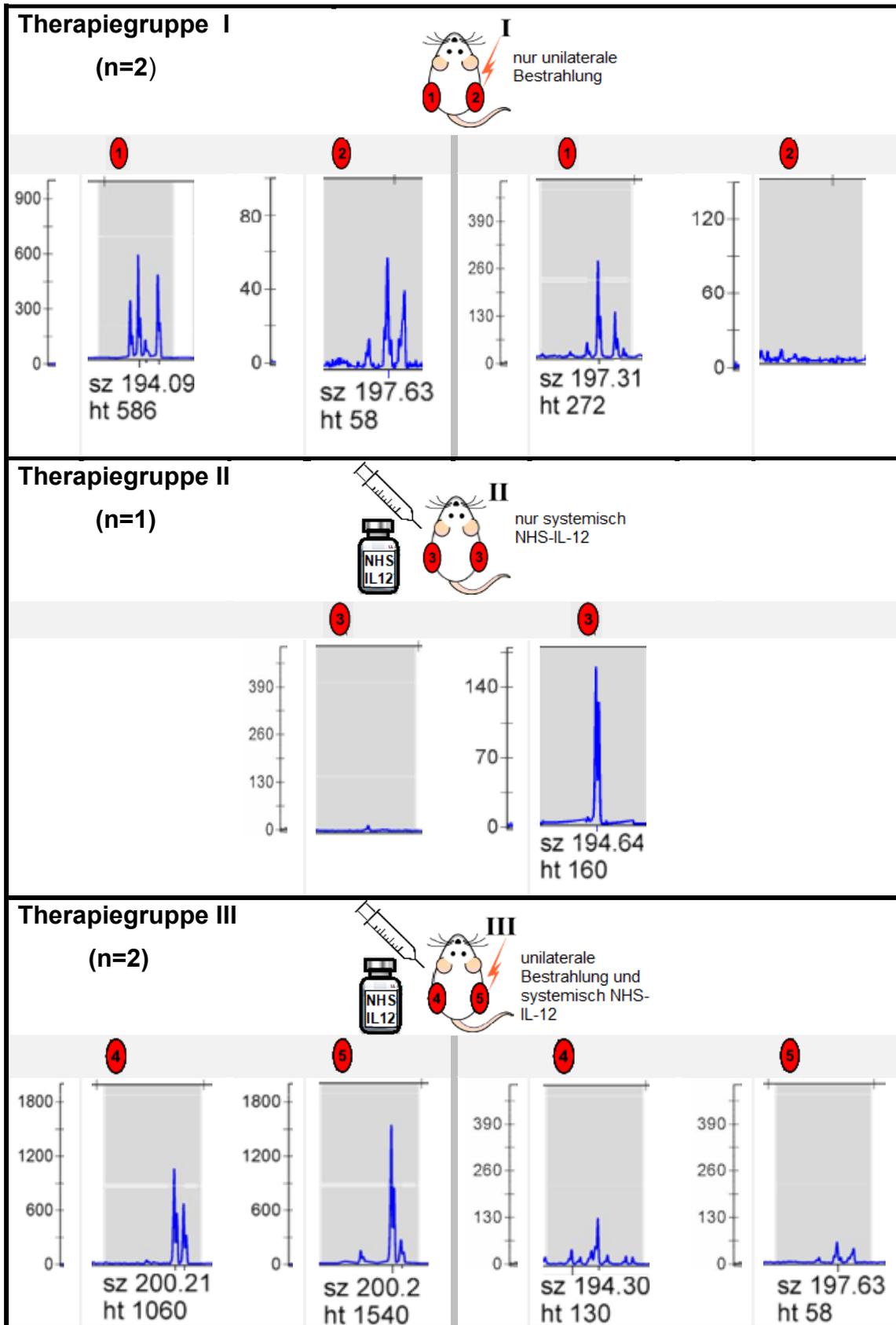
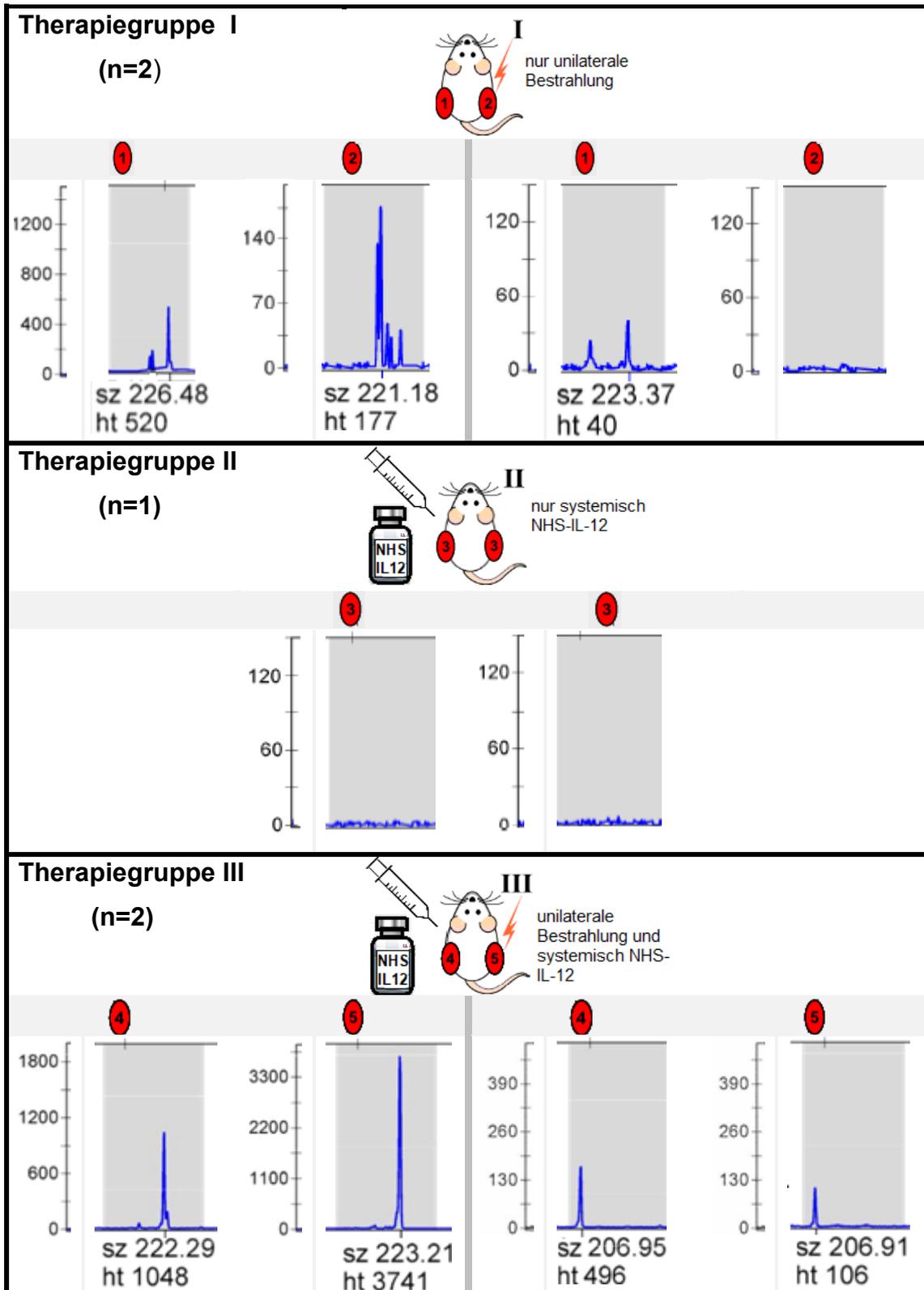


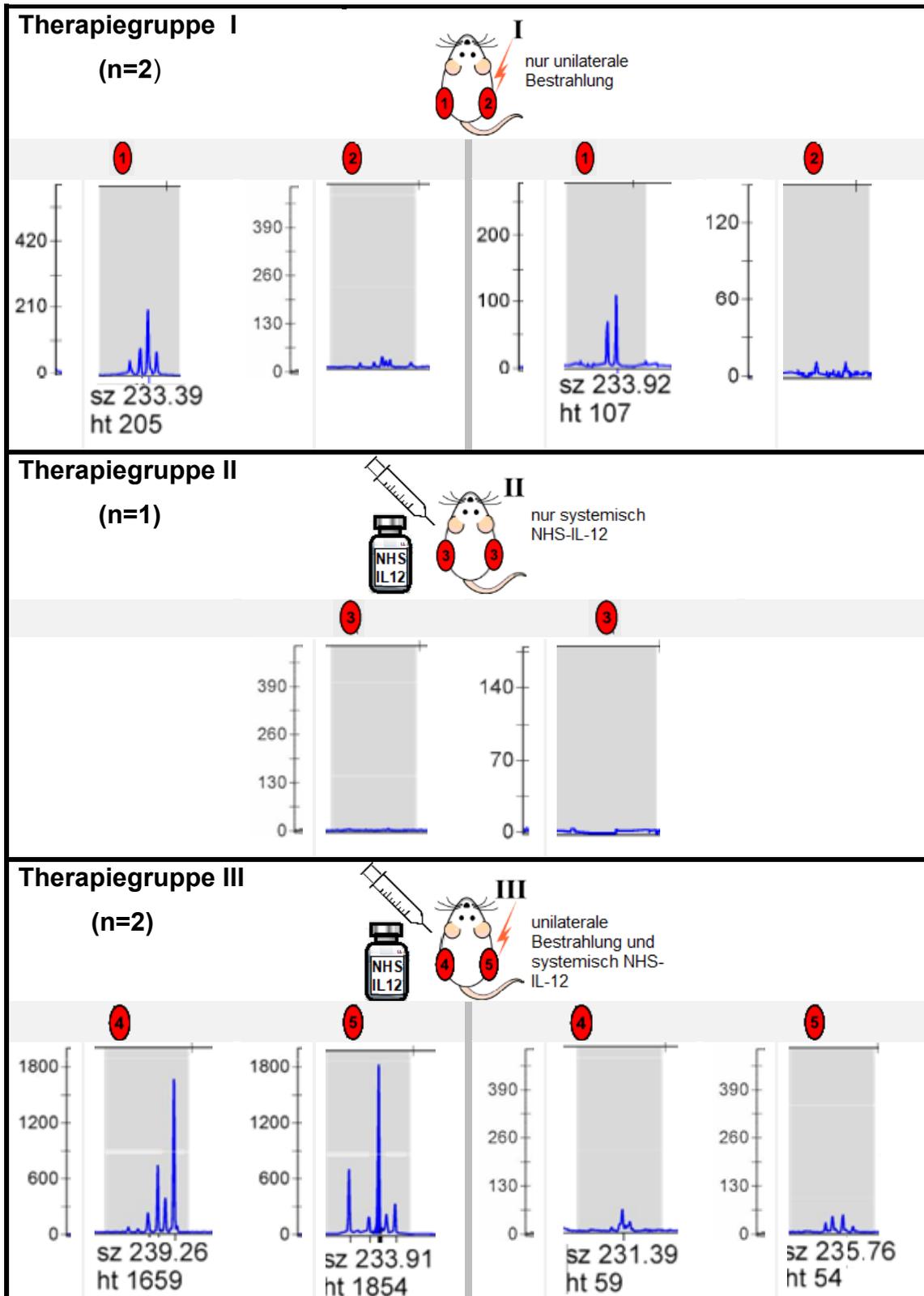
Abb. 3.22: Expressionsniveau und -Breite von TCR $\alpha$ -Segment 14DV4 || 6  
 Deutliche korrespondierende Peaks in Tumoren eines kombiniert therapierten Tieres.

# Ergebnisse



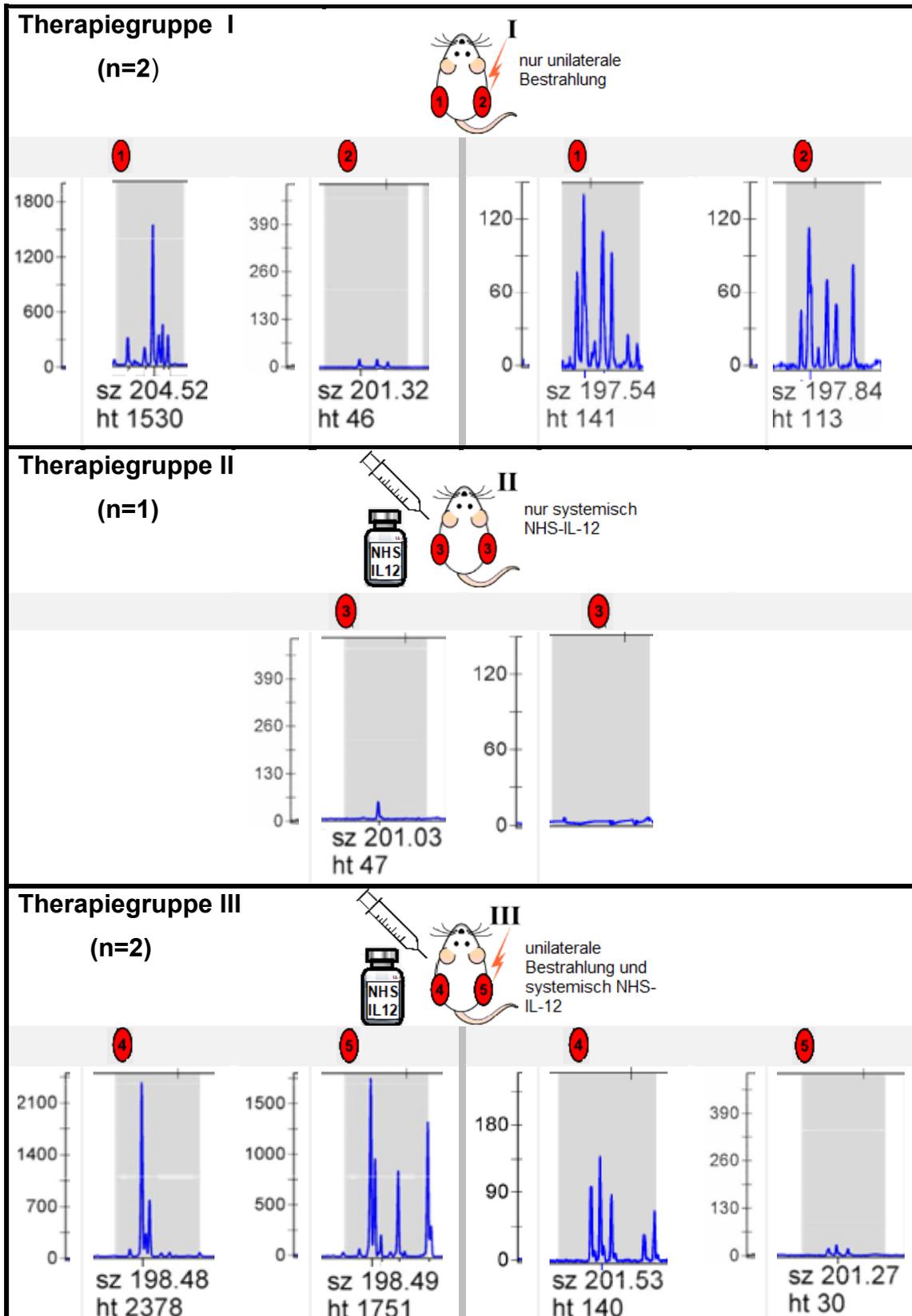
**Abb 3.23: Expressionsniveau und –Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 16 || 9**  
 Deutliche Expression vergleichbarer Single Peaks in Tumoren zweier kombiniert therapierter Tiere mit Hinweis auf einer systemischen klonalen Expansion, dieses Segment exprimierender T-Zellen.

# Ergebnisse



**Abb. 3.24: Expressionsniveau und -Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 17 || 3**  
 Intensivste polyklonale Peaks bei einem Tier nach kombinierter unilateraler Bestrahlung und systemischer NHS-IL12-Gabe.

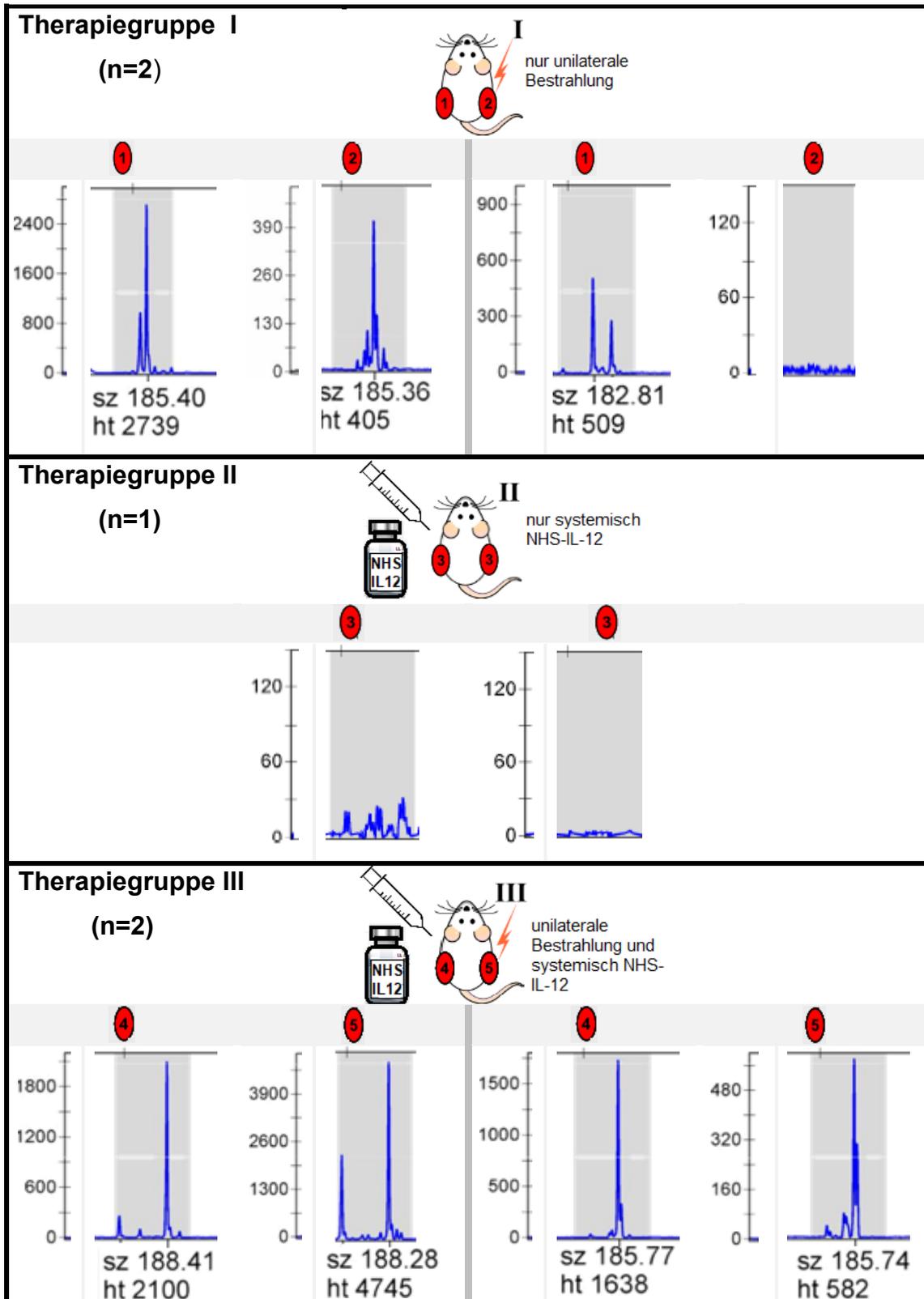
# Ergebnisse



**Abb. 3.25: Expressionsniveau und -Breite von TCRα-Segment 19 || 12**

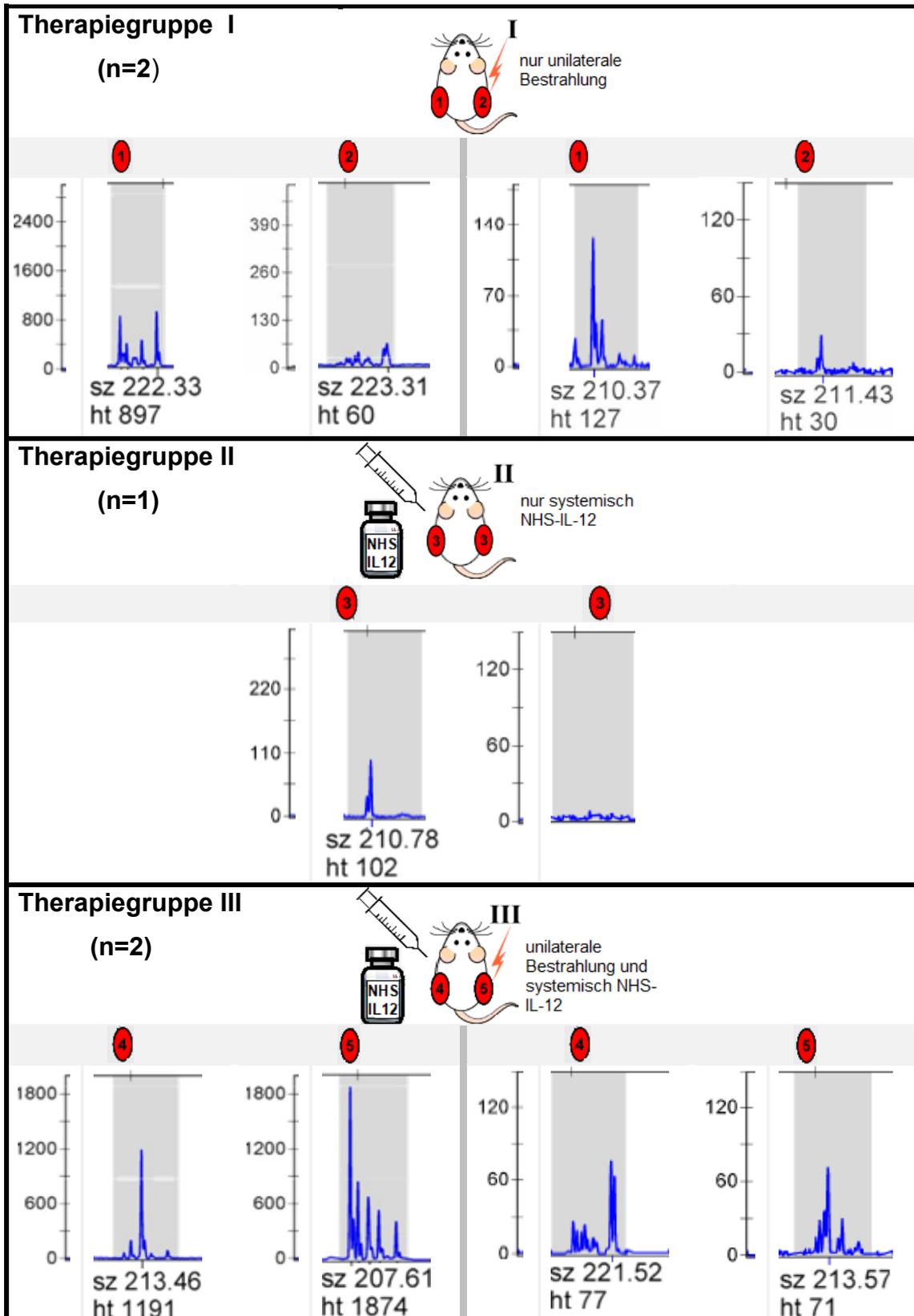
Expression multipler Peaks in Tumoren kombiniert therapierter Mäuse mit deutlicher Expression korrespondierender Peaks. Deutliche, polyklonale Peaks nach kontralateraler Radiation in einem Tumor der KG (I1).

# Ergebnisse



**Abb. 3.26: Expressionsniveau und -Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 20 || 30**  
 Detektion deutlicher korrespondierender Single Peaks bei zwei Tieren nach Kombinationstherapie sowie bei einem Tier nach nur unilateraler Radiatio.

# Ergebnisse



**Abb. 3.27: Expressionsniveau und -Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 21 || 23**  
 Intensivste polyklonale Peaks in Tumoren eines Tieres nach Kombinationstherapie.

# Ergebnisse

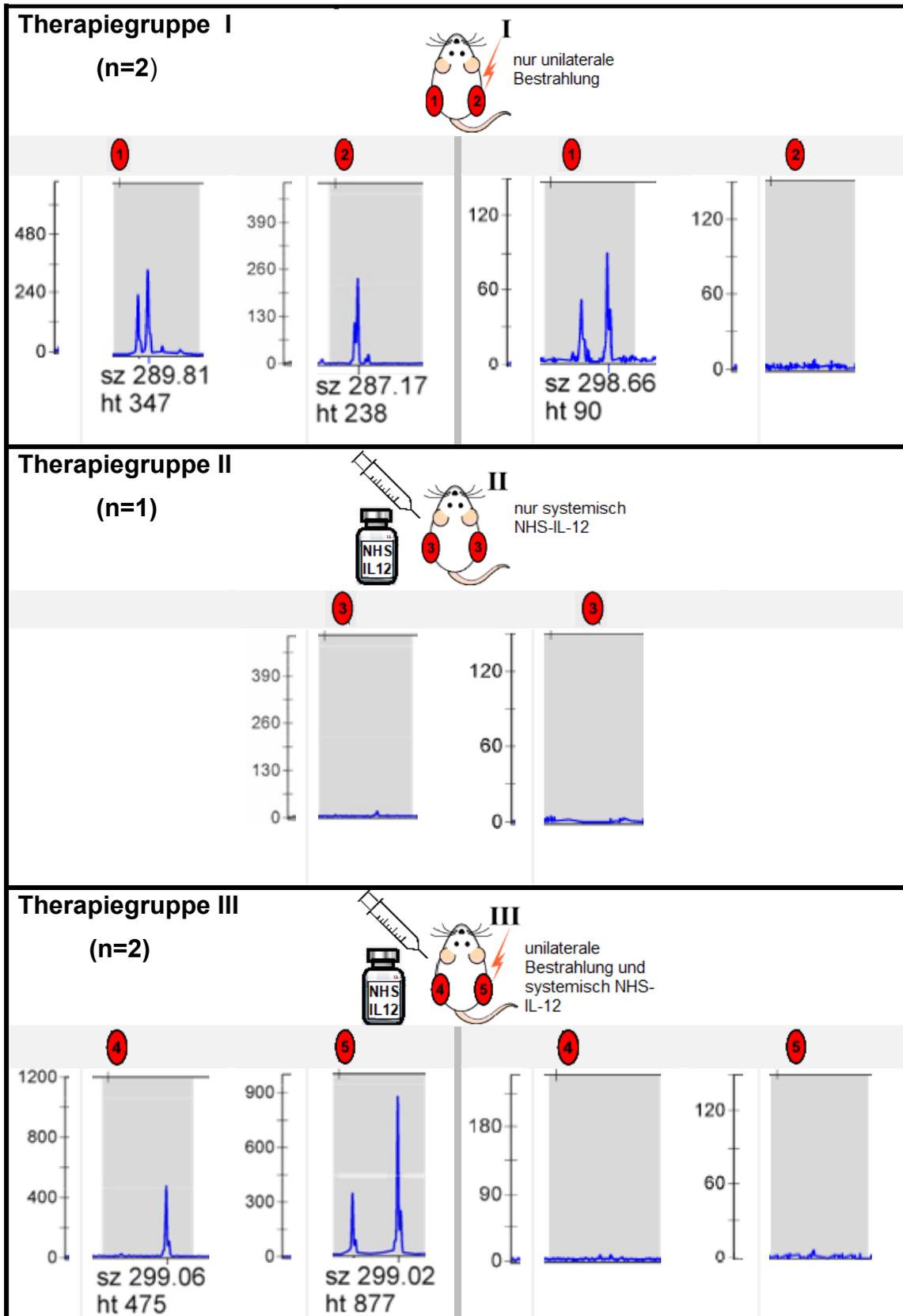
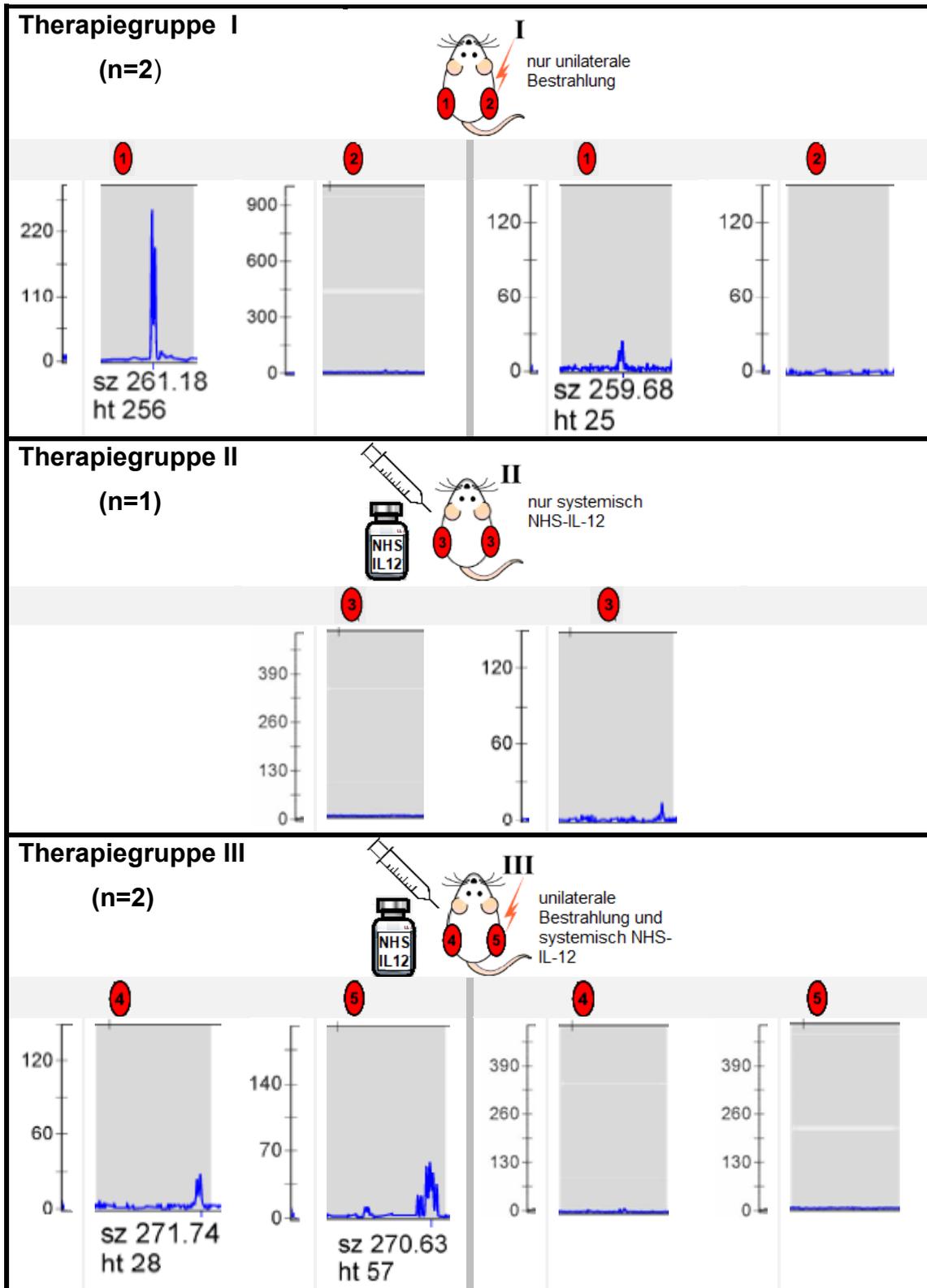


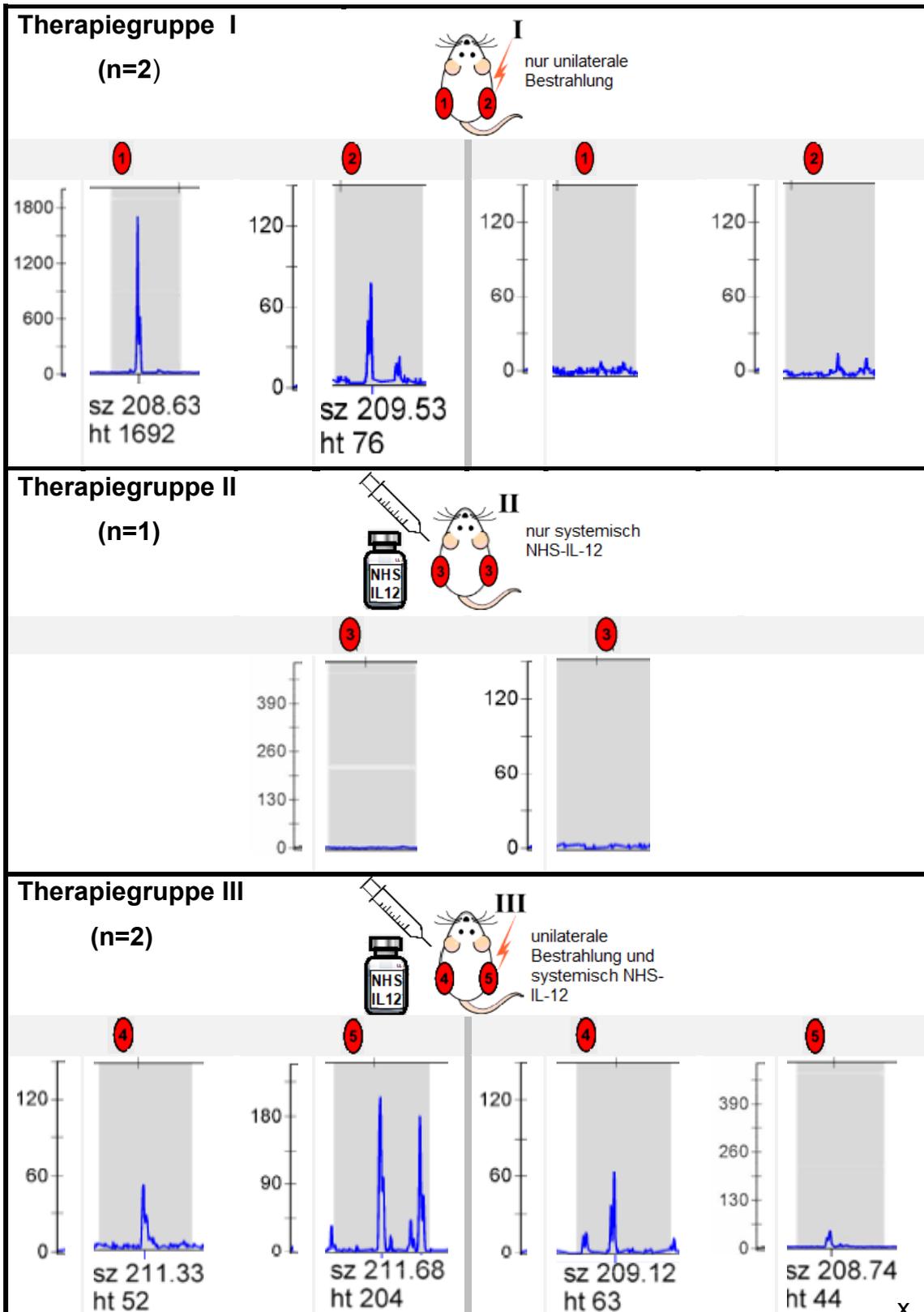
Abb. 3.28: Expressionsniveau und -Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 22 || 13  
 Detektion vergleichbarer Peaks in Tumoren einer Maus nach Kombinationstherapie.

# Ergebnisse



**Abb. 3.29: Expressionsniveau und -Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 23DV6 || 17**  
 Geringfügige Expression dieses Segments in den Tumoren der untersuchten Mäuse. Detektion eines Single Peaks in einem unbestrahlten Tumor einer unilateral bestrahlten Maus (I1).

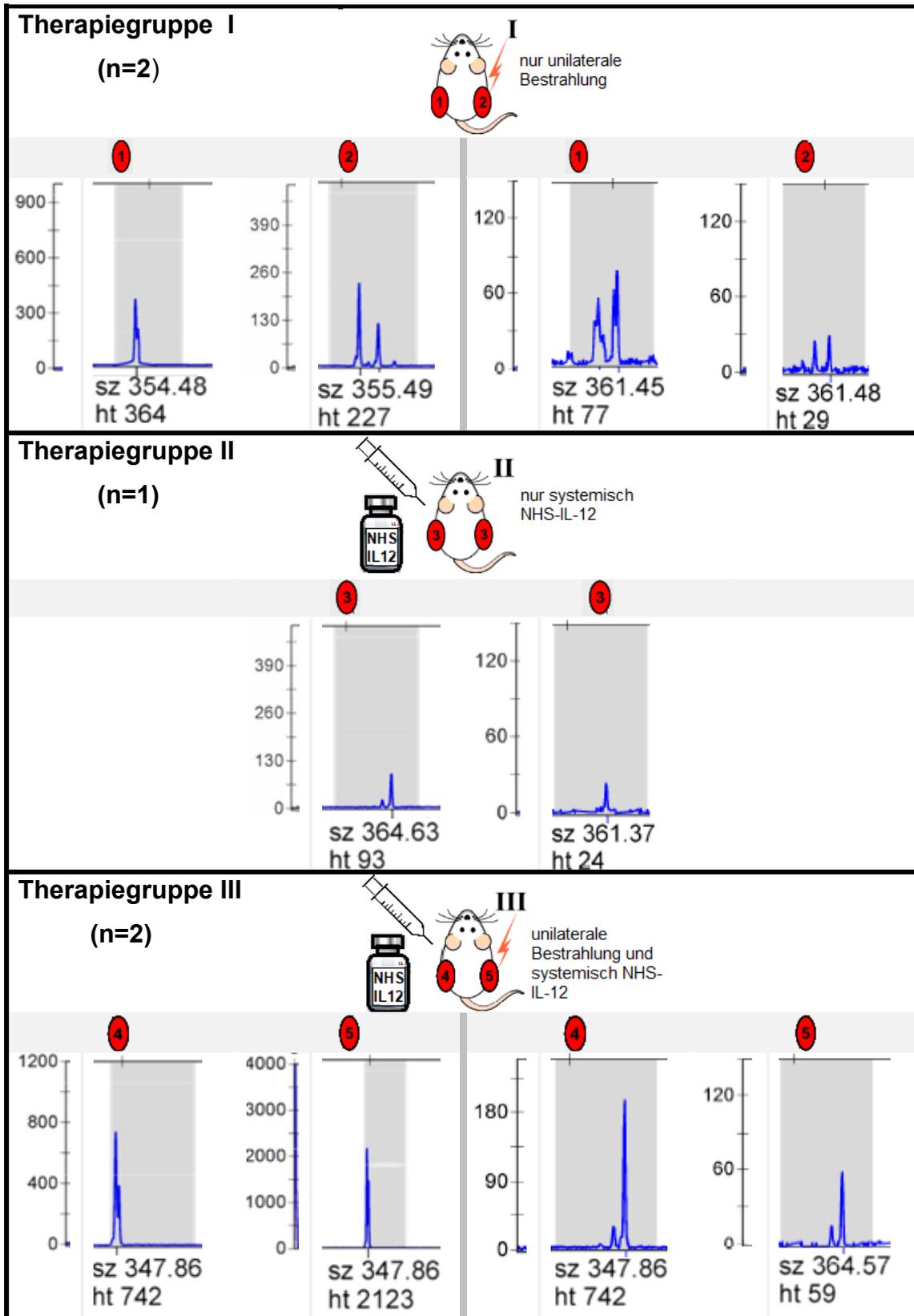
# Ergebnisse



**Abb. 3.30: Expressionsniveau und -Breite von TCR $\alpha$ -Segment 24 || 18**

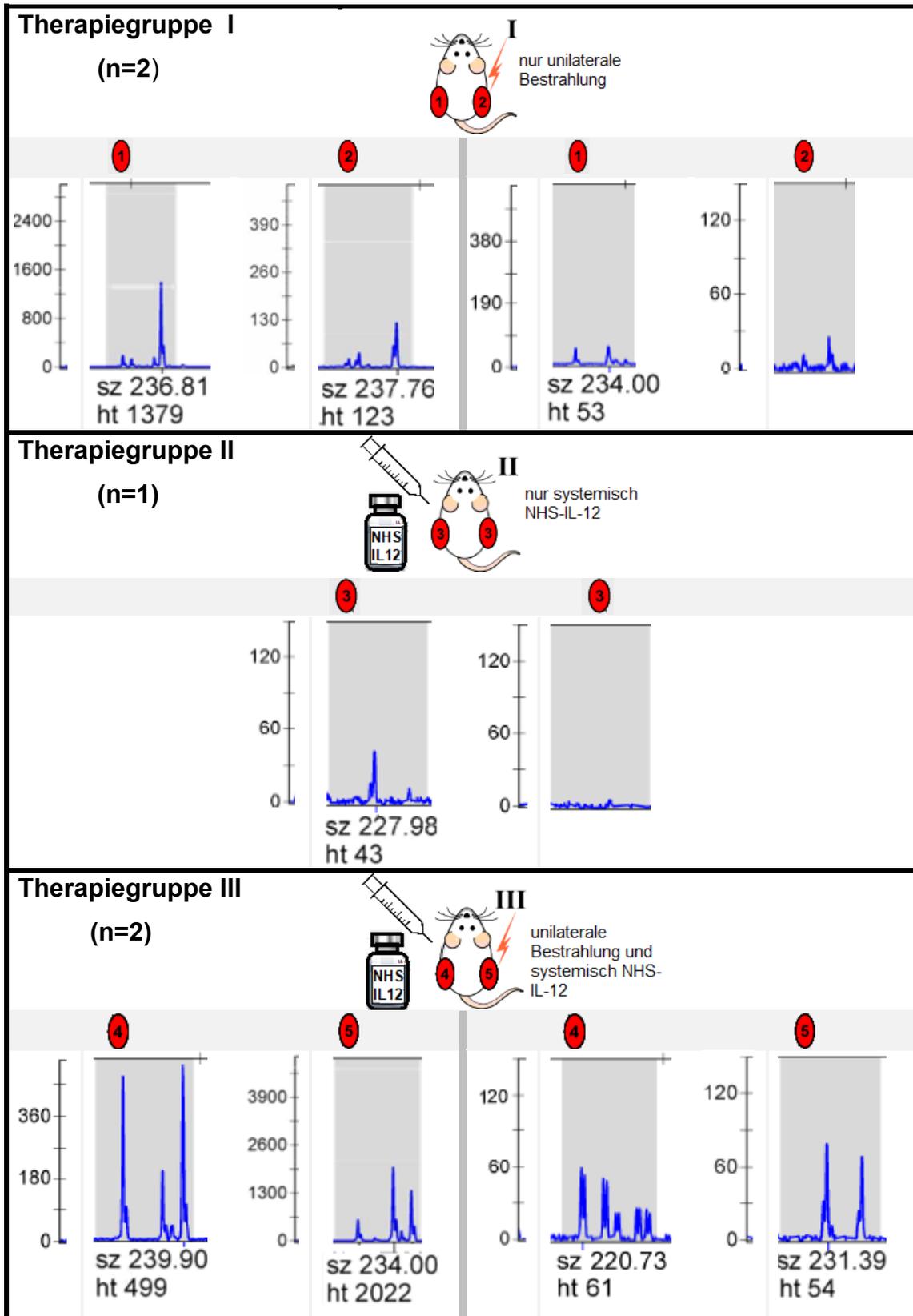
Detektion des intensivsten Single Peaks in einem nicht bestrahlten Tumor einer unilateral bestrahlten Maus (I1). Weniger deutliche aber vergleichbare Peaks bei beiden kombiniert therapierten Mäusen (III).

# Ergebnisse



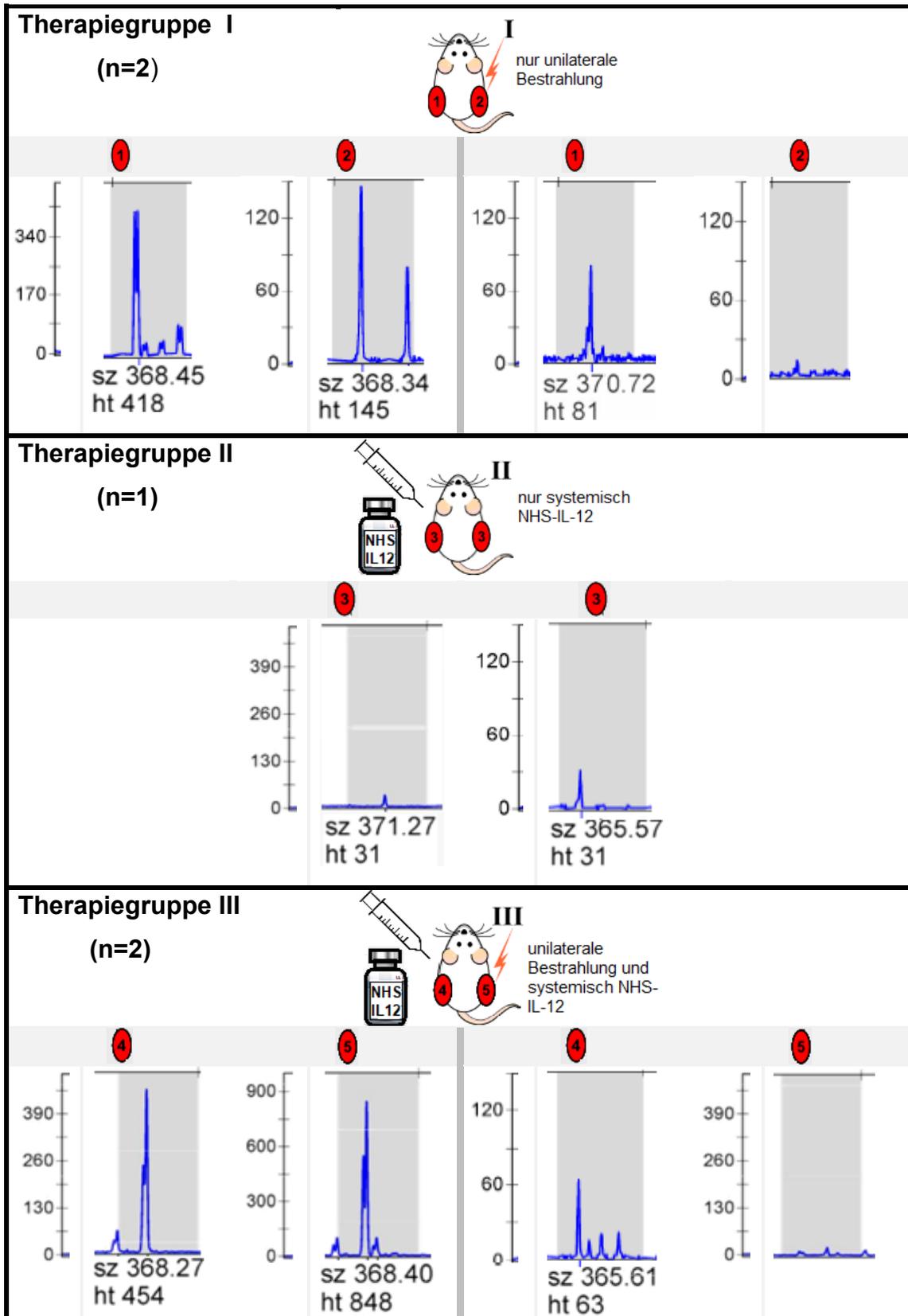
**Abb. 3.31: Expressionsniveau und -Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 25 || 32**  
 Detektion korrespondierender Single Peaks in Tumoren beider Mäuse nach Kombinationstherapie. Weniger deutliche Single und Double Peaks bei unilateral bestrahlten Mäusen.

# Ergebnisse



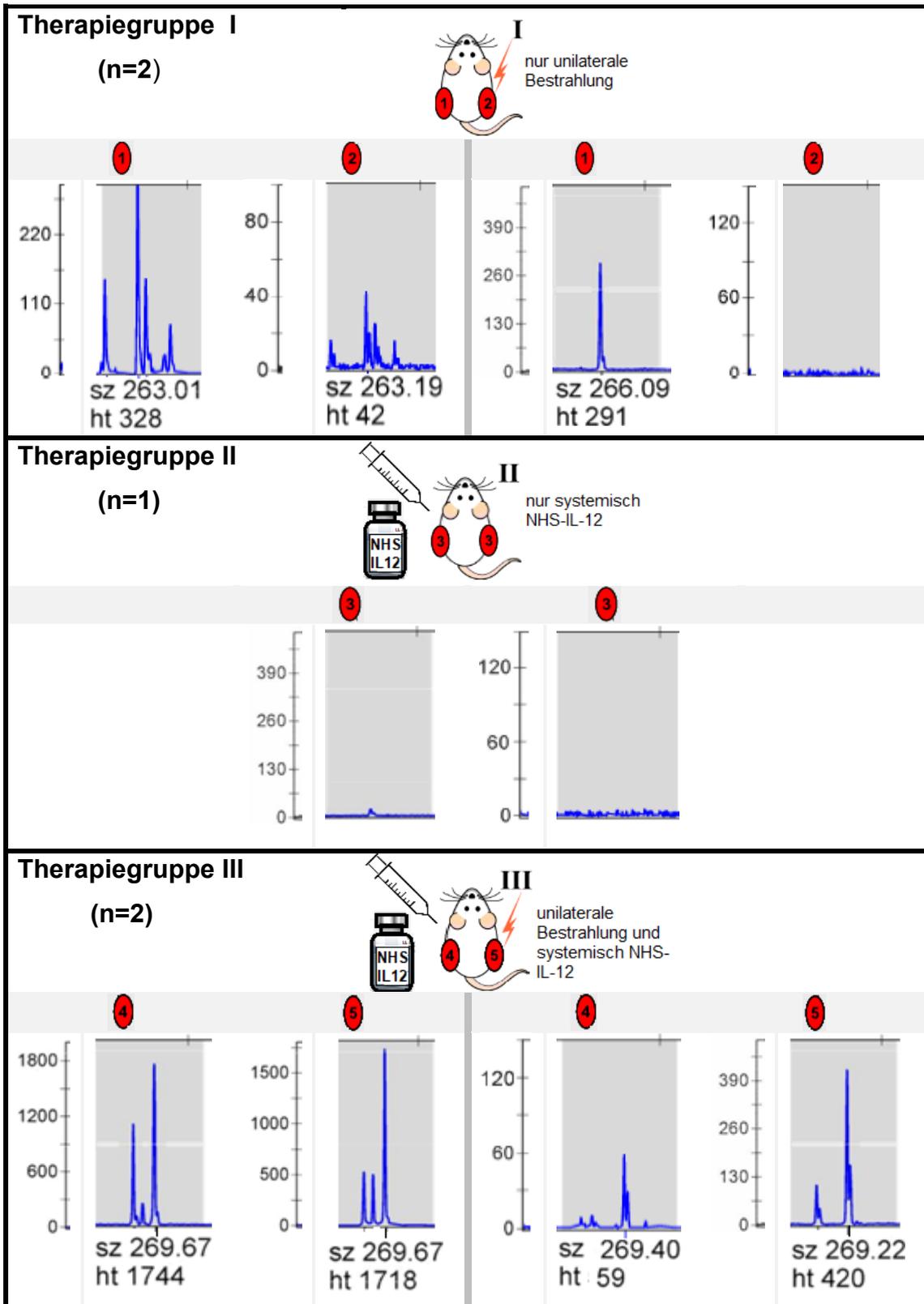
**Abb. 3.32: Expressionsniveau und -Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 26-2 || 4A**  
 Deutliche vergleichbare Single Peaks bei einer unilateral radiotherapierten Maus. Expression der deutlichsten multiplen Peaks in einem Tumor einer kombiniert therapierten Maus.

# Ergebnisse



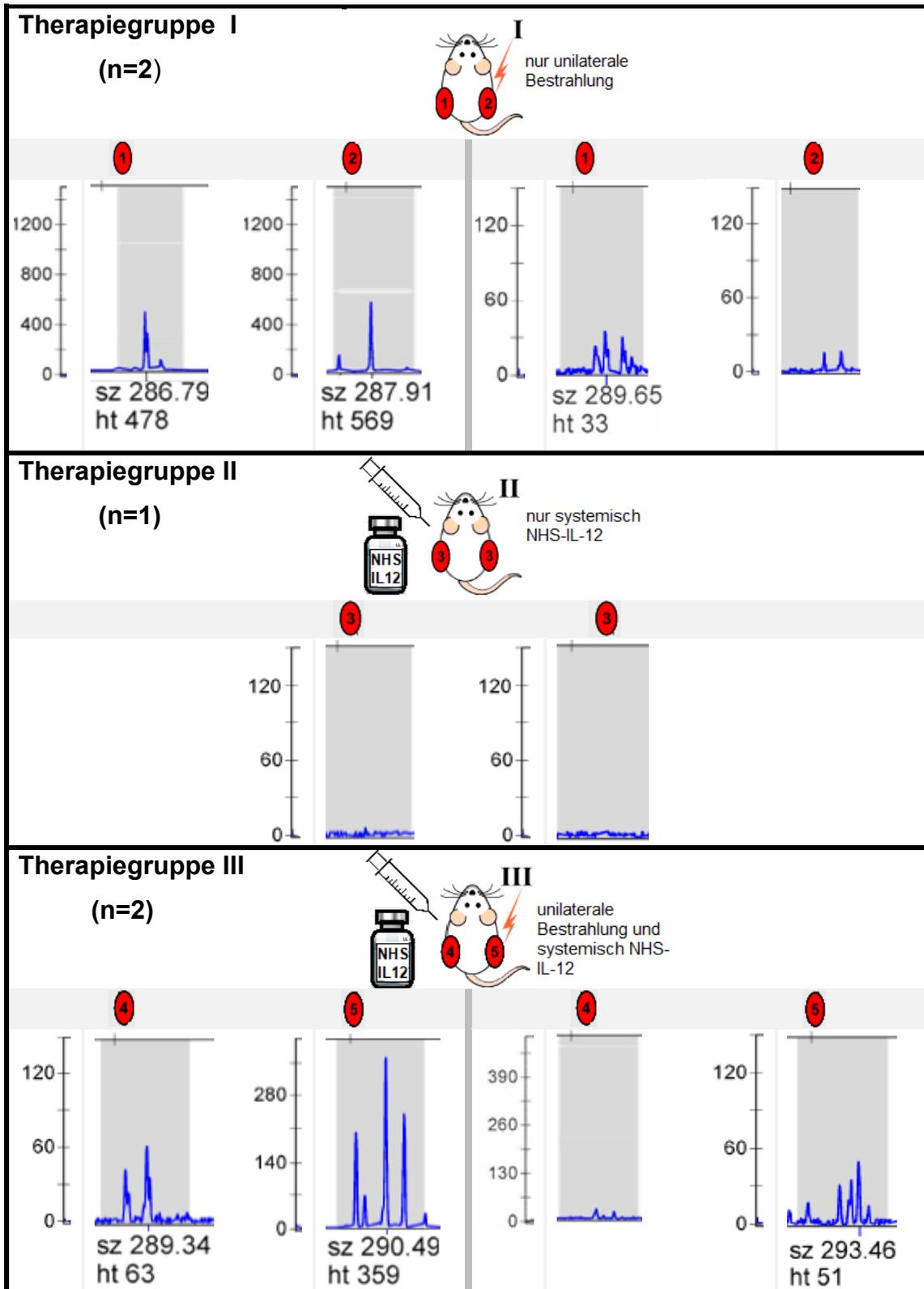
**Abb. 3.33: Expressionsniveau und -Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 26-2 || 4B**  
 Es zeigen sich korrespondierende Single Peaks bei einer jeweils lediglich unilateral bestrahlten, sowie einer kombiniert therapierten Maus.

# Ergebnisse



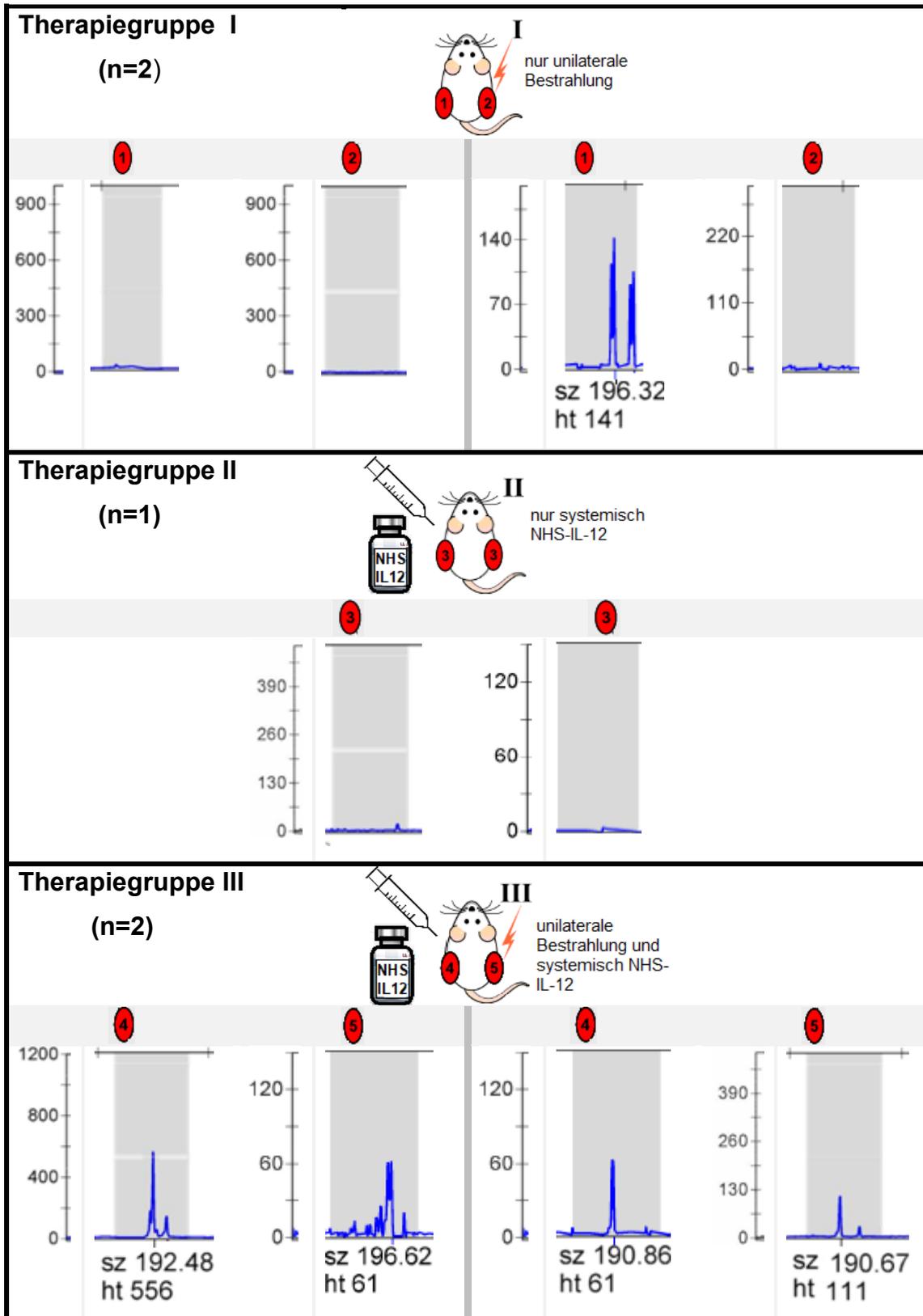
**Abb. 3.34: Expressionsniveau und -Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 27 || 10**  
 Intensivste polyklonale Expression mit vergleichbaren Peaks in Tumoren kombiniert therapierter Mäuse (III).

# Ergebnisse



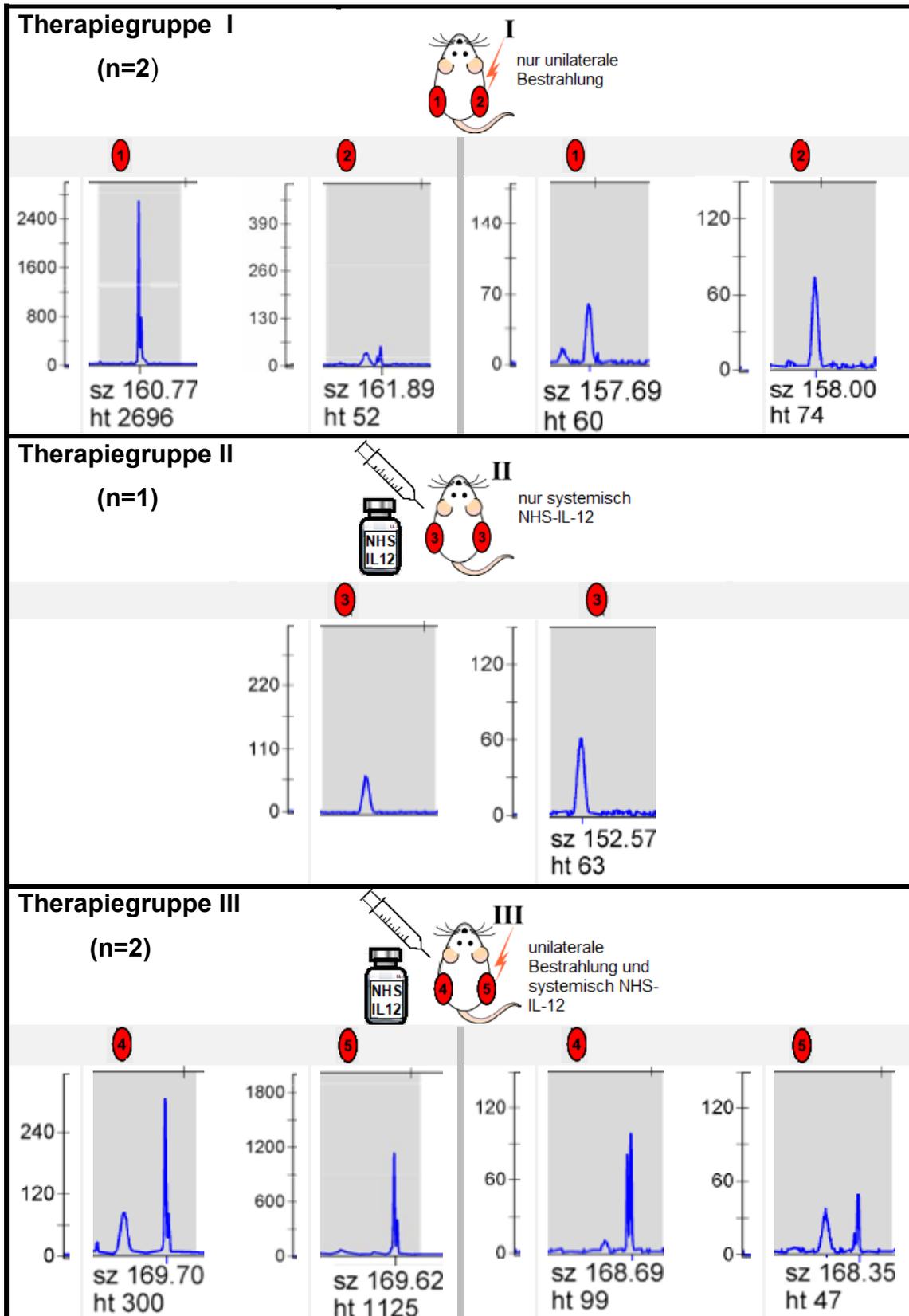
**Abb. 3.35: Expressionsniveau und -Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 29DV5 || 21**  
 Detektion von Single Peaks in beiden Tumoren einer lediglich unilateral bestrahlten Maus. Polyclonale Expression bei Tieren nach Kombinationstherapie.

# Ergebnisse



**Abb. 3.36: Expressionsniveau und -Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 30 || 29**  
 Vergleichbare Single Peaks bei einer kombiniert therapierten Maus. Deutlichster Single Peak in einem Tumor einer anderen Maus, welche die Kombinationstherapie erhalten hatte.

# Ergebnisse



**Abb. 3.37: Expressionsniveau und –Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 34 || 26**  
 Detektion vergleichbarer Single Peaks in den Tumoren beider kombiniert therapierter Mäuse.  
 Eichpeaks in Tumoren welche nur mit Radiatio oder systemisch mit NHS-IL12 therapiert wurden.

# Ergebnisse

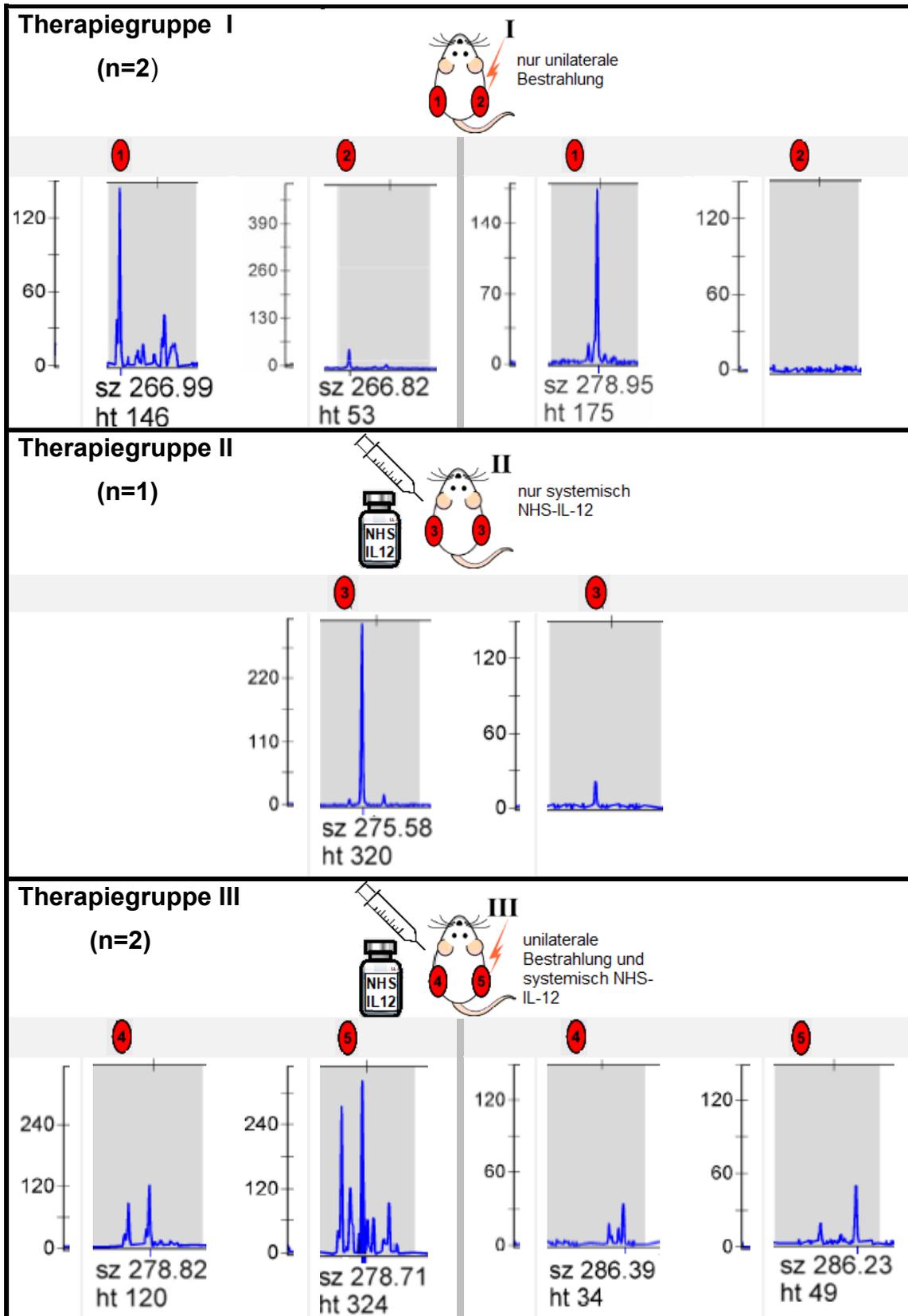
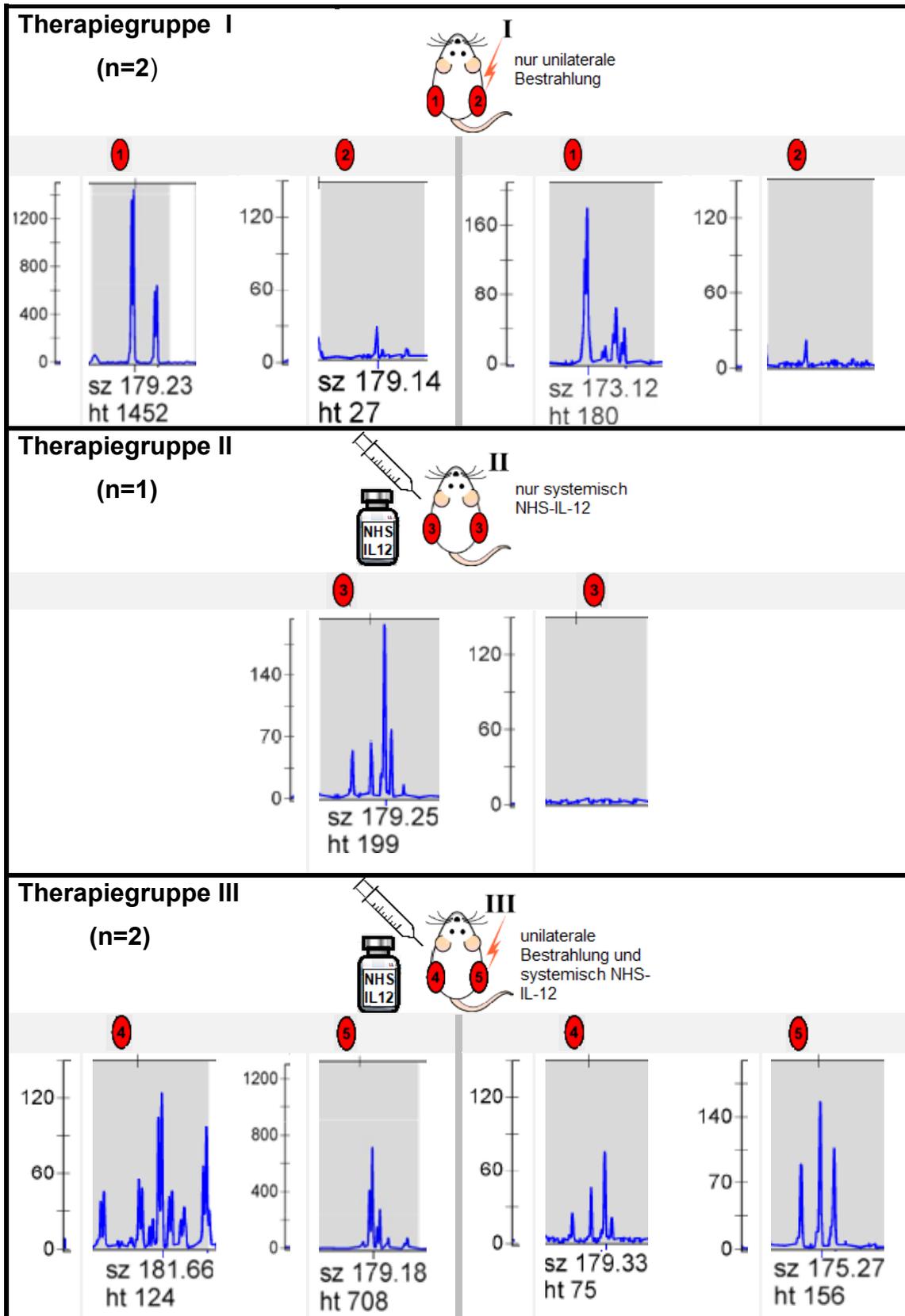


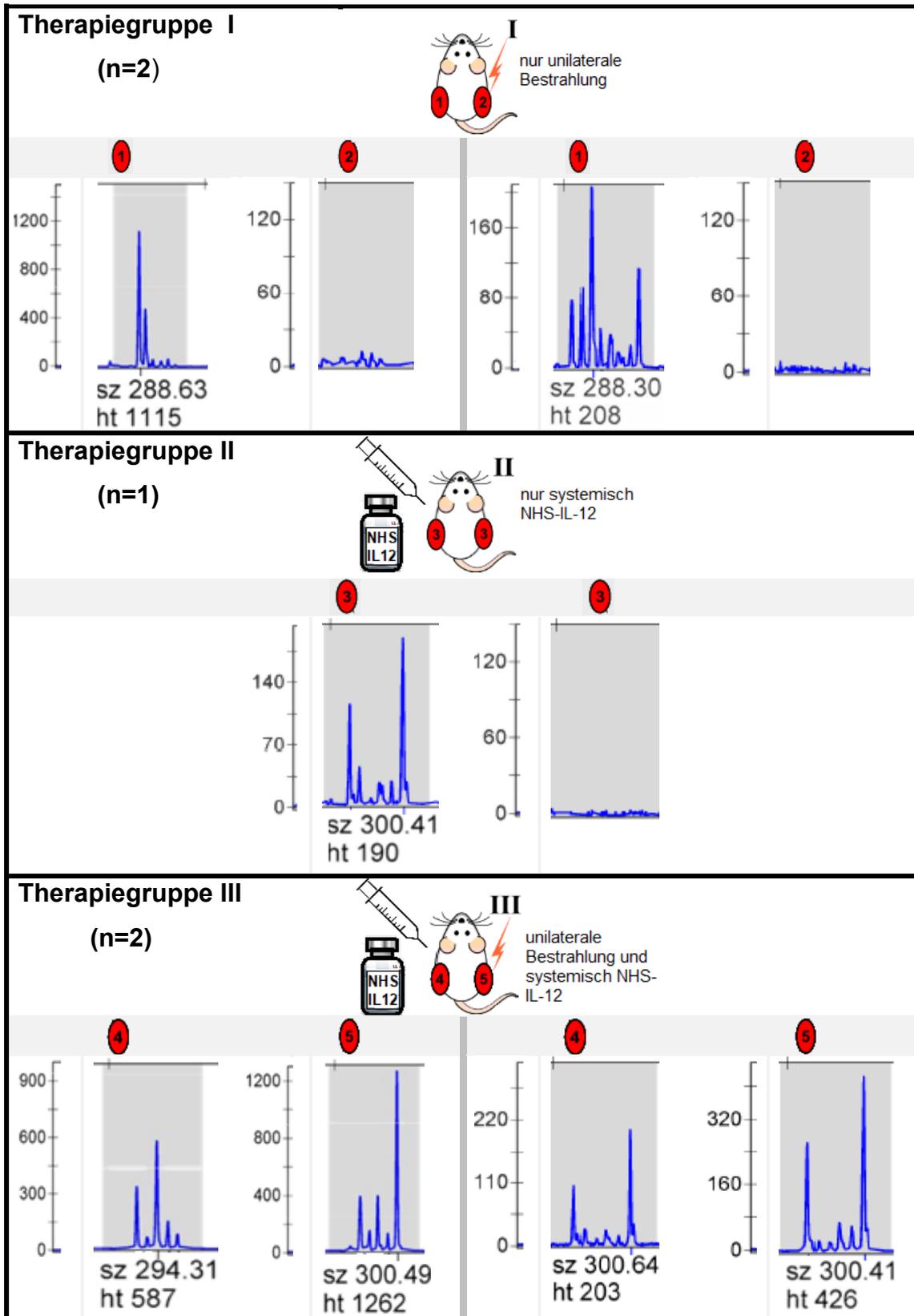
Abb. 3.38: Expressionsniveau und -Breite von TCR $\alpha$ -Segment 35 || 25  
 Polyklonale Expression mit vergleichbaren Peaks bei einer kombiniert therapierten Maus.

# Ergebnisse



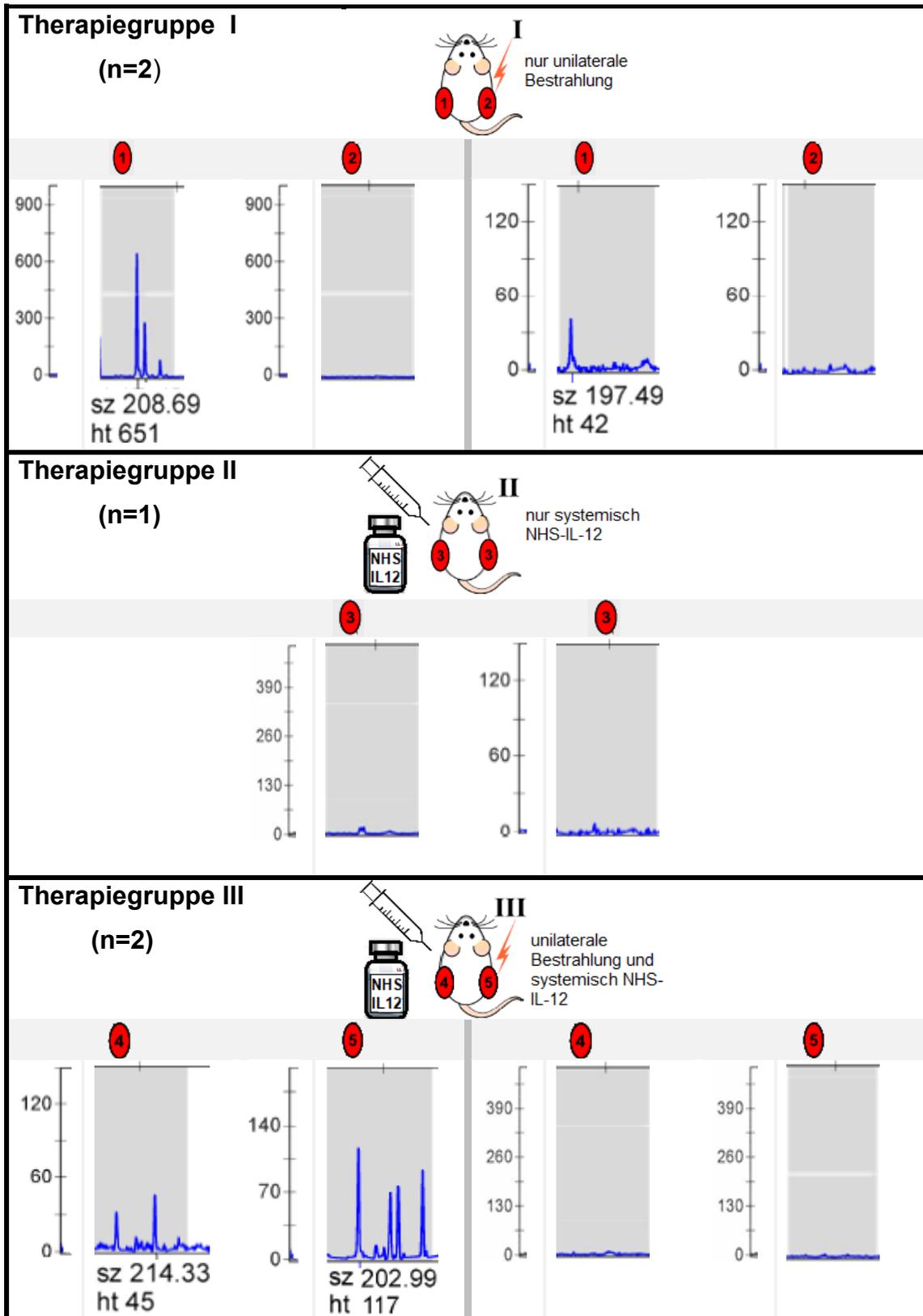
**Abb. 3.39: Expressionsniveau und -Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 36DV7 25 || 28**  
Induktion der intensivsten Antwort mit einem Doublepeak in einem kontralateral radiotherapierten Tumor. Breite Expression mit polyklonalen Peaks nach Kombinationstherapie.

# Ergebnisse



**Abb. 3.40: Expressionsniveau und -Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 38-1 38-2DV || 14**  
 In zwei unbestrahlten Tumoren der KG (I) sowie allen Tumoren kombiniert therapierter Mäuse (III) zeigte sich eine polyklonale Expression. Bei einer Maus (III) mit vergleichbaren Peaks.

# Ergebnisse



**Abb. 3.41: Expressionsniveau und -Breite von TCRVα-Segment 39 || 27**  
 Deutliche polyklonale Expression dieses Segments in einem Tumor einer unilateral bestrahlten Maus.

# Ergebnisse

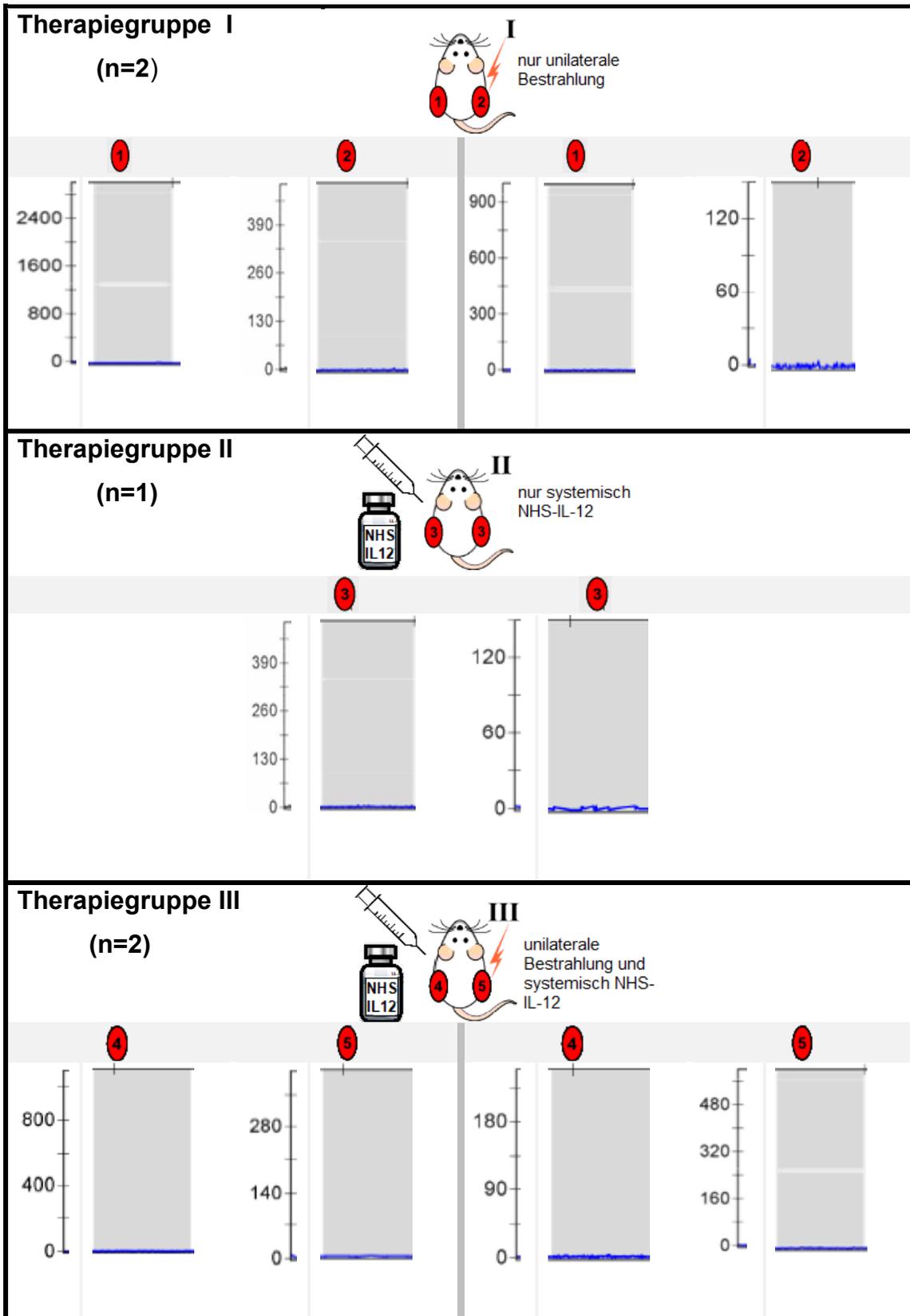


Abb. 3.42: Expressionsniveau und -Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 40 || 31  
 Für dieses Segment konnten keine Expression detektiert werden.

# Ergebnisse

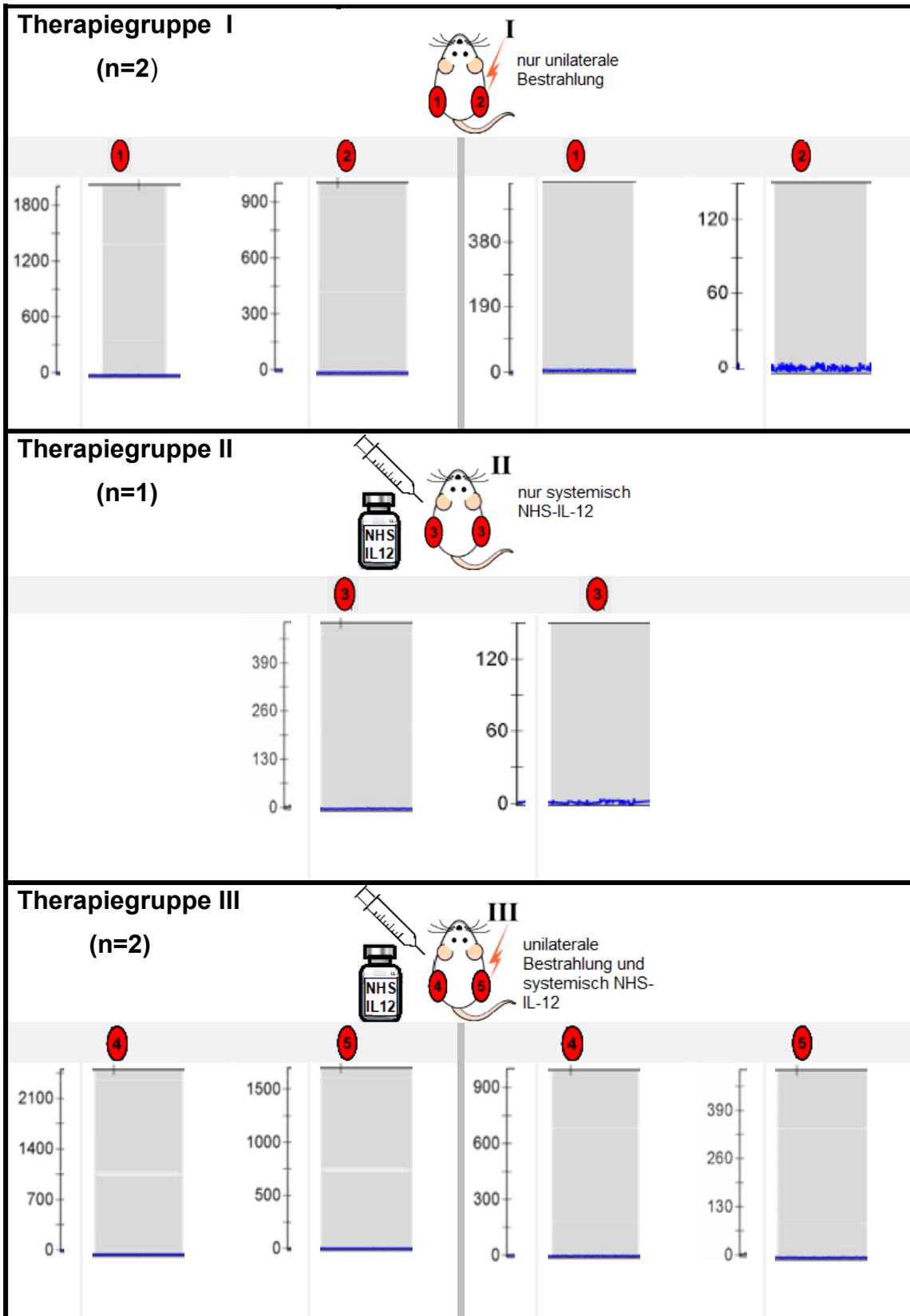
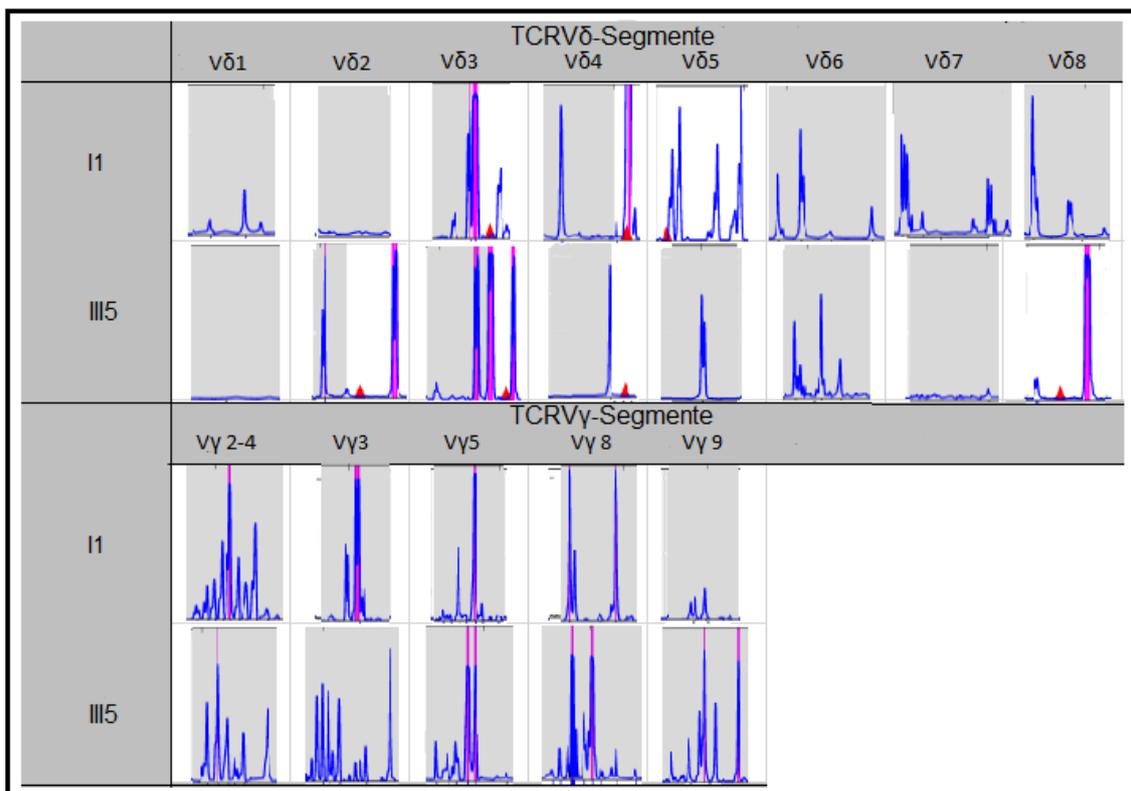


Abb. 3.43: Expressionsniveau und -Breite von TCRV $\alpha$ -Segment 41 || 19  
 Für dieses Segment konnte keine Expression detektiert werden

### 3.2.3 TCRV $\gamma$ - und $\delta$ -Repertoire indifferent zwischen Behandlungsgruppen mit größter klonaler Breite in Tumoren von kombiniert therapierten Mäusen

Hier untersuchten wir das TCRV $\gamma$ - und  $\delta$ -Repertoire intratumoraler TCR $\gamma\delta^+$ -Klone mittels Spectratyping. Wir verglichen Expressionsniveau und klonale Breite bzw. mögliche klonale Expansion für die einzelnen  $\gamma$ - und  $\delta$ -Segmente in Abhängigkeit von der Therapie.

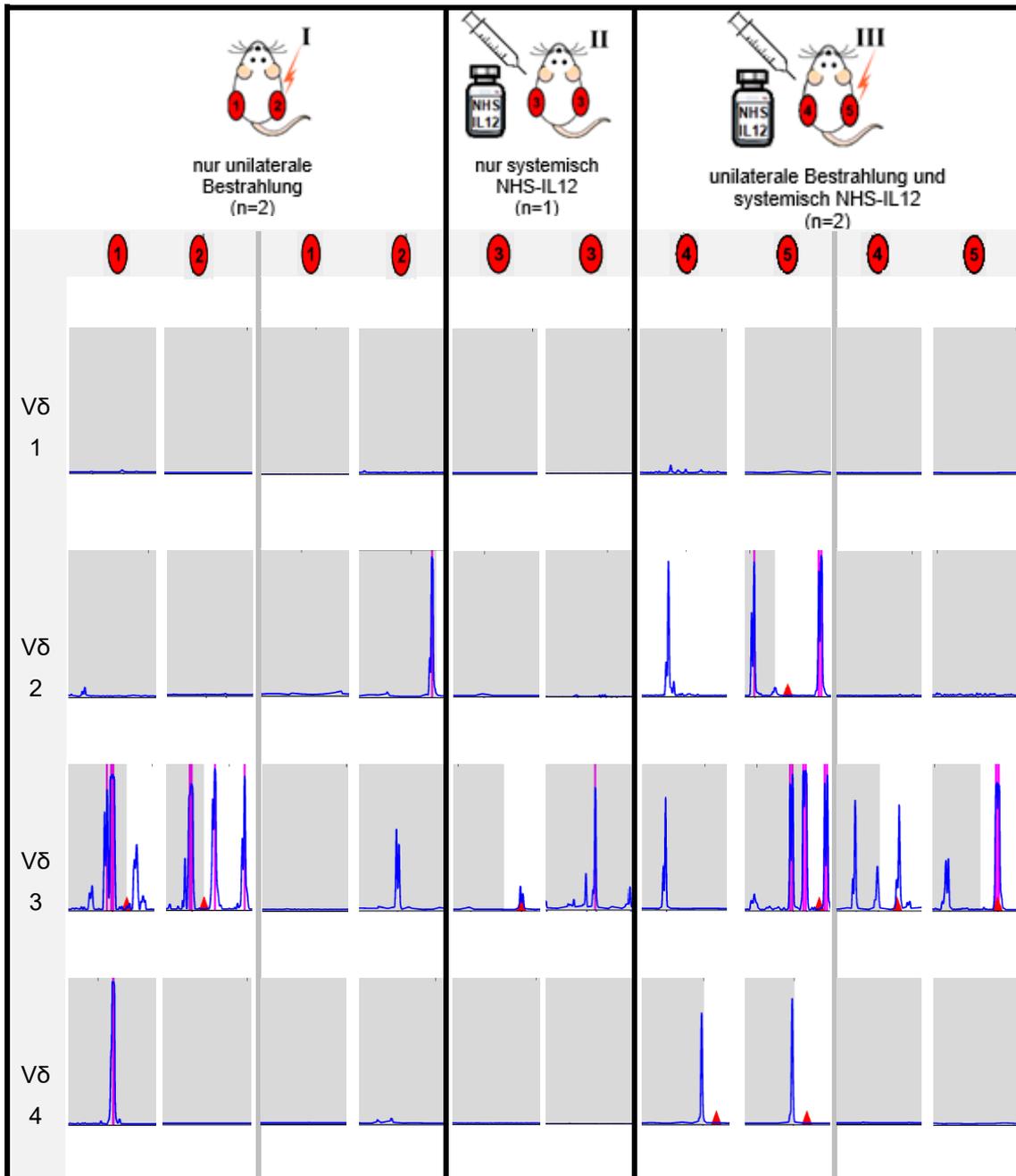


**Abb 3.44:** Exemplarische Darstellung des TCRV $\gamma$ - und  $\delta$ -Spectratyping bei Tumoren von Mäusen unterschiedlicher Therapiegruppen.

Insgesamt präsentierten sich die jeweils exprimierten TCR-Repertoires der intratumoralen TCR $\gamma\delta^+$ -Zellen im Vergleich der Therapiegruppen untereinander weniger deutlich different als für die untersuchten TCRV $\alpha$ -Segmente. Expressionsniveau und vereinzelt klonale Expansion waren unabhängig von der Therapie gleichmäßig über die Tumoren der unterschiedlich behandelten Mäuse verteilt. Allerdings fanden sich bei Mäusen, welche die Kombinationstherapie erhalten hatten, in ipsilateral wie auch kontralateral bestrahlten Tumoren (III4 und

III5) häufiger multiple Peaks als bei nur unilateral bestrahlten (I1,I2) oder nur systemisch mit NHS-IL12 behandelten Mäusen (II3). (s.Abb. 3.45 und 3.46) Korrespondierende Peaks mit Hinweis auf die systemische Expansion der betreffenden  $\gamma\delta$  T-Zellklone ließen sich für die  $V\delta 4$ -Kette in den Tumoren einer kombiniert therapierten Maus, sowie für die  $V\delta 5$ -Kette in einer nur systemisch mit NHS-IL12 behandelten Maus finden. (s. Abb. 3.45 u 3.46) Die häufigere und breiter gefächerte pseudo-gaußsche Expression der einzelnen  $\gamma$ - und  $\delta$ -Ketten im Vergleich zu den untersuchten  $\alpha$ -Ketten kann durch die Organisation der Gensegmente dieser Loci bedingt sein. Die Gesamtvielfalt entstehender  $\gamma\delta^+$  TCR wird bei, im Vergleich zu den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Loci, geringerer Segmentanzahl der  $\gamma$ -, und  $\delta$ -Loci durch eine höhere junktionale Variabilität erreicht. Ein weiterer Grund hierfür kann eine polyspezifische MHC-unabhängige Aktivierung von  $\gamma\delta$  T-Zellen sein. (s.a. 1.2.2.1) Auffallenderweise wurden das Segment  $V\delta 1$  gar nicht und Segment  $V\delta 2$  lediglich in drei der untersuchten Tumoren exprimiert. Deutlich überwiegend wurde die  $V\delta 3$ -Kette exprimiert. (s.Abb. 3.45) Physiologisch bildet die  $V\delta 2$ -Kette mit  $V\gamma 9$  koexprimiert eine Subpopulation von in der Peripherie zirkulierenden  $\gamma\delta$  T-Zellen.  $V\delta 1$  mit einer variablen  $V\gamma$ -Kette koexprimiert bildet eine intraepithelial lokalisierte Subpopulation. Das gezeigte deutlich exprimierte  $V\delta 3$ -Segment, welches mit einem variablen  $V\gamma$ -Segment koexprimiert wird, ist in einer Subpopulation von  $\gamma\delta$  T-Zellen zu finden, die bei chronischen viralen Infektionen oder in der Leber vorkommt. Die überwiegende  $V\delta 3$ -Expression kann Folge von false priming sein. Aufgrund ähnlicher cDNA-Sequenzen, kann es es sein, dass ein Primer während des PCR-Verfahrens an eine andere als die eigentliche Ziel-cDNA-Sequenz bindet. Es werden fälschlich entstandene cDNA-Abschnitte amplifiziert. Im Spectratyping können so zum einen Peaks detektiert werden, die zusätzlich im Hintergrund auftreten, zum anderen aber auch falsch positive Peaks für Fragmente anderer Länge gefunden werden. Letzteres tritt auf, wenn der eingesetzte Primer innerhalb des angestrebten cDNA-Abschnitts an anderer Stelle bindet und so ein kürzerer cDNA-Abschnitt amplifiziert wird, der ebenfalls einer funktionsfähigen mRNA entspricht. In diesem Fall, ist es wahrscheinlich, dass es sich bei den detektierten  $V\delta 3$ -Ketten um  $V\delta 1$ -Ketten handelt.

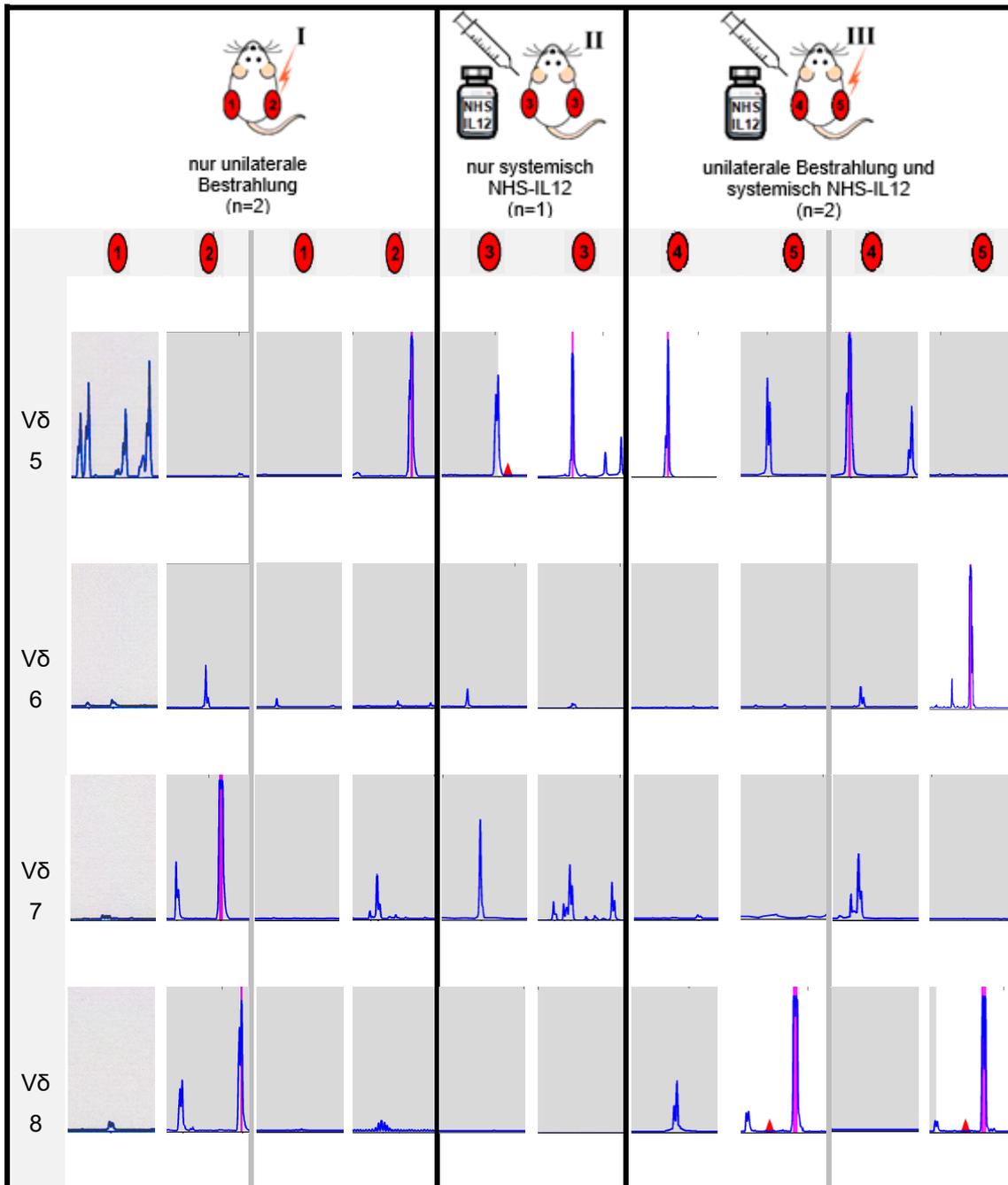
## Ergebnisse



**Abb 3.45: Darstellung des Vδ-Repertoires für die TCRVδ-Segmente 1-4**

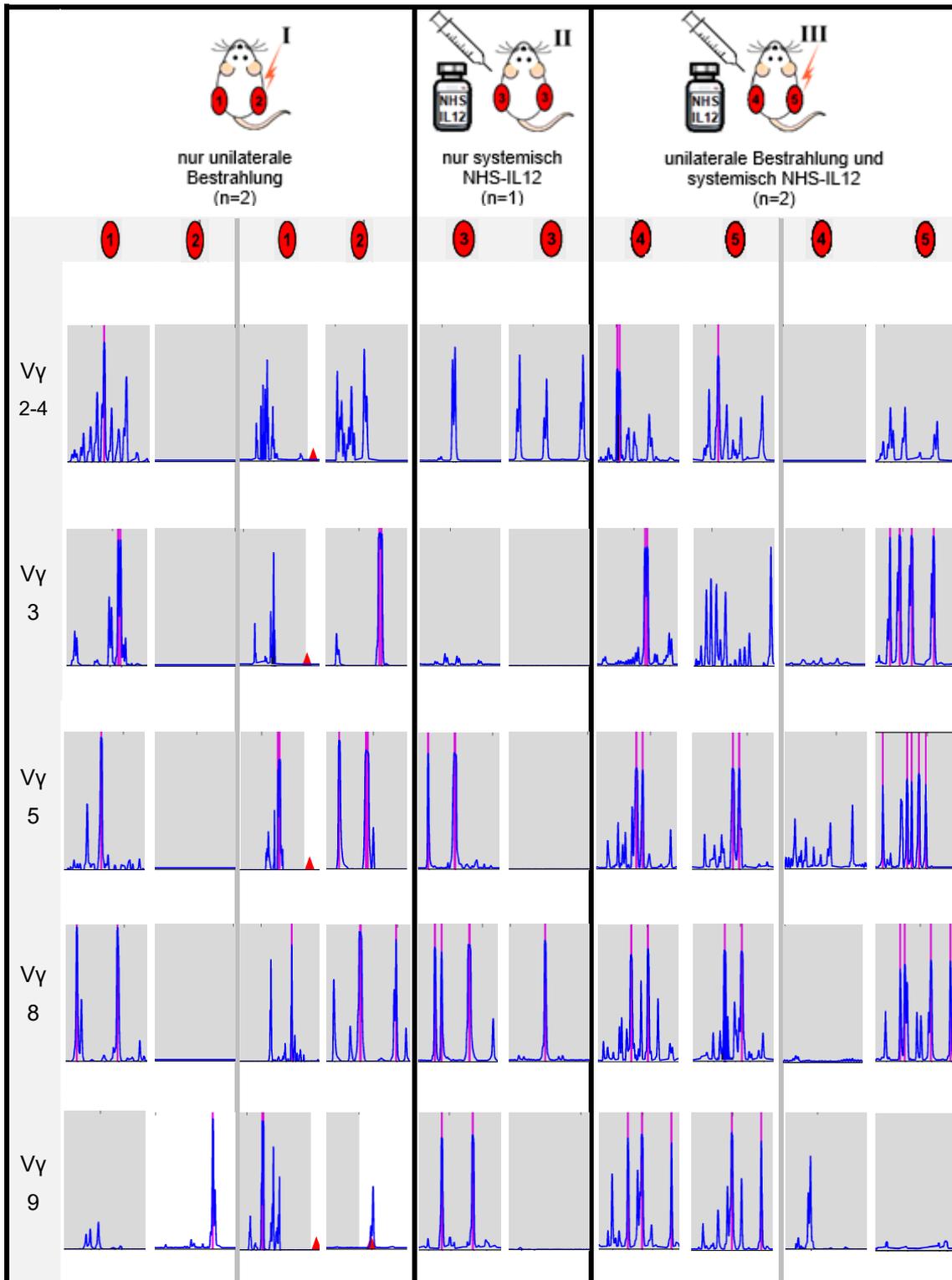
Für Vδ2-4 deutlichste und breiteste Peaks exprimiert bei kombiniert therapierten Mäusen (III4 und III5). Auffällig ist die deutliche Expression von Single Peaks in Tumoren der unilateral bestrahlten Tieren (I1 und I2) sowie die stark überwiegende Expression der Vδ3-Kette. Hingegen keine bzw. kaum Expression der Segmente Vδ1 und Vδ2, Ketten der häufigsten γδ T-Zell-Subpopulationen.

# Ergebnisse



**Abb 3.46: Darstellung des Vδ-Repertoires für die TCRVδ-Segmente 5-8**  
Indifferente Expression von Single Peaks in Tumoren von Tieren aller Therapiegruppen.

# Ergebnisse



**Abb 3.47: Darstellung der V $\gamma$ -Repertoires für die TCRV $\gamma$ -Segmente 2-4, 3, 5, 8 und 9**  
 Detektion der deutlichsten pseudo-gausschen Expression nach Kombinationstherapie.

### 3.2.4 Induktion der deutlichsten Immunantwort nach Kombinationstherapie

In der Gesamtbetrachtung infiltrierender Immunkompartimente ließ sich die dichteste und differenzierteste Immunconttexture in Tumoren der Mäusen zeigen, welche kombiniert mit lokaler Radiotherapie und systemisch mit NHS-IL12 behandelt worden waren.

Die untersuchten Rezeptor-Repertoires der intratumoralen NK-Zellen waren homogen bei Mäusen aller Therapiegruppen exprimiert. (s. Abb. 3.48 A) Es ließen sich sowohl die aktivierenden Rezeptoren NKG2D, NKG2E, NKp30, NKp46 und CD226 aber auch CD161 als lineage marker mit Hinweis auf intratumorale T<sub>H</sub>17-Zelle nachweisen. Es kam zu Tumor-Infiltration durch NK-Zellen mit Ausbildung eines Rezeptorrepertoires, welches auf deren Aktivierung und lytisches Potential hinweist.

Die Repertoires tumorinfiltrierender TCR $\gamma\delta^+$ -Zellen präsentierten sich im Vergleich der Therapiegruppen untereinander, ähnlich den untersuchten NK-Zellrepertoires, indifferent. Die Expression von polyklonalen  $\gamma$ - und  $\delta$ -Ketten mit vereinzelt deutlichen Single Peaks war in Tumoren aller Mäuse unabhängig von der Therapie zu sehen. (s. Abb. 3.48 C)

Das differenteste Immunkompartiment in Abhängigkeit von der Therapie präsentierte das V $\alpha$ -Repertoire tumorinfiltrierender  $\alpha\beta$  T-Lymphozyten. Hier fanden wir in den Tumoren der Mäuse, welche die Kombinationstherapie erhalten hatten, das breiteste V $\alpha$ -Repertoire. Die Kombinationstherapie induzierte die Expression der größten Vielfalt verschiedener V $\alpha$ -Ketten mit Peaks der deutlichsten Intensität und mit den häufigsten Single Peaks. (s. 3.48 B) Neben Single Peaks mit Hinweis auf klonale Expansion bestimmter  $\alpha\beta$  T-Zellklone fanden sich in den Tumoren der Tiere, welche mit der Kombinationstherapie behandelt worden waren, bilateral korrespondierende Peaks, welche die Expansion systemischer Klone implizieren können. Die Expression korrespondierender Single Peaks war auch für vereinzelt V $\alpha$ -Segmente in Tumoren von unilateral bestrahlten Mäusen zu sehen.

Deutlicher und häufiger waren sie durch die multimodale Kombination lokale Bestrahlung und systemische NHS-IL12 Gabe induziert worden. (s.a. 3.2.2)

# Ergebnisse

## A

KIR/NKR/NKP	Irradiation only				NHS-IL12 only		NHS-IL12 and Irradiation			
	contralat.	ipsilat.	contralat.	ipsilat.	no Irradiat.	no Irratiot.	contralat.	ipsilat.	contralat.	ipsilat.
NKG2D										
NKG2E										
Nkp30										
Nkp44										
Nkp46										
CD 226										
CD161										

Expression of Geneloc.  
 no Expression

## B

TCRVα	Irradiation only				NHS-IL12 only		NHS-IL12 and Irradiation			
	contralat.	ipsilat.	contralat.	ipsilat.	no Irradiat.	no Irratiot.	contralat.	ipsilat.	contralat.	ipsilat.
7  1-1 1-2			I				I	I		
11  2	IV						I	III	I	
16  3	I	I						III		
20  4	III	I					II	III	I	
15  5	II						III	I		III
5  6	III		IV				III	III	I	I
1B  8-1 8-3	IV	II	II				II	IV		
1A  8-4 8-6	III	II	IV			III	III	III		
22  9-2	III	I	IV				II	I	I	
24  10	IV	IV	III				I	VII	IV	V
2  12-1 12-2 12-3	III	III	I	III			IV	III	I	V
8  13-1 13-2	III	III	I	I	III		VII	V		III
6  14DV4	III	II	IV			II	II	IV	VI	V
9  16	I	V	I				I	I	I	I
3  17	III		II				IV	V	III	III
12  19	V	III	VII	V	I		I	V	V	III
30  20	II	I	II				I	II	I	I
23  21	IV	IV	III	I	I		I	V	II	IV
13  22	II	I	II				I	II		
17  23DV6	I									
18  24	I	I					I	II	I	I
32  25	I	II	III		I		I	I	I	I
4A  26-2	I	I	II		I		III	III		II
4B  26-2	IV	II	I				I	I	I	
10  27	IV		I				III	III	I	I
21  29DV5	I	I	III				II	III		
29  30			II				III	III	I	I
26  34	I	I					I	I	II	I
25  35		I	I		I		II	IV		I
28  36DV7 25	II		III		IV		III	VI		III
14  38-1 38-2DV8	V		VI		V		V	V	V	VI
27  39	III		I				I	IV		
31  40										
19  41										

## C

TCRVδ und -γ	Irradiation only				NHS-IL12 only		NHS-IL12 and Irradiation			
	contralat.	ipsilat.	contralat.	ipsilat.	no Irradiat.	no Irratiot.	contralat.	ipsilat.	contralat.	ipsilat.
Vδ 1	I									
Vδ 2				I			I	II		
Vδ 3	III	III		I	I	I	IV	III	IV	I
Vδ 4	II						I	I		
Vδ 5	IV			I	I	I	I	I	I	
Vδ 6				I	I					I
Vδ 7		I		I	I	V				
Vδ 8		I					I	I		I
Vγ 2-4	VIII		V	IV	I	III	V	VI		V
Vγ 3	III		I	I	IV		I	VIII	IV	VIII
Vγ 5	V		III	II	II		VIII	VII	VIII	VII
Vγ 8	II		II	VI	IV	I	VIII	VII		VII
Vγ 9	III	IV	IV	I	V		VII	VI	I	

I,II,III,...,n Number of peaks expr.  
 highest Peak ht > 8000  
 h. Peak ht < 8000 > 5000  
 h. Peak ht < 5000 > 1000  
 h. Peak ht < 1000 > 100  
 h. Peak ht < 100 > 30

Abb. 3.48: Exprimierte NK-Zellrezeptorgene, TCRVα- und TCRVδγ-Repertoires (s.a.)<sup>20</sup>

---

## 4 Diskussion

Patienten, welche mit einem Rhabdomyosarkom diagnostiziert werden, sind häufig mit einer schlechten Prognose konfrontiert. Vielversprechend sind multimodale Behandlungskonzepte mit immunstimulierenden Therapieansätzen. (s.a. Kapitel 1.2.3) Während T<sub>H</sub>1-polarisierte Immunkompartimente durch IL-12 als Monotherapie RMS in seinem Tumorwachstum arretieren können,<sup>21</sup> zeigt die Kombination lokaler Radiotherapie mit Immuntherapie eine synergistische immunmodulierende Wirkung und befördert Abscopale Effekte.<sup>203,208</sup> Abscopale Effekte sind selten vorbeschriebene Befunde bei in Monotherapie bestrahlten Tumorpatienten.<sup>220,238(p)</sup> Dieses Phänomen gezielt und zuverlässiger zu induzieren begründete die Rationale, lokale Radiotherapie mit Immuntherapie zu kombinieren.<sup>208,222</sup> Die vorliegende Arbeit untersuchte die *in vivo* Zusammensetzung der intratumoralen Immuncontexture nach Behandlung des RMS mit lokaler Bestrahlung und systemischer Gabe von tumorgerichtetem IL-12. Humanisierte Mäuse – Mäuse, welche mit humanen CD34<sup>+</sup> Stammzellen transplantiert ein humanes Immunsystem heranbildeten – erhielten jeweils in beide Flanken humane Rhabdomyosarkomzellen, die zu soliden Tumoren heranwuchsen, injiziert. Die Tumormäuse erhielten dann IL-12 als Fusionsprotein mit dem histonbindenden Antikörper NHS76 (NHS-IL12) und/oder unilateral lokale Radiotherapie. Neben der Wirksamkeit der Therapie galt es die Mechanismen der intratumoralen Immunaktivität/Immunantwort zu beleuchten. Wir konnten zeigen, dass nur die Kombination aus systemischer NHS-IL12-Gabe und lokaler Radiotherapie ein intratumorales Immunkompartiment mit intensiver  $\alpha\beta$  T-Zellinfiltration mit breitem TCR-Repertoire und systemischen Klonen sowie starker Infiltration durch NK-Zellen und  $\gamma\delta$  T-Zellen induziert, assoziiert mit Tumorregression und verbessertem Gesamtüberleben.<sup>20,21</sup>

Das für diese Arbeit etablierte humanisierte Mausmodell bestand aus fünf NSG-Mäusen, welche nach systemischer Bestrahlung mit CD34<sup>+</sup> humanen Stammzellen transplantiert worden waren. Da auf Grund mehrerer genetischer

Modifikationen immundefizient, sind diese Tiere sehr geeignet als Empfänger für Tumore aber auch Stammzellen und Immunzellen und damit für die Etablierung einer humanen Hämatopoese und eines menschlichen Immunsystems. Humanisierte NSG-Mäuse bieten somit die Möglichkeit, humane Immunreaktionen im Kontext von Neoplasien und wie hier geschehen immuntherapeutischer Intervention Spezies-spezifisch zu untersuchen.<sup>223–229</sup> Nach Überprüfung des Engraftments wurden den Tieren in die Oberschenkel beider Hinterläufe RMS-Zellen der Zelllinie A204 inokuliert. Die Therapie in drei unterschiedlichen Therapiegruppen begann ab einer Tumorgroße von 7 mm. Zwei Tiere wurden lediglich unilateral lokal radiotherapiert. Ein Tier wurde nur systemisch mit NHS-IL12 behandelt. Zwei Tiere wurden mit der Kombinationstherapie aus unilateraler lokaler Radiatio und systemischer Gabe von NHS-IL12 behandelt. (Vgl. Kapitel 2.1.1 und 2.2.1) So konnte die Wirksamkeit der Kombinationstherapie beider Therapiemodi im Vergleich zur Monotherapie durch alleinige Immuntherapie bzw. lokale Radiotherapie betrachtet werden.

Wie zuvor beschrieben liegt die Wirksamkeit von Radiotherapie gegen Tumore neben der direkten lytischen Komponente auch in der (meist zeitlich limitierten) Wiederherstellung von Tumorimmunogenität durch Induktion von immunogenem Zelltod (ICD) und Vermittlung Abscopaler Effekte.<sup>208–210,218–221,239</sup> ICD ist eine immunstimulierende Form des Zelltods, welche durch Freisetzung sogenannter Damage associated patterns (DAMPs), z.B. Calreticulin und HSP, angeborene und adaptive Immunantwort induziert.<sup>209,210</sup> Es kommt nach lokaler Radiotherapie zur Hochregulation von MHC-I, Tumorantigenen und FAS/CD95 auf Tumorzellen und zur Polarisierung der intratumoralen Immuncontexture in Richtung einer zytotoxisch inflammatorischen T<sub>H</sub>1-Antwort mit Präsenz von IL-2, IL-12 und IFN $\gamma$ .<sup>208,213–218</sup> Die nach Radiatio infiltrierenden T-Zellkompartimente werden durch DC-Interaktion tumorgerichtet geprimed und so eine systemische CD8<sup>+</sup> T-Zell-Toxizität induziert, welche Abscopalen Effekten zurunde liegen könnte<sup>208–212,222,240</sup> Die gesteigerte Tumorimmunogenität nach lokaler Bestrahlung in Monotherapie war bisher durch die bestrahlungsbedingte Immunsuppression

limitiert.<sup>241–243</sup>

Durch Kombination lokaler Radiotherapie mit IL-12 konnten wir eine Effizienzsteigerung der gegen den Tumor gerichteten Aktivierung des Immunsystems in einer Verbesserung des Outcomes zeigen. (Vgl. overall survival Abb. 3.3)<sup>244</sup> Die Wirksamkeit von intratumoralem IL-12 fusioniert mit dem Nekrose- bzw. *naked-histone binding* Antikörper NHS76 zu NHS-IL12 war vorangehend durch Schilbach et al. gezeigt worden.<sup>21</sup> IL-12 beförderte eine Polarisierung des intratumoralen Immunkompartiments in Richtung einer inflammatorischen T<sub>H</sub>1-Antwort, begünstigte die Konversion von TAM (Tumor associated Makrophagen) zum M1-Phänotyp, supprimierte ROR $\gamma$ t- und Foxp3 und induzierte einen aktivierten Phänotyp von  $\alpha\beta$  und  $\gamma\delta$  T-Zellen und NK-Zellen, der große Mengen an T<sub>H</sub>1 Zytokinen sezerniert: Während IFN $\gamma$  vornehmlich aus Lymphozyten stammt, könnte TNF $\alpha$  auch über angelockte M1-Makrophagen sezerniert worden sein.<sup>64,193–196</sup> Durch die Fusionierung mit NHS76 zu NHS-IL12 konnte IL-12 mit hoher intratumoraler Bioverfügbarkeit bei geringer systemischer Toxizität verwendet werden.<sup>196,201,202</sup> Die in unserem Studiendesign eingesetzte Kombination dieser zwei Therapiemodi wirkte synergistisch: Immuntherapie beförderte Abscopale Effekte an nicht bestrahlten Orten der Tumormanifestation, lokale Radiotherapie setzte immunogene Muster frei, polarisierte das tumor micro environment (TME) und Tumorummunkompartiment gegen den Tumor und erhöhte die intratumorale Verfügbarkeit von NHS-IL12.<sup>203,208,222</sup>

Die weitere Optimierung und Feinabstimmung der Kombination von Radiotherapie und Immuntherapie wird ein vielversprechendes Feld in der Tumorthherapie ausmachen.<sup>244</sup>

Wir untersuchten für die drei Therapiegruppen zunächst das jeweilige Tumorwachstum und das Gesamtüberleben der Mäuse. Nachdem den Mäusen die Tumore entnommen worden waren, untersuchten wir weiterhin die infiltrierenden Immunkompartimente histologisch, immunhistochemisch und molekular-biologisch mittels  $\alpha$ - und  $\gamma\delta$ -Spectratyping und mittels KIR-Typing auf aktivierende NK-Rezeptoren.

Der verwendete Studienaufbau war limitiert, da das verwendete Mausmodell keine Zeit für follow-up-Untersuchungen bot. Die Mäuse waren vor Entnahme der untersuchten Tumore euthanasiert worden, sodass eine weitere Entwicklung des intratumoralen Tumorkompartiments und dessen möglicher Einfluss auf das Tumorwachstum nicht untersucht werden konnten. (Vgl. 2.1.1)

Wo in einer vorangegangenen Studie mit Therapiebeginn bei geringerer Tumorgöße das Tumorwachstum durch NHS-IL12 allein oder in Kombination mit anderen Zytokinen (IL-2, IL-7) kontrolliert werden konnte, waren in unserer Studie sowohl Radiotherapie als auch Immuntherapie als Monotherapie ineffizient.<sup>21</sup> Dies liegt in der geringeren Therapiezeit sowie der verdoppelten Tumormasse begründet. Die Tumore lediglich mit lokaler Bestrahlung oder systemisch mit NHS-IL12 monotherapierter Tiere wuchsen unkontrolliert über den Beobachtungszeitraum von 25 Tagen. Einer der nur lokal bestrahlten Tumore wurde ab Tag 10 in seinem Wachstum arretiert. Ganz im Gegensatz dazu zeigte sich die Kombination der systemischen Gabe von NHS-IL12 mit lokaler Radiotherapie signifikant wirksam in Bezug auf die Kontrolle des Tumorwachstums. (Vgl. Kapitel 3.1.1, Abb. 3.1 und Abb. 3.2) Mäuse welche kombiniert therapiert worden waren, lebten tumorgößespezifisch signifikant länger, im Schnitt 40 Tage bis zum Ende des Beobachtungszeitraums, lediglich ein Tier musste wegen Unterschreitung einer Tumorgöße von 3 mm vorzeitig euthanasiert werden. Tiere, welche in Monotherapie radiotherapiert worden waren überschritten im Schnitt 21,5 Tage nach Behandlungsbeginn eine Tumorgöße von 15 mm und wurden euthanasiert. In Monotherapie systemisch mit NHS-IL12 behandelte Tiere erreichten den Endpunkt von 15 mm Tumorgöße im Schnitt nach 24,5 Tagen. (s. Tumorgößespezifische Survivalanalyse in Abb. 3.3).

Nicht nur wurden bei Tieren nach Kombinationstherapie die lokal radiotherapierten Tumore in ihrem Wachstum arretiert oder schrumpften, sondern auch ihre contralateralen Counterparts.<sup>20</sup> Wir konnten zeigen, dass die Kombination lokaler Radiotherapie mit necrose-targeted IL-12 eine systemische Immunantwort mit Vermittlung von Tumorregression an nicht bestrahlten Orten der Tumormanifestation begünstigt. Das Auftreten Abscopaler Effekte in Bezug

auf Tumorregression trat nur bei Tieren auf, welche die Kombinationstherapie erhalten hatten, waren jedoch nicht bei jedem der kombiniert therapierten Tiere zu sehen.

Histologie und Immunhistochemie zeigten analog zu den Befunden aus Tumorwachstums- und Survivalanalyse dichte intratumorale Immuninfiltrate vornehmlich ipsi- sowie contralateral in den Tumoren, welche unter der Kombinationstherapie im Wachstum kontrolliert werden konnten. (Vgl. 3.1.2, Abb. 3.4 und 3.5)

Eine dichtere CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zell-Infiltration war mit einer geringeren TumorgroÙe und einem besseren Gesamtüberleben assoziiert. (s. Abb. 3.6) Die Forderung nach Erweiterung bzw. Ergänzung des Tumorstagings durch einen Immunoscore besteht schon seit längerem. Nach Galon waren Marker einer T<sub>H</sub>1-Polarisierung und CTL-Infiltration des intratumoralen Immunkompartiments mit einer besseren Prognose in CRC korreliert. Wie durch Galon und Fridman gezeigt, wies die Zusammensetzung des tumorinfiltrierenden Immunkompartiments für Tumore verschiedener Entitäten (u.a. CRC, Tumore der Blase, Brust, Ovarien oder der Kopf-Hals-Region) einen höheren prognostischen Wert auf als etablierte TNM-Klassifikationen.<sup>24,154,155</sup>

Das in der vorliegenden Arbeit nach Kombinationstherapie in den Tumoren induzierte Immunkompartiment wies neben CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen zytolytische Aktivität auf, nachgewiesen durch den Marker Granzym B. (Vgl. Kapitel 3.1.2, Abb. 3.4 und 3.5) CD8<sup>+</sup> CTLs werden als die Haupt-Antitumorzellen („gold standard“ effector cells in tumor immunotherapy)<sup>162</sup> betrachtet, die effizient über Perforin und Granzyme Tumorzellen lysieren können – dann, wenn sie diese über MHC I präsentierte Tumorantigene erkennen.<sup>155,158,159</sup> Der Nachweis von Granzym B mit Hinweis auf eine zytolytische Aktivierung und CTL-Differenzierung des intratumoralen Immunkompartiments korrelierte mit einem signifikant geringeren Tumorwachstum, nicht aber einem besseren overall survival. (s. Abb. 3.6) Bemerkenswerterweise konnten neben Granzym B vornehmlich in Tumoren kombiniert therapierten Tiere Desmin detektiert werden. (s. Abb. 3.4 und 3.5) Desmin ist ein Marker, der für myogene Enddifferenzierung

steht. Die Desminexpression korrelierte mit prominenten T-Zellkompartimenten und zeigte sich in Tumoren als histologisch mehrkernig myogenes Synzytium und quergestreiftes Muskelgewebe. (s. Abb. 3.4) Über das CTL-abhängige Abtöten von Tumorzellen hinaus induzierte die Kombinationstherapie hier myogene Enddifferenzierung aus undifferenzierten RMS-Zellen. Desmin<sup>+</sup> Tumore wiesen überraschenderweise kein geringeres Volumen auf als nichttherapierte. Vorangehend hatten Braumüller, Röcken und Schilbach beschrieben, dass es sich bei dem der myogenen Enddifferenzierung von RMS-Zellen zugrunde liegenden Mechanismus um Seneszenz handelte.<sup>21,163</sup> In einem durch IL-12 in Richtung einer T<sub>H</sub>1-Antwort polarisierten TME hatten IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  geringeres Tumorstadium und Seneszenz induziert, zu sehen an der intranuclearen Lokalisation des Proliferationsmarkers p-HP1 $\gamma$ , der vermehrten Expression des Zellzyklusregulators und Tumorsuppressorproteins p16<sup>INK4a</sup> sowie der verminderten Expression des Proliferationsmarkers Ki-67.<sup>21,163,245</sup> Auch in unserer Studie konnten IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  nur gemeinsam entsprechende Marker und Wachstumsarettierung in A204-Kulturen *in vitro* induzieren, wobei eine Blockade von TNF $\alpha$  trotz IFN $\gamma$ -Präsenz die Seneszenzentwicklung aufhob. TNF $\alpha$ , bestrahlungsabhängig aus Tumorzellen freigesetzt, wird in Kombination mit IFN $\gamma$  effektiver in der Seneszenzinduktion als IFN $\gamma$  kombiniert mit TNF $\alpha$ .<sup>20</sup> (Daten nicht Teil dieser Arbeit) Bestrahlte RMS-Zellen und M1-Makrophagen können in unserer Studie als Quelle des immunmodulierend wirkenden TNF $\alpha$  vermutet werden.<sup>193</sup> IFN $\gamma$  wurde durch den eindeutigen Nachweis aktivierter Phänotypen von NK-Zellen,  $\alpha\beta$  und  $\gamma\delta$  T-Zellen in dem durch IL-12 T<sub>H</sub>1-polarisierten TME sezerniert.<sup>191</sup> Die T<sub>H</sub>1 Zytokine TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  konnten unabhängig von zytolytischer T-Zell-Aktivität nach Stimulation durch IL-12 und lokale Radiotherapie Tumorzellen zur Seneszenz und Ausdifferenzierung treiben, was die Antitumorrelevanz der CD4<sup>+</sup> T-Zellen weiter untermauert.<sup>21,160–163</sup> Im Kontrast dazu zeigten Tumore solcher Tiere, welche unimodal behandelt worden waren, geringere T-Zell-Infiltration, kaum Marker zytolytischer Aktivität und keine Marker myogener Enddifferenzierung. In keinem der Tumore monotherapierter Tiere waren histologisch quergestreifte Muskelgewebe oder mehrkernige Myozyten zu erkennen. Unilateral radiotherapierte Tumore zeigten,

abgesehen von einem Tumor, wenige intratumorale Immunkompartimente, ebenso ihre nichtbestrahlten Counterparts. Mäuse, welche lediglich mit NHS-IL12 behandelt worden waren, präsentierten eine noch geringere intratumorale Infiltration durch Immunzellen. (Vgl. 3.1.2, Abb. 3.4 und 3.5)

In der molekularbiologischen Analyse intratumoraler Immunkompartimente zeigte sich eine homogene Expression von NK-Zellrezeptorgenen in allen Tumoren. Die dichtesten und differenziertesten T-Zellinfiltrate von  $\alpha\beta$  und  $\gamma\delta$  T Lymphozyten wiesen die Tumore der Mäuse auf, welche die Kombinations-therapie erhalten hatten.

In Tumoren aller Therapiegruppen konnten wir mittels Spectratyping die NK-Zellrezeptorgene NKG2D, NKG2E, NKp30, NKp46, CD226 sowie CD161 detektieren. Das gefundene Oberflächenmarker-Profil suggeriert eine zytolytische Aktivierung der intratumoralen NK-Zellen und setzt eine hohe IL-12-Verfügbarkeit voraus. (Vgl. 3.2.1, Abb. 3.7 und Abb. 3.8)

NKG2D bindet stressinduzierte MHC-I-ähnliche Moleküle (MICA und MICB), ist auf NK-Zellen, auf  $\gamma\delta^+$  T-Zellen, Makrophagen und CD8<sup>+</sup> CTLs zu finden und aktiviert deren zytolytische Effektorfunktionen.<sup>103</sup> Die Relevanz des NKG2D-Rezeptors für Tumorüberwachung und -kontrolle ist groß.<sup>113,133,134</sup> NKG2D-Liganden wie MICA und ULBP sind häufig auf neoplastischen Zellen exprimierte MHC-I-ähnliche Moleküle.<sup>99,101,103</sup> Neben der zytolytischen Aktivierung waren vermutlich begünstigt durch das hohe IL-12-Angebot in Kombination mit NKG2D-abhängiger Aktivierung CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen an der IFN $\gamma$ -Sekretion im TME beteiligt.<sup>113,118,121</sup> Gemeinsam mit dem ebenfalls detektierten NKp46 ist NKG2D über ULBP1 an der Lyse inhibierender T<sub>regs</sub> beteiligt. T<sub>regs</sub> regulieren die zytotoxische Aktivität von CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen herunter.<sup>246,247</sup> Das in Tumoren aller Therapiegruppen exprimierte NKp30 suggeriert NK-Zell-DC Crosstalk, welcher DC-Reifung bzw. Lyse unreifer DCs induziert und so spezifisches T-Zell-Priming ermöglicht.<sup>248,249</sup> Denn der NKp30<sup>+</sup> NK-Zell Phänotyp erkennt DC-Zielstrukturen, wirkt nach Aktivierung zytotoxisch auf nichtdifferenzierte DCs und vermittelt über die Sekretion von IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  die Ausreifung von DC, welche eine T<sub>H</sub>1-polarisierte adaptive Immunantwort induzieren können.<sup>249,250</sup> CD161 als lineage Marker für T<sub>H</sub>17 Zellen konnte in allen Tumoren gefunden werden.<sup>65</sup> CD161 weist

auf intratumorale IL-17 produzierende T-Zell-Subsets vom memory Phänotyp hin, welche wie zuvor gezeigt durch IL-12 in  $T_H1$ -Zellen konvertiert werden können.<sup>21,251</sup> Für diese T-Zell Subpopulation ist CD161 für die frühe Tumordinfiltration durch chemokinunabhängige transvasale Migration relevant.<sup>252</sup> In keinem Tumor ließ sich der ebenfalls untersuchte NCR NKp44 finden. NKp44 ist ein auf aktivierten NK-Zellen und  $\gamma\delta$ -T-Zellen zu findender Rezeptor, welcher MHC-unabhängig tumorlytisch wirkt.<sup>38,253,254</sup> Das hier detektierte Oberflächenmarkerprofil suggeriert Tumordinfiltration durch innate NK-Zellen, sowie verschiedene innate T-Zell-Subpopulationen, welche in der Lage sind  $T_H1$ -Zytokine zu sezernieren und über NK-DC-Crosstalk eine adaptive T-Zell Immunantwort einzuleiten.<sup>249,255</sup>

Im Gegensatz zu der unter den Therapiegruppen homogenen Expression von NK-Zellrezeptorgenen, unterschieden sich die mittels Spectratyping detektierten intratumoralen TCR-Repertoires in Abhängigkeit von der Therapie teilweise deutlich. Das intratumorale TCRV $\alpha$ -Repertoire nach alleiniger NHS-IL12-Therapie wies die geringste Breite und Intensität auf. Unilaterale Radiotherapie induzierte ein mäßig breites TCRV $\alpha$ -Repertoire mit bemerkenswerterweise intensiverer Expression in nicht bestrahlten contralateralen Tumoren sowie die klonale Expansion einiger weniger  $\alpha\beta$  T-Zell-Klone angezeigt durch die Expression von Single Peaks. Intratumorale  $\alpha\beta$  T-Zellen von Mäusen, welche die Kombinationstherapie erhalten hatten, wiesen die größte Vielfalt exprimierter V $\alpha$ -Ketten auf. Die im Vergleich zu Tumoren von Mäusen anderer Therapiegruppen häufigste und deutlichste Expression von Single Peaks wies auf die klonale Expansion tumor-antigenspezifisch aktivierter T-Lymphozyten hin. Darüber hinaus ließen sich in ipsilateral wie contralateralen Tumoren von kombiniert therapierten Tieren am häufigsten systemische  $\alpha\beta$  T-Zell-Klone mit bilateral ebenbürtiger Tumordinfiltration finden.

Der Großteil der Tumore welche lokale Radiotherapie erhalten hatten, exprimierten die V $\alpha$ -Kette 24 (TRAV 10). Die Expression war in Tumoren von Mäusen, welche die Bestrahlung in Kombination mit NHS-IL12 erhalten hatten, deutlicher als in Tumoren von in Monotherapie bestrahlten Mäusen. TCRV $\alpha$  24

exprimierende invariant natural killer T cells (iNKT) bilden gemeinsam mit NKp46<sup>+</sup> NK-Zellen,  $\gamma\delta$  T-Zellen und IL-17 produzierenden T-Zell-Subsets ein T<sub>H</sub>17-Kompartiment, welches unter IL-12-Einfluss in ein T<sub>H</sub>1-Kompartiment konvertiert werden kann. Wie schon vorher gezeigt können iNKT selbst IFN $\gamma$  sezernieren, DC-Reifung vermitteln und so zum T-Zell-Priming beitragen.<sup>21,256</sup>

Bestrahlte und unbestrahlte Tumore der Mäuse, welche lokale Radiotherapie und systemisch NHS-IL12 erhalten hatten, zeigten die stärkste Tumorregression, myogene Enddifferenzierung und analog dazu bilateral die deutlichsten intratumoralen  $\alpha\beta$  T-Zell-Kompartimente mit dem vielfältigsten Repertoire an V $\alpha$ -Ketten. Abscopale Effekte mit Tumorregress waren schon zuvor mit T-Zell-Infiltration und Priming nach Radiotherapie in Kombination mit Immuntherapie assoziiert worden.<sup>257,258</sup> Grundlage derartiger Effekte und Ziel einer langfristig wirksamen Therapie ist die Induktion einer adaptiven Anti-Tumor Immunantwort, die dann systemisch T-Zell-abhängig zytolytisch oder über Sekretion von T<sub>H</sub>1-Zytokinen Tumorkontrolle ermöglicht.<sup>185,259</sup>

Die in dieser Studie angewandte Kombinationstherapie konnte dabei für eine tumorgerichtete T-Zell Antwort mehrere entscheidende Effekte vermitteln: Radiotherapie kann die notwendige Tumordinfiltration durch T-Zellen bewirken und die Diversität derer TCR Repertoires erhöhen (s. Abb 3.48).<sup>257,260,261</sup> Relevant ist dabei vor allem die Induktion systemischer tumorspezifischer TCR, wie hier sichtbar durch prominente Single Peaks, die auf einen monoklonalen Ursprung eines antigenspezifisch expandierenden Klons schließen lassen (z.B. TRAV 9-2 (Abb. 3.18.) und TRAV 16 (Abb. 3.23)).<sup>154,262,263</sup> IL-12 kann ebenso T-Zell-Infiltration fördern und das tumorspezifische T-Zell-Priming begünstigen. Es kann das Formen eines Übergangs von einer innate Immunität hin zur adaptiven Immunität<sup>191,192</sup> und das Beibehalten einer gegen den Tumor gerichteten T<sub>H</sub>1-Polarisierung des intratumoralen Immunkompartiments mit Neutralisation/Repolarisierung immunsupprimierender Faktoren wie T<sub>regs</sub>, IL-10 oder TGF $\beta$  Immunantwort vermitteln<sup>264–266</sup>. Denn auch die Induktion tumorgeprimierter T-Zellen kann in einem immunsupprimierenden, tumorbegünstigend polarisierten TME nur vorübergehend Tumorkontrolle vermitteln, was eine Erklärung für die Seltenheit Abscopaler Effekte liefert.<sup>257,267</sup>

In dieser Studie jedoch konnte die Verwendung von lokaler Radiotherapie kombiniert mit dem  $T_H1$ -immunstimulierenden NHS-IL12 langfristige Tumorkontrolle induzieren.<sup>260</sup> Die antitumorale Wirksamkeit des gezeigten deutlichen  $\alpha\beta^+$  T-Zell-Kompartiments lag dabei vermutlich nicht nur in der Zytotoxizität  $CD8^+$   $\alpha\beta$  T-Zellen begründet: Unter IL-12-Einfluss konnten  $T_H1$ -polarisierte, tumorgeprimete  $CD4^+$   $\alpha\beta$  T-Lymphozyten zusammen mit NK-Zellen und  $\gamma\delta$  T-Zellen große Mengen IFN $\gamma$  sezernieren. Gemeinsam mit aus Tumorzellen bestrahlungsabhängig freigesetztem TNF $\alpha$  konnte so lokal und systemisch Seneszenz und Tumorregression vermittelt werden.

Das mittels CDR3-Fragmentlängenanalyse untersuchte TCRV-Repertoire intratumoraler  $\gamma\delta$  T-Zellen zeigte sich weniger different im Vergleich der einzelnen Therapiegruppen untereinander als die Rezeptor-Repertoires der untersuchten TCR $\alpha\beta^+$  Zellen. In Tumoren von Mäusen aller Therapiegruppen fand sich ein vergleichbar breites Repertoire von V $\gamma$ - und V $\delta$ -Ketten. Es kam in Tumoren aller Tiere zu polyklonaler Expansion starker Intensität, hinweisend auf eine unspezifische Aktivierung der  $\gamma\delta$  T-Zellen durch Zytokine und Mitogene. In den Tumoren eines Tieres, welches die Kombinationstherapie erhalten hatte, waren häufiger multiple Peaks (pseudo-gaußsche Expression) der V $\gamma$ -Ketten exprimiert worden als in anderen Tumoren. Vereinzelt monoklonale Peaks für verschiedene V $\delta$ -Ketten konnten in Tumoren aller Mäuse unabhängig von der Therapie detektiert werden. Die Expression der V $\delta 1$ - und V $\delta 2$ -Ketten war im Verhältnis zur starken V $\delta 3$ -Expression auffallend gering. Das V $\delta 1$ -Segment war in keinem der untersuchten Tumoren zu finden. Dies ließ sich später im Sequencing über durch false priming fälschlich als V $\delta 3$ -Ketten detektierte V $\delta 1$ -Ketten erklären (Sequencingdaten nicht Teil dieser Arbeit). Physiologisch werden V $\delta 1$ - und V $\delta 2$ -Segmente von den häufigsten humanen  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulationen exprimiert. V $\gamma 9$ /V $\delta 2$  T-Lymphozyten zirkulieren in der Peripherie. V $\delta 1^+$  T-Zellen exprimieren eine variable V $\gamma$ -Kette, machen einen Großteil der IEL aus und spielen in der Tumorüberwachung eine wichtige Rolle. Eine weitere T-Zell-Subpopulation, welche TCRV $\delta 3$ - Kette mit einer variablen V $\gamma$ -Kette exprimiert, ist vor allem in der Leber oder bei chronischen viralen

Infekten in der Peripherie zu detektieren.<sup>85,87</sup> (s.a. Kapitel 1.2.1.1.2)

Die Detektion breiter TCR Repertoires intratumoraler  $\gamma\delta$  T-Zellen bei Mäusen aller Therapiegruppen lässt auf die Entstehung antigenun-spezifisch aktivierter  $\gamma\delta^+$  Immunkompartimente unabhängig von der Therapie schließen. Wie schon bei der Analyse der NK-Zellrezeptorgene vermutet, suggeriert dies eine frühe Tumordinfiltration durch ein nicht-adaptives  $T_H17$ -Kompartiment, dem auch  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten angehören können.<sup>21,105</sup> Die Antitumor-Relevanz von  $\gamma\delta$  T-zellen ist wie in der Wirksamkeit gegen verschiedene Neoplasien gezeigt groß (z.B. bei Plasmozytomen, Lymphomen, Leukämien und dem Neuroblastom) (s.a. 1.2.2.1.2).<sup>104–108</sup> Durch ihre polyspezifischen Erkennungsmuster und pleiotropen Effektorwege wird den  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten ein entscheidender Stellenwert in der Tumorbekämpfung und in der Vermittlung zwischen angeborener und adaptiver Antitumor-Immunität zugesprochen.<sup>58,85,99</sup>

So waren  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten in unserem Modell vermutlich unter Einfluss von NHS-IL12 an der Sekretion von  $T_H1$  Zytokinen, allen voran IFN $\gamma$ , beteiligt.<sup>109,191</sup> IL-12 begünstigt Tumordinfiltration und Proliferation von  $\gamma\delta$ -T-Zellen.<sup>268</sup> Intratumorale  $\gamma\delta$ -T-Zellen können Makrophagen rekrutieren und haben wie zuvor gezeigt das Potential, selbst als APC  $CD4^+$  und  $CD8^+$   $\alpha\beta$  T-Zellen Antigene zu präsentieren. So können  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten neben einer schnellverfügbaren innate Immunantwort, wie die Zytokinproduktion von IFN $\gamma$ , einen Übergang zu einer starken adaptiven Anti-Tumor-Immunität bereiten.<sup>85,93</sup>

Insgesamt ist aus den in dieser Arbeit gezeigten Befunden abzuleiten, dass in diesem Tumormodel eine langfristig effektive Tumorkontrolle nur mit der Kombination aus systemischer Gabe von tumogerichtetem NHS-IL12 und lokaler Radiotherapie gegeben war – nicht jedoch durch ihre Einzelkomponenten. Die nach Kombinationstherapie vermittelte Tumorregression wurde nicht nur über  $CD8^+$  zytolytische Aktivierung der deutlichen intratumoralen Immunkompartimente sondern auch über massive  $T_H1$ -Zytokinproduktion durch tumorinfiltrierende  $CD4^+$  und  $CD8^+$   $\alpha\beta$  T-Zellen,  $\gamma\delta$  T-Zellen und NK-Zellen bewirkt. Abscopale Effekte waren durch eine systemische Immunantwort und Induktion von Sensezenz und Enddifferenzierung von RMS-Zellen durch IFN $\gamma$  und

nach Bestrahlung aus Tumorzellen freigesetztem TNF $\alpha$  induziert worden. Für die Therapie von Rhabdomyosarkomen und anderen Neoplasien stehen mittlerweile mannigfaltige immuntherapeutische Konzepte zur Verfügung, die mit unterschiedlichem Erfolg langfristige Tumorkontrolle vermitteln können. Das Ziel muss dabei nicht notwendigerweise die lokale Tumoreradikation sein, sondern eher eine langfristige systemische Tumor- und Metastasenkontrolle, welche eine langfristiges Überleben mit einer Tumorerkrankung ermöglicht.<sup>155,185,188,189</sup> Die hier besprochenen Ergebnisse zeigen, dass die Kombination von lokaler Radiotherapie mit systemischer NHS-IL12-Gabe ein wirksamer multimodaler Ansatz ist systemisch immunvermittelt Tumorkontrolle zu erreichen und sie empfiehlt sich so für die Anwendung im klinischen Setting.

## 5 Zusammenfassung

Patienten, bei denen ein Rhabdomyosarkom (RMS) festgestellt wird, sind mit einer schlechten Prognose konfrontiert. Standardtherapien (Radiochemotherapie und chirurgische Tumoresektion) können keine langfristige Tumorkontrolle induzieren. Das 5-Jahresüberleben liegt unter 25%.

Vielversprechend sind multimodale immunstimulierende Behandlungskonzepte die eine langlebige adaptive Anti-Tumor-Immunität etablieren kann. Tumorkontrolle durch ein IL-12 T<sub>H</sub>1-polarisiertes Immunkompartiment wurde als Monotherapie bereits beim RMS gezeigt. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht ob die Kombination aus IL-12 und lokaler Bestrahlung als Kombinationstherapie des disseminierten RMS wirksam ist.

IL-12 wurde um die Halbwertszeit zu erhöhen und die Toxizität zu eliminieren als Fusionsprotein gegeben, das aus einem Antikörper besteht, der Histon erkennt und an die funktionellen Domänen des IL-12 fusioniert wurde. So bindet dieses Konstrukt über den Antikörper an die nekrotischen Areale des Tumors, wo nukleäre DNA freigesetzt wird.

In NSG Mäuse, die über CD34<sup>+</sup> Stammzellen ein humanes Immunsystem erhalten hatten, wurden ipsilateral und contralateral humane RMS Zellen (A204) appliziert. Nach *in vivo* Behandlung mit lokaler Bestrahlung (unilateral) und/oder systemischer Gabe von tumorgerichtetem IL-12 wurden die Tumore präpariert und das intratumoral induzierte Immunkompartiment molekular untersucht.

Die Analysedaten zeigen zweifelsfrei, dass

1. nur die Kombination aus systemischer NHS-IL12-Gabe und lokaler Radiotherapie eines intratumoralen Immunkompartiments mit massiver  $\alpha\beta$  T-Zellinfiltration und breitem TCR-Repertoire induzieren kann, das systemische Klone aufweist sowie eine starke Infiltration durch NK-Zellen und  $\gamma\delta$  T-Zellen aufzeigt.
2. die kontralateral nichtbestrahlten Tumore, interessanterweise sogar etwas mehr als die bestrahlten Tumore, Infiltration von Immunzellen des T-

Zellkompartiments und NK Zellen zeigten.

3. Tumorkontrolle durch Induktion von terminalem Wachstumsarrest (Seneszenz) und Enddifferenzierung der malignen Rhabdomyozyten in quergestreifte Muskelzellen nur durch die neue immuntherapeutische Kombinationstherapie von NHS-IL12 und lokaler Radiotherapie erzielt wurde, nicht aber durch eine der beiden Therapieverfahren als Monotherapie.
4. Wir konnten schließlich zeigen, dass Tumorregression und ein verbessertes Gesamtüberleben mit vermehrter T-Zell-Infiltration sowie myogener Enddifferenzierung korrelieren.

Damit qualifiziert sich die Kombination aus lokaler Radiotherapie mit systemischer NHS-IL12-Gabe als ein herausragend effizienter Therapieansatz, der über ein TH1 polarisiertes Immunsystem vollständige Tumorkontrolle erzielt.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Qualman SJ, Coffin CM, Newton WA, et al. Intergroup Rhabdomyosarcoma Study: Update for Pathologists. *Pediatr Dev Pathol.* 1998;1(6):550-561. doi:10.1007/s100249900076
2. Sulser H. Das Rhabdomyosarkom. *Virchows Arch A.* 1978;379(1):35-71. doi:10.1007/BF00432781
3. Hiniker SM, Donaldson SS. Recent advances in understanding and managing rhabdomyosarcoma. *F1000Prime Rep.* 2015;7. doi:10.12703/P7-59
4. Donaldson SS, Meza J, Breneman JC, et al. Results from the IRS-IV randomized trial of hyperfractionated radiotherapy in children with rhabdomyosarcoma—a report from the IRSG1 1For a complete list of the members of the Children’s Oncology Group Soft Tissue Sarcoma Committee (formerly Intergroup Rhabdomyosarcoma Group) representing the Children’s Oncology Group and the Quality Assurance Review Center, see the Appendix. *Int J Radiat Oncol.* 2001;51(3):718-728. doi:10.1016/S0360-3016(01)01709-6
5. Stevens MCG, Rey A, Bouvet N, et al. Treatment of Nonmetastatic Rhabdomyosarcoma in Childhood and Adolescence: Third Study of the International Society of Paediatric Oncology—SIOP Malignant Mesenchymal Tumor 89. *J Clin Oncol.* 2005;23(12):2618-2628. doi:10.1200/JCO.2005.08.130
6. Donaldson SS, Anderson JR. Rhabdomyosarcoma: Many Similarities, a Few Philosophical Differences. *J Clin Oncol.* 2005;23(12):2586-2587. doi:10.1200/JCO.2005.11.909
7. Smith LM, Anderson JR, Qualman SJ, et al. Which Patients With Microscopic Disease and Rhabdomyosarcoma Experience Relapse After Therapy? A Report From the Soft Tissue Sarcoma Committee of the Children’s Oncology Group. *J Clin Oncol.* 2001;19(20):4058-4064. doi:10.1200/JCO.2001.19.20.4058
8. Crist W, Gehan EA, Ragab AH, et al. The Third Intergroup Rhabdomyosarcoma Study. *J Clin Oncol.* 1995;13(3):610-630. doi:10.1200/JCO.1995.13.3.610
9. Burke M, Anderson JR, Kao SC, et al. Assessment of Response to Induction Therapy and Its Influence on 5-Year Failure-Free Survival in Group III Rhabdomyosarcoma: The Intergroup Rhabdomyosarcoma Study-IV Experience—A Report From the Soft Tissue Sarcoma Committee of the Children’s Oncology Group. *J Clin Oncol.* 2007;25(31):4909-4913.

doi:10.1200/JCO.2006.10.4257

10. Ferrari A, Miceli R, Meazza C, et al. Comparison of the Prognostic Value of Assessing Tumor Diameter Versus Tumor Volume at Diagnosis or in Response to Initial Chemotherapy in Rhabdomyosarcoma. *J Clin Oncol*. 2010;28(8):1322-1328. doi:10.1200/JCO.2009.25.0803
11. Oberlin O, Rey A, Lyden E, et al. Prognostic Factors in Metastatic Rhabdomyosarcomas: Results of a Pooled Analysis From United States and European Cooperative Groups. *J Clin Oncol*. 2008;26(14):2384-2389. doi:10.1200/JCO.2007.14.7207
12. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, et al. Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *N Engl J Med*. 2010;363(8):711-723. doi:10.1056/NEJMoa1003466
13. Postow MA, Callahan MK, Barker CA, et al. Immunologic Correlates of the Abscopal Effect in a Patient with Melanoma. *N Engl J Med*. 2012;366(10):925-931. doi:10.1056/NEJMoa1112824
14. Vansteenkiste J, Craps J, De Brucker N, Wauters I. Immunotherapy for non-small-cell lung cancer: the past 10 years. *Future Oncol Lond Engl*. Published online May 20, 2015:1-15.
15. Silvestri I, Cattarino S, Aglianò A, Anna Maria, Collalti G, Sciarra A. Beyond the Immune Suppression: The Immunotherapy in Prostate Cancer. *BioMed Research International*. doi:10.1155/2015/794968
16. Preusser M, Lim M, Hafler DA, Reardon DA, Sampson JH. Prospects of immune checkpoint modulators in the treatment of glioblastoma. *Nat Rev Neurol*. 2015;11(9):504-514. doi:10.1038/nrneurol.2015.139
17. De Felice F, Marchetti C, Palaia I, et al. Immunotherapy of Ovarian Cancer: The Role of Checkpoint Inhibitors. *Journal of Immunology Research*. doi:10.1155/2015/191832
18. Roberts SS, Chou AJ, Cheung N-KV. Immunotherapy of Childhood Sarcomas. *Front Oncol*. 2015;5:181. doi:10.3389/fonc.2015.00181
19. Mackall CL, Rhee EH, Read EJ, et al. A Pilot Study of Consolidative Immunotherapy in Patients with High-Risk Pediatric Sarcomas. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2008;14(15):4850-4858. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-4065
20. Eckert F, Jelas I, Oehme M, et al. Tumor-targeted IL-12 combined with local irradiation leads to systemic tumor control via abscopal effects in vivo. *Oncol Immunology*. 2017;0(0):e1323161. doi:10.1080/2162402X.2017.1323161

## Literaturverzeichnis

---

21. Schilbach K, Alkhaled M, Welker C, et al. Cancer-targeted IL-12 controls human rhabdomyosarcoma by senescence induction and myogenic differentiation. *Oncoimmunology*. 2015;4(7). doi:10.1080/2162402X.2015.1014760
22. Kawamoto H. A close developmental relationship between the lymphoid and myeloid lineages. *Trends Immunol*. 2006;27(4):169-175. doi:10.1016/j.it.2006.02.004
23. Kaufmann SHE, Sher A, Ahmed R. Immunology of infectious diseases. *Immunol Infect Dis*. Published online 2002. Accessed July 27, 2017. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20023087710>
24. Fridman WH, Remark R, Goc J, et al. The Immune Microenvironment: A Major Player in Human Cancers. *Int Arch Allergy Immunol*. 2014;164(1):13-26. doi:10.1159/000362332
25. W Haas, P Pereira, Tonegawa and S. Gamma/Delta Cells. *Annu Rev Immunol*. 1993;11(1):637-685. doi:10.1146/annurev.iy.11.040193.003225
26. Rosa SCD, Andrus JP, Perfetto SP, et al. Ontogeny of  $\gamma\delta$  T Cells in Humans. *J Immunol*. 2004;172(3):1637-1645. doi:10.4049/jimmunol.172.3.1637
27. Flament C, Benmerah A, Bonneville M, Triebel F, Mami-Chouaib F. Human TCR-gamma/delta alloreactive response to HLA-DR molecules. Comparison with response of TCR-alpha/beta. *J Immunol*. 1994;153(7):2890-2904. Accessed August 11, 2017. <http://www.jimmunol.org/content/153/7/2890>
28. Litt M, Patel B, Li Y, Qiu Y, Huang S. Molecular Morphogenesis of T-Cell Acute Leukemia. Published online 2013. doi:10.5772/55144
29. Adolfsson J, Månsson R, Buza-Vidas N, et al. Identification of Flt3<sup>+</sup> Lympho-Myeloid Stem Cells Lacking Erythro-Megakaryocytic Potential. *Cell*. 2005;121(2):295-306. doi:10.1016/j.cell.2005.02.013
30. Scimone ML, Aifantis I, Apostolou I, Boehmer H von, Andrian UH von. A multistep adhesion cascade for lymphoid progenitor cell homing to the thymus. *Proc Natl Acad Sci*. 2006;103(18):7006-7011. doi:10.1073/pnas.0602024103
31. Boehm T, Bleul CC. Thymus-homing precursors and the thymic microenvironment. *Trends Immunol*. 2006;27(10):477-484. doi:10.1016/j.it.2006.08.004
32. Gray DH, Ueno T, Chidgey AP, et al. Controlling the thymic microenvironment. *Curr Opin Immunol*. 2005;17(2):137-143. doi:10.1016/j.coi.2005.02.001

33. Raviola E, Karnovsky MJ. EVIDENCE FOR A BLOOD-THYMUS BARRIER USING ELECTRON-OPAQUE TRACERS. *J Exp Med.* 1972;136(3):466-498. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2139259/>
34. Anderson G, Jenkinson EJ. Lymphostromal interactions in thymic development and function. *Nat Rev Immunol.* 2001;1(1):31-40. doi:10.1038/35095500
35. Ef L, Se P, He P, Ht P. Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development., Mapping Precursor Movement through the Postnatal Thymus Reveals Specific Microenvironments Supporting Defined Stages of Early Lymphoid Development. *J Exp Med J Exp Med.* 2001;194, 194(2, 2):127, 127-134. doi:10.1084/jem.194.2.127
36. Boehmer H von, Fehling HJ. Structure and Function of the Pre-T Cell Receptor. *Annu Rev Immunol.* 1997;15(1):433-452. doi:10.1146/annurev.immunol.15.1.433
37. Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA. Positive and Negative Selection of T Cells. *Annu Rev Immunol.* 2003;21(1):139-176. doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141107
38. Murphy K, Travers P. *Janeway-Immunologie.* 7. Auflage.
39. Rothenberg EV, Moore JE, Yui MA. Launching the T-cell-lineage developmental programme. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(1):9-21. doi:10.1038/nri2232
40. Bhandoola A, Sambandam A. From stem cell to T cell: one route or many? *Nat Rev Immunol.* 2006;6(2):117-126. doi:10.1038/nri1778
41. Rodewald HR, Kretzschmar K, Takeda S, Hohl C, Dessing M. Identification of pro-thymocytes in murine fetal blood: T lineage commitment can precede thymus colonization. *EMBO J.* 1994;13(18):4229-4240. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC395350/>
42. Harman BC, Jenkinson WE, Parnell SM, Rossi SW, Jenkinson EJ, Anderson G. T/B lineage choice occurs prior to intrathymic Notch signaling. *Blood.* 2005;106(3):886-892. doi:10.1182/blood-2004-12-4881
43. Boehmer HV. The Developmental Biology of T Lymphocytes. *Annu Rev Immunol.* 1988;6(1):309-326. doi:10.1146/annurev.iy.06.040188.001521
44. Muñoz-Ruiz M, Ribot JC, Grosso AR, et al. TCR signal strength controls thymic differentiation of discrete proinflammatory  $\gamma\delta$  T cell subsets. *Nat Immunol.* 2016;17(6):721-727. doi:10.1038/ni.3424

45. Ciofani M, Zúñiga-Pflücker JC. Determining  $\gamma\delta$  versus  $\alpha\beta$  T cell development. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(9):657-663. doi:10.1038/nri2820
46. Hayes SM, Shores EW, Love PE. An architectural perspective on signaling by the pre-,  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T cell receptors. *Immunol Rev.* 2003;191(1):28-37. doi:10.1034/j.1600-065X.2003.00011.x
47. Fayard E, Moncayo G, Hemmings BA, Holländer GA. Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling in Thymocytes: The Need for Stringent Control. *Sci Signal.* 2010;3(135):re5-re5. doi:10.1126/scisignal.3135re5
48. Hernández-Munain C, Sleckman BP, Krangel MS. A Developmental Switch from TCR $\delta$  Enhancer to TCR $\alpha$  Enhancer Function during Thymocyte Maturation. *Immunity.* 1999;10(6):723-733. doi:10.1016/S1074-7613(00)80071-0
49. Boehmer H von. Positive selection of lymphocytes. *Cell.* 1994;76(2):219-228. doi:10.1016/0092-8674(94)90330-1
50. Germain RN. T-cell development and the CD4–CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(5):309-322. doi:10.1038/nri798
51. Fugmann SD, Lee AI, Shockett PE, Villey IJ, Schatz DG. The RAG Proteins and V(D)J Recombination: Complexes, Ends, and Transposition. *Annu Rev Immunol.* 2000;18(1):495-527. doi:10.1146/annurev.immunol.18.1.495
52. Diagnostic role of tests for T cell receptor (TCR) genes [J]. ResearchGate. doi:http://dx.doi.org/10.1136/jcp.56.1.1
53. Locus maps and genomic repertoire of the human T-cell receptor genes. ResearchGate. Accessed August 14, 2017. [https://www.researchgate.net/publication/290791641\\_Locus\\_maps\\_and\\_genomic\\_repertoire\\_of\\_the\\_human\\_T-cell\\_receptor\\_genes](https://www.researchgate.net/publication/290791641_Locus_maps_and_genomic_repertoire_of_the_human_T-cell_receptor_genes)
54. Charles A Janeway J, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. T-cell receptor gene rearrangement. Published online 2001. Accessed March 16, 2016. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27145/>
55. Ezquerra A, Cron RQ, McConnell TJ, Valas RB, Bluestone JA, Coligan JE. T cell receptor delta-gene expression and diversity in the mouse spleen. *J Immunol.* 1990;145(5):1311-1317. Accessed August 14, 2017. <http://www.jimmunol.org/content/145/5/1311>
56. Jorgensen JL, Esser U, Groth BF de S, Reay PA, Davis MM. Mapping T-cell receptor–peptide

- contacts by variant peptide immunization of single-chain transgenics. *Nature*. 1992;355(6357):224-230. doi:10.1038/355224a0
57. Poster: T cells: the usual subsets. Accessed September 5, 2017. <http://www.nature.com/nri/posters/tcellsubsets/index.html?foxtrotcallback=true>
58. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. Pillars Article: A Novel Transcription Factor, T-bet, Directs Th1 Lineage Commitment. *Cell*. 2000. 100: 655–669. *J Immunol*. 2015;194(7):2961-2975. Accessed September 5, 2017. <http://www.jimmunol.org/content/194/7/2961>
59. Murphy KM, Reiner SL. The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(12):933-944. doi:10.1038/nri954
60. Ho I-C, Glimcher LH. Transcription. *Cell*. 2002;109(2):S109-S120. doi:10.1016/S0092-8674(02)00705-5
61. Gessner A, Röllinghoff M. Biologic Functions and Signaling of the Interleukin-4 Receptor Complexes. *Immunobiology*. 2000;201(3):285-307. doi:10.1016/S0171-2985(00)80084-4
62. Crome SQ, Wang AY, Levings MK. Translational Mini-Review Series on Th17 Cells: Function and regulation of human T helper 17 cells in health and disease. *Clin Exp Immunol*. 2010;159(2):109-119. doi:10.1111/j.1365-2249.2009.04037.x
63. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, et al. The Orphan Nuclear Receptor ROR $\gamma$ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17+ T Helper Cells. *Cell*. 2006;126(6):1121-1133. doi:10.1016/j.cell.2006.07.035
64. Lexberg MH, Taubner A, Albrecht I, et al. IFN- $\gamma$  and IL-12 synergize to convert in vivo generated Th17 into Th1/Th17 cells. *Eur J Immunol*. 2010;40(11):3017-3027. doi:10.1002/eji.201040539
65. Maggi L, Santarlasci V, Capone M, et al. CD161 is a marker of all human IL-17-producing T-cell subsets and is induced by RORC. *Eur J Immunol*. 2010;40(8):2174-2181. doi:10.1002/eji.200940257
66. Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, et al. Foxp3+CD25+CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev*. 2006;212(1):8-27. doi:10.1111/j.0105-2896.2006.00427.x
67. Josefowicz SZ, Lu L-F, Rudensky AY. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:531-564.

- doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141623
68. Bevan MJ. Helping the CD8+ T-cell response. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(8):595-602. doi:10.1038/nri1413
69. Lertmemongkolchai G, Cai G, Hunter CA, Bancroft GJ. Bystander Activation of CD8+ T Cells Contributes to the Rapid Production of IFN- $\gamma$  in Response to Bacterial Pathogens. *J Immunol.* 2001;166(2):1097-1105. doi:10.4049/jimmunol.166.2.1097
70. CD8+ T Cells: Foot Soldiers of the Immune System: Immunity. Accessed September 5, 2017. [http://www.cell.com/immunity/fulltext/S1074-7613\(11\)00303-7](http://www.cell.com/immunity/fulltext/S1074-7613(11)00303-7)
71. Chávez-Galán L, Arenas-Del Angel MC, Zenteno E, Chávez R, Lascurain R. Cell Death Mechanisms Induced by Cytotoxic Lymphocytes. *Cell Mol Immunol.* 2009;6(1):15-25. doi:10.1038/cmi.2009.3
72. Farber DL, Yudanin NA, Restifo NP. Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(1):24-35. doi:10.1038/nri3567
73. Bio-Rad. Macrophage Polarization Mini-review. Bio-Rad. Accessed August 28, 2017. <https://www.bio-rad-antibodies.com/macrophage-polarization-minireview.html>
74. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(12):958-969. doi:10.1038/nri2448
75. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *J Immunol.* 2000;164(12):6166-6173. doi:10.4049/jimmunol.164.12.6166
76. R&#x151; Szer T, s. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators of Inflammation.* doi:10.1155/2015/816460
77. Anthony RM, Urban JF, Alem F, et al. Memory TH2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites. *Nat Med.* 2006;12(8):955-960. doi:10.1038/nm1451
78. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest.* 2012;122(3):787-795. doi:10.1172/JCI59643
79. Davis MJ, Tsang TM, Qiu Y, et al. Macrophage M1/M2 Polarization Dynamically Adapts to Changes in Cytokine Microenvironments in *Cryptococcus neoformans* Infection. *mBio.* 2013;4(3):e00264-13. doi:10.1128/mBio.00264-13

80. Varol C, Mildner A, Jung S. Macrophages: Development and Tissue Specialization. *Annu Rev Immunol.* 2015;33(1):643-675. doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112220
81. Movahedi K, Laoui D, Gysemans C, et al. Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes. *Cancer Res.* 2010;70(14):5728-5739. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4672
82. Allavena P, Sica A, Solinas G, Porta C, Mantovani A. The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2008;66(1):1-9. doi:10.1016/j.critrevonc.2007.07.004
83. Komohara Y, Jinushi M, Takeya M. Clinical significance of macrophage heterogeneity in human malignant tumors. *Cancer Sci.* 2014;105(1):1-8. doi:10.1111/cas.12314
84. Mills CD, Lenz LL, Harris RA. A Breakthrough: Macrophage-Directed Cancer Immunotherapy. *Cancer Res.* 2016;76(3):513-516. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-1737
85. Wu Y-L, Ding Y-P, Tanaka Y, et al.  $\gamma\delta$  T Cells and Their Potential for Immunotherapy. *Int J Biol Sci.* 2014;10(2):119-135. doi:10.7150/ijbs.7823
86. Beetz S, Wesch D, Marischen L, Welte S, Oberg H-H, Kabelitz D. Innate immune functions of human  $\gamma\delta$  T cells. *Immunobiology.* 2008;213(3):173-182. doi:10.1016/j.imbio.2007.10.006
87. Mangan BA, Dunne MR, O'Reilly VP, et al. Cutting Edge: CD1d Restriction and Th1/Th2/Th17 Cytokine Secretion by Human V $\delta$ 3 T Cells. *J Immunol.* 2013;191(1):30-34. doi:10.4049/jimmunol.1300121
88. Pf B, Js A, S L, Pa S, Th R, RI M. Patterns of cytokine production by mycobacterium-reactive human T-cell clones., Patterns of cytokine production by mycobacterium-reactive human T-cell clones. *Infect Immun Infect Immun.* 1993;61, 61(1, 1):197, 197-203. Accessed August 23, 2017. <http://europepmc.org/abstract/MED/8418042>, <http://europepmc.org/articles/PMC302705/?report=abstract>
89. Li H, Luo K, Pauza CD. TNF- $\alpha$  Is a Positive Regulatory Factor for Human V $\gamma$ 2V $\delta$ 2 T Cells. *J Immunol.* 2008;181(10):7131-7137. doi:10.4049/jimmunol.181.10.7131
90. Poccia F, Battistini L, Cipriani B, et al. Phosphoantigen-Reactive V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T Lymphocytes Suppress In Vitro Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication by Cell-Released Antiviral Factors Including CC Chemokines. *J Infect Dis.* 1999;180(3):858-861. doi:10.1086/314925
91. I T, Co D, R P, et al. Human V $\gamma$ 2V $\delta$ 2 T cells contain cytoplasmic RANTES., Human

- V $\gamma$ 2V $\delta$ 2 T cells contain cytoplasmic RANTES. *Int Immunol Int Immunol*. 2006;18, 18(8, 8):1243, 1243-1251. doi:10.1093/intimm/dxl055, 10.1093/intimm/dxl055
92. Spada FM, Grant EP, Peters PJ, et al. Self-Recognition of Cd1 by  $\gamma\delta$  T Cells. *J Exp Med*. 2000;191(6):937-948. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2193122/>
93. Brandes M, Willimann K, Moser B. Professional Antigen-Presentation Function by Human  $\gamma\delta$  T Cells. *Science*. 2005;309(5732):264-268. doi:10.1126/science.1110267
94. H L, Cd P. Rapamycin increases the yield and effector function of human  $\gamma\delta$  T cells stimulated in vitro., Rapamycin increases the yield and effector function of human  $\gamma\delta$  T cells stimulated in vitro. *Cancer Immunol Immunother Cll Cancer Immunol Immunother Cll*. 2011;60, 60(3, 3):361, 361-370. doi:10.1007/s00262-010-0945-7, 10.1007/s00262-010-0945-7
95. Moser B, Eberl M.  $\gamma\delta$  T-APCs: a novel tool for immunotherapy? *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2011;68(14):2443-2452. doi:10.1007/s00018-011-0706-6
96. Sharp LL, Jameson JM, Cauvi G, Havran WL. Dendritic epidermal T cells regulate skin homeostasis through local production of insulin-like growth factor 1. *Nat Immunol*. 2005;6(1):73-79. doi:10.1038/ni1152
97. Kabelitz D, Marischen L, Oberg H-H, Holtmeier W, Wesch D. Epithelial Defence by  $\gamma\delta$  T Cells. *Int Arch Allergy Immunol*. 2005;137(1):73-81. doi:10.1159/000085107
98. V gamma 2V delta 2 T Cell Receptor Recognition of Prenyl Pyrophosphates Is Dependent on All CDRs. Accessed August 22, 2017. [https://www.researchgate.net/publication/44612604\\_V\\_gamma\\_2V\\_delta\\_2\\_T\\_Cell\\_Receptor\\_or\\_Recognition\\_of\\_Prenyl\\_Pyrophosphates\\_Is\\_Dependent\\_on\\_All\\_CDRs](https://www.researchgate.net/publication/44612604_V_gamma_2V_delta_2_T_Cell_Receptor_or_Recognition_of_Prenyl_Pyrophosphates_Is_Dependent_on_All_CDRs)
99. Wk B, M KA, RI O. Diversity of  $\gamma\delta$  T-cell antigens., Diversity of  $\gamma\delta$  T-cell antigens. *Cell Mol Immunol Cell Mol Immunol*. 2013;10, 10(1, 1):13, 13-20. doi:10.1038/cmi.2012.45, 10.1038/cmi.2012.45
100. Agea E, Russano A, Bistoni O, et al. Human CD1-restricted T cell recognition of lipids from pollens. *J Exp Med*. 2005;202(2):295-308. doi:10.1084/jem.20050773
101. Kong Y, Cao W, Xi X, Ma C, Cui L, He W. The NKG2D ligand ULBP4 binds to TCR $\gamma\delta$  and induces cytotoxicity to tumor cells through both TCR $\gamma\delta$  and NKG2D. *Blood*. 2009;114(2):310-317. doi:10.1182/blood-2008-12-196287
102. Ribot JC, debarros A, Silva-Santos B. Searching for "signal 2": costimulation requirements of  $\gamma\delta$  T cells. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2011;68(14):2345-2355.

- doi:10.1007/s00018-011-0698-2
103. Bauer S, Groh V, Wu J, et al. Activation of NK Cells and T Cells by NKG2D, a Receptor for Stress-Inducible MICA. *Science*. 1999;285(5428):727-729. doi:10.1126/science.285.5428.727
104. Todaro M, D'Asaro M, Caccamo N, et al. Efficient Killing of Human Colon Cancer Stem Cells by  $\gamma\delta$  T Lymphocytes. *J Immunol*. 2009;182(11):7287-7296. doi:10.4049/jimmunol.0804288
105. Schilbach KE, Geiselhart A, Wessels JT, Niethammer D, Handgretinger R. Human gammadelta T lymphocytes exert natural and Il-2-induced cytotoxicity to neuroblastoma cells. *J Immunother Hagerstown Md* 1997. 23(5):536-548. Accessed July 18, 2017. <https://insights.ovid.com/pubmed?pmid=11001547>
106. Aq G, Dv C, Ar G, et al. Identification of a panel of ten cell surface protein antigens associated with immunotargeting of leukemias and lymphomas by peripheral blood gammadelta T cells., Identification of a panel of ten cell surface protein antigens associated with immunotargeting of leukemias and lymphomas by peripheral blood  $\gamma\delta$  T cells. *Haematol* 2010;95, 95(8, 8):1397, 1397-1404. doi:10.3324/haematol.2009.020602, 10.3324/haematol.2009.020602
107. Human intestinal Vdelta1+ lymphocytes recognize tumor cells of epithelial origin. *J Exp Med*. 1996;183(4):1681-1696. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2192504/>
108. Kunzmann V, Bauer E, Wilhelm M.  $\gamma\delta$  T-Cell Stimulation by Pamidronate. *N Engl J Med*. 1999;340(9):737-738. doi:10.1056/NEJM199903043400914
109. Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumour–host interface. *Nature*. 2001;411(6835):375-379. doi:10.1038/35077241
110. Natural killer cell deficiency - Europe PMC Article - Europe PMC. Accessed August 28, 2017. <http://europepmc.org/articles/PMC3917661>
111. Min-Oo G, Kamimura Y, Hendricks DW, Nabekura T, Lanier LL. Natural killer cells: walking three paths down memory lane. *Trends Immunol*. 2013;34(6):251-258. doi:10.1016/j.it.2013.02.005
112. Janeway CA. Natural killer cells: a primitive immune system. *Nature*. 1989;341(6238):108. doi:10.1038/341108a0
113. Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood*. 2008;112(3):461-469. doi:10.1182/blood-

2007-09-077438

114. Human natural killer cell deficiencies. - PubMed - NCBI. Accessed August 28, 2017. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17088643>
115. Galy A, Travis M, Cen D, Chen B. Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity*. 1995;3(4):459-473. doi:10.1016/1074-7613(95)90175-2
116. Freud AG, Caligiuri MA. Human natural killer cell development. *Immunol Rev*. 2006;214(1):56-72. doi:10.1111/j.1600-065X.2006.00451.x
117. Chan A, Hong D-L, Atzberger A, et al. CD56bright Human NK Cells Differentiate into CD56dim Cells: Role of Contact with Peripheral Fibroblasts. *J Immunol*. 2007;179(1):89-94. doi:10.4049/jimmunol.179.1.89
118. Fehniger TA, Cooper MA, Nuovo GJ, et al. CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood*. 2003;101(8):3052-3057. doi:10.1182/blood-2002-09-2876
119. Cooper MA, Fehniger TA, Fuchs A, Colonna M, Caligiuri MA. NK cell and DC interactions. *Trends Immunol*. 2004;25(1):47-52. doi:10.1016/j.it.2003.10.012
120. Mocikat R, Braumüller H, Gumy A, et al. Natural Killer Cells Activated by MHC Class II Targets Prime Dendritic Cells to Induce Protective CD8 T Cell Responses. *Immunity*. 2003;19(4):561-569. doi:10.1016/S1074-7613(03)00264-4
121. Bryceson YT, March ME, Ljunggren H-G, Long EO. Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunol Rev*. 2006;214(1):73-91. doi:10.1111/j.1600-065X.2006.00457.x
122. Bottino C, Castriconi R, Pende D, et al. Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as Cell Surface Ligands for the Human DNAM-1 (CD226) Activating Molecule. *J Exp Med*. 2003;198(4):557-567. doi:10.1084/jem.20030788
123. Aldemir H, Prod'homme V, Dumaurier M-J, et al. Cutting Edge: Lectin-Like Transcript 1 Is a Ligand for the CD161 Receptor. *J Immunol*. 2005;175(12):7791-7795. doi:10.4049/jimmunol.175.12.7791
124. Parham P. MHC class I molecules and their role in human history, health and survival. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(3):201-214. doi:10.1038/nri1570

125. Ljunggren H-G, Kärre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today*. 1990;11:237-244. doi:10.1016/0167-5699(90)90097-S
126. Lanier LL. Nk Cell Recognition. *Annu Rev Immunol*. 2005;23(1):225-274. doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115526
127. Fang M, Shamsedeen A, Orr M, Lanier L, Sigal L. The activating receptor CD94-NKG2E is required for protective NK cell responses to a lethal viral infection (39.26). *J Immunol*. 2010;184(1 Supplement):39.26-39.26. Accessed August 31, 2017. [http://www.jimmunol.org/content/184/1\\_Supplement/39.26](http://www.jimmunol.org/content/184/1_Supplement/39.26)
128. Martinet L, Smyth MJ. Balancing natural killer cell activation through paired receptors. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(4):243-254. doi:10.1038/nri3799
129. Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med*. 2000;6(4):443-446. doi:10.1038/74704
130. Arase N, Arase H, Park SY, Ohno H, Ra C, Saito T. Association with FcRγ Is Essential for Activation Signal through NKR-P1 (CD161) in Natural Killer (NK) Cells and NK1.1+ T Cells. *J Exp Med*. 1997;186(12):1957-1963. Accessed January 31, 2019. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2199168/>
131. Cartron G, Dacheux L, Salles G, et al. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood*. 2002;99(3):754-758. doi:10.1182/blood.V99.3.754
132. Mj S, J S, E C, N Z, Wm Y, Y H. NKG2D function protects the host from tumor initiation., NKG2D function protects the host from tumor initiation. *J Exp Med J Exp Med*. 2005;202, 202(5, 5):583, 583-588. doi:10.1084/jem.20050994, 10.1084/jem.20050994
133. Doubrovina ES, Doubrovin MM, Vider E, et al. Evasion from NK Cell Immunity by MHC Class I Chain-Related Molecules Expressing Colon Adenocarcinoma. *J Immunol*. 2003;171(12):6891-6899. doi:10.4049/jimmunol.171.12.6891
134. Castriconi R, Cantoni C, Della Chiesa M, et al. Transforming growth factor β1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: Consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(7):4120-4125. doi:10.1073/pnas.0730640100
135. Fuchs A, Colonna M. The role of NK cell recognition of nectin and nectin-like proteins in tumor immunosurveillance. *Semin Cancer Biol*. 2006;16(5):359-366. doi:10.1016/j.semcancer.2006.07.002

136. Shibuya A, Campbell D, Hannum C, et al. DNAM-1, A Novel Adhesion Molecule Involved in the Cytolytic Function of T Lymphocytes. *Immunity*. 1996;4(6):573-581. doi:10.1016/S1074-7613(00)70060-4
137. Castriconi R, Dondero A, Corrias MV, et al. Natural Killer Cell-Mediated Killing of Freshly Isolated Neuroblastoma Cells: Critical Role of DNAX Accessory Molecule-1–Poliovirus Receptor Interaction. *Cancer Res*. 2004;64(24):9180-9184. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-2682
138. Pende D, Spaggiari GM, Marcenaro S, et al. Analysis of the receptor-ligand interactions in the natural killer–mediated lysis of freshly isolated myeloid or lymphoblastic leukemias: evidence for the involvement of the Poliovirus receptor (CD155) and Nectin-2 (CD112). *Blood*. 2005;105(5):2066-2073. doi:10.1182/blood-2004-09-3548
139. Tahara-Hanaoka S, Shibuya K, Kai H, et al. Tumor rejection by the poliovirus receptor family ligands of the DNAM-1 (CD226) receptor. *Blood*. 2006;107(4):1491-1496. doi:10.1182/blood-2005-04-1684
140. Ruggeri L, Aversa F, Martelli MF, Velardi A. Allogeneic hematopoietic transplantation and natural killer cell recognition of missing self. *Immunol Rev*. 2006;214:202-218. doi:10.1111/j.1600-065X.2006.00455.x
141. Uhrberg M, Valiante NM, Shum BP, et al. Human Diversity in Killer Cell Inhibitory Receptor Genes. *Immunity*. 1997;7(6):753-763. doi:10.1016/S1074-7613(00)80394-5
142. Farag SS, Fehniger TA, Ruggeri L, Velardi A, Caligiuri MA. Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood*. 2002;100(6):1935-1947. doi:10.1182/blood-2002-02-0350
143. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, et al. Effectiveness of Donor Natural Killer Cell Alloreactivity in Mismatched Hematopoietic Transplants. *Science*. 2002;295(5562):2097-2100. doi:10.1126/science.1068440
144. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science*. 2011;331(6024):1565-1570. doi:10.1126/science.1203486
145. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*. 2002;3(11):991-998. doi:10.1038/ni1102-991
146. Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res*. 1970;13:1-

- 27.
147. Smyth MJ, Thia KYT, Street SEA, et al. Differential Tumor Surveillance by Natural Killer (Nk) and Nkt Cells. *J Exp Med.* 2000;191(4):661-668. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2195840/>
148. Smyth MJ, Thia KYT, Street SEA, MacGregor D, Godfrey DI, Trapani JA. Perforin-Mediated Cytotoxicity Is Critical for Surveillance of Spontaneous Lymphoma. *J Exp Med.* 2000;192(5):755-760. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2193269/>
149. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, et al. IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature.* 2001;410(6832):1107-1111. doi:10.1038/35074122
150. Girardi M, Oppenheim DE, Steele CR, et al. Regulation of Cutaneous Malignancy by  $\gamma\delta$  T Cells. *Science.* 2001;294(5542):605-609. doi:10.1126/science.1063916
151. Penn I. Malignant melanoma in organ allograft recipients. *Transplantation.* 1996;61(2):274-278.
152. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature.* 1998;396(6712):643-649. doi:10.1038/25292
153. Becht E, Giraldo NA, Dieu-Nosjean M-C, Sautès-Fridman C, Fridman WH. Cancer immune contexture and immunotherapy. *Curr Opin Immunol.* 2016;39(Supplement C):7-13. doi:10.1016/j.coi.2015.11.009
154. Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(4):298-306. doi:10.1038/nrc3245
155. Palucka AK, Coussens LM. The Basis of Oncoimmunology. *Cell.* 2016;164(6):1233-1247. doi:10.1016/j.cell.2016.01.049
156. Coussens LM, Zitvogel L, Palucka AK. Neutralizing Tumor-Promoting Chronic Inflammation: A Magic Bullet? *Science.* 2013;339(6117):286-291. doi:10.1126/science.1232227
157. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol.* 2010;11(10):889-896. doi:10.1038/ni.1937
158. Appay V, Douek DC, Price DA. CD8+ T cell efficacy in vaccination and disease. *Nat Med.*

- 2008;14(6):623-628. doi:10.1038/nm.f.1774
159. Finn OJ. Cancer Immunology. *N Engl J Med*. 2008;358(25):2704-2715. doi:10.1056/NEJMra072739
160. Müller-Hermelink N, Braumüller H, Pichler B, et al. TNFR1 Signaling and IFN- $\gamma$  Signaling Determine whether T Cells Induce Tumor Dormancy or Promote Multistage Carcinogenesis. *Cancer Cell*. 2008;13(6):507-518. doi:10.1016/j.ccr.2008.04.001
161. Wiegering V, Eyrich M, Rutkowski S, Wöfl M, Schlegel PG, Winkler B. TH1 predominance is associated with improved survival in pediatric medulloblastoma patients. *Cancer Immunol Immunother*. 2011;60(5):693-703. doi:10.1007/s00262-011-0981-y
162. Perez-Diez A, Joncker NT, Choi K, et al. CD4 cells can be more efficient at tumor rejection than CD8 cells. *Blood*. 2007;109(12):5346-5354. doi:10.1182/blood-2006-10-051318
163. Braumüller H, Wieder T, Brenner E, et al. T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature*. 2013;494(7437):361-365. doi:10.1038/nature11824
164. Dieu-Nosjean M-C, Antoine M, Danel C, et al. Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2008;26(27):4410-4417. doi:10.1200/JCO.2007.15.0284
165. Koebel CM, Vermi W, Swann JB, et al. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature*. 2007;450(7171):903-907. doi:10.1038/nature06309
166. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer. *Annu Rev Immunol*. 2011;29(1):235-271. doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101324
167. de Visser KE, Eichten A, Coussens LM. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(1):24-37. doi:10.1038/nrc1782
168. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
169. Dannenberg AJ, Subbaramaiah K. Targeting cyclooxygenase-2 in human neoplasia. *Cancer Cell*. 2003;4(6):431-436. doi:10.1016/S1535-6108(03)00310-6
170. Plaks V, Boldajipour B, Linnemann JR, et al. Adaptive Immune Regulation of Mammary Postnatal Organogenesis. *Dev Cell*. 2015;34(5):493-504. doi:10.1016/j.devcel.2015.07.015
171. Raman D, Baugher PJ, Thu YM, Richmond A. Role of chemokines in tumor growth.

- Cancer Lett.* 2007;256(2):137-165. doi:10.1016/j.canlet.2007.05.013
172. Goel HL, Mercurio AM. VEGF targets the tumour cell. *Nat Rev Cancer.* 2013;13(12):871-882. doi:10.1038/nrc3627
173. Cremer I, Fridman WH, Sautès-Fridman C. Tumor microenvironment in NSCLC suppresses NK cells function. *Oncoimmunology.* 2012;1(2):244. doi:10.4161/onci.1.2.18309
174. Ohm J, Carbone D. *Ohm JE, Carbone DP. VEGF as a Mediator of Tumor-Associated Immunodeficiency. Immunol Res* 23: 263-272. Vol 23.; 2001. doi:10.1385/IR:23:2-3:263
175. Chomarar P, Banchereau J, Davoust J, Karolina Palucka A. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat Immunol.* 2000;1(6):510-514. doi:10.1038/82763
176. Chen DS, Mellman I. Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. *Immunity.* 2013;39(1):1-10. doi:10.1016/j.immuni.2013.07.012
177. Abès R, Gélizé E, Fridman WH, Teillaud J-L. Long-lasting antitumor protection by anti-CD20 antibody through cellular immune response. *Blood.* 2010;116(6):926-934. doi:10.1182/blood-2009-10-248609
178. Galluzzi L, Vacchelli E, Fridman WH, et al. Trial Watch. *Oncoimmunology.* 2012;1(1):28-37. doi:10.4161/onci.1.1.17938
179. Kalos M, Levine BL, Porter DL, et al. T Cells with Chimeric Antigen Receptors Have Potent Antitumor Effects and Can Establish Memory in Patients with Advanced Leukemia. *Sci Transl Med.* 2011;3(95):95ra73-95ra73. doi:10.1126/scitranslmed.3002842
180. Palucka K, Banchereau J. Dendritic-Cell-Based Therapeutic Cancer Vaccines. *Immunity.* 2013;39(1):38-48. doi:10.1016/j.immuni.2013.07.004
181. Wolchok JD, Kluger H, Callahan MK, et al. Nivolumab plus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med.* 2013;369(2):122-133. doi:10.1056/NEJMoa1302369
182. Nastala CL, Edington HD, McKinney TG, et al. Recombinant IL-12 administration induces tumor regression in association with IFN-gamma production. *J Immunol.* 1994;153(4):1697-1706. Accessed September 27, 2017. <http://www.jimmunol.org/content/153/4/1697>
183. Franke V, Berger DMS, Klop WMC, et al. High Response Rates for T-VEC in Early Metastatic Melanoma (Stage IIIB/C-IVM1a). *Int J Cancer.* Published online January 29, 2019. doi:10.1002/ijc.32172

184. Ma Y, Adjemian S, Mattarollo SR, et al. Anticancer Chemotherapy-Induced Intratumoral Recruitment and Differentiation of Antigen-Presenting Cells. *Immunity*. 2013;38(4):729-741. doi:10.1016/j.immuni.2013.03.003
185. Fridman WH, Teillaud JL, Sautès-Fridman C, et al. The ultimate goal of curative anti-cancer therapies: inducing an adaptive anti-tumor immune response., The Ultimate Goal of Curative Anti-Cancer Therapies: Inducing an Adaptive Anti-Tumor Immune Response. *Front Immunol Front Immunol*. 2011;2, 2:66-66. doi:10.3389/fimmu.2011.00066, 10.3389/fimmu.2011.00066
186. Vincent J, Mignot G, Chalmin F, et al. 5-Fluorouracil Selectively Kills Tumor-Associated Myeloid-Derived Suppressor Cells Resulting in Enhanced T Cell-Dependent Antitumor Immunity. *Cancer Res*. 2010;70(8):3052-3061. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3690
187. Zitvogel L, Galluzzi L, Smyth MJ, Kroemer G. Mechanism of Action of Conventional and Targeted Anticancer Therapies: Reinstating Immunosurveillance. *Immunity*. 2013;39(1):74-88. doi:10.1016/j.immuni.2013.06.014
188. Gatenby RA. A change of strategy in the war on cancer. *Nature*. 2009;459(7246):508-509. doi:10.1038/459508a
189. Gatenby RA, Silva AS, Gillies RJ, Frieden BR. Adaptive Therapy. *Cancer Res*. 2009;69(11):4894-4903. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3658
190. Br A, Br on K, Science on K. To Survive Cancer, Live With It. WIRED. Accessed July 24, 2017. <https://www.wired.com/2009/05/cancercompromise/>
191. Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(2):133-146. doi:10.1038/nri1001
192. Trinchieri G. Interleukin-12: A Proinflammatory Cytokine with Immunoregulatory Functions that Bridge Innate Resistance and Antigen-Specific Adaptive Immunity. *Annu Rev Immunol*. 1995;13(1):251-276. doi:10.1146/annurev.iy.13.040195.001343
193. Kerkar SP, Goldszmid RS, Muranski P, et al. IL-12 triggers a programmatic change in dysfunctional myeloid-derived cells within mouse tumors., IL-12 triggers a programmatic change in dysfunctional myeloid-derived cells within mouse tumors. *J Clin Invest J Clin Invest*. 2011;121, 121(12, 12):4746, 4746-4757. doi:10.1172/JCI58814, 10.1172/JCI58814
194. Wigginton JM, Kuhns DB, Back TC, Brunda MJ, Wiltrout RH, Cox GW. Interleukin 12 Primes Macrophages for Nitric Oxide Production in Vivo and Restores Depressed Nitric Oxide Production by Macrophages from Tumor-bearing Mice: Implications for the Antitumor

- Activity of Interleukin 12 and/or Interleukin 2. *Cancer Res.* 1996;56(5):1131-1136. Accessed October 10, 2017. <http://cancerres.aacrjournals.org/content/56/5/1131>
195. Prochazkova J, Pokorna K, Holan V. IL-12 inhibits the TGF- $\beta$ -dependent T cell developmental programs and skews the TGF- $\beta$ -induced differentiation into a Th1-like direction. *Immunobiology.* 2012;217(1):74-82. doi:10.1016/j.imbio.2011.07.032
196. Fallon J, Tighe R, Kradjian G, et al. The immunocytokine NHS-IL12 as a potential cancer therapeutic. *Oncotarget.* 2014;5(7):1869-1884. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4039112/>
197. Sgadari C, Angiolillo AL, Tosato G. Inhibition of angiogenesis by interleukin-12 is mediated by the interferon-inducible protein 10. *Blood.* 1996;87(9):3877-3882. Accessed October 10, 2017. <http://www.bloodjournal.org/content/87/9/3877>
198. Strasly M, Cavallo F, Geuna M, et al. IL-12 Inhibition of Endothelial Cell Functions and Angiogenesis Depends on Lymphocyte-Endothelial Cell Cross-Talk. *J Immunol.* 2001;166(6):3890-3899. doi:10.4049/jimmunol.166.6.3890
199. Leonard JP, Sherman ML, Fisher GL, et al. Effects of Single-Dose Interleukin-12 Exposure on Interleukin-12-Associated Toxicity and Interferon- $\gamma$  Production. *Blood.* 1997;90(7):2541-2548. Accessed October 10, 2017. <http://www.bloodjournal.org/content/90/7/2541>
200. Gollob JA, Mier JW, Veenstra K, et al. Phase I Trial of Twice-Weekly Intravenous Interleukin 12 in Patients with Metastatic Renal Cell Cancer or Malignant Melanoma: Ability to Maintain IFN- $\gamma$  Induction Is Associated with Clinical Response. *Clin Cancer Res.* 2000;6(5):1678-1692. Accessed September 27, 2017. <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/6/5/1678>
201. Lechner MG, Russell SM, Bass RS, Epstein AL. Chemokines, costimulatory molecules and fusion proteins for the immunotherapy of solid tumors., Chemokines, costimulatory molecules and fusion proteins for the immunotherapy of solid tumors. *Immunother Immunother.* 2011;3, 3(11, 11):1317, 1317-1340. doi:10.2217/imt.11.115, 10.2217/imt.11.115
202. Sharifi J, Khawli LA, Hu P, King S, Epstein AL. Characterization of a Phage Display-Derived Human Monoclonal Antibody (NHS76) Counterpart to Chimeric TNT-1 Directed Against Necrotic Regions of Solid Tumors. *Hybrid Hybridomics.* 2001;20(5-6):305-312. doi:10.1089/15368590152740707
203. Eckert F, Schmitt J, Zips D, et al. Enhanced binding of necrosis-targeting immunocytokine NHS-IL12 after local tumour irradiation in murine xenograft models. *Cancer Immunol*

- Immunother Cll.* 2016;65(8):1003-1013. doi:10.1007/s00262-016-1863-0
204. Ascierto ML, Melero I, Ascierto PA. Melanoma: From Incurable Beast to a Curable Bet. The Success of Immunotherapy. *Front Oncol.* 2015;5:152-152. doi:10.3389/fonc.2015.00152
205. Gettinger S, Rizvi NA, Chow LQ, et al. Nivolumab Monotherapy for First-Line Treatment of Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol.* 2016;34(25):2980-2987. doi:10.1200/JCO.2016.66.9929
206. Thomas A, Giaccone G. Why has active immunotherapy not worked in lung cancer? *Ann Oncol.* 2015;26(11):2213-2220. doi:10.1093/annonc/mdv323
207. Müller P, Kreuzaler M, Khan T, et al. Trastuzumab emtansine (T-DM1) renders HER2+ breast cancer highly susceptible to CTLA-4/PD-1 blockade. *Sci Transl Med.* 2015;7(315):315ra188. doi:10.1126/scitranslmed.aac4925
208. Reynders K, Illidge T, Siva S, Chang JY, De Ruyscher D. The abscopal effect of local radiotherapy: using immunotherapy to make a rare event clinically relevant. *Cancer Treat Rev.* 2015;41(6):503-510. doi:10.1016/j.ctrv.2015.03.011
209. Perez CA, Fu A, Onishko H, Hallahan DE, Geng L. Radiation induces an antitumour immune response to mouse melanoma. *Int J Radiat Biol.* 2009;85(12):1126-1136. doi:10.3109/09553000903242099
210. Gameiro SR, Jammed ML, Wattenberg MM, Tsang KY, Ferrone S, Hodge JW. Radiation-induced immunogenic modulation of tumor enhances antigen processing and calreticulin exposure, resulting in enhanced T-cell killing. *Oncotarget.* 2013;5(2):403-416. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3964216/>
211. Krysko DV, Garg AD, Kaczmarek A, Krysko O, Agostinis P, Vandenabeele P. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(12):860-875. doi:10.1038/nrc3380
212. Kroemer G, Galluzzi L, Kepp O, Zitvogel L. Immunogenic Cell Death in Cancer Therapy. *Annu Rev Immunol.* 2013;31(1):51-72. doi:10.1146/annurev-immunol-032712-100008
213. Reits EA, Hodge JW, Herberts CA, et al. Radiation modulates the peptide repertoire, enhances MHC class I expression, and induces successful antitumor immunotherapy. *J Exp Med.* 2006;203(5):1259-1271. doi:10.1084/jem.20052494
214. Sharma A, Bode B, Wenger RH, et al.  $\gamma$ -Radiation Promotes Immunological Recognition of Cancer Cells through Increased Expression of Cancer-Testis Antigens In Vitro and In Vivo.

- PLOS ONE*. 2011;6(11):e28217. doi:10.1371/journal.pone.0028217
215. Chakraborty M, Abrams SI, Camphausen K, et al. Irradiation of Tumor Cells Up-Regulates Fas and Enhances CTL Lytic Activity and CTL Adoptive Immunotherapy. *J Immunol*. 2003;170(12):6338-6347. doi:10.4049/jimmunol.170.12.6338
216. Lim JYH, Gerber SA, Murphy SP, Lord EM. Type I Interferons Induced by Radiation Therapy Mediate Recruitment and Effector Function of CD8+ T Cells. *Cancer Immunol Immunother Cll*. 2014;63(3):259-271. doi:10.1007/s00262-013-1506-7
217. Burnette B, Liang H, Lee Y, et al. The Efficacy of Radiotherapy Relies Upon Induction of Type I Interferon-Dependent Innate and Adaptive Immunity. *Cancer Res*. 2011;71(7):2488-2496. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2820
218. Mole RH. Whole Body Irradiation—Radiobiology or Medicine? *Br J Radiol*. 1953;26(305):234-241. doi:10.1259/0007-1285-26-305-234
219. Hendry J, V. Moore J. The Radiobiology of Human Cancer Radiotherapy. *Br J Cancer*. 1979;40:175-175. doi:10.1038/bjc.1979.161
220. Hutchinson L. Radiotherapy: Abscopal responses: pro-immunogenic effects of radiotherapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015;12(9):504-504. doi:10.1038/nrclinonc.2015.127
221. Park B, Yee C, Lee K-M. The Effect of Radiation on the Immune Response to Cancers. *Int J Mol Sci*. 2014;15(1):927-943. doi:10.3390/ijms15010927
222. Shahabi V, Postow MA, Tuck D, Wolchok JD. Immune-priming of the Tumor Microenvironment by Radiotherapy: Rationale for Combination With Immunotherapy to Improve Anticancer Efficacy. *Am J Clin Oncol*. 2015;38(1):90-97. doi:10.1097/COC.0b013e3182868ec8
223. Shultz LD, Ishikawa F, Greiner DL. Humanized mice in translational biomedical research. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(2):118-130. doi:10.1038/nri2017
224. Cao X, Shores EW, Hu-Li J, et al. Defective lymphoid development in mice lacking expression of the common cytokine receptor gamma chain. *Immunity*. 1995;2(3):223-238.
225. Shultz LD, Lyons BL, Burzenski LM, et al. Human Lymphoid and Myeloid Cell Development in NOD/LtSz-*scid* *IL2R $\gamma$* <sup>null</sup> Mice Engrafted with Mobilized Human Hemopoietic Stem Cells. *J Immunol*. 2005;174(10):6477-6489. doi:10.4049/jimmunol.174.10.6477
226. Shultz LD, Schweitzer PA, Christianson SW, et al. Multiple defects in innate and adaptive

- immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J Immunol.* 1995;154(1):180-191. Accessed July 19, 2017. <http://www.jimmunol.org/content/154/1/180>
227. Takenaka K, Prasolava TK, Wang JCY, et al. Polymorphism in Sirpa modulates engraftment of human hematopoietic stem cells. *Nat Immunol.* 2007;8(12):1313-1323. doi:10.1038/ni1527
228. Greiner DL, Hesselton RA, Shultz LD. SCID mouse models of human stem cell engraftment. *Stem Cells Dayt Ohio.* 1998;16(3):166-177. doi:10.1002/stem.160166
229. Blunt T, Finnie NJ, Taccioli GE, et al. Defective DNA-dependent protein kinase activity is linked to V(D)J recombination and DNA repair defects associated with the murine scid mutation. *Cell.* 1995;80(5):813-823.
230. Hinson ARP, Jones R, Crose LES, Belyea BC, Barr FG, Linardic CM. Human Rhabdomyosarcoma Cell Lines for Rhabdomyosarcoma Research: Utility and Pitfalls. *Front Oncol.* 2013;3. doi:10.3389/fonc.2013.00183
231. Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, et al. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst.* 1973;51(5):1417-1423.
232. Romano P, Manniello A, Aresu O, Armento M, Cesaro M, Parodi B. Cell Line Data Base: structure and recent improvements towards molecular authentication of human cell lines. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(suppl\_1):D925-D932. doi:10.1093/nar/gkn730
233. Han M, Harrison L, Kehn P, Stevenson K, Currier J, Robinson MA. Invariant or Highly Conserved TCR  $\alpha$  Are Expressed on Double-Negative (CD3+CD4-CD8-) and CD8+ T Cells. *J Immunol.* 1999;163(1):301-311. Accessed October 17, 2016. <http://www.jimmunol.org/content/163/1/301>
234. Déchanet J, Merville P, Lim A, et al. Implication of  $\gamma\delta$  T cells in the human immune response to cytomegalovirus. *J Clin Invest.* 1999;103(10):1437-1449. doi:10.1172/JCI5409
235. Labor Dr. Gärtner: Nested PCR. Accessed May 12, 2020. [https://www.labor-gaertner.de/labor/abteilungen/molekularbiologie/informationen-zu-molekularbiologischen-methoden/nested\\_pcr/](https://www.labor-gaertner.de/labor/abteilungen/molekularbiologie/informationen-zu-molekularbiologischen-methoden/nested_pcr/)
236. Kepler TB, He M, Tomfohr JK, Devlin BH, Sarzotti M, Markert ML. Statistical analysis of antigen receptor spectratype data. *Bioinformatics.* 2005;21(16):3394-3400. doi:10.1093/bioinformatics/bti539,

237. Chen X, Knowles J, Barfield R, et al. A novel approach for quantification of KIR expression in healthy donors and pediatric recipients of hematopoietic SCTs. *Bone Marrow Transplant.* 2009;43(7):525-532. doi:10.1038/bmt.2008.352
238. Regression of non-irradiated metastases after extracranial stereotactic radiotherapy in metastatic renal cell carcinoma: *Acta Oncologica*: Vol 45, No 4. Accessed February 21, 2019. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/02841860600604611>
239. Shen MJ, Xu LJ, Yang L, et al. Radiation alters PD-L1/NKG2D ligand levels in lung cancer cells and leads to immune escape from NK cell cytotoxicity via IL-6-MEK/Erk signaling pathway. *Oncotarget.* 2017;8(46):80506-80520. doi:10.18632/oncotarget.19193
240. Mortara L, Frangione V, Castellani P, Barbaro ADL, Accolla RS. Irradiated CIITA-positive mammary adenocarcinoma cells act as a potent anti-tumor-preventive vaccine by inducing tumor-specific CD4+ T cell priming and CD8+ T cell effector functions. *Int Immunol.* 2009;21(6):655-665. doi:10.1093/intimm/dxp034
241. Wang S-J, Haffty B. Radiotherapy as a New Player in Immuno-Oncology. *Cancers.* 2018;10:515. doi:10.3390/cancers10120515
242. Chiang C-S, Fu SY, Wang S-C, et al. Irradiation Promotes an M2 Macrophage Phenotype in Tumor Hypoxia. *Front Oncol.* 2012;2. doi:10.3389/fonc.2012.00089
243. Venkatesulu BP, Mallick S, Lin SH, Krishnan S. A systematic review of the influence of radiation-induced lymphopenia on survival outcomes in solid tumors. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2018;123:42-51. doi:10.1016/j.critrevonc.2018.01.003
244. Wang S-J, Haffty B. Radiotherapy as a New Player in Immuno-Oncology. *Cancers.* 2018;10(12):515. doi:10.3390/cancers10120515
245. Takahashi A, Ohtani N, Yamakoshi K, et al. Mitogenic signalling and the p16INK4a-Rb pathway cooperate to enforce irreversible cellular senescence. *Nat Cell Biol.* 2006;8(11):1291-1297. doi:10.1038/ncb1491
246. Lee SK, Kim JY, Jang BW, et al. Foxp3<sup>high</sup> and Foxp3<sup>low</sup> Treg cells differentially correlate with T helper 1 and natural killer cells in peripheral blood. *Hum Immunol.* 2011;72(8):621-626. doi:10.1016/j.humimm.2011.03.013
247. Roy S, Barnes PF, Garg A, Wu S, Cosman D, Vankayalapati R. NK Cells Lyse T Regulatory Cells That Expand in Response to an Intracellular Pathogen. *J Immunol.* 2008;180(3):1729-1736. doi:10.4049/jimmunol.180.3.1729

248. Walzer T, Dalod M, Robbins SH, Zitvogel L, Vivier E. Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force." *Blood*. 2005;106(7):2252-2258. doi:10.1182/blood-2005-03-1154
249. Vitale M, Chiesa MD, Carlomagno S, et al. NK-dependent DC maturation is mediated by TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$  released upon engagement of the NKp30 triggering receptor. *Blood*. 2005;106(2):566-571. doi:10.1182/blood-2004-10-4035
250. Human Dendritic Cells Activate Resting Natural Killer (NK) Cells and Are Recognized via the NKp30 Receptor by Activated NK Cells. Accessed February 24, 2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2193591/>
251. Takahashi T, Dejbakhsh-Jones S, Strober S. Expression of CD161 (NKR-P1A) Defines Subsets of Human CD4 and CD8 T Cells with Different Functional Activities. *J Immunol*. 2006;176(1):211-216. doi:10.4049/jimmunol.176.1.211
252. Fergusson JR, Fleming VM, Klenerman P. CD161-Expressing Human T Cells. *Front Immunol*. 2011;2. doi:10.3389/fimmu.2011.00036
253. Vitale M, Bottino C, Sivori S, et al. NKp44, a Novel Triggering Surface Molecule Specifically Expressed by Activated Natural Killer Cells, Is Involved in Non-Major Histocompatibility Complex-restricted Tumor Cell Lysis. *J Exp Med*. 1998;187(12):2065-2072. Accessed January 9, 2019. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2212362/>
254. Cantoni C, Bottino C, Vitale M, et al. NKp44, A Triggering Receptor Involved in Tumor Cell Lysis by Activated Human Natural Killer Cells, Is a Novel Member of the Immunoglobulin Superfamily. *J Exp Med*. 1999;189(5):787-796. Accessed January 9, 2019. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2192947/>
255. Bottino C, Moretta L, Moretta A. NK cell activating receptors and tumor recognition in humans. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2006;298:175-182.
256. Kitayama S, Zhang R, Liu T-Y, et al. Cellular Adjuvant Properties, Direct Cytotoxicity of Re-differentiated V $\alpha$ 24 Invariant NKT-like Cells from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Rep*. 2016;6(2):213-227. doi:10.1016/j.stemcr.2016.01.005
257. Ngwa W, Irabor OC, Schoenfeld JD, Hesser J, Demaria S, Formenti SC. Using immunotherapy to boost the abscopal effect. *Nat Rev Cancer*. 2018;18(5):313-322. doi:10.1038/nrc.2018.6
258. Lee Y, Auh SL, Wang Y, et al. Therapeutic effects of ablative radiation on local tumor require CD8+ T cells: changing strategies for cancer treatment. *Blood*. 2009;114(3):589-595. doi:10.1182/blood-2009-02-206870

259. Kaminski JM, Shinohara E, Summers JB, Niermann KJ, Morimoto A, Brousal J. The controversial abscopal effect. *Cancer Treat Rev.* 2005;31(3):159-172. doi:10.1016/j.ctrv.2005.03.004
260. Twyman-Saint Victor C, Rech AJ, Maity A, et al. Radiation and dual checkpoint blockade activate non-redundant immune mechanisms in cancer. *Nature.* 2015;520(7547):373-377. doi:10.1038/nature14292
261. Slone HB, Peters LJ, Milas L. Effect of Host Immune Capability on Radiocurability and Subsequent Transplantability of a Murine Fibrosarcoma. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 1979;63(5):1229-1235. doi:10.1093/jnci/63.5.1229
262. Becht E, Giraldo NA, Germain C, et al. Immune Contexture, Immunoscore, and Malignant Cell Molecular Subgroups for Prognostic and Theranostic Classifications of Cancers. *Adv Immunol.* 2016;130:95-190. doi:10.1016/bs.ai.2015.12.002
263. Scheper W, Kelderman S, Fanchi LF, et al. Low and variable tumor reactivity of the intratumoral TCR repertoire in human cancers. *Nat Med.* 2019;25(1):89. doi:10.1038/s41591-018-0266-5
264. Galluzzi L, Buqué A, Kepp O, Zitvogel L, Kroemer G. Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(2):97-111. doi:10.1038/nri.2016.107
265. Galluzzi L, Buqué A, Kepp O, Zitvogel L, Kroemer G. Reply: Immunosuppressive cell death in cancer. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(6):402. doi:10.1038/nri.2017.48
266. Vatner RE, Cooper BT, Vanpouille-Box C, Demaria S, Formenti SC. Combinations of Immunotherapy and Radiation in Cancer Therapy. *Front Oncol.* 2014;4. doi:10.3389/fonc.2014.00325
267. Barker HE, Paget JTE, Khan AA, Harrington KJ. The Tumour Microenvironment after Radiotherapy: Mechanisms of Resistance and Recurrence. *Nat Rev Cancer.* 2015;15(7):409-425. doi:10.1038/nrc3958
268. Perussia B, Chan SH, D'Andrea A, et al. Natural killer (NK) cell stimulatory factor or IL-12 has differential effects on the proliferation of TCR-alpha beta+, TCR-gamma delta+ T lymphocytes, and NK cells. *J Immunol.* 1992;149(11):3495-3502. Accessed April 5, 2019. <http://www.jimmunol.org/content/149/11/3495>

## 6.1 Nutzungslizenzen für verwendete Abbildungen

Abb. 1.1.: Reprinted from *Kawamoto H. A close developmental relationship between the lymphoid and myeloid lineages. Trends Immunol. 2006;27(4):169-175. doi:10.1016/j.it.2006.02.004* with permission from Elsevier.

Abb. 1.2.A: Reprinted from *Litt M, Patel B, Li Y, Qiu Y, Huang S. Molecular Morphogenesis of T-Cell Acute Leukemia. Published online 2013. doi:10.5772/55144* with permission though open access.

Abb. 1.2.B: Reprinted from *Fayard E, Moncayo G, Hemmings BA, Holländer GA. Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling in Thymocytes: The Need for Stringent Control. Sci Signal. 2010;3(135):re5-re5. doi:10.1126/scisignal.3135re5* with permission from AAAS.

Abb. 1.3: Reprinted from *Charles A Janeway J, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. T-cell receptor gene rearrangement. Published online 2001. Accessed March 16, 2016. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27145/>* with permission from Springer Nature.

Abb. 1.4: Reprinted from *Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer Immunoeediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. Science. 2011;331(6024):1565-1570. doi:10.1126/science.1203486* with permission from AAAS.

Abb. 1.5: Reprinted from *Chen DS, Mellman I. Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. Immunity. 2013;39(1):110. doi:10.1016/j.immuni.2013.07.012* with permission from Elsevier.

Abb. 1.6: Reprinted from *Palucka AK, Coussens LM. The Basis of Oncoimmunology. Cell. 2016;164(6):1233-1247. doi:10.1016/j.cell.2016.01.049* with permission from Elsevier.

Abb. 2.5: Reprinted from *Labor Dr. Gärtner: Nested PCR*. Accessed May 12, 2020. [https://www.laborgaertner.de/labor/abteilungen/molekularbiologie/informationen-zu-molekularbiologischen-methoden/nested\\_pcr/](https://www.laborgaertner.de/labor/abteilungen/molekularbiologie/informationen-zu-molekularbiologischen-methoden/nested_pcr/) with permission from Labor Gärtner Ravensburg.

Abb. 2.6: Reprinted from *Kepler TB, He M, Tomfohr JK, Devlin BH, Sarzotti M, Markert ML. Statistical analysis of antigen receptor spectratype data. Bioinformatics. 2005;21(16):3394-3400. doi:10.1093/bioinformatics/bti539* with permission from Oxford University Press.

Abb.3.1 bis Abb. 3.6: Adopted and reprinted from *Eckert F, Jelas I, Oehme M, et al. Tumor-targeted IL-12 combined with local irradiation leads to systemic tumor control via abscopal effects in vivo. OncoImmunology. 2017;0(0):e1323161. doi:10.1080/2162402X.2017.1323161* with permission from Co-author PD Dr. F. Eckert and publisher Francis & Taylor.

## 7 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde in der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen unter Betreuung von Frau Prof. Dr. rer. nat. Karin Schilbach durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Frau Prof. Dr. rer. nat. Karin Schilbach in Zusammenarbeit mit Frau PD Dr. med. Franziska Eckert.

Sämtliche Versuche zur molekularbiologischen Untersuchung des Tumormaterials (PCR-Untersuchungen und Spectratyping) wurden nach Einarbeitung durch die Labormitglieder Frau Prof. Dr. rer. nat. Karin Schilbach, Friederike Müller, Katja Sonntag und Christian Welker von mir eigenständig mit Unterstützung durch die genannten Labormitglieder durchgeführt. Sämtliche Ergebnisse und Darstellung zu molekularbiologischen Untersuchung des Tumormaterials (PCRs und Spectratyping) wurden durch mich angefertigt und teilweise in u.g. Veröffentlichung übernommen. Die Methoden zur Immunhistochemie und Histologie (Immunhistochemische Färbungen, Mikroskopieren), sowie die Untersuchungen zum Tumorwachstum und Überleben der Versuchstiere wurden durch Frau PD Dr. med. Franziska Eckert und durch mich mit Unterstützung der genannten Labormitglieder durchgeführt. Die aus diesen Methoden entstandenen Ergebnisse und Darstellungen wurden durch Frau PD Dr. med. Franziska Eckert produziert und teilweise nach Modifikation durch mich aus der u.g. Veröffentlichung in diese Arbeit übernommen (Abbildungen 3.1 bis 3.6). Die Vorbereitung (Bestrahlung, Transplantation und Tumoringokulation) und Therapie an den Versuchstieren (Bestrahlung und Injektion der Immuntherapie) wurden allein durch Frau PD Dr. med. Franziska Eckert unter Anleitung durch Frau Prof. Dr. rer. nat. Karin Schilbach und mit Unterstützung der Versuchstiereinrichtung der Kinder- und Jugendmedizin

## Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

---

Tübingen durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Beratung durch das Institut für Biometrie Tübingen durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig nach Anleitung durch Frau Prof. Dr. rer. nat. Karin Schilbach verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

Moritz Oehme

## 8 Veröffentlichung

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

Eckert F., Jelas I, Oehme M. et al. *Tumor-targeted IL-12 combined with local irradiation leads to systemic tumor control via abscopal effects in vivo* Oncolmmunology, April 2017, doi:10.1080/2162402X.2017.1323

## Danksagung

Mein Dank gilt allen voran Frau Professor Dr. Karin Schilbach dafür, dass sie sich bereit erklärt hat, meine Dissertation zu betreuen und mich trotz des langen Weges und der zuletzt großen Distanz stets mit großem Enthusiasmus und hilfreicher Kritik unterstützt hat.

Ich danke Frau PD Franziska Eckert für die Einführung in die Arbeit mit Versuchstieren und die Zusammenarbeit und den Austausch, an deren Ende ich Teil an o.g. Publikation haben konnte.

Frau Friederike Müller danke ich für die Einarbeitung und Betreuung im Labor.

Ich möchte Frau Katja Sonntag für die Einarbeitung und stetige Unterstützung in allen technischen Fragen danken. Weiterhin danke ich Harun Cin und Christian Welker für die Unterstützung sowie dem Chimärismuslabor des Universitätsklinikums Tübingen für Kinder und Jugendmedizin für die Bereitstellung und Unterstützung bei einigen Experimenten. Dem gesamten Team der Arbeitsgruppe Schilbach danke ich für die freundliche Aufnahme und das stets offene Ohr für jedwede Frage.

Mein Dank gilt Professor Dr. M. Eichner des Instituts für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie Tübingen für die statistische Beratung.

Ich möchte zuletzt meiner Familie und meinen Freunden, insbesondere Nils und Nadine und Tim danken, für Rat, Tat und Tipps.