

# **Die Prostaglandin E2 vermittelte Dysfunktion intratumoraler cDC1 - Ein neuer Mechanismus der Immunevasion von Tumoren**

Felix Archibald Bayerl

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Medicine and Health der Technischen Universität München zur Erlangung eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Marc Schmidt-Supprian

Prüfende der Dissertation:

1. TUM Junior Fellow Dr. Jan P. Böttcher
2. Prof. Dr. Martin Klingenspor
3. Prof. Dr. Jörg Renkawitz

Die Dissertation wurde am 02.10.2023 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die TUM School of Medicine and Health am 08.05.2024 angenommen.



## Publikationen

Die in dieser Arbeit gezeigten Daten wurden in Bayerl, F., Meiser, P., Donakonda, S., Hirschberger, A., Lacher, S.B., Pedde, A.M., Hermann, C.D., Elewaut, A., Knolle, M., Ramsauer, L., Rudolph, T.J., Grassmann, S. Öllinger, R., Kirchhammer, N., Trefny, M., Anton, M., Wohlleber, D., Höchst, B., Zaremba, A., Krüger, A., Rad, R., Obenauf A.C., Schadendorf, D., Zippelius, A., Buchholz, V.R., Schraml, B.U. und Böttcher, J.P. Tumor-derived prostaglandin E2 programs cDC1 dysfunction to impair intratumoral orchestration of anti-cancer T cell responses. *Immunity* (2023) 56, 1341-1358.e1311. 10.1016/j.immuni.2023.05.011. veröffentlicht.



# Inhaltsverzeichnis

Publikationen.....	3
Inhaltsverzeichnis.....	5
Zusammenfassung.....	9
Abstract.....	11
1 Einleitung.....	13
1.1 Dendritische Zellen: Die Verbindung zwischen angeborener und erworbener Immunität .....	13
1.1.1 Die Entwicklung dendritischer Zellen aus hämatopoetischen Stammzellen ..	14
1.1.2 DC-Arbeitsteilung bei der Steuerung von T Zell Antworten .....	15
1.2 Die cDC1-vermittelte anti-tumorale Immunantwort .....	17
1.2.1 cDC1 steuern CD8 <sup>+</sup> und CD4 <sup>+</sup> T Zell Antworten .....	17
1.2.2 Die Initiierung adaptiver T Zell Antworten durch cDC1 .....	18
1.2.3 Die Steuerung intratumoraler CD8 <sup>+</sup> T Zell Antworten durch cDC1.....	19
1.2.4 Transkriptionelle Regulierung der Funktionalität intratumoraler cDC1.....	20
1.3 Die Tumor-Mikroumgebung unterdrückt anti-tumorale Immunantworten .....	22
1.3.1 Die Regulation intratumoraler cDC1 in der TMU .....	22
1.3.2 Prostaglandin E2 (PGE <sub>2</sub> ) Produktion in Tumoren .....	23
1.3.3 Der PGE <sub>2</sub> Signalweg .....	24
1.3.4 Der Einfluss von PGE <sub>2</sub> auf intratumorale Immunzellen .....	25
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit .....	27
2 Ergebnisse.....	29
2.1 Die Förderung der intratumoralen cDC1-Akkumulation führt nicht zu einer gesteigerten anti-tumoralen Immunantwort.....	29
2.2 cDC1 zeigen keine Einschränkung der Antigenaufnahme, Aktivierung oder Kreuzpräsentation in PGE <sub>2</sub> -produzierenden Tumoren .....	32
2.3 PGE <sub>2</sub> blockiert die Chemokin- und Zytokin-Produktion intratumoraler cDC1 .....	35
2.4 Dysfunktionale cDC1 können in PGE <sub>2</sub> -produzierenden Tumoren nicht mit CD8 <sup>+</sup> T Zellen interagieren .....	37
2.5 PGE <sub>2</sub> programmiert einen dysfunktionalen Zustand in aktivierten cDC1 .....	39
2.6 PGE <sub>2</sub> reguliert die cDC1-Dysfunktion auf transkriptioneller Ebene.....	41

2.7	PGE <sub>2</sub> -abhängiger Verlust von IRF8 fördert cDC1-Dysfunktion .....	44
2.8	Tumoren kontrollieren die cDC1-Dysfunktion durch PGE <sub>2</sub> -vermittelte IRF8 Regulation .....	46
2.9	PGE <sub>2</sub> aktiviert den cAMP Signalweg in cDC1 .....	49
2.10	PGE <sub>2</sub> wirkt auf cDC1 über die Rezeptoren EP2 und EP4.....	51
2.11	Gleichzeitige Ablation von Ptger2 und Ptger4 in cDC1 verhindert die cDC1- Dysfunktion .....	53
2.12	EP2/EP4-Defizienz verhindert die Dysfunktion intratumoraler cDC1 .....	54
2.13	EP2/EP4-defiziente cDC1 sind in der Lage CD8 <sup>+</sup> T Zell Antworten in der TMU effektiv zu steuern .....	56
2.14	PGE <sub>2</sub> insensitive NK Zellen können eine cDC1-Dysfunktion nur teilweise kompensieren.....	60
2.15	PGE <sub>2</sub> induziert eine Dysfunktion in humanen cDC1 über EP2 und EP4.....	61
2.16	Gensignaturen funktionaler cDC1 in humanen Tumoren korrelieren mit dem Überleben von Patienten und dem Ansprechen auf Anti-PD-1-Immuntherapien.....	64
3	Diskussion .....	67
3.1	Die Regulierung des Transkriptionsfaktors IRF8 programmiert die lokale cDC1- Dysfunktion .....	68
3.2	PGE <sub>2</sub> inhibiert das Potential zur Clusterbildung intratumoraler Immunzellen .....	69
3.3	Die Funktionalität intratumoraler cDC1 bestimmt den Ausgang der Krebserkrankung .....	70
3.4	Das Verständnis der cDC1-Dysfunktion ermöglicht neue Therapiansätze .....	71
3.5	Der Effekt von PGE <sub>2</sub> auf andere Immunzellen in der TMU .....	73
3.6	PGE <sub>2</sub> als regulatorisches Signalwegsmolekül in der Gewebehomöostase.....	74
4	Material und Methoden .....	75
4.1	Material.....	75
4.1.1	Laborgeräte .....	75
4.1.2	Allgemeine Lösungen .....	75
4.1.3	Antikörper .....	76
4.1.4	Chemikalien und Reagenzien .....	78
4.1.5	Kit Systeme .....	79

---

4.1.6	Bioinformatische Datensets.....	79
4.1.7	Software .....	80
4.1.8	Biologische Systeme .....	80
4.1.9	Oligonukleotide.....	82
4.1.10	Plasmide und rekombinante DNA .....	83
4.2	Methoden .....	83
4.2.1	Humanes Probenmaterial .....	83
4.2.2	Mauskrebs-Zelllinien und primäre Zellkultur .....	84
4.2.3	Injektion von Tumorzellen.....	85
4.2.4	In-vivo Behandlung mit FLT3-L .....	85
4.2.5	In-vivo-Depletion von CD8+ T Zellen .....	85
4.2.6	Adaptiver OT-I T Zell-Transfer .....	85
4.2.7	CXCR3-Blockade in vivo .....	85
4.2.8	IL-12-Blockade in vivo.....	85
4.2.9	FTY720-Behandlung in vivo .....	86
4.2.10	Aufbereitung von Mausgeweben.....	86
4.2.11	Ex-vivo-Analyse der cDC1-Funktionen .....	86
4.2.12	<i>In vitro</i> cDC1-Experimente .....	87
4.2.13	Retrovirale Transduktion von cDC1.....	88
4.2.14	In-vitro Analyse der CD8+ T Zell Interaktion.....	88
4.2.15	Durchflusszytometrie und fluoreszenzaktivierte Zellsortierung .....	89
4.2.16	Antikörper für Durchflusszytometrie und Zellsortierung .....	89
4.2.17	Volumetrische Immunfluoreszenzmikroskopie und Bildanalyse .....	90
4.2.18	Antikörper für die Immunfluoreszenzmikroskopie .....	91
4.2.19	RNA-Isolierung und quantitative RT-PCR .....	91
4.2.20	RNA-seq Analysen von murinen cDC1 aus <i>in vitro</i> DC-Kulturen .....	91
4.2.21	RNA-seq-Analyse von murinen Tumor cDC1 .....	92
4.2.22	RNA-seq-Analyse von humanen cDC1 .....	92
4.2.23	Bioinformatische Analysen der RNA-seq-Daten .....	93
4.2.24	Analyse des Transkriptionsfaktor-Netzwerks .....	93
4.2.25	Analyse der Anreicherung von Gensätzen.....	94
4.2.26	Bioinformatische Analysen der Daten von Krebspatienten .....	94
4.2.27	Quantifizierung und statistische Analyse.....	95
5	Quellenangaben .....	96
6	Anhang .....	114

6.1	Glossar .....	114
6.2	Tabellen .....	117
6.3	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....	118
6.3.1	Abbildungsverzeichnis.....	118
6.3.2	Tabellenverzeichnis .....	119
7	Erklärung zu Beiträgen anderer Wissenschaftler .....	120
8	Danksagung .....	121
9	Eidesstattliche Erklärung.....	122

## Zusammenfassung

Konventionelle dendritische Zellen Typ 1 (cDC1) sind ein zentraler Bestandteil einer wirksamen anti-tumoralen Immunantwort. Sie sind in der Lage, tumorantigen-spezifische CD8<sup>+</sup> T Zell Antworten zu initiieren und innerhalb der Tumormikroumgebung (TMU) zu steuern. Die Regulierung dieser Funktion und ihre potenzielle Unterwanderung durch Tumoren zur Umgehung des Immunsystems sind bisher jedoch nicht ausreichend erforscht.

In dieser Arbeit wurde die Rolle von cDC1 in der anti-tumoralen Immunantwort und die Beeinflussung ihrer Funktion durch von Tumoren produziertes Prostaglandin E2 (PGE<sub>2</sub>) untersucht. Hierbei zeigte sich, dass intratumorale cDC1 durch PGE<sub>2</sub> in ihrer Funktion, CD8<sup>+</sup> T Zell Antworten innerhalb der TMU zu steuern, gestört wurden. Dies war allerdings nicht auf eine generelle Blockade ihrer Aktivierung zurückzuführen. Vielmehr waren cDC1 in ihrer Fähigkeit lokal eingeschränkt, Chemokine und Zytokine zu produzieren, die essentiell für die Unterstützung intratumoraler CD8<sup>+</sup> T Zellen sind. Diese spezifische Funktionsstörung konnte auf die Aktivierung des cAMP-Signalwegs über die PGE<sub>2</sub> Rezeptoren EP2 und EP4 zurückgeführt werden, was letztendlich zum Verlust des Transkriptionsfaktors IRF8 führte. Die Blockade der PGE<sub>2</sub>-EP2/EP4-IRF8-Achse in cDC1 verhinderte diese Funktionsstörung, wodurch eine effiziente Orchestrierung der anti-tumoralen CD8<sup>+</sup> T-Zell Antwort ermöglicht und eine vollständige Immunkontrolle des Tumors erreicht wurde. Versuche mit humanem Probenmaterial zeigten, dass der PGE<sub>2</sub>-Signalweg in humanen cDC1 eine sehr ähnliche Dysfunktion induzierte und mit einer fehlenden Immunkontrolle humaner Tumoren sowie einer schlechten Überlebensprognose von Krebspatienten assoziiert ist.

Insgesamt decken die hier präsentierten Ergebnisse einen bisher unbekanntem Mechanismus der Immunevasion von Tumoren auf, bei dem PGE<sub>2</sub> intratumorale cDC1 gezielt dabei hemmt, die Migration und Expansion von CD8<sup>+</sup> T Zellen in der TMU zu steuern. Die Analysen humaner Tumorproben legen nahe, dass dysfunktionale cDC1 in Patienten lokal zu einer unzureichenden T Zell Antwort gegen Krebs beitragen. Die Ergebnisse unterstreichen, dass die Steuerung intratumoraler CD8<sup>+</sup> T Zellen durch cDC1 für eine effektive Immunantwort von zentraler Bedeutung ist. Strategien zur Verhinderung der cDC1-Dysfunktion könnten die Effektivität anti-tumoraler Immunreaktionen verstärken und die Wirksamkeit cDC1 basierender Immuntherapien verbessern. Durch die Identifizierung der beteiligten Mechanismen eröffnet die Studie neue Wege zur Verstärkung der Immunantwort gegen Krebs und Verbesserung potenzieller therapeutischer Strategien.



## Abstract

Conventional type 1 dendritic cells (cDC1) are critical for effective anti-tumor immune responses. They are able to initiate antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cell responses and orchestrate them within the tumor microenvironment. However, the regulation of this function and its potential subversion by tumors to evade the immune system have not been well understood.

In this work, the role of intratumoral cDC1 for anti-cancer immunity and the interference of their function by tumor-derived prostaglandin E2 (PGE<sub>2</sub>) were investigated. Here, intratumoral cDC1 were found to be disrupted by PGE<sub>2</sub> in their function to orchestrate CD8<sup>+</sup> T cell responses within the tumor microenvironment. However, this was not due to a general blockade of their activation but rather a local impairment of their ability to produce chemokines and cytokines essential for supporting intratumoral CD8<sup>+</sup> T cells. This specific dysfunction of cDC1 could be attributed to an activation of the cAMP signaling pathway via the PGE<sub>2</sub> receptors EP2 and EP4, which ultimately led to loss of the transcription factor IRF8. Blockade of the PGE<sub>2</sub>-EP2/EP4-IRF8 axis in cDC1 prevented this dysfunction, allowing them to efficiently orchestrate the anti-tumor CD8<sup>+</sup> T cell response, thereby achieving complete immune control of the tumor. Experiments using human samples showed that the PGE<sub>2</sub> pathway induced a very similar dysfunctionality in human cDC1 and was associated with a lack of immune control of human tumors and poor survival prognosis of cancer patients.

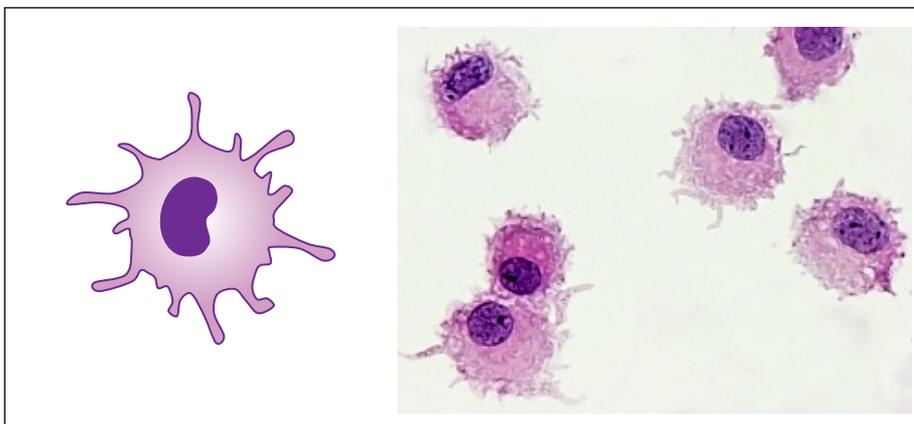
Overall, the results presented here reveal a previously unknown mechanism of tumor immune evasion in which PGE<sub>2</sub> specifically inhibits intratumoral cDC1 from directing the migration and expansion of CD8<sup>+</sup> T cells in the tumor microenvironment. Analyses of human tumor samples suggest that dysfunctional cDC1 in patients contribute locally to an inadequate T cell response against cancer. The results highlight the central role of intratumoral cDC1 for anti-tumor immunity. Strategies to prevent cDC1 dysfunction could enhance the effectiveness of anti-tumor immune responses and improve the efficacy of cDC1-based immunotherapies. By identifying the mechanisms involved, this study opens new avenues for enhancing anti-cancer immune responses and improving potential therapeutic strategies.



# 1 Einleitung

## 1.1 Dendritische Zellen: Die Verbindung zwischen angeborener und erworbener Immunität

Dendritische Zellen (DC; Engl.: *Dendritic cell*) sind in der Lage, Krankheitserreger und maligne transformierte Zellen zu erkennen und adaptive Immunantworten einzuleiten, und spielen eine zentrale Rolle bei der Steuerung von Effektor T Zellen<sup>1</sup>. Als Wächter Zellen sind sie im ganzen Körper zu finden, insbesondere in lymphatischen Organen und an Grenzflächen zur Umwelt wie dem Darm und der Haut. Sie untersuchen kontinuierlich ihre Umgebung und sind an der Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase beteiligt, indem sie in Abwesenheit inflammatorischer Signale die periphere T Zell-Toleranz verstärken<sup>2,3</sup>. Sobald jedoch inflammatorische Signale, wie Pathogene oder transformierte Zellen, erkannt werden, erfolgt die Aktivierung der DC. Dabei phagozytieren DC die als fremd erkannten Antigene, zerlegen diese in Peptidketten und präsentieren sie auf ihrer Oberfläche gegenüber Effektor T Zellen, die dadurch selber aktiviert werden und die infizierten oder transformierten Zellen eliminieren. Zudem sezernieren aktivierte DC auch Zytokine und Wachstumsfaktoren, die Immunreaktionen verstärken und modulieren. Morphologisch unterscheiden sich DC von anderen mononukleären Phagozyten durch ihre verzweigte "dendritische" Morphologie.

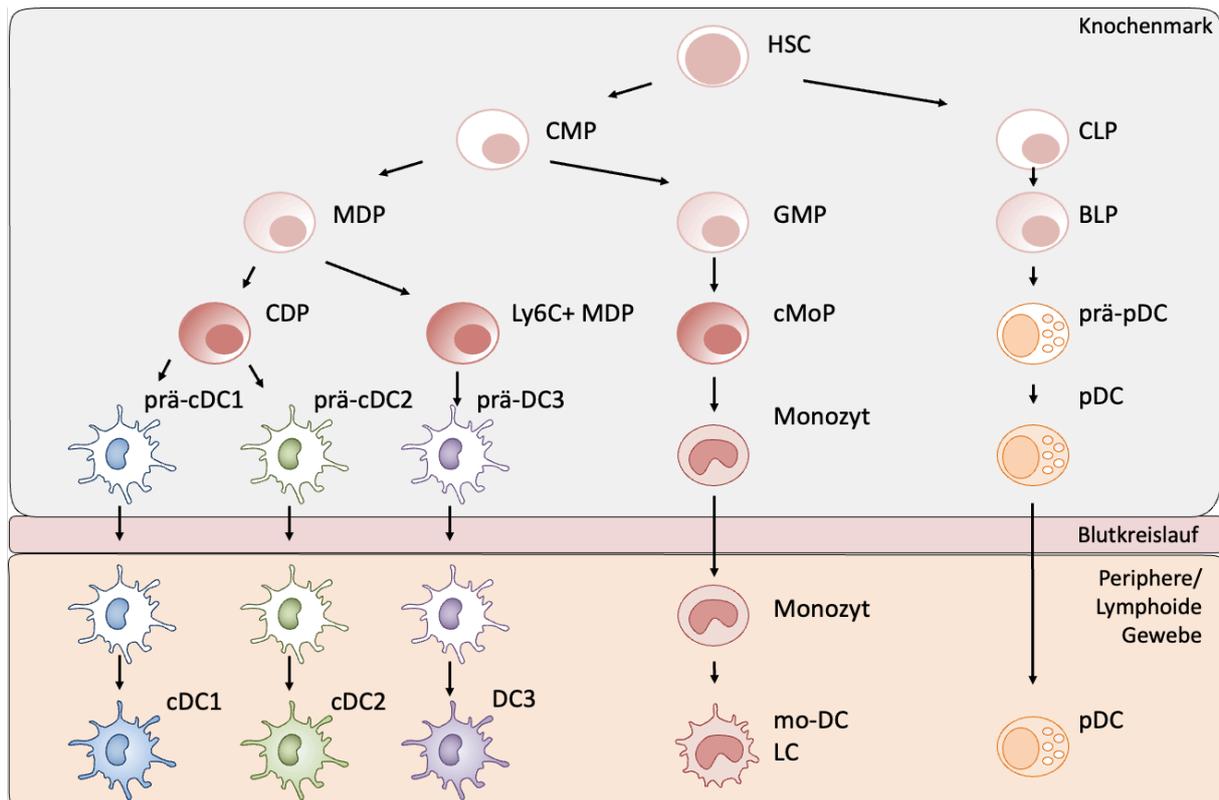


**Abbildung 1: Dendritische Zellen (DC).**

Namensgebend sind ihre zahlreichen „dendritischen“ Membranfortsätze, mit denen sie konstant ihre Umgebung abtasten. Links: Schema, das in dieser Arbeit zur Repräsentation von DC verwendet wird. Rechts: Humane DC unter dem Mikroskop, gefärbt mit Hämatoxylin und Eosin<sup>4</sup>.

### 1.1.1 Die Entwicklung dendritischer Zellen aus hämatopoetischen Stammzellen

Der Begriff DC beschreibt eine komplexe Familie an Zellen des angeborenen Immunsystems, die sich bereits während ihrer Ontogenese in verschiedene Untergruppen differenzieren<sup>5</sup>. Ihre Entwicklung besteht aus einer mehrstufigen Differenzierungskaskade<sup>6</sup>, beginnend im Knochenmark. Hier entwickeln sich aus hämatopoetischen Stammzellen (HSC; Engl.: *Hematopoietic stem cells*) multipotente Progenitorzellen, die sich in myeloide (CMP; Engl.: *Common myeloid progenitor*) sowie lymphoide (CLP; Engl.: *Common lymphoid progenitor*) Vorläuferzellen differenzieren. CMP differenzieren zu Granulozyten-Makrophagen-Vorläufern (GMP; Engl.: *Granulocyte-Macrophage progenitor*) sowie Monozyten-DC-Vorläufern (MDP; Engl.: *Monocyte-DC progenitor*). GMP entwickeln sich noch im Knochenmark über Monozyten-Vorläuferzellen (cMoP; Engl.: *Common monocyte progenitor*) zu Monozyten<sup>5</sup>, die aus dem Knochenmark über den Blutkreislauf in periphere Gewebe wandern und sich dort in Monozyten-DC (mo-DC; Engl.: *Monocyte-derived dendritic cell*), in der Epidermis Langerhans Zellen (LC; Engl.: *Langerhans cell*) genannt<sup>7,8</sup>, entwickeln. MDP entwickeln sich in DC-Vorläuferzellen (CDP; Engl.: *common DC progenitor*)<sup>9,10</sup>, welche im Knochenmark bereits ihre Differenzierung in prä-cDC1 sowie prä-cDC2 erhalten<sup>11</sup>. Über den Blutkreislauf erreichen diese Zellen sowohl periphere als auch lymphoide Gewebe, wo sie ihre finale Differenzierung zu cDC1 und cDC2 (Konventionelle DC; von engl.: *conventional*) erhalten<sup>11</sup>. Eine aktuelle Studie konnte zudem zeigen, dass DC3, anders als cDC1 und cDC2, von einem Ly6C<sup>+</sup> Monozyten-DC-Vorläufer (Ly6C<sup>+</sup>MDP) abstammen, welcher als prä-DC3 das Knochenmark verlässt um in peripheren Geweben in DC3 zu differenzieren<sup>12</sup>. Anders als es der Name vermuten lässt, entstammen plasmazytoide DC (pDC) den lymphoiden Vorläuferzellen (CLP) und differenzieren bereits im Knochenmark vollständig. Sie durchlaufen dabei das Stadium der B-Zell-lymphoiden Vorläuferzellen (BLP; Engl.: *B-cell-biased lymphoid progenitor*), und der prä-pDC<sup>13</sup>, bevor sie als pDC über den Blutkreislauf in das Gewebe einwandern.



**Abbildung 2: Hierarchisches Modell der Hämatopoese dendritischer Zellen.**

Die Abbildung zeigt die Entwicklung der dendritischen Zellen cDC1, cDC2, DC3, mo-DC und pDC aus gemeinsamen Vorläuferzellen. HSC, Hämatopoetische Stammzelle; CMP, Myeloide Vorläuferzelle; CLP, Lymphoide Vorläuferzelle; MDP, Monozyten-DC-Vorläuferzelle; GMP, Granulozyten-Makrophagen-Vorläuferzelle; BLP, B-Zell-lymphoide Vorläuferzelle; CDP, DC-Vorläuferzelle; cMoP, Monozyten-Vorläuferzelle; pDC, Plasmazytoide DC; cDC, Konventionelle DC; mo-DC, Monozyten-DC; LC, Langerhans-Zelle

2014 führte man für cDC1 und cDC2 den Oberbegriff „konventionelle“ dendritische Zellen ein um die wachsende Fülle an Gewebe-, Art- und Krankheitsspezifischen Untergruppenbezeichnungen einzugrenzen und zu vereinheitlichen<sup>5</sup>. Je nachdem, ob prä-cDC1 aus dem Blutkreislauf direkt in lymphatische oder periphere Gewebe wandern, bezeichnet man die Zellen als residente oder nicht-residente cDC1<sup>14</sup>.

### 1.1.2 DC-Arbeitsteilung bei der Steuerung von T Zell Antworten

DC sind aufgrund ihrer besonderen Fähigkeit zur Antigenpräsentation und Initiierung von T Zell Antworten von großer Bedeutung für die medizinische Forschung. Dabei ist jede DC-Untergruppe jedoch auf eine andere Art der T Zell Interaktion spezialisiert. Ein genaues Verständnis der Entwicklung, Funktion und Regulation der verschiedenen Untergruppen von DC ist, aufgrund ihrer prominenten Rolle bei der Steuerung verschiedener physiologischer und pathologischer Prozesse, essentiell für die damit einhergehenden möglichen Therapieansätze<sup>1</sup> und Bestandteil aktueller Forschung. Generell gibt es sehr große Gemeinsamkeiten zwischen humanen und murinen DC und ihren Untergruppen<sup>15,16</sup>. Die vorliegende Arbeit behandelt die bekannten murinen Untergruppen und ihre beschriebenen

Pendants im humanen Körper. In Tabelle 1 sind die verschiedenen Untergruppen inklusive ihrer Funktionen, der für ihre Identifikation hilfreichen einzigartigen Oberflächenmarker, sowie ihrer für ihre Entwicklung essentiellen Transkriptionsfaktoren zusammengefasst.

**Tabelle 1: Wichtige Transkriptionsfaktoren, Oberflächenmarker und Funktionen der Untergruppen dendritischer Zellen.**

Akürzungen: (L), exprimiert in lymphatischem Gewebe; (P), exprimiert in nicht-lymphoidem Gewebe

DC-Untergruppe	Essentielle TF	Oberflächenmarker	Funktion
<b>cDC1</b> 	BATF3 <sup>17</sup> IRF8 <sup>18</sup> ZNF366 <sup>19</sup>	Maus: CD11c, MHC-II, CLEC9A, CD8a (L), CD103 (P) <sup>20</sup> Human: CD11c, HLA-DR, CD141, CLEC9A <sup>21</sup>	Priming und Kreuzpräsentation zu CD8 <sup>+</sup> und CD4 <sup>+</sup> T Zellen Produktion von T Zell stimulierenden Zytokinen <sup>20</sup>
<b>cDC2</b> 	IRF4 <sup>22</sup> ZEB2 <sup>23</sup>	Maus: CD11c, MHC-II, CD11b, CD172a Human: CD11c, HLA-DR, CD1c, CD1b	Priming und Antigenpräsentation zu CD4 <sup>+</sup> T Zellen <sup>5,22</sup>
<b>DC3</b> 	KLF4 IRF8 <sup>12</sup>	Maus: CD16, CD32, CD172a <sup>12</sup> Human: CD163, Clec12a, CD209a <sup>24,25</sup>	Induktion von Th17 T Zell Antworten <sup>12</sup>
<b>pDC</b> 	E2-2 <sup>26</sup>	Maus: CD11c, Bst2, B220, MHC-II <sup>niedrig</sup> Human: HLA-DR, CD303, CD123	Typ I und III IFN Sekretion <sup>26</sup>
<b>mo-DC</b> 	KLF4 MAFB <sup>27</sup>	Maus: CD11c, CD11b, CD64, MerTK, CD88 Human: CD11c, CD11b, CD1a, CD1b, CD206, CD209, CD172A	Gewebshomöostase <sup>27</sup> Werden bei Inflammation rekrutiert um T Zell Antworten zu unterstützen <sup>28</sup> Induktion von Th17 T Zell Antworten <sup>28</sup>

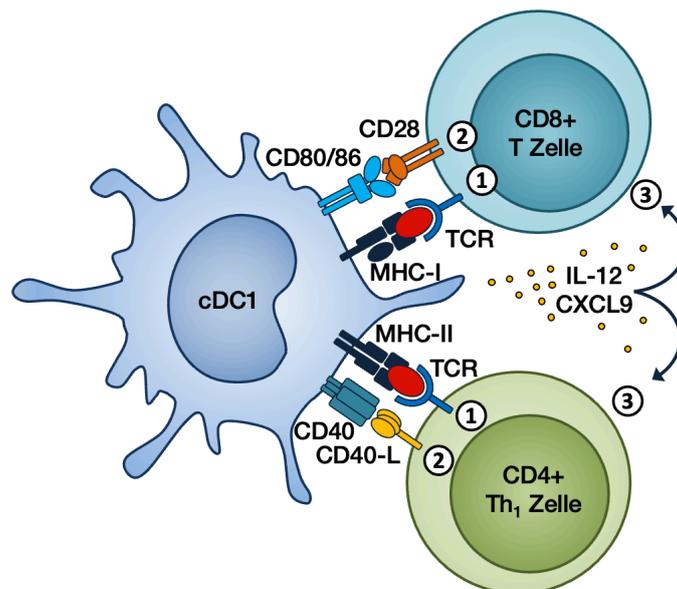
Aktuelle Forschung hat mit Hilfe von Einzelzellanalysen eine erhebliche Heterogenität innerhalb der klassisch definierten DC-Untergruppen aufgezeigt<sup>29</sup>. So wurden beispielsweise neben den in Tabelle 1 aufgelisteten Untergruppen in humanen als auch murinen Geweben AXL<sup>+</sup> DC identifiziert, die sowohl Eigenschaften von cDC als auch pDC aufweisen. Diese DC präsentieren Antigene, produzieren aber kein Typ-I-IFN, und man geht davon aus, dass sie eine transitorische DC-Untergruppe (tDC) darstellen<sup>30</sup>.

## 1.2 Die cDC1-vermittelte anti-tumorale Immunantwort

cDC1 sind ein integraler Teil der adaptiven Immunantwort gegen Krebs, da sie in der Lage sind transformierte Zellen zu identifizieren, lösliche Faktoren zu sezernieren, welche die Mikroumgebung des Tumors konditionieren, und tumorassoziierte Antigene zu präsentieren, um T Zell Antworten auszulösen<sup>31</sup>. Verschiedene präklinische Modelle haben gezeigt, dass das Vorhandensein von cDC1 unabdingbar für die CD8<sup>+</sup> T Zell-vermittelte Bekämpfung von Infektionen oder die Regression immunogener Tumoren<sup>17,32-34</sup>, sowie den Erfolg T Zell basierter Immuntherapien ist<sup>35,36</sup>.

### 1.2.1 cDC1 steuern CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T Zell Antworten

Im Zusammenhang mit CD8<sup>+</sup> T Zell vermittelten Immunantworten spielen cDC1 eine wichtige Rolle aufgrund ihrer Spezialisierung zur Kreuzpräsentation exogener Antigene<sup>37</sup>. Sie lassen sich durch eine hohe Oberflächenexpression von CD11c und MHC-II (bei Menschen HLA-DR), sowie CD8 $\alpha$  (residente cDC1) oder CD103 (nicht-residente cDC1; bzw. CD141 im humanen Körper)<sup>38</sup> identifizieren. Ihre Entwicklung ist zudem von der Aktivität der Transkriptionsfaktoren BATF3 sowie IRF8 abhängig<sup>17,18,39</sup>. Nach der Aufnahme fremdartiger Antigene migrieren cDC1 in den nächstgelegenen Lymphknoten, wo sie naive T Zellen durch den ersten Kontakt mit Antigen aktivieren und expandieren („Priming“). Dort können sie CD8<sup>+</sup> T Zellen durch Kreuzpräsentation von Fremdantigenen auf Molekülen der Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC-I; Engl.: *Major histocompatibility complex*), bzw. CD4<sup>+</sup> T Zellen durch Antigenpräsentation auf MHC-II, stimulieren.



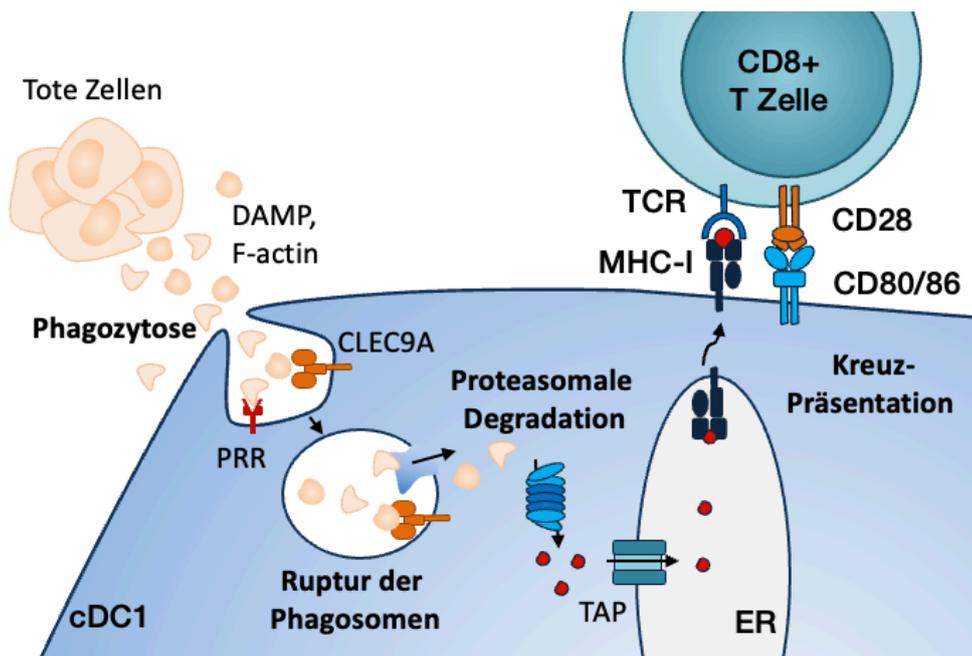
**Abbildung 3: Stimulation von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T Zellen durch cDC1.**

Aktivierte cDC1 können CD4<sup>+</sup> T Zellen durch Antigenpräsentation auf MHC-II und CD8<sup>+</sup> T Zellen durch Kreuzpräsentation auf MHC-I stimulieren. Für eine potente T Zell Antwort müssen dabei der T Zell Rezeptor mit MHC-gebundenem Antigen (Signal 1), ko-stimulatorische Rezeptoren mit CD80/86 oder CD40 (Signal 2) und pro-inflammatorische Zytokinrezeptoren mit löslichen Signalmediatoren (Signal 3) stimuliert werden<sup>40,41</sup>.

Darüber hinaus spielen cDC1 auch direkt am Ort der Inflammation eine Schlüsselrolle bei der Unterstützung der T Zell Antwort <sup>36</sup>. Durch die lokale Antigenpräsentation <sup>37</sup> und Sekretion von Chemokinen und Zytokinen <sup>42,43</sup> innerhalb des entzündeten Gewebes regulieren sie die lokale Effektorfunktion sowie das Überleben der Effektor T Zellen <sup>44</sup>.

### 1.2.2 Die Initiierung adaptiver T Zell Antworten durch cDC1

cDC1 übernehmen eine zentrale Rolle bei der Initiierung anti-tumoraler Immunantworten. Sie sind in der Lage, Fremd-Antigene von infizierten oder transformierten Zellen aufzunehmen und zu Lymphknoten zu transportieren <sup>45</sup>, um dort antigenspezifische CD8<sup>+</sup> T Zellen zu aktivieren. Diese besondere Spezialisierung erhalten sie unter anderem durch die Expression des Rezeptors CLEC9A, durch den cDC1 Zelltrümmer aufnehmen und kreuzpräsentieren können. Dabei vermittelt CLEC9A nicht nur die Aufnahme der Zelltrümmer, sondern auch die Ruptur der Phagosomen und damit das kontrollierte Entweichen von Fremdantigenen in das Zytosol, was für eine Beladung der MHC-I Moleküle zur Kreuzpräsentation notwendig ist <sup>46</sup>.



**Abbildung 4: Kreuzpräsentation transformierter Tumorantigene durch cDC1.**

Binden DAMP an Mustererkennungsrezeptoren auf cDC1, so kommt es zur Phagozytose der damit verbundenen Zelltrümmer toter Zellen. Das beim Zelltod freiwerdende F-Aktin bindet an den Rezeptor CLEC9A, der dadurch aktiv die kontrollierte Ruptur der Phagosomen einleitet, wodurch intakte Fremdantigene in das Zytosol gelangen. Dort werden diese durch das Proteasom in Peptidketten zerlegt, welche über TAP (Engl.: *Transporter associated with antigen processing*) in das ER gelangen, wo schließlich die Beladung der MHC-I Komplexe stattfindet <sup>47</sup>.

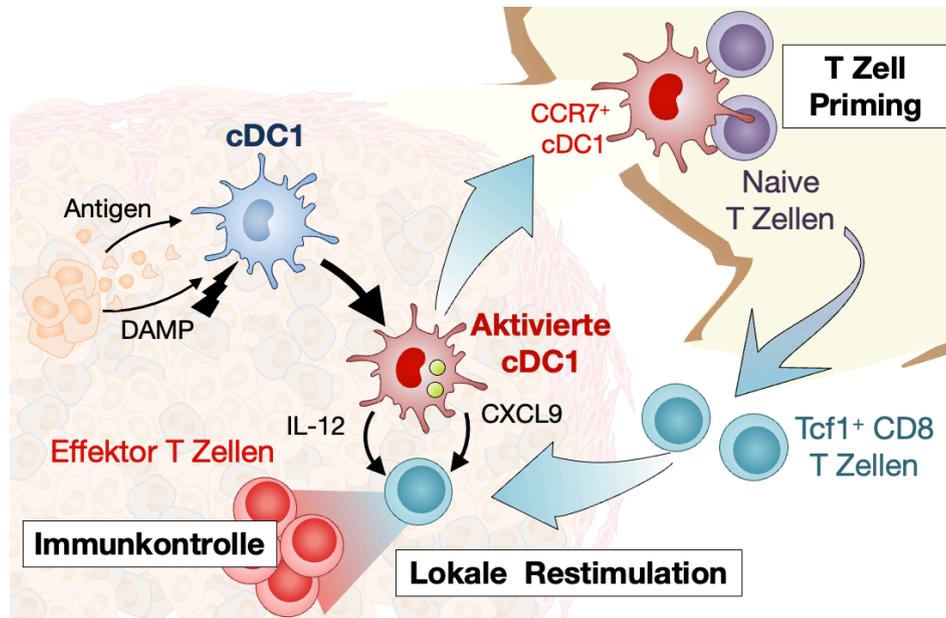
Die Bindung von pathogen-assoziierten molekularen Mustern (PAMP; Engl.: *Pathogen-associated molecular pattern*) oder Zellschadens-assoziierten molekularen Mustern (DAMP; Engl.: *Damage-associated molecular pattern*) an Mustererkennungsrezeptoren (PRR; Engl.: *Pattern recognition receptors*) auf cDC1 initiiert die Phagozytose der erkannten Zelltrümmer

und die cDC1 wird aktiviert. cDC1 exprimieren eine breite Palette von PRR, darunter oberflächliche und endosomale Toll-like-Rezeptoren (TLR), wie TLR3 oder TLR9, C-Typ-Lektine, beispielsweise CLEC12A, und zytosolische Sensoren wie beispielsweise STING<sup>31,48</sup>. Durch die Stimulation dieser PRR durchlaufen cDC1 massive metabolische, zelluläre und transkriptionelle Veränderungen, die sie zu effizienten Aktivatoren von T Zellen transformieren. Sie regulieren die Antigenpräsentationsmaschinerie hoch, einschließlich MHC-II, ko-stimulatorischer Moleküle wie CD80, CD86 oder CD40 und schütten pro-inflammatorische Zytokine aus. Durch die Hochregulation des Chemokinrezeptors CCR7 bewegen sich aktivierte cDC1 auf einen Lymphgewebe-spezifischen Chemokingradienten aus CCL19 und CCL21 zu, entlang von afferenten Lymphgefäßen in die nächstgelegenen Lymphknoten<sup>49</sup>. Dort angekommen migrieren sie in die T Zell-Bereiche, wo sie naive antigenspezifische TCF1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen aktivieren, die daraufhin in den Tumor einwandern. Aktivierte Tumorantigen-spezifische TIM3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen sind in der Lage bei Erkennung der Antigene auf Tumorzellen diese spezifisch zu eliminieren, indem sie unter anderem Granzyme über Perforine in die Zielzelle einschleusen, welche in der Tumorzelle über Aktivierung der Caspase 3 die Apoptose einleiten<sup>50</sup>.

### 1.2.3 Die Steuerung intratumoraler CD8<sup>+</sup> T Zell Antworten durch cDC1

Neben ihrer Rolle als Initiatoren adaptiver T Zell Antworten für die Bekämpfung immunogener Tumoren haben aktuelle Studien aber auch die wichtige Funktion von cDC1 innerhalb der Tumormikroumgebung (TMU) untersucht<sup>51</sup>. Es wurde gezeigt, dass cDC1 in der TMU einer der Hauptproduzenten des T Zell-rekrutierenden Chemokins CXCL9 sind, einem Liganden des Rezeptors CXCR3 auf T Zellen<sup>52</sup>. CXCL9 spielt insbesondere für die Orientierung der CXCR3<sup>+</sup> T Zellen innerhalb der TMU eine wichtige Rolle<sup>36,52-54</sup>. Ein Unterbinden der CXCL9-CXCR3 Signalisierung führt dazu, dass sich cDC1 und T Zellen in der TMU nicht finden können, was die Entstehung von cDC1-CD8<sup>+</sup> T Zell-Clustern verhindert<sup>53</sup>. Ohne diesen erneuten Kontakt mit cDC1 in der TMU sind CD8<sup>+</sup> T Zellen nicht in der Lage Tumoren effektiv zu kontrollieren<sup>53,55</sup>. Man hat herausgefunden, dass es innerhalb dieser Cluster zu einer Restimulation der T Zellen kommt<sup>53</sup>, bestehend aus erneuter Antigenpräsentation, Costimulation<sup>37</sup>, sowie der Exposition hoher Konzentrationen an Zytokinen wie beispielsweise Interleukin (IL)-12<sup>42,44</sup>. Interessanterweise ist auch die Chemokin- und Zytokin-Produktion der cDC1 durch Interferone Typ I und III reguliert, welche von aktivierten T Zellen produziert werden<sup>42</sup>. Dies deutet auf einen positiven Feedbackmechanismus innerhalb der cDC1-CD8<sup>+</sup> T Zell-Cluster hin, in denen sich die stimulierenden Signale potenzieren, was die Relevanz dieses erneuten cDC1-CD8<sup>+</sup> T Zell-Kontakts innerhalb der TMU zeigt. Außerdem spielen cDC1 eine wichtige Rolle bei der Lizenzierung von CD4<sup>+</sup> -Zellen für die Aktivierung

von CD8<sup>+</sup> T Zellen<sup>56,57</sup>. Die Interaktion zwischen cDC1 und CD4<sup>+</sup> T Zellen über die CD40/CD40L-Signalübertragung fördert das Überleben der cDC1 sowie die Differenzierung und Expansion der tumorspezifischen CD8<sup>+</sup> T Zellen<sup>56,58,59</sup>. Dies alles sind Gründe, warum die Anwesenheit von cDC1 unabdingbar für das Ansprechen von T Zell basierten Immunzelltherapien sind<sup>37</sup>.



**Abbildung 5: Die lokale Rolle von cDC1 in der TMU.**

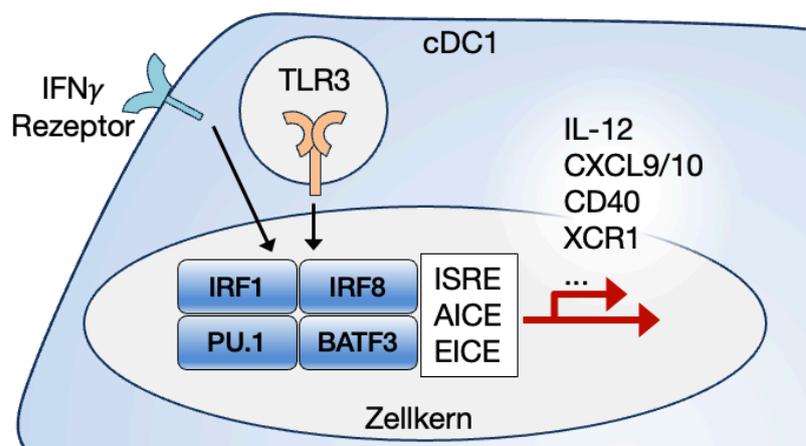
Bei Aktivierung durch beispielsweise DAMP, sind cDC1 in der Lage Antigene von absterbenden Krebszellen aufzunehmen und diese in lymphatische Gewebe zu transportieren, um tumorspezifische T Zellen zu aktivieren. Außerdem sind cDC1 für eine effektive anti-tumorale Immunantwort erforderlich, da sie T Zell-Reaktionen innerhalb der Tumoren aufrechterhalten, indem sie tumorspezifische T Zellen durch Chemokingradienten steuern (CXCL9) und diese restimulieren (IL-12) und expandieren. Abbildung adaptiert von<sup>33</sup>.

Bestrebungen, dendritische Zellen therapeutisch zu nutzen, gewinnen aufgrund ihrer prominenten Rolle in der anti-tumoralen Immunantwort zunehmend an Interesse<sup>60</sup>. Da cDC1 im Blut von Tumorpatienten sehr rar sind und der damit einhergehenden Schwierigkeit, sie zu isolieren, werden vornehmlich cDC2 oder mo-DC für DC-Vakzinierungsversuche verwendet, mit bisher mäßigem Erfolg<sup>34,45,61</sup>. Auch Versuche, die Akkumulation von cDC1 in der TMU zu fördern durch die Steigerung der XCL1 Konzentration, einem cDC1-rekrutierendem Chemokin<sup>62,63</sup>, oder die Applikation des cDC1 Wachstumsfaktors FLT3L<sup>35,64,65</sup>, konnten bisher nicht erfolgreich in der Klinik angewandt werden. Erfolgreiche Ansätze, die es ermöglichen, cDC1 in der TMU effektiv zu unterstützen gibt es aufgrund des fehlenden Verständnisses der molekularen Vorgänge, intrazellulären Mechanismen und notwendigen Zell-Zell Interaktionen bisher leider nicht.

#### 1.2.4 Transkriptionelle Regulierung der Funktionalität intratumoraler cDC1

Um nachzuvollziehen, wie genau die Funktionalität von cDC1 in Tumoren reguliert wird, ist es wichtig, ihre transkriptionelle Steuerung zu verstehen, die diese Funktionalität programmiert.

cDC1 spezifische Transkriptionsfaktoren (LDTF; Engl.: *Lineage-defining transcription factor*) wie IRF8, IRF1, PU.1, BATF3 und auch ID2 sind für die Entwicklung und Differenzierung von cDC1 unabdingbar <sup>66-68</sup>. Demnach ist zwar viel über ihre Rolle für die Entstehung von cDC1 bekannt, dafür erschwert ihre Unverzichtbarkeit aber auch die Erforschung ihrer Rolle in vollends differenzierten cDC1, obwohl sie gerade bei der Funktionalität nach Aktivierung dieser Zellen eine von großer Bedeutung sind <sup>68</sup>. In der TMU beeinflussen verschiedene Faktoren die Aktivierung von cDC1. Die Bindung von PAMP an Mustererkennungsrezeptoren, wie beispielsweise TLR3, der doppelsträngige RNA erkennt wie sie z.B. bei dem Tod transformierter Zellen frei wird <sup>69</sup>, bei gleichzeitiger Kostimulation durch Zytokine wie Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), aktiviert eine intrazelluläre Signalwegskaskade. An deren Ende stehen Transkriptionsfaktoren (SITF; Engl.: *Stimulation induced transcription factor*), die unter anderem die Aktivität sogenannter Interferon-regulierter Promotoren (ISRE; Engl.: *Interferon-stimulated response element*) <sup>70</sup>, AP1-IRF-bindender Elemente (AICE; Engl.: *AP1-IRF composite element*) und Ets-IRF-bindender Elemente (EICE; Engl.: *Ets-IRF composite element*) <sup>71</sup>. Wichtige Transkriptionsfaktoren sind hierbei STATs, NF $\kappa$ B, aber auch cDC1 spezifische TF wie IRF8, PU.1, BATF3 und auch IRF1 <sup>68</sup>, die als Homo- oder Heterodimere wirken können <sup>72,73</sup>. In Makrophagen wurde gezeigt, dass die Regulation dieses Transkriptionsfaktor-Netzwerks eine wichtige Rolle bei der Responsivität der Zellen gegenüber aktivierenden Stimulantien spielt <sup>73,74</sup>. Insbesondere IRF8 schien in diesen Studien eine wichtige Rolle bei der Regulation der Chemokin- und Zytokin-Produktion zu spielen <sup>73,74</sup>. Die Aktivität und Regulation dieses so essentiellen und komplex regulierten TF <sup>39</sup> ist in vollständig differenzierten cDC1 allerdings bisher nicht untersucht worden und könnte insbesondere für die Regulation der anti-tumoralen Immunantwort eine wichtige Rolle spielen.



**Abbildung 6: Transkriptionsfaktornetzwerk, das die Funktionalität der cDC1 bei Aktivierung bestimmt.**

Durch Stimulation des IFNGR oder TLR3 kommt es zur Aktivierung einer Signalwegskaskade deren Effekte durch ein TF-Netzwerk aus IRF1, IRF8, PU.1, BATF3 und Anderen gesteuert wird. Diese TF regulieren Gene die essentiell für die Funktionalität von cDC1 sind, und steuern so u.A. die Produktion von IL-12B, CXCL9, CD40 und XCR1 <sup>39,68,73,74</sup>.

### 1.3 Die Tumor-Mikroumgebung unterdrückt anti-tumorale Immunantworten

Die Umgehung der Immunantwort ist eines der integralen Kennzeichen einer malignen Tumorerkrankung<sup>75</sup>. Durch den starken Selektionsdruck des Immunsystems entwickeln sich Tumoren, deren TMU immunsuppressiv auf einwandernde Immunzellen wirkt, indem sie grundlegende immunregulatorische Mechanismen kapern. Hierbei spielt die Suppression myeloider Zellen innerhalb der Tumormikroumgebung eine zentrale Rolle<sup>76,77</sup>. Es wurde beobachtet, dass die TMU in soliden Tumoren die Entstehung regulatorischer suppressiver myeloider Zellen fördert, wie beispielsweise regulatorische myeloide Zellen (MDSC; Engl.: *Myeloid-derived suppressor cells*) oder tumor-assoziierte Makrophagen (TAM; Engl.: *Tumor-associated macrophages*)<sup>76,78</sup>. Diese Zellen bewirken durch die Sezernierung immunregulatorischer Signalmoleküle wie IL-6, IL-10 oder TGF- $\beta$  eine Einschränkung der Funktion zytotoxischer Effektorzellen wie NK Zellen oder T Zellen und fördern dadurch das Tumorwachstum<sup>79,80</sup>. Zudem wurde beobachtet, dass eine immunsuppressive TMU die Funktion pro-inflammatorischer myeloider Zellen einschränkt<sup>81-83</sup>. Die zahlreichen Mechanismen, welche von Tumorzellen hierbei gekapert werden sind allerdings nach wie vor nicht vollständig erkannt und verstanden. Insbesondere ist unklar, inwieweit die Umgehung des Immunsystems die Sabotage der cDC1-vermittelten Unterstützung von CD8<sup>+</sup> T Zellen in der TMU erfordert.

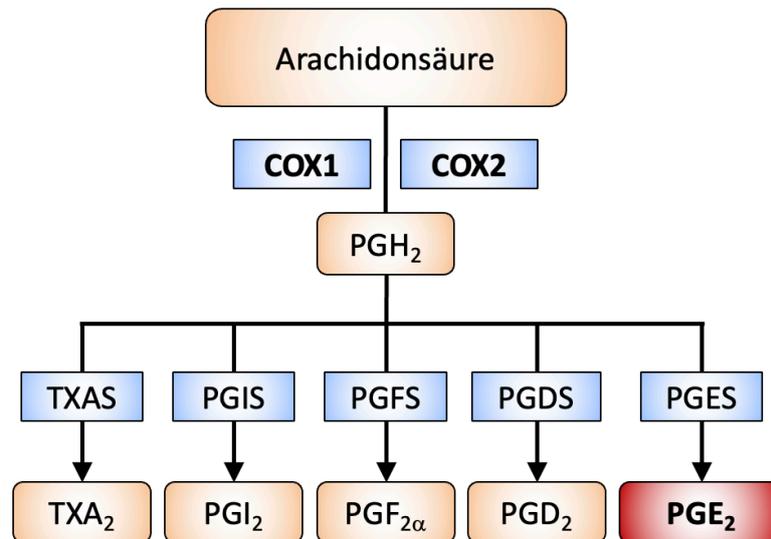
#### 1.3.1 Die Regulation intratumoraler cDC1 in der TMU

Welche Mechanismen hierbei die Funktionen intratumoraler cDC1 steuern ist bisher nicht im Detail untersucht worden, trotz ihrer kritischen Rolle bei der Unterstützung zytotoxischer T Zell Antworten. Die cDC1-Infiltration immunogener Tumoren wird durch die Produktion cDC1-rekrutierender Chemokine wie XCL1<sup>32,34</sup> oder Wachstumsfaktoren wie FLT3-L, welches die vollständige Differenzierung der cDC1 im Tumorgewebe bewirkt<sup>35,84</sup>, von intratumoralen Zellen wie NK Zellen oder auch T Zellen gesteuert. Zudem führt die Produktion von IFN $\gamma$  durch CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T Zellen in der TMU zu einer verstärkten Aktivierung der cDC1 und einer gesteigerten Effektorfunktion<sup>85</sup>. Gleichzeitig wirken aber auch eine Reihe regulatorischer Signale auf cDC1 um sie zu regulieren. Zum Einen hat man beobachtet, dass die drastisch veränderten metabolischen Bedingungen, welche innerhalb unkontrolliert proliferierender Läsionen herrschen, einen starken Einfluss auf Immunzellen haben<sup>77</sup>. Zum Anderen ist auch die direkte Wirkung verschiedener Signalwegsmoleküle auf cDC1 beschrieben. Tumorzellen, aber auch tumorassoziierte Fibroblasten und suppressive Immunzellen, wie regulatorische T Zellen (Treg; Engl.: *Regulatory T cell*), TAM oder MDSC, die sich in der TMU befinden, sezernieren eine Reihe von immunsuppressiven Faktoren wie IL-10<sup>44</sup>, oder TGF- $\beta$ <sup>60,86</sup>.

Darüber hinaus wurde beobachtet, dass von Tumorzellen produzierte Prostaglandine, insbesondere PGE<sub>2</sub> auf Immunzellen in der TMU wirkt <sup>32,87</sup>.

### 1.3.2 Prostaglandin E2 (PGE<sub>2</sub>) Produktion in Tumoren

Bioaktive Lipide regulieren eine Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Prozesse und fördern sowohl Entzündungsreaktionen als auch deren Resolution <sup>88</sup>. Sie entstehen durch die enzymatische Umsetzung von Membranphospholipiden, die in eine Reihe ungesättigter Fettsäuren, wie beispielsweise Arachidonsäuren, zerlegt werden <sup>89</sup>. Diese sind anfällig für Lipidperoxidation, insbesondere unter oxidativem Stress, wie er bei Entzündungsreaktionen auftritt <sup>90</sup>. Die Umsetzung dieser mehrfach ungesättigten Fettsäuren zu Eicosanoiden geschieht hauptsächlich über drei Stoffwechselwege: Den Cyclooxygenase-Weg (COX-1 und COX-2), bei dem Prostaglandine und Thromboxane produziert werden, den Lipoxygenase-Weg (5-LOX, 12-LOX und 15-LOX), der Leukotriene sowie zahlreiche Hydroperoxy- und Hydroxy-Fettsäuren freisetzt und der Cytochrom-P450-Weg, bei dem Epoxid- und Dihydroxy-Metaboliten der Arachidonsäure frei werden <sup>91</sup>. Mehrere dieser bioaktiven Lipidmediatoren sind für ihre Beteiligung an entzündlichen Prozessen bekannt <sup>91</sup>. So sind beispielsweise für über den Lipoxygenaseweg gewonnene Lipoxine, Resolvine, Protectine und Maresine sowohl entzündungshemmende als auch entzündungsfördernde Eigenschaften beschrieben <sup>92</sup>. Diese Lipidmediatoren können das Eindringen von Immunzellen in den Infektionsherd verhindern <sup>93</sup>, indem sie die nicht-phlogistische Phagozytose von apoptotischen Zellen vermitteln <sup>94</sup>, so dass das System nach einer Infektion zur Homöostase zurückkehren kann <sup>95</sup>. Im Zusammenhang mit Immunreaktionen auf kanzerogen transformierte Zellen ist die Aktivität des Eicosanoids Prostaglandin E2 (PGE<sub>2</sub>) beschrieben <sup>96</sup>. Es wird von nahezu allen Zellen des humanen Körpers in geringen Mengen produziert und kann bei Zelltod freigesetzt werden. In diesem Zusammenhang ist seine Rolle in der Aufrechterhaltung der Gewebemöostase und sein regulierender Einfluss als inhibitorisches DAMP beschrieben worden <sup>97</sup>.



**Abbildung 7: Prostaglandinsynthese.**

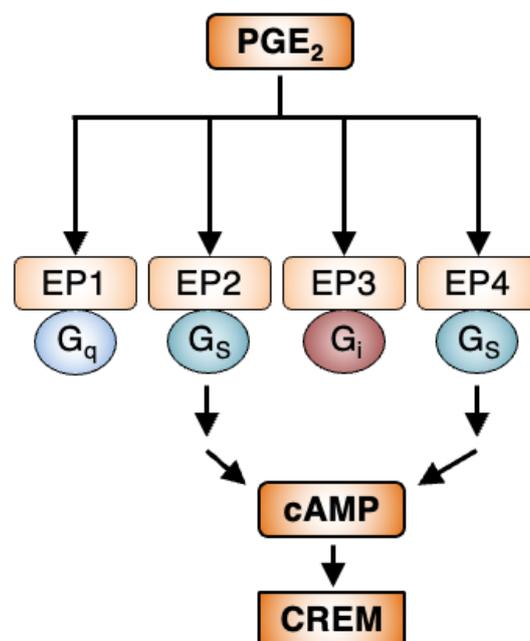
Aus der Zellmembran freigesetzte Phospholipide werden durch Phospholipase A<sub>2</sub> zu Arachidonsäure umgesetzt<sup>98</sup>. Cyclooxygenasen (COX) 1 und 2 setzen Arachidonsäure in PGH<sub>2</sub> um, welches wiederum in eine Vielzahl von Eicosanoiden umgesetzt werden kann. PGE<sub>2</sub> entsteht hierbei über die Aktivität der Prostaglandin E Synthase (PGES)<sup>99</sup>. Der limitierende Schritt ist in dieser Kaskade die Aktivität der Cyclooxygenasen. Während COX-1 konstitutiv exprimiert wird, ist die Aktivität von COX-2 induzierbar und kann durch verschiedene physiologische aber auch inflammatorische Stimuli aktiviert werden<sup>100</sup>.

PGE<sub>2</sub> ist das am häufigsten vorkommende Prostaglandin, das bei verschiedenen bösartigen Tumorentitäten, darunter Dickdarm-, Lungen-, Brust- sowie Kopf- und Halskrebs, gefunden wird und häufig mit einer schlechten Prognose verbunden ist<sup>101-104</sup>. Seine lokale Konzentration im Gewebe ist streng reguliert durch die Sezernierung über MRP4 (Engl.: *Multidrug resistance-associated protein 4*) aber auch Transporter-vermittelte Aufnahme und Inaktivierung im Zytoplasma durch PGT (Engl.: *Prostaglandin Influx Transporter*)<sup>105</sup>. Der Abbau von PGE<sub>2</sub> wird durch das Enzym HPGD (Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase 15-(NAD), auch bekannt als 15-PGDH) streng kontrolliert, welches die Oxidation von PGE<sub>2</sub> zu inaktiven 15-Keto-Metaboliten katalysiert<sup>106</sup>. Während HPGD in normalem Gewebe in hohem Maße exprimiert wird, fehlt es ubiquitär bei humanem Dickdarm-, Magen-, Lungen- und Brustkrebs<sup>107-110</sup>, was mit erhöhten endogenen PGE<sub>2</sub> Konzentrationen in diesen Läsionen einher geht.

### 1.3.3 Der PGE<sub>2</sub> Signalweg

Prostaglandine üben ihre autokrine oder parakrine biologische Wirkung über die Bindung an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR; Engl.: G-protein coupled receptors) aus. Die Signalwirkung von PGE<sub>2</sub> wird in diesem Fall durch die Rezeptoren EP1, EP2, EP3 und EP4 (kodiert durch PTGER1, PTGER2, PTGER2 bzw. PTGER4) vermittelt. Diese Rezeptoren unterscheiden sich durch den Signaltransduktionsweg, der nach Ligandenbindung in der Zielzelle aktiviert wird. Zum einen erhöht die Bindung von PGE<sub>2</sub> an EP1 die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup> Konzentration, indem EP1-gekoppelte G<sub>q</sub>-Proteine aktiviert werden, was wiederum zu einer

Aktivierung der Phospholipase C führt <sup>111</sup>. Zum Anderen beeinflussen PGE<sub>2</sub> Rezeptoren aber auch die Konzentrationen intrazellulären cAMPs. Während EP2 und EP4 die Produktion von cAMP anregen, wird diese durch die Aktivierung EP3-gekoppelter G<sub>i</sub> Proteine gehemmt <sup>111</sup>. EP2 und EP4 sind im Gegensatz dazu G<sub>s</sub>-gekoppelte Rezeptoren, welche unterschiedlich empfindlich gegenüber Aktivierung und Desensibilisierung sind. EP4 übermittelt bei Aktivierung Signale schnell und stark, wird aber auch ebenso schnell wieder desensibilisiert, während EP2 die PGE<sub>2</sub> Funktion über einen längeren Zeitraum vermittelt <sup>112</sup>. In beiden Fällen führt die Ligandenbindung zu einer Aktivierung der membrangebundenen Adenylatcyclase, welche cAMP produziert. Die Erhöhung der intrazellulären cAMP Konzentration aktiviert wiederum die Proteinkinase A (PKA) <sup>113</sup>, was zur direkten und indirekten Aktivierung einer Reihe von Transkriptionsfaktoren wie CREM (Engl.: *cAMP responsive element modulator*), CREB (Engl.: *cAMP responsive element binding protein*) oder ICER (Engl.: *inducible cAMP early repressor*) führt <sup>114,115</sup>.



**Abbildung 8: EP2 und EP4 induzieren den cAMP Signalweg.**

PGE<sub>2</sub> bindet an G-protein gekoppelte Rezeptoren EP1-EP4, von denen EP2 und EP4 über G<sub>s</sub> Proteine den cAMP Signalweg induzieren und dadurch unter anderem den Transkriptionsfaktor CREM aktivieren <sup>113,114</sup>.

### 1.3.4 Der Einfluss von PGE<sub>2</sub> auf intratumorale Immunzellen

Bisherige Forschung zum Effekt von PGE<sub>2</sub> auf Immunzellen hat die Relevanz dieses Signalwegs für anti-tumorale Immunantworten bereits gezeigt <sup>32,87</sup>. Die Elimination der Cyclooxygenase-Gene aus Tumorzellen ermöglicht demnach eine vollständige Immunkontrolle dieser Tumoren und die Hemmung der Cyclooxygenase Aktivität wirkt synergistisch mit Immun-Checkpoint-Blockade-Therapien <sup>87</sup>. Es wurde festgestellt, dass NK

Zellen die Rekrutierung von cDC1 in die Mikroumgebung des Tumors stimulieren und so die Kontrolle des Krebsimmunsystems fördern und, dass eine Unterbrechung dieses Prozesses durch vom Tumor stammendes PGE<sub>2</sub> zu einer Umgehung der Immunantwort führen kann<sup>32</sup>. Bereits 1999 wurde hypothetisiert, dass auch dendritische Zellen ein direktes Ziel der PGE<sub>2</sub>-vermittelten Einschränkung sein könnten<sup>96,116</sup>. Allerdings ist bisher nicht bekannt, inwieweit PGE<sub>2</sub> die cDC1-vermittelten Unterstützung von CD8<sup>+</sup> T Zellen in der TMU beeinflusst und welche Mechanismen hierbei die Funktionen intratumoraler cDC1 steuern.

## 1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

In dieser Arbeit wird untersucht, ob und wie vom Tumor stammendes PGE<sub>2</sub> die cDC1 Funktionalität beeinflusst und welche Auswirkungen das auf die T Zell Antwort hat. cDC1 erfüllen eine kritische Rolle in der Initiierung und Unterstützung effektiver T Zell Antworten innerhalb der TMU. Es wurde gezeigt, dass PGE<sub>2</sub>-produzierende Tumoren in der Lage sind, dieser cDC1-vermittelten Immunkontrolle zu entkommen. Bisherige Ergebnisse legen nahe, dass PGE<sub>2</sub> die Rekrutierung und die Unterstützung von cDC1 einschränkt, jedoch ist bisher nicht klar, ob auch die direkte Beeinflussung der cDC1 Funktionalität eine wichtige Rolle spielt. Das Ziel dieser Arbeit ist demnach die Untersuchung einer potentiellen Beeinflussung intratumoraler cDC1 durch PGE<sub>2</sub> und deren Bedeutung für die anti-tumorale Immunantwort. Es werden die folgenden Fragen beantwortet:

1. Beeinflusst PGE<sub>2</sub> neben der Akkumulation auch die Funktion intratumoraler cDC1?
2. Welche Funktionen intratumoraler cDC1 sind durch PGE<sub>2</sub> beeinträchtigt und wie wirkt sich dies auf die Orchestrierung intratumoraler T Zell Antworten aus?
3. Welche intrazellulären Signalwege vermitteln diese cDC1-Dysfunktion und wie lassen sie sich beeinflussen?
4. Rettet eine Aufhebung des PGE<sub>2</sub> Signalings auf cDC1 die anti-tumorale Immunantwort?
5. Welche Implikationen haben diese Ergebnisse für Tumorpatienten?

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern durch die Identifikation relevanter Signalwege neue Ansätze zur Verstärkung der Immunantwort gegen Krebs und der Verbesserung potenzieller therapeutischer Strategien.



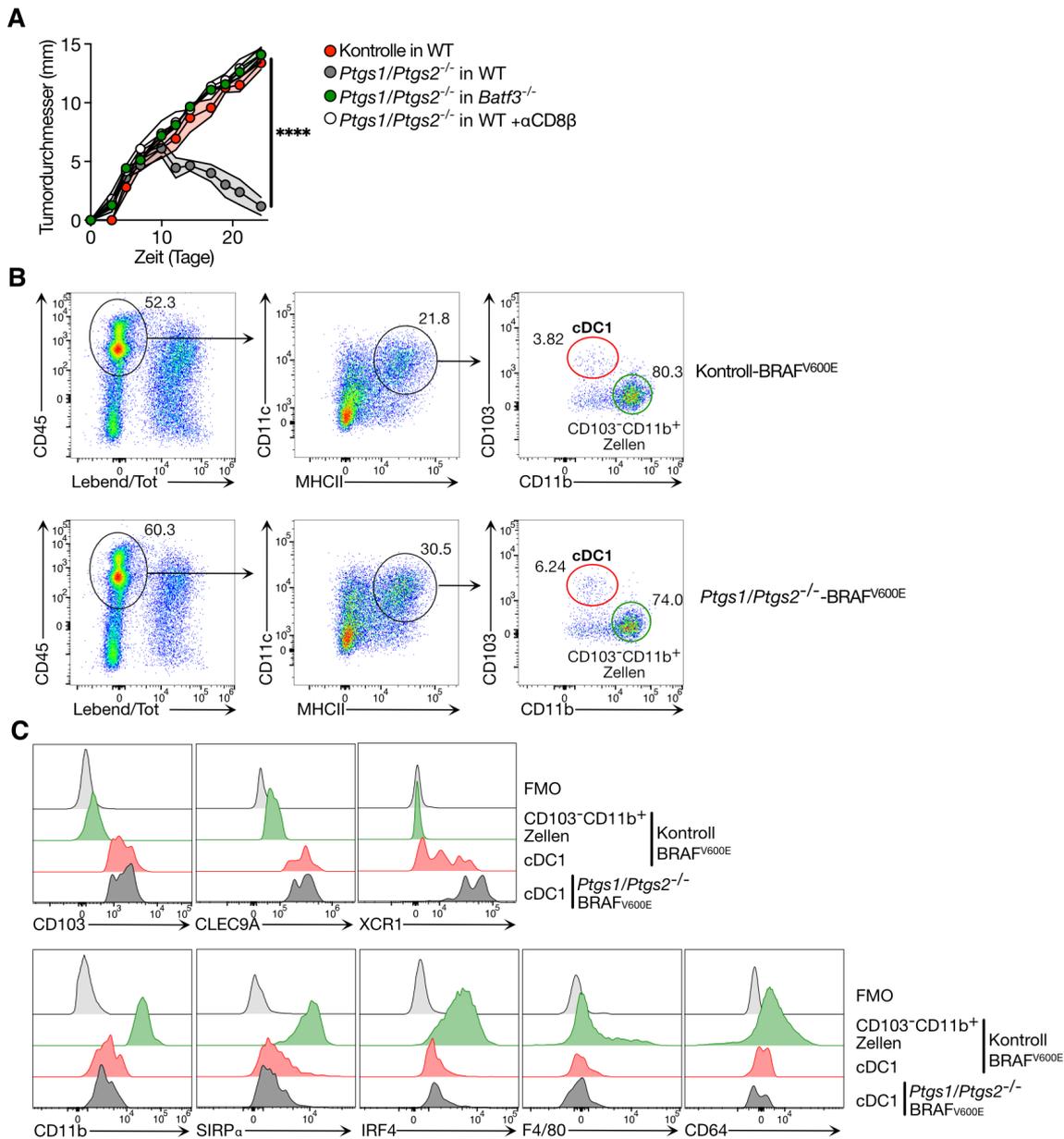
## 2 Ergebnisse

Für eine effektive CD8<sup>+</sup> T Zell-vermittelte Tumorabstoßung ist die Anwesenheit funktionaler cDC1 in der TMU entscheidend (siehe 0). In vielen fortschreitend wachsenden soliden Tumoren mangelt es jedoch an cDC1<sup>34</sup>. Wir haben uns daher gefragt, ob der Mangel an cDC1 in der TMU eine wirksame anti-tumorale Immunantwort einschränkt und für das Fortschreiten der Krebserkrankung verantwortlich ist.

### 2.1 Die Förderung der intratumoralen cDC1-Akkumulation führt nicht zu einer gesteigerten anti-tumoralen Immunantwort

Um dies zu untersuchen, nutzten wir ein bereits etabliertes präklinisches Mausmodell progressiv wachsender BRAF<sup>V600E</sup>-Melanomtumoren, die sich durch eine erhöhte PGE<sub>2</sub> Produktion der anti-tumoralen Immunantwort entziehen und eine geringe Menge an intratumoralen cDC1 aufweisen<sup>32,87</sup>. Wie bereits bekannt, zeigten PGE<sub>2</sub>-produzierende Kontroll-Tumoren ein progressives Tumorstadium in immunkompetenten Wildtyp (WT) Mäusen (Abbildung 9A), während Tumoren, die nicht in der Lage waren PGE<sub>2</sub> zu produzieren (Ptgs1/Ptgs2<sup>-/-</sup>), sich nach anfänglichem Tumorstadium spontan zurückbildeten. Wir validierten in cDC1-defizienten Batf3<sup>-/-</sup> Mäusen, dass die Immunkontrolle dieser Ptgs1/Ptgs2<sup>-/-</sup>-Tumoren von der Anwesenheit von cDC1 abhängt. Zudem überprüften wir durch eine Depletion von CD8β<sup>+</sup> T Zellen, dass die Abstoßung durch CD8<sup>+</sup> T Zellen vermittelt wird (Abbildung 9A).

In diesem Tumormodell identifizierten wir intratumorale cDC1 als CD45<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> Zellen mithilfe eines durchflusszytometrischen Färbeprotokolls<sup>32</sup> (Abbildung 9B). cDC1 ließen sich klar von cDC2 und auch anderen myeloiden Zellpopulationen, wie beispielsweise Makrophagen, abgrenzen, wie man an der fehlenden Expression von CD11b, SIRPα, IRF4, F4/80 oder auch CD64 sah (Abbildung 9C). Wie bereits bekannt<sup>32</sup>, wiesen Kontroll-Tumoren im Vergleich zu Ptgs1/Ptgs2<sup>-/-</sup>-Tumoren eine geringere Anzahl an cDC1 auf, die eine verringerte Expression von XCR1 besaßen. Andere für cDC1 charakteristische Marker, so wie das Integrin αE CD103 oder der Rezeptor CLEC9A, waren allerdings unverändert (Abbildung 9B,C).

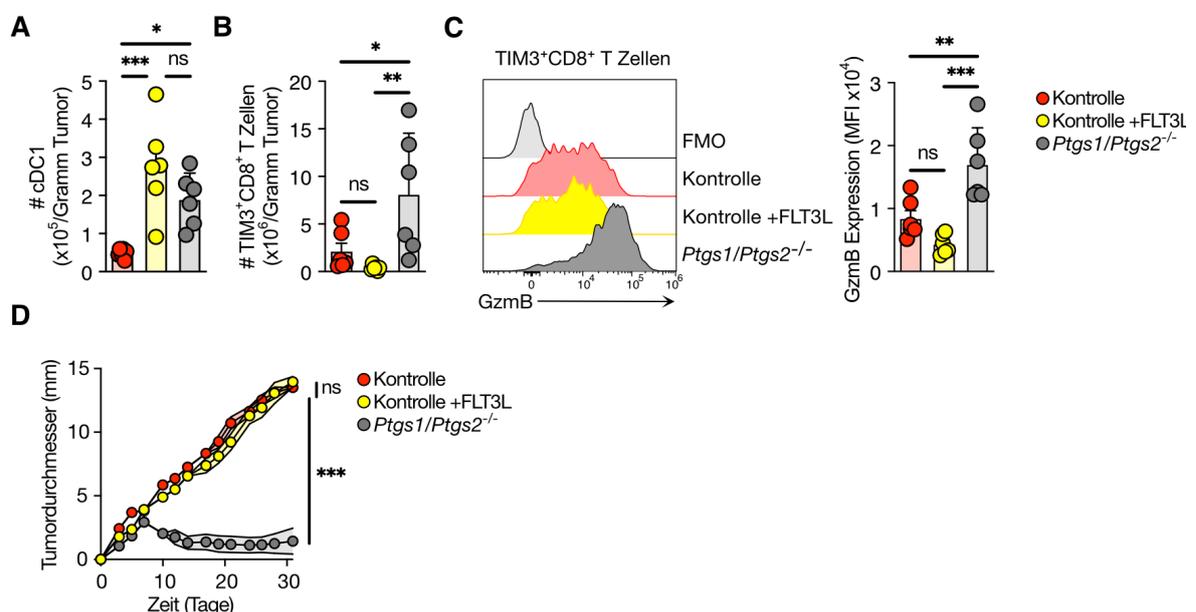


**Abbildung 9: Intratumorale cDC1 in PGE<sub>2</sub>-produzierenden Tumoren.**

(A) Tumorwachstumsprofile von  $2 \times 10^5$  Kontroll- oder *Ptgs1/Ptgs2<sup>-/-</sup>*-BRAF<sup>V600E</sup>-Zellen, die s.c. in *Batf3<sup>-/-</sup>* Mäuse oder WT Mäuse mit und ohne CD8<sup>+</sup> T Zell-Depletion injiziert wurden (n=10 pro Gruppe). (B) Durchflusszytometrische Gating-Strategie zur Identifizierung intratumoraler cDC1. Gezeigt ist je ein repräsentativer Kontroll- oder *Ptgs1/Ptgs2<sup>-/-</sup>*-BRAF<sup>V600E</sup>-Tumor, der 6 Tage nach Tumortransplantation analysiert wurde. Die Zahlen geben den Prozentsatz an Zellen innerhalb des dargestellten Gates an. (C) Analyse intratumoraler cDC1 und CD103<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup> Zellen für die Expression myeloider Zellmarker (repräsentativ für n=4). Die Daten in (A) sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. \*\*\*\*p < 0,0001.

Ist neben dem Mangel an intratumoralen cDC1 auch deren funktionale Einschränkung entscheidend an der Unwirksamkeit der anti-tumoralen Immunantwort in PGE<sub>2</sub>-produzierenden progressiv wachsenden Tumoren beteiligt?

Um diese Frage zu beantworten, förderten wir experimentell die intratumorale cDC1-Akkumulation in BRAF<sup>V600E</sup>-Kontroll-Tumoren durch FLT3L-Therapie<sup>35</sup>. Obwohl eine solche Behandlung die Anzahl intratumoraler cDC1 in Kontroll-Tumoren signifikant erhöhte, sodass die Mengen vergleichbar mit Ptgs1/Ptgs2<sup>-/-</sup>-Tumoren waren (Abbildung 10A), konnte sie die beeinträchtigte intratumorale CD8<sup>+</sup> T Zell Antwort, gemessen an der Generierung von TIM3<sup>+</sup> Effektor CD8<sup>+</sup> T Zellen (Abbildung 10B), nicht retten. Neben der fehlenden Akkumulation von TIM3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen, war auch deren Effektorfunktion weiterhin eingeschränkt, ersichtlich an der Produktion von Granzym B (GzmB) (Abbildung 10C). Die Erhöhung der Anzahl intratumoraler cDC1 hatte auch auf lange Sicht keinen Einfluss auf das fortschreitende Tumorstadium (Abbildung 10D). Es lässt sich schlussfolgern, dass neben dem Mangel an cDC1 auch eine Einschränkung ihrer Funktion für die unwirksame CD8<sup>+</sup> T Zell Antwort in PGE<sub>2</sub>-produzierenden Tumoren verantwortlich ist und zur Tumorstadium beiträgt. Dies veranlasste uns zu einer umfassenden Analyse der funktionellen Kapazitäten von cDC1 im Tumorgewebe.



**Abbildung 10: Die Erhöhung der Anzahl intratumoraler cDC1 fördert nicht die Immunkontrolle PGE<sub>2</sub>-produzierender Tumoren.**

(A-D)  $2 \times 10^6$  (A-C) oder  $2 \times 10^5$  (D) Kontroll- oder Ptgs1/Ptgs2<sup>-/-</sup>-BRAF<sup>V600E</sup>-Zellen wurden s.c. in WT Mäuse implantiert, die beginnend ab Tag 3 täglich intraperitoneale (i.p.) Injektionen von FLT3L oder PBS als Kontrolle erhielten. Quantifizierung von (A) intratumoralen cDC1, (B) TIM3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen sowie Quantifizierung der Granzym B (GzmB) Expression dieser Effektor CD8<sup>+</sup> T Zellen (C) 11 Tage nach Transplantation der Tumorzellen (n=6). (D) Analyse des Tumorstadiums (n=10). Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001; ns, nicht signifikant.

## 2.2 cDC1 zeigen keine Einschränkung der Antigenaufnahme, Aktivierung oder Kreuzpräsentation in PGE<sub>2</sub>-produzierenden Tumoren

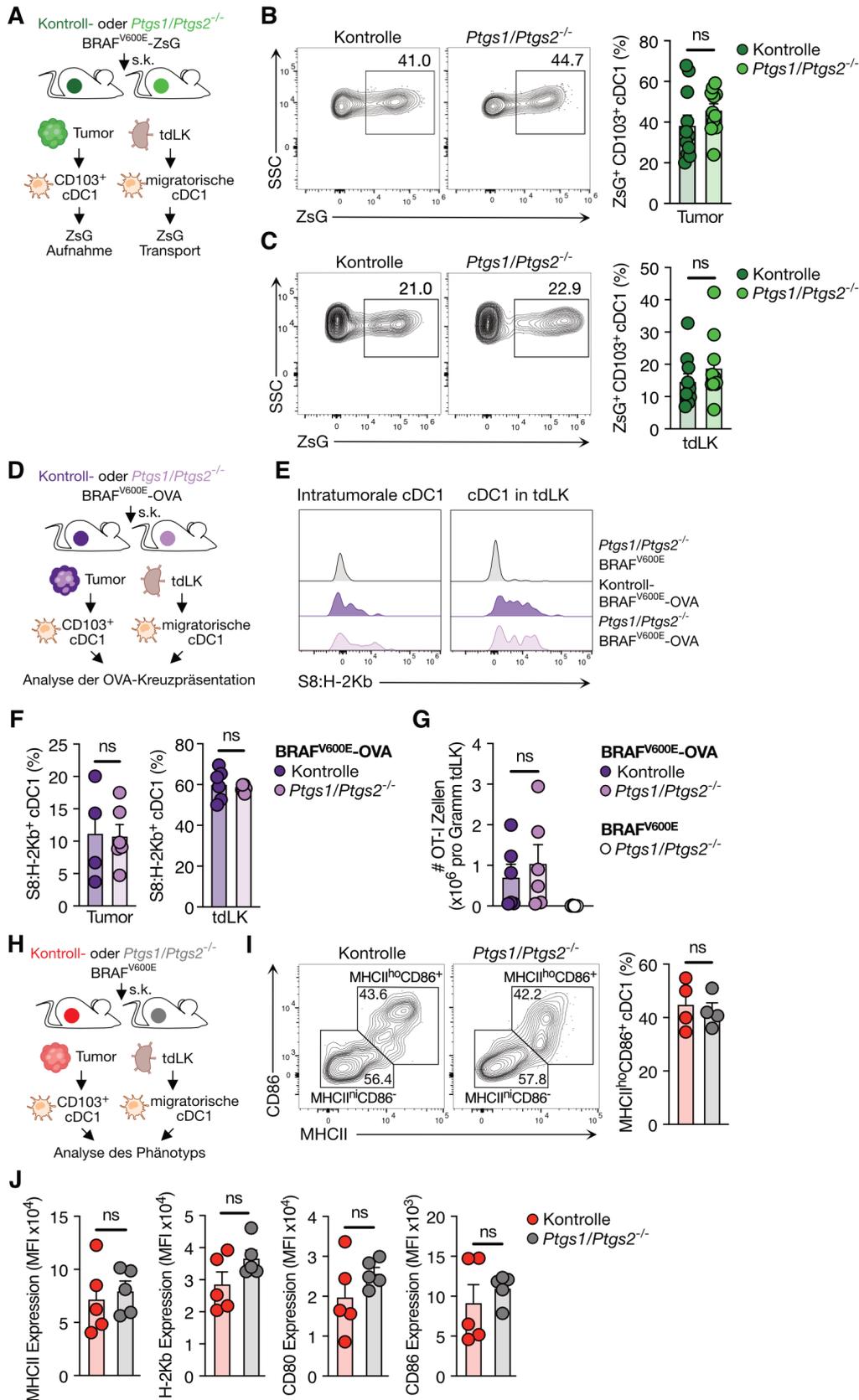
Um festzustellen, ob funktionale Veränderungen intratumoraler cDC1 der unwirksamen anti-tumoralen Immunantwort zugrunde liegen, führten wir eine vergleichende Analyse von cDC1 aus Kontroll- und Ptgs1/Ptgs2<sup>-/-</sup>-BRAF<sup>V600E</sup>-Tumoren durch. Wir konzentrierten uns dabei auf die Analyse von cDC1-Funktionen, die kritisch für eine effektive CD8<sup>+</sup> T Zell Antwort sind. Dies betraf die Aufnahme von Tumorantigenen und deren Transport in Tumor-drainierende Lymphknoten (tdLK), die intratumorale Aktivierung von cDC1, sowie die Zytokinproduktion innerhalb der TMU.

Um zunächst die Fähigkeit von cDC1 zur Aufnahme von Tumorantigenen zu analysieren, injizierten wir WT Mäusen Kontroll- und Ptgs1/Ptgs2<sup>-/-</sup>-BRAF<sup>V600E</sup>-ZsG-Melanomzellen, die so manipuliert wurden, dass sie ZsGreen (ZsG) exprimieren (Abbildung 11A), ein abbauresistentes Fluorophor, das in intratumoralen cDC1 nach Aufnahme von Zelldebris ZsG-exprimierender Tumorzellen nachgewiesen werden kann<sup>45</sup>. An Tag 6 nach Inokulation der Tumorzellen stellten wir fest, dass cDC1 sowohl in Kontroll- als auch in Ptgs1/Ptgs2<sup>-/-</sup>-BRAF<sup>V600E</sup>-ZsG-Tumoren effizient ZsG aufgenommen hatten, sowohl in Bezug auf den Anteil von ZsG<sup>+</sup> cDC1 als auch auf die Menge an intrazellulärem ZsG (Abbildung 11B). Auch der Anteil migratorischer ZsG<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup> cDC1 in tdLK war in beiden Gruppen identisch (Abbildung 11C), was auf einen intakten cDC1-vermittelten Transport von Tumorantigenen hindeutet.

Zur Untersuchung der Antigen-Kreuzpräsentation analysierten wir cDC1 in Tumoren, die von Ovalbumin (OVA)-exprimierenden Kontroll- und Ptgs1/Ptgs2<sup>-/-</sup>-BRAF<sup>V600E</sup>-Zellen gebildet wurden (Abbildung 11D). Wir stellten fest, dass intratumorale cDC1 in beiden Modellen das vom Tumor stammende OVA-Protein effizient kreuzpräsentierten, gemessen durch die Färbung von OVA<sub>257-264</sub> (SIINFEKL)-Peptid-MHC-I Komplexen (Abbildung 11E). Ähnliche Beobachtungen machten wir für migratorische CD103<sup>+</sup> cDC1 in tdLK (Abbildung 11F). Zudem konnten naive OVA-spezifische OT-I CD8<sup>+</sup> T Zellen, die adaptiv in Mäuse transferiert worden waren, bevor diesen Mäusen Kontroll- oder Ptgs1/Ptgs2<sup>-/-</sup>-BRAF<sup>V600E</sup>-OVA-Tumoren transplantiert wurden, in tdLK beider Gruppen ähnlich effizient expandieren (Abbildung 11G). Dies deutet darauf hin, dass von Tumoren produziertes PGE<sub>2</sub> die Kreuzpräsentation von cDC1 gegenüber CD8<sup>+</sup> T Zellen in tdLK nicht beeinflusst.

Als nächstes untersuchten wir mögliche Unterschiede in der phänotypischen Aktivierung intratumoraler cDC1. Wir führten eine separate phänotypische Analyse von cDC1 in Kontroll- und Ptgs1/Ptgs2<sup>-/-</sup>-BRAF<sup>V600E</sup>-Tumoren (ohne ZsG-Expression) durch (Abbildung 11H), bei der in beiden Modellen ähnlich große Anteile an cDC1 mit einem aktivierten MHCII<sup>hoch</sup>CD86<sup>+</sup>-

Phänotyp festgestellt wurden (Abbildung 11I). Intratumorale MHCII<sup>hoch</sup>CD86<sup>+</sup> cDC1 exprimierten außerdem gleich hohe Mengen an MHC- und kostimulatorischen Molekülen (Abbildung 11J). Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass intratumorale cDC1 sowohl in PGE<sub>2</sub>-produzierenden Progressor- als auch in PGE<sub>2</sub>-defizienten Regressor-Tumoren Tumorantigene effizient aufnehmen und verarbeiten, phänotypisch aktiviert werden und Tumorantigene für ein effektives T Zell-Priming in den tdLK transportieren.



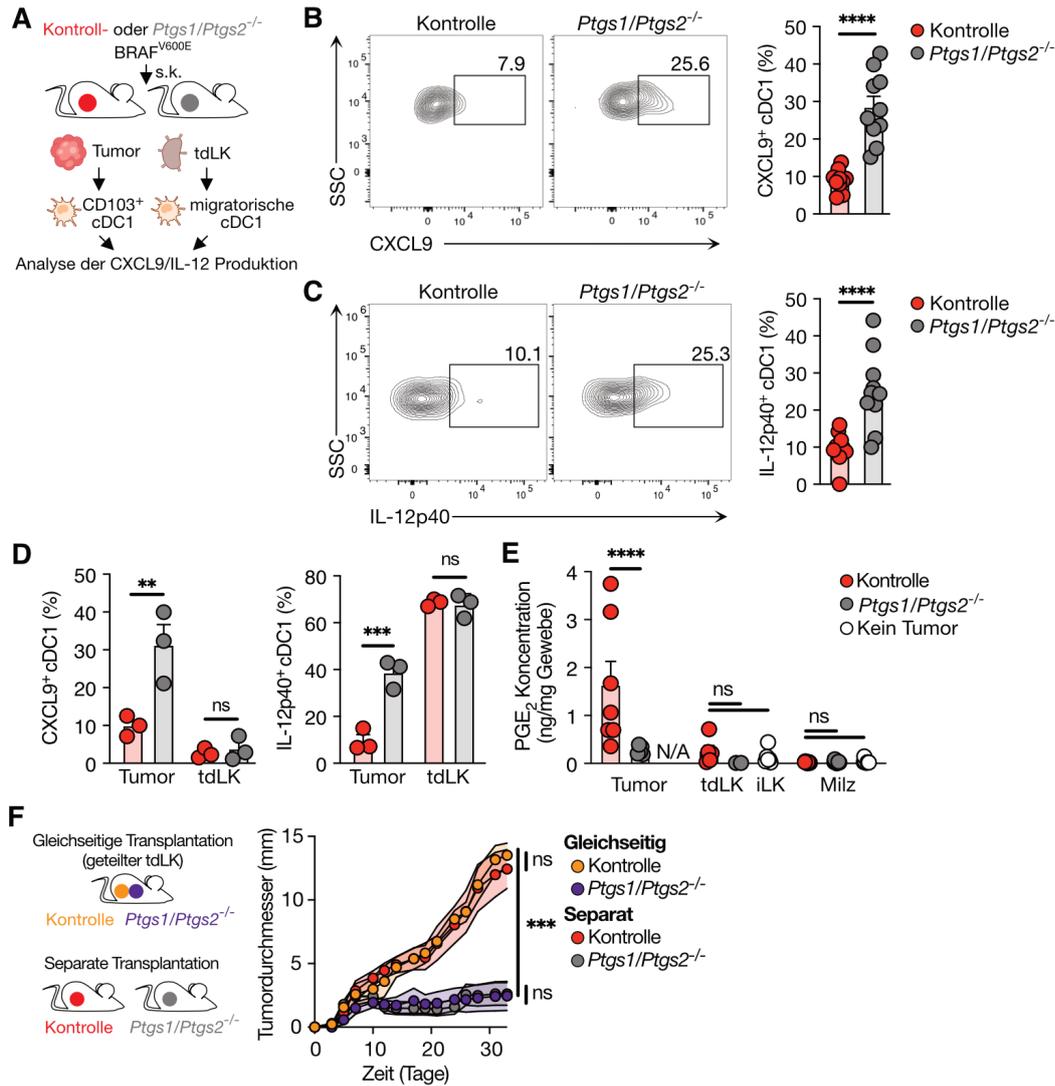
**Abbildung 11: cDC1 in PGE<sub>2</sub>-produzierenden Tumoren sind aktiviert.**

(A) Versuchsaufbau für (B) und (C). WT Mäusen wurden 2x10<sup>6</sup> ZsG-exprimierende Kontroll- oder *Ptgs1/Ptgs2*<sup>-/-</sup>-BRAF<sup>V600E</sup>-Zellen injiziert und 6 Tage später analysiert. (B) Vergleich der ZsG-Aufnahme durch intratumorale cDC1 (n=11). (C) Quantifizierung von ZsG<sup>+</sup> migrierenden cDC1 in tdLK (n=10). (D) Versuchsaufbau für (E) und (F). WT Mäusen wurden 2x10<sup>6</sup> Kontroll- oder *Ptgs1/Ptgs2*<sup>-/-</sup>-BRAF<sup>V600E</sup>-OVA-Zellen injiziert und Tumoren und tdLK wurden 6 Tage später analysiert (n=4-6 pro Gruppe). (Fortsetzung der Legende auf der nächsten Seite)

Mäuse, denen Ptgs1/Ptgs2<sup>-/-</sup>-BRAF<sup>V600E</sup>-Zellen (ohne OVA-Expression) injiziert wurden, dienten als Kontrolle. **(E)** Repräsentative Darstellung der S8:H-2Kb-Oberflächenfärbung von 4-6 Proben wie in **(F)** gezeigt. **(F)** Quantifizierung der OVA-kreuzpräsentierenden CD103<sup>+</sup> cDC1 in Tumoren und tdLK (n=4-6). **(G)** Analyse der OT-I T Zell-Expansion im tdLK bei Mäusen, die an Tag 0 1x10<sup>3</sup> naive OVA-spezifische CD45.1<sup>+</sup> OT-I T Zellen erhielten (n=6). **(H)** Versuchsaufbau zur phänotypischen Analyse von cDC1 in Tumoren und tdLK 6 Tage nach Inokulation von WT Mäusen mit 2x10<sup>6</sup> Kontroll- oder Ptgs1/Ptgs2<sup>-/-</sup>-BRAF<sup>V600E</sup>-Zellen in **(I,J)**. **(I)** Anteil von MHCII<sup>hoch</sup>CD86<sup>+</sup> cDC1 in Tumoren (n=4). **(M)** Expression der angegebenen Marker durch intratumorale cDC1 mit einem aktivierten (MHCII<sup>hoch</sup>CD86<sup>+</sup>) Phänotyp (n=5). Die Daten sind als Mittelwert ± SEM angegeben. MFI, mittlere Fluoreszenzintensität. ns, nicht signifikant.

### 2.3 PGE<sub>2</sub> blockiert die Chemokin- und Zytokin-Produktion intratumoraler cDC1

Für eine wirksame intratumorale T Zell Antwort ist neben der Antigenpräsentation die Sekretion von Zytokinen durch intratumorale cDC1 unerlässlich<sup>42,53</sup> (siehe 1.2.3), weswegen wir die Produktion von CXCL9 sowie IL-12 durch cDC1 in PGE<sub>2</sub>-produzierenden Tumoren untersuchten. Bei der Analyse intratumoraler cDC1 mittels intrazellulärer Durchflusszytometrie stellten wir fest, dass cDC1 in Kontroll-Tumoren weder CXCL9 (Abbildung 12B) noch IL-12 (Abbildung 12C) produzierten, während cDC1 in Ptgs1/Ptgs2<sup>-/-</sup>-Tumoren eine aktive Produktion beider Zytokine zeigten (Abbildung 12B,C). Bemerkenswerterweise beschränkte sich die Unfähigkeit, Zytokine zu produzieren, auf cDC1 in der TMU. Migratorische cDC1 in tdLK wiesen, unabhängig ihres Tumorsprungs, eine starke IL-12-, aber minimale CXCL9-Produktion auf (Abbildung 12D). In Übereinstimmung mit diesen Daten konnten wir keine signifikanten Mengen an PGE<sub>2</sub> in tdLK von Kontroll- oder Ptgs1/Ptgs2<sup>-/-</sup>-BRAF<sup>V600E</sup>-Tumoren oder auch anderen entfernteren Organen nachweisen (Abbildung 12E). Darüber hinaus beobachteten wir eine unbeeinflusste Immunkontrolle von Ptgs1/Ptgs2<sup>-/-</sup>-BRAF<sup>V600E</sup>-Tumoren, selbst wenn sie zusammen mit BRAF<sup>V600E</sup>-Kontroll-Tumoren neben denselben tdLK transplantiert wurden. Dies deutet darauf hin, dass beide CD8<sup>+</sup> T Zell Antworten effizient im gemeinsamen tdLK generiert wurden und eine Abstoßung des PGE<sub>2</sub>-defizienten Tumors erreichten, aber dennoch den gleichzeitig transplantierten PGE<sub>2</sub>-produzierenden Tumor nicht eliminieren konnten (Abbildung 12F). Wir schließen daraus, dass PGE<sub>2</sub> seine unterdrückende Wirkung auf Immunzellen lokal im Tumorgewebe entfaltet und, dass dies für die Umgehung der Immunantwort ausreichend ist.

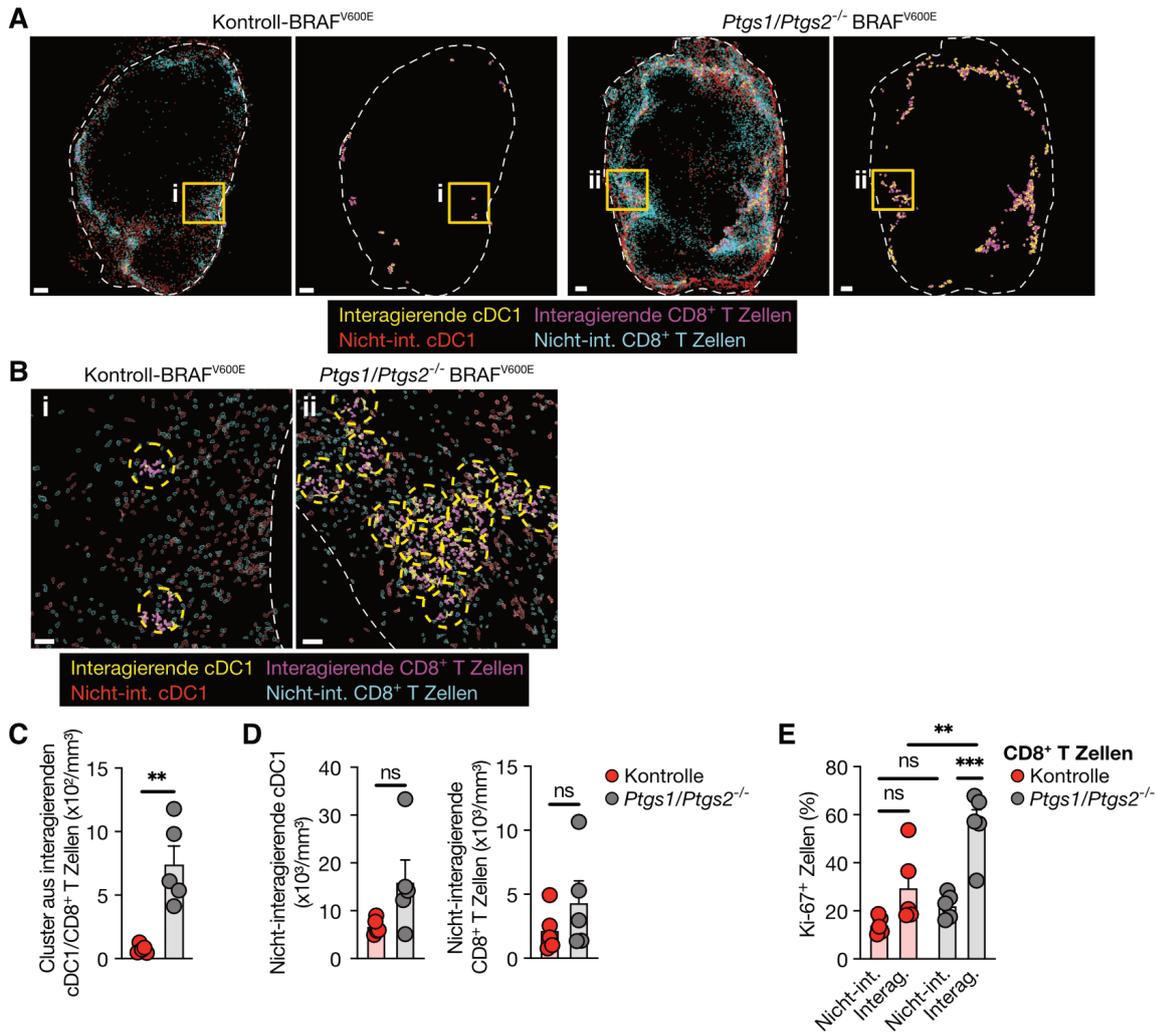


**Abbildung 12: cDC1 sind lokal in PGE<sub>2</sub>-produzierenden Tumoren dysfunktional und produzieren weniger IL-12 und CXCL9.**

(A) Versuchsaufbau zur funktionalen Analyse von cDC1 in Tumoren und tdLK 6 Tage nach Inokulation von WT Mäusen mit  $2 \times 10^6$  Kontroll- oder *Ptgs1/Ptgs2*<sup>-/-</sup>-BRAF<sup>V600E</sup>-Zellen in (B-D). (B,C) Quantifizierung der intrazellulären (B) CXCL9- und (C) IL-12p40-Expression durch intratumorale cDC1 (n=10). (D) Vergleichende Analyse der CXCL9- und IL-12p40-Expression durch intratumorale cDC1 und CD103<sup>+</sup> migratorische cDC1 in tdLK 6 Tage nach Implantation eines Kontroll- oder *Ptgs1/Ptgs2*<sup>-/-</sup>-BRAF<sup>V600E</sup>-Melanoms (n=3). (E) PGE<sub>2</sub>-Konzentration in Lysaten von Tumoren, tdLK und Milz 11 Tage nach s.c. Inokulation von WT Mäusen mit Kontroll- oder *Ptgs1/Ptgs2*<sup>-/-</sup>-BRAF<sup>V600E</sup> Melanomzellen (n=3-7 pro Gruppe). Inguinale Lymphknoten (iLN) und Milz von tumorfreien Mäusen dienten als Kontrolle (n=6). (F) Auswirkung der gleichseitigen Tumor-Ko-Transplantation auf das Tumorwachstum. WT Mäuse erhielten zwei aufeinanderfolgende s.c. Injektionen von  $2 \times 10^5$  Kontroll- und *Ptgs1/Ptgs2*<sup>-/-</sup>-BRAF<sup>V600E</sup>-Zellen an derselben (gleichseitigen) Flanke oder eine einzelne s.c. Injektion von entweder  $2 \times 10^5$  Kontroll- oder *Ptgs1/Ptgs2*<sup>-/-</sup>-BRAF<sup>V600E</sup>-Zellen (n=8 pro Gruppe). Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001; ns, nicht signifikant.

## 2.4 Dysfunktionale cDC1 können in PGE<sub>2</sub>-produzierenden Tumoren nicht mit CD8<sup>+</sup> T Zellen interagieren

Die bisherigen Daten lassen vermuten, dass cDC1 in PGE<sub>2</sub>-produzierenden Progressionstumoren in ihrer Fähigkeit zur produktiven Interaktion mit tumorinfiltrierenden CD8<sup>+</sup> T Zellen beeinträchtigt sein könnten. Dies veranlasste uns dazu, die intratumorale Positionierung und Orientierung von cDC1 und CD8<sup>+</sup> T Zellen mittels volumetrischer konfokaler Immunfluoreszenzmikroskopie zu analysieren (Abbildung 13A) <sup>117</sup>. Die Analysen zeigten, dass cDC1 in Kontroll-Tumoren im Allgemeinen weiter von intratumoralen CD8<sup>+</sup> T Zellen entfernt waren und selbst in dicht besiedelten Tumorregionen nicht mit CD8<sup>+</sup> T Zellen interagierten, im Gegensatz zu cDC1 in Ptgs1/Ptgs2<sup>-/-</sup>-Tumoren, welche oft mit tumorinfiltrierenden CD8<sup>+</sup> T Zellen eng interagierten (Abbildung 13B). Distanzanalysen zeigten außerdem, dass cDC1 in Ptgs1/Ptgs2<sup>-/-</sup>-Tumoren zahlreiche Cluster mit CD8<sup>+</sup> T Zellen bildeten, während diese Cluster in Kontroll-Tumoren selten waren (Abbildung 13C), obwohl die Anzahl der nicht interagierenden Zellen in beiden Tumormodellen ähnlich war (Abbildung 13D). Mit Hilfe quantitativer Histozytometrie von gerenderten CD8<sup>+</sup> T Zellen konnten wir feststellen, dass der Verlust von cDC1-CD8<sup>+</sup> T Zell-Interaktionen in Kontroll-Tumoren mit einer signifikant verringerten intratumoralen CD8<sup>+</sup> T Zell-Proliferation einherging, gemessen an der Hochregulierung der Ki-67 Expression (Abbildung 13E). Ki-67 wurde von clusternden CD8<sup>+</sup> T Zellen in Ptgs1/Ptgs2<sup>-/-</sup>-Tumoren stark exprimiert (Abbildung 13E), während das bei den wenigen clusternden CD8<sup>+</sup> T Zellen in Kontroll-Tumoren nicht der Fall war. Dies spricht dafür, dass Interaktionen zwischen CD8<sup>+</sup> T Zellen und cDC1 innerhalb der TMU für die intratumorale CD8<sup>+</sup> T Zell-Proliferation erforderlich sind. Zusammengenommen deuten diese Daten darauf hin, dass das vom Tumor stammende PGE<sub>2</sub> intratumorale cDC1 darin behindert, wirksame CD8<sup>+</sup> T Zell Antworten im Tumorgewebe zu steuern, was zur Umgehung der Immunantwort und dem Fortschreiten der Krebserkrankung führt.



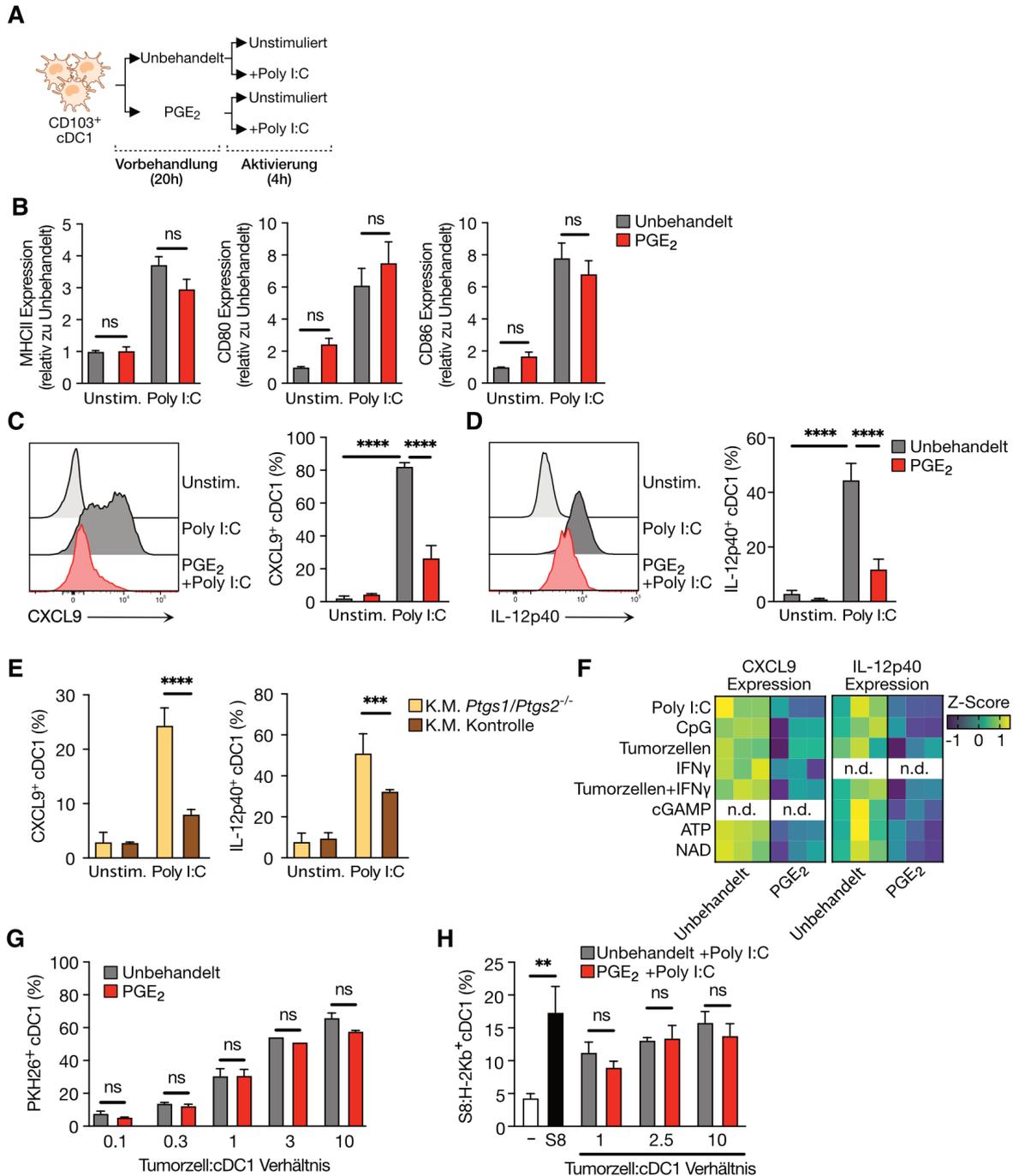
**Abbildung 13: Dysfunktionale cDC1 interagieren nicht produktiv mit CD8<sup>+</sup> T Zellen in der TMU PGE<sub>2</sub>-produzierender Tumoren.**

(A-E) Analyse der Interaktionen zwischen cDC1 und CD8<sup>+</sup> T Zellen in Bildern ganzer Tumorschnitte, die mit konfokaler Immunfluoreszenzmikroskopie aufgenommen wurden. (A) Repräsentative Visualisierung intratumoraler cDC1- und CD8<sup>+</sup> T Zellen nach Zell-Rendering. Gelbe Quadrate kennzeichnen die in (B) gezeigten vergrößerten Tumorregionen, Maßstab 400µm. (B) Vergrößerte Tumorregion mit cDC1-CD8<sup>+</sup> T Zell-Clustern. Gelbe Kreise markieren cDC1-CD8<sup>+</sup> T Zell-Cluster, Maßstab 70µm. (C) Quantifizierung von cDC1-CD8<sup>+</sup> T Zell-Clustern in n=5 Tumoren. (D) Quantifizierung nicht interagierender Zellen (n=5). (E) Ki-67-Expression in CD8<sup>+</sup> T Zellen, die mit cDC1 in cDC1-CD8<sup>+</sup> T Zell-Clustern interagieren, im Vergleich zu nicht interagierenden CD8<sup>+</sup> T Zellen (n=5). Die Daten in (C-E) sind als Mittelwert ± SEM angegeben. \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001; ns, nicht signifikant.

## 2.5 PGE<sub>2</sub> programmiert einen dysfunktionalen Zustand in aktivierten cDC1

Es ist bereits bekannt, dass sich PGE<sub>2</sub> auf die Biologie und Funktion myeloider Immunzellen auswirken kann<sup>118,119</sup>. Welchen direkten Einfluss PGE<sub>2</sub> dabei auf cDC1 hat, ist bisher jedoch nicht untersucht. Um diese Frage zu klären, differenzierten wir cDC1 aus Knochenmarkstammzellen *in vitro* um ihre Funktionalität nach direkter PGE<sub>2</sub>-Exposition und Aktivierung mit Polyinosin:Polycytidylsäure (Poly I:C) zu untersuchen (Abbildung 14A). Wir stellten fest, dass PGE<sub>2</sub> die Hochregulierung typischer Aktivierungsmarker (MHC-II, CD80 und CD86) nicht beeinträchtigte (Abbildung 14B), was darauf schließen lässt, dass PGE<sub>2</sub> nicht generell die cDC1-Aktivierung verhindert. Die PGE<sub>2</sub>-Exposition führte jedoch zu einer deutlich reduzierten CXCL9- und IL-12-Produktion durch aktivierte cDC1 (Abbildung 14C,D), was auf einen funktionell beeinträchtigten cDC1-Aktivierungszustand hindeutet. Dies war ebenso der Fall, wenn cDC1 mit konditioniertem Medium (K.M.) von Kontroll-, aber nicht von Ptgs1/Ptgs2<sup>-/-</sup>-BRAF<sup>V600E</sup>-Zellen behandelt wurden (Abbildung 14E).

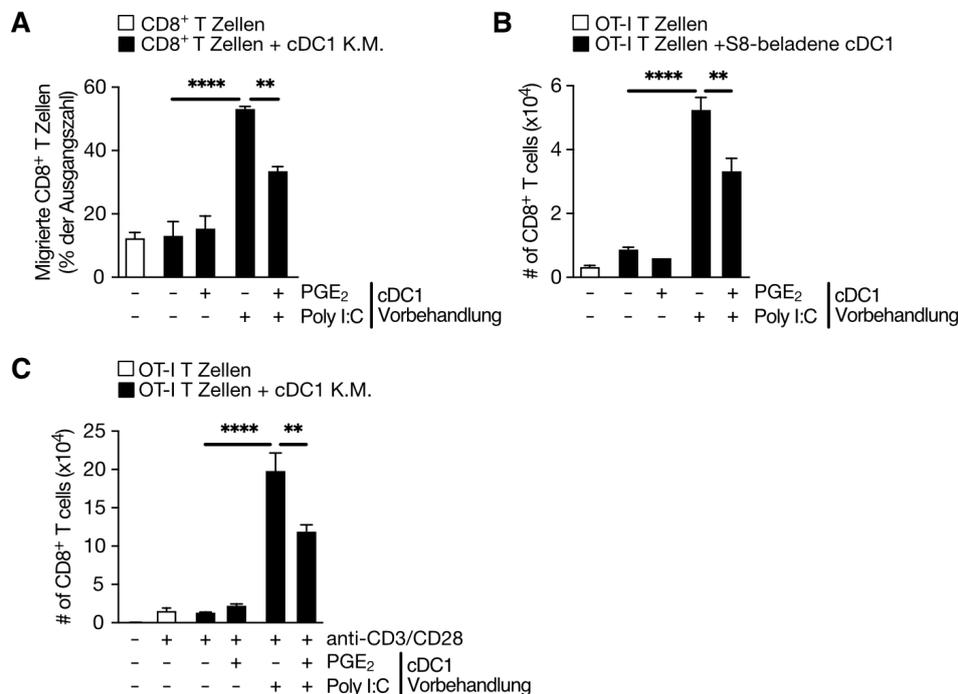
Wir testeten die Aktivierung von cDC1 mit verschiedenen innatem Stimuli, von denen bekannt ist, dass sie die cDC1-Aktivierung in Tumoren regulieren können, einschließlich ATP, cGAMP, toten Tumorzellen und dem Zytokin IFN $\gamma$ . Die Beeinträchtigung der CXCL9 und IL-12 Produktion durch PGE<sub>2</sub> war bei der Stimulation all dieser Aktivierungssignalwege festzustellen (Abbildung 14F), was darauf hindeutet, dass diese Dysfunktion nicht von der Art der Aktivierung der cDC1 abhängt. Interessanterweise war diese Dysfunktion selektiv für die Zytokin- und Chemokinproduktion, da mit PGE<sub>2</sub>-behandelte cDC1 effizient Zelldebris von toten Tumorzellen aufnehmen konnten (Abbildung 14G) und sie waren in ihrer Fähigkeit, mit toten Zellen assoziiertes Antigen zu präsentieren (Abbildung 14F) nicht beeinträchtigt. Es lässt sich schlussfolgern, dass nach PGE<sub>2</sub>-Exposition aktivierte cDC1 phänotypisch und funktional ähnlich eingeschränkt sind wie cDC1 in PGE<sub>2</sub>-produzierenden Tumoren.



**Abbildung 14: Der PGE<sub>2</sub>-Signalweg induziert einen dysfunktionalen Zustand in aktivierten cDC1.**

(A) Experimenteller Aufbau für funktionale Analysen von cDC1 in (A-D). (B) Quantifizierung der MHCII-, CD80- und CD86-Expression (n=4). Das Diagramm zeigt die Veränderung im Vergleich zu cDC1, die in Abwesenheit von PGE<sub>2</sub> kultiviert und nicht stimuliert wurden. (C,D) Quantifizierung der Expression von (C) CXCL9 und (D) IL-12p40. (n=4) (E) Quantifizierung der Expression von CXCL9 und IL-12p40 in cDC1, die mit konditioniertem Medium (K.M.) von PGE<sub>2</sub>-produzierenden Kontroll- oder PGE<sub>2</sub>-defizienten *Ptgs1/Ptgs2<sup>-/-</sup>-BRAF<sup>V600E</sup>*-Zellen für 20h inkubiert und anschließend mit dem TLR3-Liganden Poly I:C (10 µg/ml) für 4 Stunden aktiviert wurden (n=4). (F) Wirkung von PGE<sub>2</sub> auf die Expression von CXCL9 oder IL-12p40 durch cDC1, die wie angegeben stimuliert wurden. Die Daten stellen den Z-Score der MFI-Werte aus drei unabhängigen Experimenten dar. (G) Quantifizierung der Aufnahme toter Tumorzellen durch cDC1, gemessen anhand des PKH26-Signals in cDC1, die vor der Ko-Kultur mit verschiedenen Mengen UV-bestrahlter und PKH26-markierter *Ptgs1/Ptgs2<sup>-/-</sup>-BRAF<sup>V600E</sup>*-Tumorzellen 20 Stunden lang mit oder ohne PGE<sub>2</sub> behandelt wurden (n=4). (H) Analyse der Tumorantigen-Kreuzrepräsentation, gemessen durch Färbung SIINFEKL-Peptid-beladener H-2Kb-Moleküle (S8:H-2Kb) auf cDC1 nach 4-stündiger Co-Kultur mit UV-bestrahlten *Ptgs1/Ptgs2<sup>-/-</sup>-BRAF<sup>V600E</sup>*-OVA-Zellen. SIINFEKL (S8)-beladene cDC1 dienten als Positivkontrolle (n=4). Die Daten sind als Mittelwert ± SEM angegeben. \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001; ns, nicht signifikant.

Um festzustellen, wie sich die PGE<sub>2</sub>-vermittelte Einschränkung der Chemokin- und Zytokin-Produktion von cDC1 auf die Steuerung von CD8<sup>+</sup> T Zell Antworten auswirkt, untersuchten wir die Rekrutierung und Stimulation von Effektor CD8<sup>+</sup> T Zellen *in vitro*. Wir stellten fest, dass sowohl die cDC1-vermittelte Rekrutierung durch cDC1 K.M. als auch die Expansion von Effektor CD8<sup>+</sup> T Zellen in Anwesenheit von cDC1 durch PGE<sub>2</sub> deutlich reduziert waren (Abbildung 15A,B). Zudem war das K.M. von aktivierten cDC1, die mit PGE<sub>2</sub> vorbehandelt worden waren, deutlich weniger effizient bei der Förderung der Expansion von Effektor CD8<sup>+</sup> T Zellen durch anti-CD3/CD28 Dynabeads (Abbildung 15C). Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass ein direktes PGE<sub>2</sub> Signaling auf cDC1 durch eine verminderte Chemokin- und Zytokin-Produktion eine effektive Rekrutierung und Expansion von Effektor CD8<sup>+</sup> T Zellen verhindert.



**Abbildung 15: Dysfunktionale cDC1 können CD8<sup>+</sup> T Zellen nicht effektiv rekrutieren und restimulieren.**

(A) Migration polyklonaler Effektor CD8<sup>+</sup> T Zellen in konditioniertes Medium (K.M.) von cDC1, die wie in Abbildung 14A behandelt wurden (n=4). (B) Quantifizierung der OVA-spezifischen Effektor OT-I CD8<sup>+</sup> T Zellen nach 48-stündiger Co-Kultur mit cDC1, die mit dem OVA-Peptid SIINFEKL (S8) beladen wurden, nach Behandlung wie in Abbildung 14A (n=4). (C) Quantifizierung der Effektor OT-I CD8<sup>+</sup> T Zellen 48 Stunden nach Anti-CD3/CD28-Stimulation in Anwesenheit oder Abwesenheit von CM aus cDC1, die wie in Abbildung 14A behandelt wurden (n=4). Die Daten sind als Mittelwert ± SEM angegeben. \*\*p < 0,01, \*\*\*\*p < 0,0001.

## 2.6 PGE<sub>2</sub> reguliert die cDC1-Dysfunktion auf transkriptioneller Ebene

Um zu verstehen, wie es zu einer solch selektiven Einschränkung der cDC1 kommen kann, ohne dass dabei eine Aktivierung der Zellen verhindert wird, fragten wir uns, inwieweit die PGE<sub>2</sub>-vermittelte cDC1-Dysfunktion transkriptionell reguliert wird und begannen mit der Quantifizierung von RNA-Transkripten (RT-qPCR) aktivierter und nicht aktivierter cDC1 nach der Exposition mit PGE<sub>2</sub> (Abbildung 16A). Da die Herunterregulation von CXCL9 und IL-12,

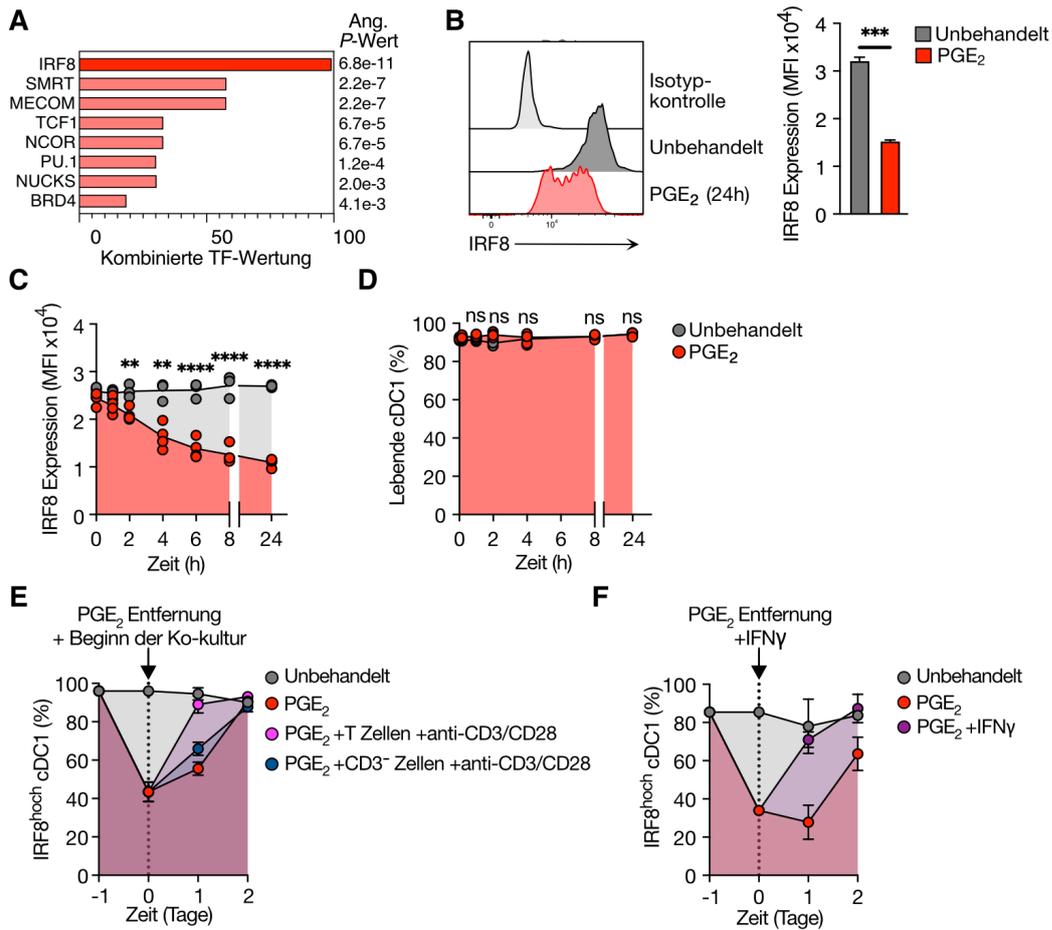
die wir in intratumoralen sowie direkt behandelten cDC1 beobachtet hatten, auch auf mRNA-Ebene konserviert zu sein schien, untersuchten wir, ob diese spezifischen Veränderungen Teil eines größeren Genregulationsprogrammes sind. Um das zu analysieren, profilierten wir entsprechend behandelte cDC1 mittels RNA-Sequenzierung (RNA-Seq). Die Hauptkomponentenanalyse (Principle Component Analysis, PCA) zeigte, dass sich die Gentranskription in cDC1, die vor der Aktivierung PGE<sub>2</sub> ausgesetzt waren, klar von cDC1, die ohne eine solche Behandlung aktiviert wurden, unterschied, was auf ein verändertes Transkriptionsprogramm hinweist (Abbildung 16B). Dennoch unterschieden sich beide aktivierten cDC1-Transkriptionsprogramme deutlich von ihren nicht aktivierten Pendanten, was darauf hindeutet, dass PGE<sub>2</sub> die Expression der meisten aktivierungsinduzierten Gene unbeeinflusst lässt. Diese Annahme wurde durch eine detailliertere Analyse der PGE<sub>2</sub>-abhängigen Veränderungen von aktivierungsinduzierten Genen bestätigt, welche ergab, dass nur 133 der 1571 aktivierungsinduzierten Gene durch PGE<sub>2</sub>-Exposition unterschiedlich reguliert wurden (Abbildung 16C). Gene, die für typische DC-Aktivierungsmarker kodieren, sowie Gene, die mit der Antigenverarbeitung und -präsentation oder der DC-Migration in Verbindung stehen, waren hoch exprimiert und nicht differenziell reguliert (Abbildung 16D). Um eine Kernsignatur für PGE<sub>2</sub>-vermittelte Dysfunktion zu extrahieren, konzentrierten wir unsere Analysen auf aktivierungsinduzierte Gene, deren Hochregulierung durch PGE<sub>2</sub> gehemmt wurde. Die Analyse der von PGE<sub>2</sub> gehemmten Signalwege mittels *Metascape* ergab, dass diese Kernsignatur mit Genen angereichert war, die relevant für die Chemokin- und Zytokinproduktion und -signalisierung sind (Abbildung 16E). Eine Genset-Anreicherungsanalyse (GSEA) bestätigte die selektive Anreicherung von Zytokin- und Chemokin-Genen im Vergleich zu Genen, die an Prozessen wie Antigenverarbeitung, DC-Maturierung und Zellmigration beteiligt sind (Abbildung 16F). Zusammengefasst deuten diese Daten darauf hin, dass das vom Tumor stammende PGE<sub>2</sub> das Transkriptionsprogramm, welches in cDC1 bei ihrer Aktivierung ausgelöst wird, selektiv verändert und dadurch cDC1 in einen dysfunktionalen Zustand versetzt, sodass sie nicht in der Lage sind CD8<sup>+</sup> T Zell Immunantworten in Tumoren effektiv zu steuern.



## 2.7 PGE<sub>2</sub>-abhängiger Verlust von IRF8 fördert cDC1-Dysfunktion

Die Funktionalität aktivierter cDC1 wird von einem streng kontrollierten Netzwerk an Transkriptionsfaktoren bestimmt (siehe 1.2.4). Um herauszufinden wie sich die PGE<sub>2</sub>-vermittelte Dysfunktion mechanistisch erklären lässt, führten wir eine TF Analyse mittels EnrichR durch. Diese Analyse ergab, dass der größte Teil der durch PGE<sub>2</sub> veränderten Gene durch den TF IRF8 reguliert werden (Abbildung 17A). Um die Hypothese, dass PGE<sub>2</sub> cDC1 selektiv daran hindert, IRF8-Zielgene bei Aktivierung hochzuregulieren, zu testen, analysierten wir, inwieweit PGE<sub>2</sub> die IRF8-Expression direkt beeinflusst. Wir stellten fest, dass eine PGE<sub>2</sub> Behandlung in cDC1 tatsächlich eine starke und schnelle Herabregulierung der IRF8-Proteinexpression auslöste (Abbildung 17B,C). Außerdem stellten wir fest, dass PGE<sub>2</sub> trotz seiner deutlichen Beeinflussung der IRF8-Expression dabei keinen Einfluss auf das Überleben der cDC1 *in vitro* hatte (Abbildung 17D).

Um zu analysieren, wie permanent diese transkriptionelle Beeinflussung der cDC1 ist, untersuchten wir die Veränderung der IRF8-Expression nach Entfernung des PGE<sub>2</sub>. Wir stellten fest, dass nach zweitägiger Kultivierung der cDC1 in PGE<sub>2</sub>-freiem Medium eine hohe IRF8-Expression festzustellen war (Abbildung 17E). Bemerkenswert ist, dass eine Ko-Kultur mit T Zellen, die aus tdLK isoliert und mit Anti-CD3/CD28 stimuliert worden waren, die Heraufregulation von IRF8 beschleunigte. Eine Ko-Kultur der PGE<sub>2</sub>-behandelten cDC1 mit CD3<sup>+</sup> Zellen aus dem tdLK hatte diesen Effekt nicht (Abbildung 17E). Passend dazu konnte auch eine direkte Behandlung der cDC1 mit IFN $\gamma$ , welches aktivierte T Zellen im tdLK in hohen Mengen produzieren, die IRF8-Expression in cDC1 retten. Es lässt sich daraus schließen, dass die PGE<sub>2</sub>-vermittelte Herunterregulation von IRF8 in cDC1 einen langanhaltenden Effekt hat, der aber in IFN $\gamma$  reichen Umgebungen aufgehoben wird, wie beispielsweise tdLK.

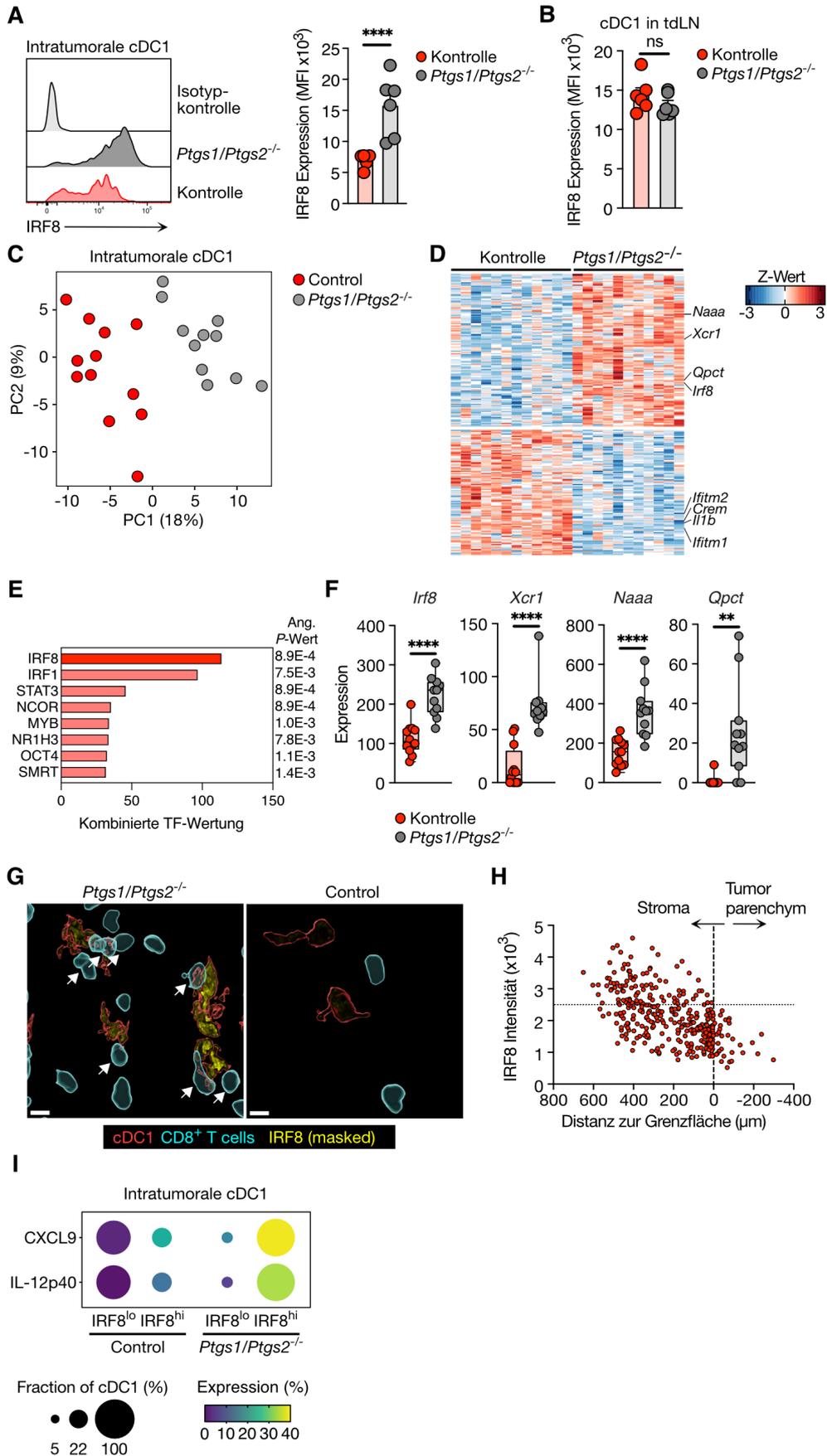


**Abbildung 17: PGE<sub>2</sub> Exposition reguliert in cDC1 den Transkriptionsfaktor IRF8 herunter.**

(A) Vorhersage der Upstream-Transkriptionsfaktoren durch EnrichR auf der Grundlage von Genen, die durch RNA-seq als beeinträchtigt in Poly I:C-stimulierten cDC1 nach Exposition mit PGE<sub>2</sub> identifiziert wurden. (B) IRF8-Expression in cDC1, die mit oder ohne PGE<sub>2</sub> (100ng/ml) für 24 Stunden inkubiert wurden (n=4). (C) Analyse der IRF8-Expression in cDC1 nach Behandlung mit PGE<sub>2</sub> (100ng/ml) für die angegebenen Zeiträume (n=4). (D) CD103<sup>+</sup> cDC1 aus *in vitro* Kulturen wurden mittels Durchflusszytometrie sortiert und mit oder ohne PGE<sub>2</sub> (100ng/ml) für die angegebenen Zeiträume inkubiert. Durchflusszytometrische Analyse des Überlebens von cDC1 durch LIVE/DEAD-Färbung. (n=3). (E, F) Analyse der IRF8-Expression in cDC1, die mit oder ohne PGE<sub>2</sub> vorbehandelt wurden, bevor das Medium abgewaschen und sie in PGE<sub>2</sub>-freiem Medium rekultiviert wurden, in Gegenwart von (E) CD3<sup>+</sup> T Zellen oder CD3<sup>-</sup> Zellen, die aus dem tdLK von WT Mäusen mit Kontroll-BRAF<sup>V600E</sup> Tumoren isoliert wurden, sowie anti-CD3/CD28 Dynabeads oder (F) IFN $\gamma$  (100ng/ml) (n=3). Die Daten in (B) sind als Mittelwert  $\pm$  SEM, die Daten in C,D als Mittelwert und die Daten in E,F als Mittelwert  $\pm$  SD angegeben. \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001

## 2.8 Tumoren kontrollieren die cDC1-Dysfunktion durch PGE<sub>2</sub>-vermittelte IRF8 Regulation

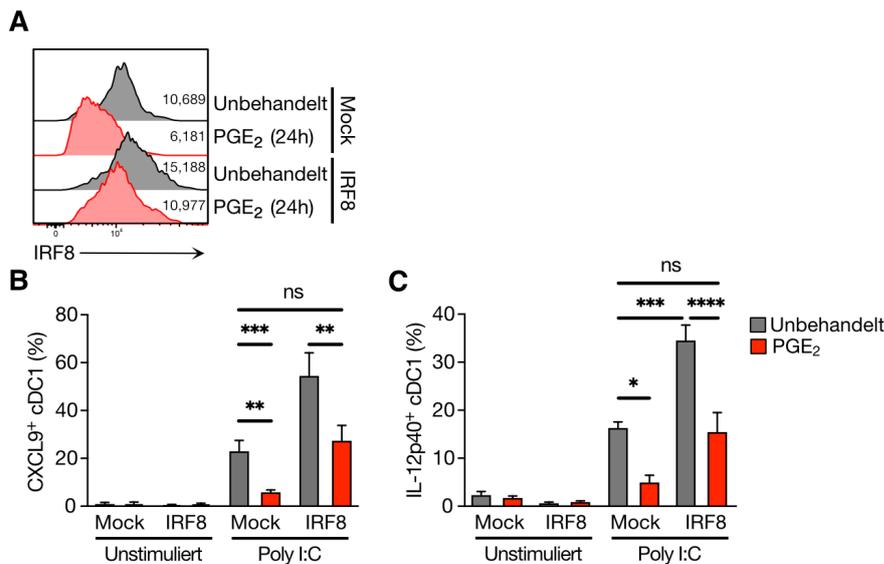
Wir dehnten diese Analysen auf intratumorale cDC1 aus und fanden eine deutlich reduzierte IRF8-Proteinexpression in cDC1 innerhalb von BRAF<sup>V600E</sup>-Tumoren (Abbildung 18A), verglichen mit cDC1 in PGE<sub>2</sub>-defizienten Ptgs1/Ptgs2<sup>-/-</sup>-BRAF<sup>V600E</sup>-Tumoren und in tdLK (Abbildung 18A,B). Wir wiederholten zudem unsere RNA-Seq-Analyse mit cDC1, die aus Kontroll- und Ptgs1/Ptgs2<sup>-/-</sup>-BRAF<sup>V600E</sup>-Tumoren isoliert wurden. Ähnlich wie cDC1, die PGE<sub>2</sub> *in vitro* ausgesetzt waren, zeigten cDC1, die aus PGE<sub>2</sub>-produzierenden BRAF<sup>V600E</sup>-Kontroll-Tumoren isoliert wurden, ein verändertes Genexpressionsprofil (Abbildung 18C,D), das durch die Herunterregulierung von *Irf8* und IRF8-abhängigen cDC1-Genen gekennzeichnet war (Abbildung 18E,F). Auch konfokale Mikroskopie bestätigte uns eine verringerte IRF8-Expression in intratumoralen cDC1 innerhalb der PGE<sub>2</sub>-produzierenden Tumoren. Zudem stellten wir fest, dass dies mit dem Fehlen von cDC1-CD8<sup>+</sup> T Zell Interaktionen (Abbildung 18G) und der Nähe von cDC1 zu PGE<sub>2</sub>-produzierenden Tumorzellen verbunden war (Abbildung 18H). Der Verlust von IRF8 in cDC1 in PGE<sub>2</sub>-produzierenden Tumoren korrelierte außerdem mit einer beeinträchtigten CXCL9- und IL-12-Produktion und der Tatsache, dass die wenigen cDC1, die IRF8 nicht verloren hatten, die Fähigkeit behielten, CXCL9 und IL-12 zu produzieren (Abbildung 18I).



**Abbildung 18: PGE<sub>2</sub>-produzierende Tumoren regulieren cDC1-Dysfunktion durch IRF8 Herunterregulation.**  
(Fortsetzung der Legende auf der nächsten Seite)

**(A)** Durchflusszytometrische Analyse der intrazellulären IRF8-Expression in cDC1 aus Kontroll- oder Ptg1/Ptg2<sup>-/-</sup>-BRAF<sup>V600E</sup>-Tumoren isoliert wurden (n=6). **(B)** IRF8-Expression in migratorischen CD103<sup>+</sup> cDC1 in tdLK von WT Mäusen 6 Tage nach Inokulation mit Kontroll- oder Ptg1/Ptg2<sup>-/-</sup>-BRAF<sup>V600E</sup>-Tumoren (n=6 pro Gruppe). **(C)** PCA basierend auf den 1000 am häufigsten exprimierten Genen in cDC1 aus Kontroll- oder Ptg1/Ptg2<sup>-/-</sup>-BRAF<sup>V600E</sup>-Tumoren 6 Tage nach Tumortransplantation (n=11-12). **(D)** Heatmap mit allen differenziell exprimierten Genen. **(E)** Vorhersage der Upstream-Transkriptionsfaktoren durch EnrichR auf der Grundlage von Genen, die in cDC1 aus Kontroll-BRAF<sup>V600E</sup> Tumoren herunterreguliert wurden. **(F)** Expression von Irf8 und IRF8-abhängigen cDC1-Genen aus (D). **(G)** Konfokale Mikroskopie-basierte Visualisierung der IRF8-Expression in cDC1, die in einem Ptg1/Ptg2<sup>-/-</sup>-BRAF<sup>V600E</sup> Tumor (links) oder cDC1 in einem Kontroll-BRAF<sup>V600E</sup> Tumor (rechts) mit CD8<sup>+</sup> T Zellen clustern. Pfeile markieren CD8<sup>+</sup> T Zellen, die mit cDC1 in Kontakt stehen. Maßstabsbalken 10µm (repräsentativ für n=3 Replikate). **(H)** Mikroskopie-basierte Analyse der IRF8-Expression im Verhältnis zur cDC1-Lokalisierung in einem Kontroll-BRAF<sup>V600E</sup>-ZsG-Tumor(repräsentativ für 3 Proben). **(I)** Quantitative Analyse der CXCL9- und IL12p40-Expression durch IRF8 hoch- (IRF8<sup>hi</sup>) und IRF8 niedrig- (IRF8<sup>lo</sup>) exprimierende cDC1 in PGE<sub>2</sub>-produzierenden Kontroll- oder PGE<sub>2</sub>-defizienten Ptg1/Ptg2<sup>-/-</sup>-BRAF<sup>V600E</sup>-Tumoren an Tag 6 nach Tumortransplantation in WT Mäuse. Die Daten in (A,B) sind als Mittelwert ± SEM und in (F) als SEM angegeben. Die Fehlerbalken in (F) entsprechen den Minimal- und Maximalwerten. \*\*p < 0,01, \*\*\*\*p < 0,0001, ns, nicht signifikant.

Schließlich versuchten wir mit Hilfe eines Gain-of-Function-Experiments festzustellen, ob eine artifizell verstärkte IRF8-Expression die PGE<sub>2</sub>-vermittelte cDC1-Dysfunktion verhindern kann. Wir transduzierten dazu cDC1 retroviral, damit diese IRF8 überexprimieren. Transduzierte cDC1 waren dadurch teilweise resistent gegen den Verlust von IRF8 bei PGE<sub>2</sub> Exposition und behielten IRF8 Mengen bei, die identisch mit denen von Mock-transduzierten Zellen waren, welche unter PGE<sub>2</sub>-freien Bedingungen kultiviert wurden (Abbildung 19A). Diese Aufrechterhaltung der IRF8-Expression rettete die Fähigkeit der PGE<sub>2</sub>-exponierten cDC1, CXCL9 und IL-12 nach Poly I:C-vermittelter Stimulierung in ähnlichen Mengen zu produzieren, wie es unbehandelte, mock-transduzierte cDC1 taten (Abbildung 19B,C). Allerdings stellten wir fest, dass PGE<sub>2</sub> trotz der Überexpression die IRF8-Expression regulieren konnte. Insgesamt deuten diese Daten darauf hin, dass die PGE<sub>2</sub>-induzierte cDC1-Dysfunktion auf einer selektiven Beeinträchtigung der IRF8-Aktivität beruht.



**Abbildung 19: IRF8-überexprimierende cDC1 sind teilweise resistent gegenüber einer PGE<sub>2</sub>-vermittelter Dysfunktion.**

**(A)** IRF8-Expressionsniveaus in IRF8-transduzierten oder mock-transduzierten cDC1 nach Behandlung mit oder ohne PGE<sub>2</sub> für 24 Stunden. Die Zahlen stellen MFI-basierte Expressionswerte dar (Repräsentativ für n=2 Replikate). (Fortsetzung der Legende auf der nächsten Seite)

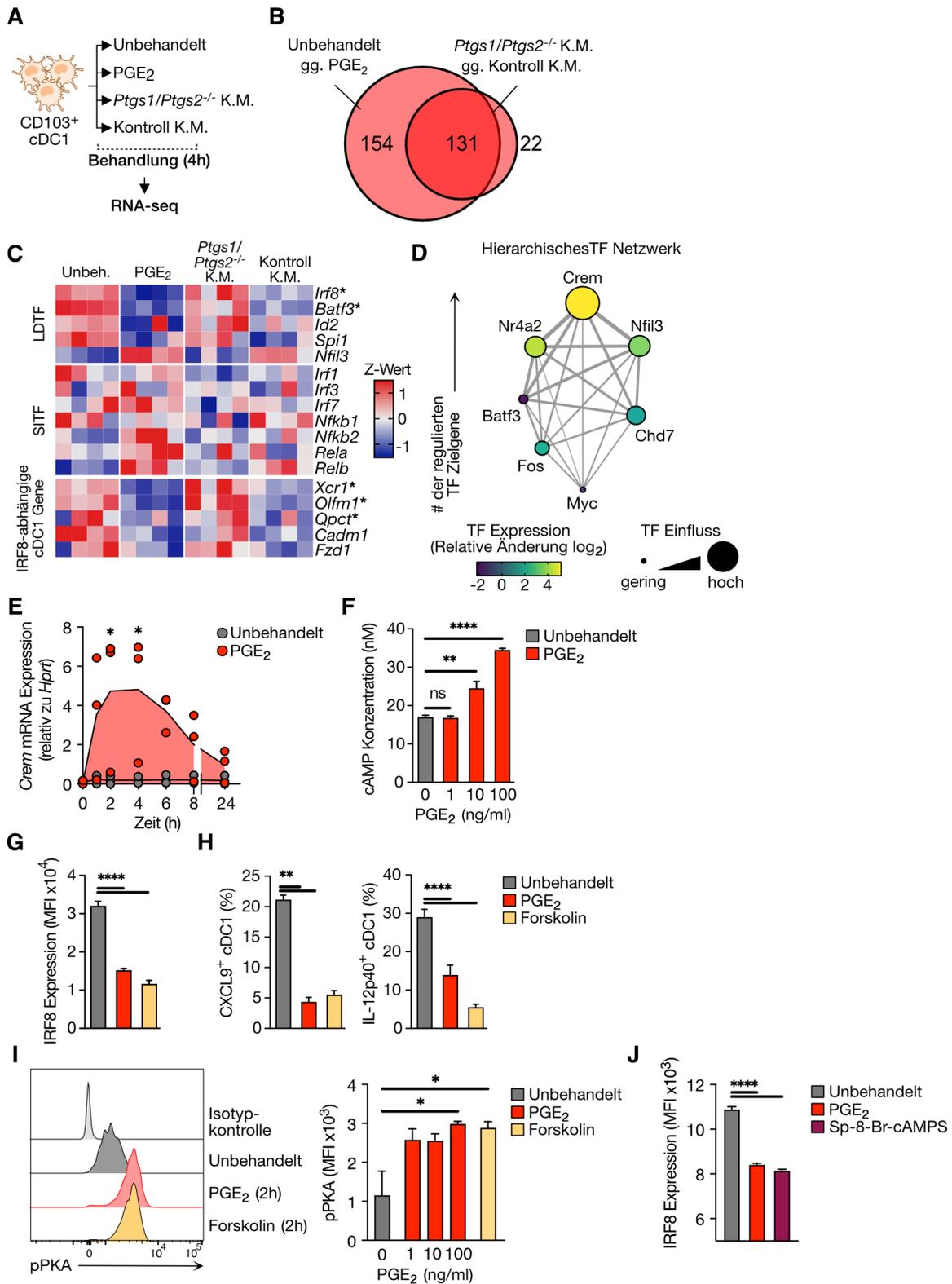
**(B,C)** Analyse der **(B)** CXCL9- und **(C)** IL-12p40-Produktion durch IRF8-transduzierte oder mock-transduzierte cDC1 nach Vorbehandlung mit PGE<sub>2</sub> und Aktivierung mit Poly I:C (n=2). Die Daten in (B, C) sind als Mittelwert ± SD angegeben. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001; ns, nicht signifikant.

## 2.9 PGE<sub>2</sub> aktiviert den cAMP Signalweg in cDC1

Um Näheres über den Mechanismus dieser PGE<sub>2</sub>-vermittelten Herunterregulation von IRF8 zu erfahren, untersuchten wir die unmittelbaren transkriptionellen Veränderungen in cDC1 nach Kurzzeitexposition mit PGE<sub>2</sub>, ohne die Zellen dabei zu aktivieren. Um PGE<sub>2</sub>-unspezifische Effekte der Behandlung auf die Genregulation auszuschließen, behandelten wir die Zellen zudem mit Tumorzell-K.M. von PGE<sub>2</sub>-produzierenden und nicht-produzierenden BRAF<sup>V600E</sup>-Tumorzellen (Abbildung 20A). Synthetisches PGE<sub>2</sub> und K.M. von PGE<sub>2</sub>-produzierenden BRAF<sup>V600E</sup>-Tumorzellen induzierten dabei vergleichbare Transkriptionsveränderungen in cDC1 (Abbildung 20B), einschließlich der Herunterregulierung von *Irf8* und IRF8-abhängiger Zielgene (Abbildung 20C)<sup>71</sup>. Wir stellten zudem eine verringerte Expression der cDC1 spezifischen LDTF BATF3 und ID2 fest, was auf die Rolle von IRF8 als Hauptregulator der cDC1-Identität zurückzuführen ist<sup>67,71</sup>. (Abbildung 20C). Die Expression anderer SITF (*IRF1*, *IRF3* und *NFκB*) wurde durch eine PGE<sub>2</sub>-Exposition nicht verändert (Abbildung 20C), was mit der Annahme übereinstimmt, dass PGE<sub>2</sub> nicht generell die Reaktionsfähigkeit auf aktivierende Immunstimuli unterdrückt, sondern selektiv in die IRF8-abhängigen cDC1-Funktionen eingreift.

Mit Hilfe der in beiden Vergleichen identifizierten Zielgene von PGE<sub>2</sub> versuchten wir nun die von PGE<sub>2</sub> beeinflussten Signalwege zu identifizieren, die zu einer cDC1-Dysfunktion führen. Eine hierarchische TF-Netzwerkanalysen prognostizierte den *cAMP-responsive element modulator* (CREM) als primären Treiber der beobachteten Transkriptionsveränderungen in cDC1 nach Exposition mit PGE<sub>2</sub>, was auf eine Beteiligung der cAMP-Signalübertragung hindeutet (Abbildung 20D). Diese Vorhersage wurde durch die Beobachtung bestätigt, dass mit PGE<sub>2</sub> behandelte cDC1 eine unmittelbare Hochregulierung von CREM (Abbildung 20E) und einen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration (Abbildung 20F) aufwiesen. Um die Rolle des cAMP-Signalübertragung bei der Regulation der cDC1-Dysfunktion näher zu untersuchen, behandelten wir cDC1 mit dem Adenylylcyclase-Agonisten Forskolin. Dieses Experiment bestätigte, dass eine direkte Aktivierung des cAMP-Signalwegs ausreicht, um eine spezifische cDC1-Dysfunktion auszulösen, eminent durch einen Rückgang der IRF8-Proteinexpression (Abbildung 20G), eine verringerte IL-12- und CXCL9-Produktion (Abbildung 20H) und einen Anstieg der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA)-Phosphorylierung (Abbildung 20I). Auch eine cAMP-unabhängige Aktivierung der PKA durch Sp-8-Br-cAMPS führte zu einer signifikanten Herunterregulierung der IRF8-Expression in

cDC1 (Abbildung 20J). Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass PGE<sub>2</sub> über den cAMP-PKA-Signalweg eine cDC1-Dysfunktion auslöst.



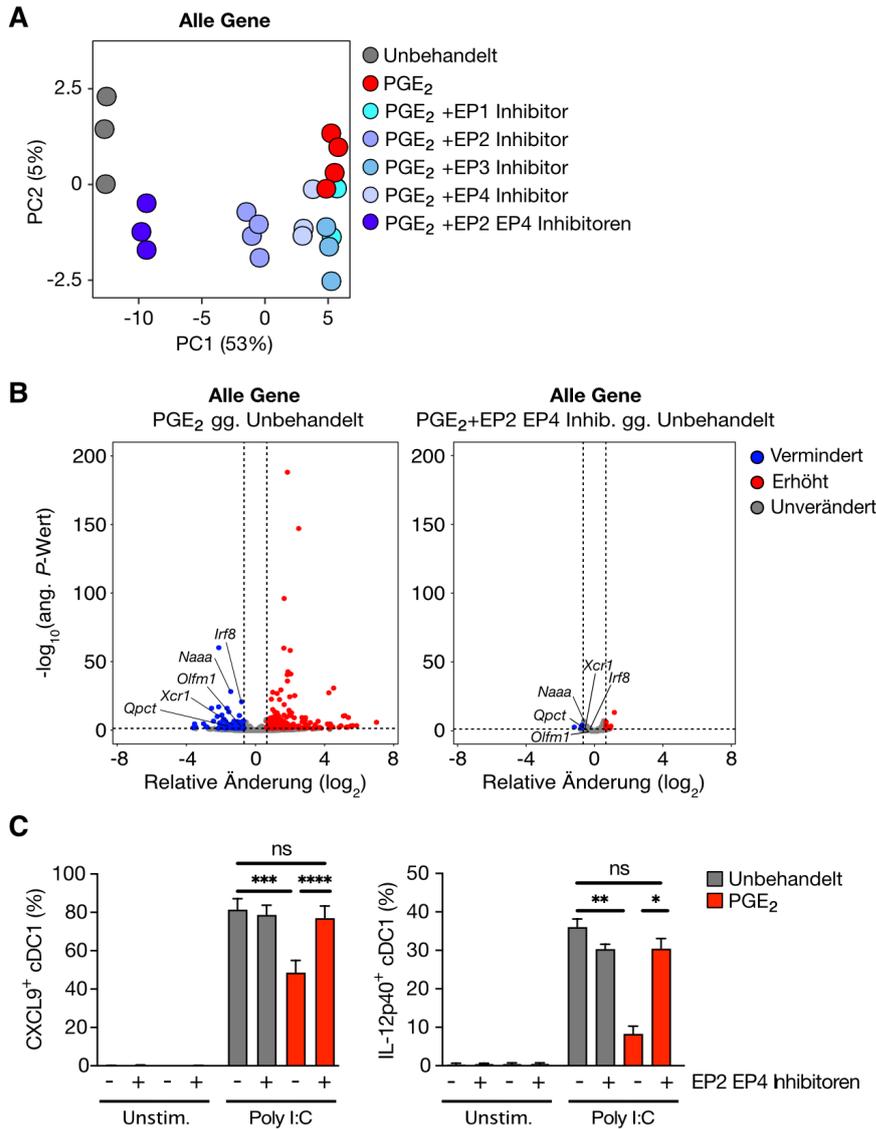
**Abbildung 20: Die PGE<sub>2</sub>-induzierte Dysfunktion in cDC1 wird über den cAMP Signalweg vermittelt.**

(A) Experimenteller Aufbau für (B-D). (B) Venn-Diagramm von Genen, die sowohl durch PGE<sub>2</sub> als auch K.M. von Kontroll-Tumorzellen unterschiedlich hoch- oder herunterreguliert werden. (C) Heatmap mit Z-transformierten Genexpressionswerten für die angegebenen Gene. Gene, die in PGE<sub>2</sub>-behandelten cDC1 signifikant herunterreguliert wurden sind mit einem Asterisk markiert. (Fortsetzung der Legende auf der nächsten Seite)

LDTF, *Lineage-defining transcription factors*. SITF, *Stimulation-induced transcription factors* (n=4). **(D)** Hierarchisches Transkriptionsfaktornetzwerk, basierend auf Genexpressionsdaten für cDC1, die PGE<sub>2</sub> oder K.M. von Kontroll-Tumorzellen ausgesetzt waren oder nicht. **(E)** Induktion der Crem-mRNA-Expression in cDC1 bei Exposition mit PGE<sub>2</sub> (100ng/ml) (n=3). **(F)** Analyse der cAMP-Konzentration in cDC1 nach Behandlung mit den angegebenen Konzentrationen an PGE<sub>2</sub> für 30 Minuten (n=3). **(G)** Durchflusszytometrische Analyse der intrazellulären IRF8-Expression in cDC1, die 20 Stunden lang mit PGE<sub>2</sub> (100ng/ml) oder Forskolin (5µM) behandelt wurden (n=4). **(H)** Auswirkung der Behandlung mit PGE<sub>2</sub> oder Forskolin auf die Produktion von CXCL9 und IL-12p40 durch cDC1 nach Poly I:C-Stimulation (n=4). **(I)** Durchflusszytometrische Analyse der PKA-Phosphorylierung in cDC1, die 2 Stunden lang mit PGE<sub>2</sub> (100ng/ml) oder Forskolin (5µM) behandelt wurden (n=4). **(J)** Analyse der IRF8-Expression in cDC1, die 20 Stunden lang mit PGE<sub>2</sub> (100ng/ml) oder Sp-8-Br-cAMPs (10µM) behandelt wurden (n=4). Die Daten in (F) sind als Mittelwert ± SD, die Daten in (G-J) sind als Mittelwert ± SEM angegeben. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*\*p < 0,0001; ns, nicht signifikant.

## 2.10 PGE<sub>2</sub> wirkt auf cDC1 über die Rezeptoren EP2 und EP4

Die PGE<sub>2</sub> Signalübertragung kann durch vier verschiedene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, EP1, EP2, EP3 und EP4, vermittelt werden, von denen EP2 und EP4 beide den cAMP Signalweg induzieren können (siehe Abbildung 8). Um zu testen ob eine kombinierte Inhibition von EP2 und EP4 die durch PGE<sub>2</sub> induzierten Transkriptionsveränderungen wirksam verhindert, analysierten wir das Transkriptom von cDC1, die PGE<sub>2</sub> in Abwesenheit oder Anwesenheit von selektiven EP-Inhibitoren ausgesetzt waren, mittels RNA Sequenzierung. Die Analyse der globalen Genexpressionsveränderungen zeigte, dass die kombinierte Blockade in der Tat einen PGE<sub>2</sub>-Effekt verhinderte, während die Blockade eines der beiden Rezeptoren alleine oder die Blockade von EP1 oder EP3 dies nicht tat (Abbildung 21A). In Übereinstimmung mit unseren bisherigen Analysen stellten wir fest, dass die duale EP2- und EP4-Blockade den IRF8-Verlust und die Herunterregulierung IRF8-spezifischer Zielgene vollständig aufhob (Abbildung 21B). Als Folge daraus waren aktivierte cDC1 bei gleichzeitiger EP2- und EP4-Blockade in der Lage IL-12 und CXCL9 zu exprimieren, obwohl sie zuvor PGE<sub>2</sub> ausgesetzt waren. (Abbildung 21C). Insgesamt zeigen diese Daten, dass die Signalübertragung über die PGE<sub>2</sub>-Rezeptoren EP2 und EP4 zu einer Dysfunktion der cDC1 führt.

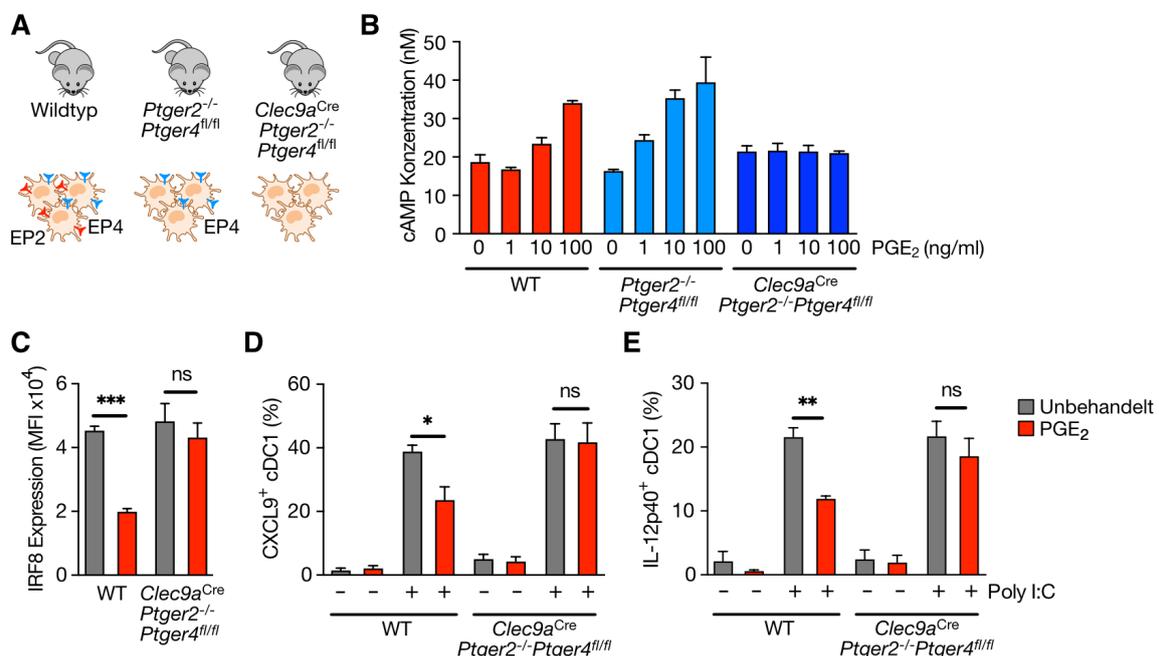


**Abbildung 21: PGE<sub>2</sub> wirkt auf cDC1 sowohl über EP2 als auch EP4.**

(A, B) Genexpressionsanalyse von cDC1, die 4 Stunden lang PGE<sub>2</sub> in Gegenwart oder Abwesenheit der angegebenen EP-Inhibitoren ausgesetzt waren (n=3-4). (A) PCA für alle differenziell exprimierte Gene. (B) Vulkandiagramm, das die Regulierung der Genexpression in cDC1 zeigt, die PGE<sub>2</sub> in Anwesenheit oder Abwesenheit von EP2/EP4-Inhibitoren ausgesetzt waren, im Vergleich zu unbehandeltem cDC1. (C) cDC1 wurden 20 Stunden lang mit PGE<sub>2</sub> (100ng/ml) in Anwesenheit oder Abwesenheit der EP2/EP4-Inhibitoren vorbehandelt und zusätzlich 4 Stunden lang mit Poly I:C stimuliert, bevor die Expression von CXCL9 und IL-12p40 mittels intrazellulärer Färbung durchflusszytometrisch analysiert wurde (n=4). Die Daten in (C) sind als Mittelwert ± SEM angegeben. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001; ns, nicht signifikant.

## 2.11 Gleichzeitige Ablation von Ptger2 und Ptger4 in cDC1 verhindert die cDC1-Dysfunktion

Die Identifizierung der PGE<sub>2</sub>-EP2/EP4-IRF8 Signalübertragung als Mechanismus der cDC1-Dysfunktion warf die Frage auf, ob eine gezielte Blockade von EP2 und EP4 auf cDC1 deren Funktionalität in Tumoren wiederherstellen und dadurch eine schützende anti-tumorale Immunantwort fördern könnte. Um dies zu untersuchen, entwickelten wir das Clec9a<sup>Cre</sup>Ptger2<sup>-/-</sup>Ptger4<sup>fl/fl</sup>-Mausmodell (Abbildung 22A), in dem eine CRE-Rekombinase spezifisch in CLEC9A<sup>+</sup> cDC1 und CLEC9A<sup>+</sup> cDC-Vorläufern<sup>120</sup> die Deletion von EP4 auf einem globalen EP2-defizienten Hintergrund induziert. Um in diesem Modell zu kontrollieren inwieweit bereits die globale EP2-Defizienz PGE<sub>2</sub> Effekte verringert, erzeugten wir zudem Kontrollmäuse, denen nur der EP2-Rezeptor fehlte (Ptger2<sup>-/-</sup>Ptger4<sup>fl/fl</sup>) (Abbildung 22A). Ein ausbleibender Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration nach PGE<sub>2</sub>-Behandlung (Abbildung 22B) zeigte uns, dass die gleichzeitige Ablation der Rezeptoren effektiv und auch notwendig zur Unterbindung der Signalübertragung in cDC1 war. Die Behandlung dieser Rezeptor-defizienten cDC1 zeigte, dass die gleichzeitige EP2- und EP4-Ablation die hemmende Wirkung von PGE<sub>2</sub> auf IRF8-Expression und Funktionalität der cDC1 *in vitro* vollständig aufhob (Abbildung 22C,D,E).

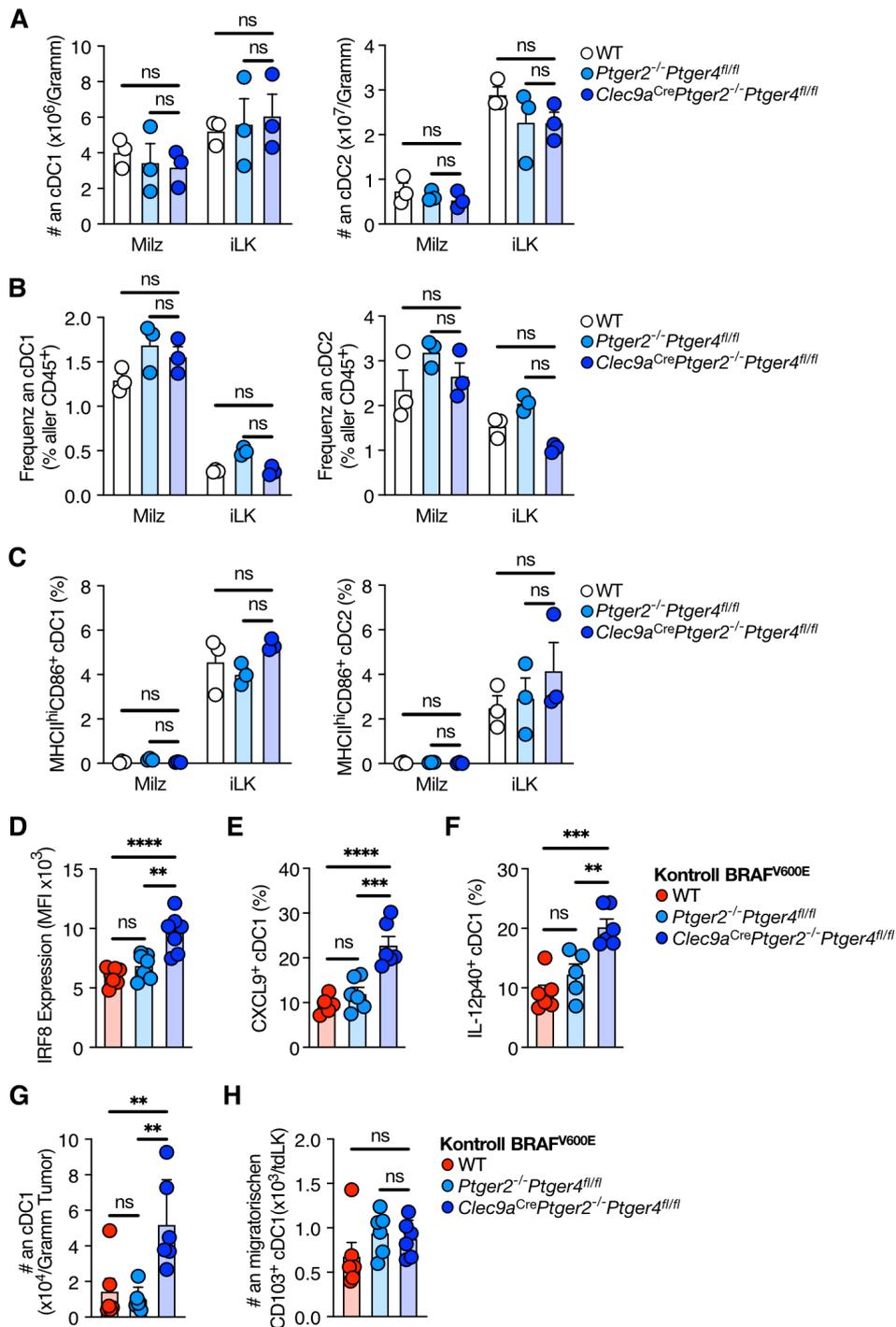


**Abbildung 22: EP2/EP4-defiziente cDC1 sind resistent gegenüber PGE<sub>2</sub>.**

(A) Mausmodelle zur Analyse des Effekts von PGE<sub>2</sub> auf cDC1 über EP2 und EP4. (B) Analyse der cAMP-Konzentrationen in WT, Ptger2<sup>-/-</sup>Ptger4<sup>fl/fl</sup> oder Clec9a<sup>Cre</sup>Ptger2<sup>-/-</sup>Ptger4<sup>fl/fl</sup> cDC1 aus *in vitro* DC-Kulturen nach Behandlung mit den angegebenen PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen für 30 Minuten (n=2). (C-E) WT oder Clec9a<sup>Cre</sup>Ptger2<sup>-/-</sup>Ptger4<sup>fl/fl</sup> cDC1 aus *in vitro* DC-Kulturen wurden mittels Durchflusszytometrie sortiert und mit PGE<sub>2</sub> (100ng/ml) für 20h inkubiert und mittels intrazellulärer Durchflusszytometrie auf (C) Expression von IRF8 oder Produktion von (D) CXCL9 oder (E) IL-12p40 nach zusätzlicher Stimulation mit Poly I:C für 4 Stunden analysiert (n=4). Die Daten in (B) sind als Mittelwert ± SD, die Daten in (C-E) als Mittelwert ± SEM angegeben. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, ns, nicht signifikant.

## 2.12 EP2/EP4-Defizienz verhindert die Dysfunktion intratumoraler cDC1

Um nun den Einfluss von PGE<sub>2</sub> auf intratumorale cDC1 in vivo zu analysieren, untersuchten wir die anti-tumorale Immunantwort gegenüber PGE<sub>2</sub>-produzierenden Tumoren im Clec9a<sup>Cre</sup>Ptger2<sup>-/-</sup>Ptger4<sup>fl/fl</sup>-Mausmodell. Dafür kontrollierten wir vorerst inwieweit die genetische Ablation der beiden Rezeptoren einen Einfluss auf Anzahl, Zusammensetzung sowie Aktivierung der cDC in diesen Tieren hatte. Wir konnten nachweisen, dass sowohl Clec9a<sup>Cre</sup>Ptger2<sup>-/-</sup>Ptger4<sup>fl/fl</sup> als auch Ptger2<sup>-/-</sup>Ptger4<sup>fl/fl</sup> Mäuse insgesamt eine unveränderte Anzahl und Zusammensetzung an cDC1 und cDC2 aufwiesen, sowie keine Anzeichen einer abnormalen DC-Aktivierung zeigen (Abbildung 23A,B,C). In diesen Mäusen untersuchten wir nun die Dysfunktion der intratumoralen cDC1 in der TMU. Wir fanden heraus, dass die gleichzeitige Ablation der EP2- und EP4-Rezeptoren zu einer erhöhten IRF8-Expression und einer deutlich verstärkten CXCL9- und IL-12-Produktion der cDC1 in PGE<sub>2</sub>-produzierenden BRAF<sup>V600E</sup>-Tumoren führte, während cDC1 in WT- oder Ptger2<sup>-/-</sup>Ptger4<sup>fl/fl</sup> Mäusen in ihrer Funktionalität eingeschränkt waren (Abbildung 23D,E,F). Clec9a<sup>Cre</sup>Ptger2<sup>-/-</sup>Ptger4<sup>fl/fl</sup> Mäuse wiesen zudem eine erhöhte Anzahl an cDC1 in den Tumoren auf (Abbildung 23G), was dafür spricht, dass der EP2/EP4-Signalweg auch die Akkumulation von cDC1 in der TMU begrenzt. Die Anzahl migratorischer cDC1 in tdLK blieb jedoch unverändert (Abbildung 23H). Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass die PGE<sub>2</sub>-Signalübertragung über die Rezeptoren EP2 und EP4 die lokale Funktion von cDC1 im Tumorgewebe einschränkt.

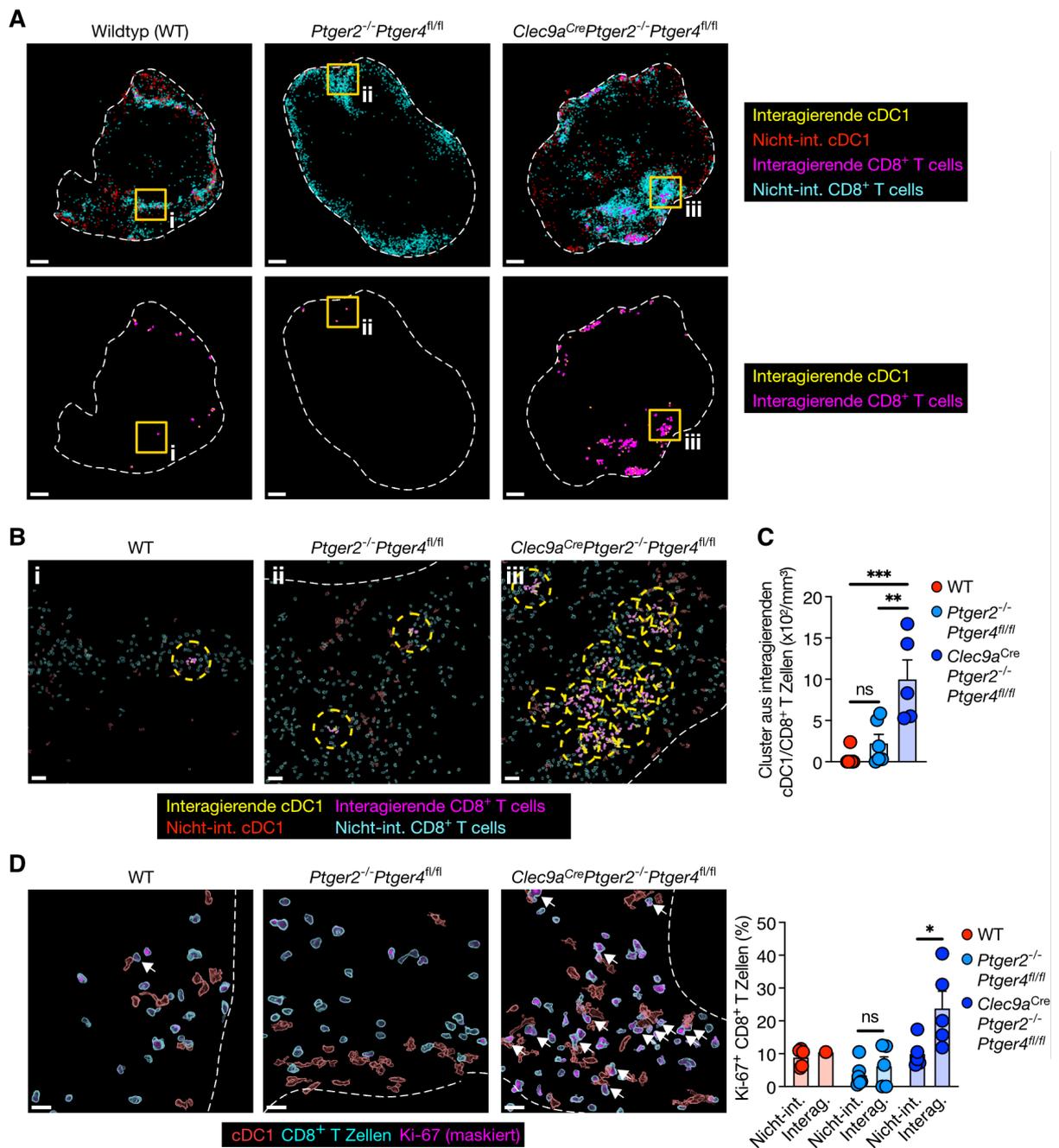


**Abbildung 23: cDC1 in *Clec9a<sup>Cre</sup>Ptger2<sup>-/-</sup>Ptger4<sup>fl/fl</sup>* Mäusen sind Resistent gegenüber PGE<sub>2</sub> in vivo.**

(A-C) Durchflusszytometrische Analyse der cDC-Untergruppen in Milz und Inguinalen Lymphknoten (iLK) von WT, *Ptger2<sup>-/-</sup>Ptger4<sup>fl/fl</sup>* und *Clec9a<sup>Cre</sup>Ptger2<sup>-/-</sup>Ptger4<sup>fl/fl</sup>* Mäusen (n=3). (A) Quantifizierung der Zellzahlen, (B) Häufigkeit der Immunzellen, (C) Anteil der aktivierten MHCII<sup>hi</sup>CD86<sup>+</sup> Zellen. (D-F) WT, *Ptger2<sup>-/-</sup>Ptger4<sup>fl/fl</sup>* oder *Clec9a<sup>Cre</sup>Ptger2<sup>-/-</sup>Ptger4<sup>fl/fl</sup>* Mäuse wurden mit  $2 \times 10^6$  PGE<sub>2</sub> produzierenden Kontroll-BRAF<sup>V600E</sup> Melanomzellen inokuliert und intratumorale cDC1 wurden 6 Tage später mittels Durchflusszytometrie auf die Expression von (D) intrazellulärem IRF8 oder (E) CXCL9 oder (F) IL-12p40 Produktion untersucht (n=5-7 pro Gruppe). (G, H) WT-, *Ptger2<sup>-/-</sup>Ptger4<sup>fl/fl</sup>* oder *Clec9a<sup>Cre</sup>Ptger2<sup>-/-</sup>Ptger4<sup>fl/fl</sup>* Mäusen wurden s.c.  $2 \times 10^6$  Kontroll-BRAF<sup>V600E</sup> Tumorzellen injiziert und 6 Tage später durchflusszytometrisch analysiert. (G) Quantifizierung von cDC1 in Tumoren und (H) migratorische CD103<sup>+</sup> cDC1 in tdLK (n=6 pro Gruppe). Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001 ns, nicht signifikant.

### 2.13 EP2/EP4-defiziente cDC1 sind in der Lage CD8<sup>+</sup> T Zell Antworten in der TMU effektiv zu steuern

Ausgehend von der Erkenntnis, dass der Verlust von EP2 und EP4 in cDC1 ihre Dysfunktion in PGE<sub>2</sub>-produzierenden Tumoren verhindert, untersuchten wir nun ihre Fähigkeit, CD8<sup>+</sup> T Zell Antworten in PGE<sub>2</sub>-produzierenden Tumoren zu steuern. Dazu analysierten wir Interaktionen zwischen cDC1 und CD8<sup>+</sup> T Zellen in der TMU früher Kontroll-BRAF<sup>V600E</sup> Tumoren sechs Tage nach Transplantation. Die Ergebnisse zeigten eine Wiederherstellung der cDC1-CD8<sup>+</sup> T Zell Ansammlungen in Clec9a<sup>Cre</sup>Ptger2<sup>-/-</sup>Ptger4<sup>fl/fl</sup> Mäusen (Abbildung 24A,B,C). Die Zunahme der cDC1-CD8<sup>+</sup> T Zell Interaktionen korrelierte zudem mit einer deutlich erhöhten Ki-67-Expression der intratumoralen CD8<sup>+</sup> T Zellen (Abbildung 24D), ein Hinweis auf deren verstärkte Proliferation und Aktivierung. Der alleinige Mangel von EP2 hingegen hatte keinen Einfluss auf Positionierung oder Proliferation der CD8<sup>+</sup> T Zellen in PGE<sub>2</sub>-produzierenden Tumoren, wie die Analyse der Ptger2<sup>-/-</sup>Ptger4<sup>fl/fl</sup> Mäusen zeigte. (Abbildung 24A-D). Insgesamt deuten diese Daten darauf hin, dass der gleichzeitige Verlust von EP2 und EP4 in cDC1 deren Fähigkeit wiederherstellt, die Positionierung und Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T Zellen innerhalb der TMU zu regulieren.



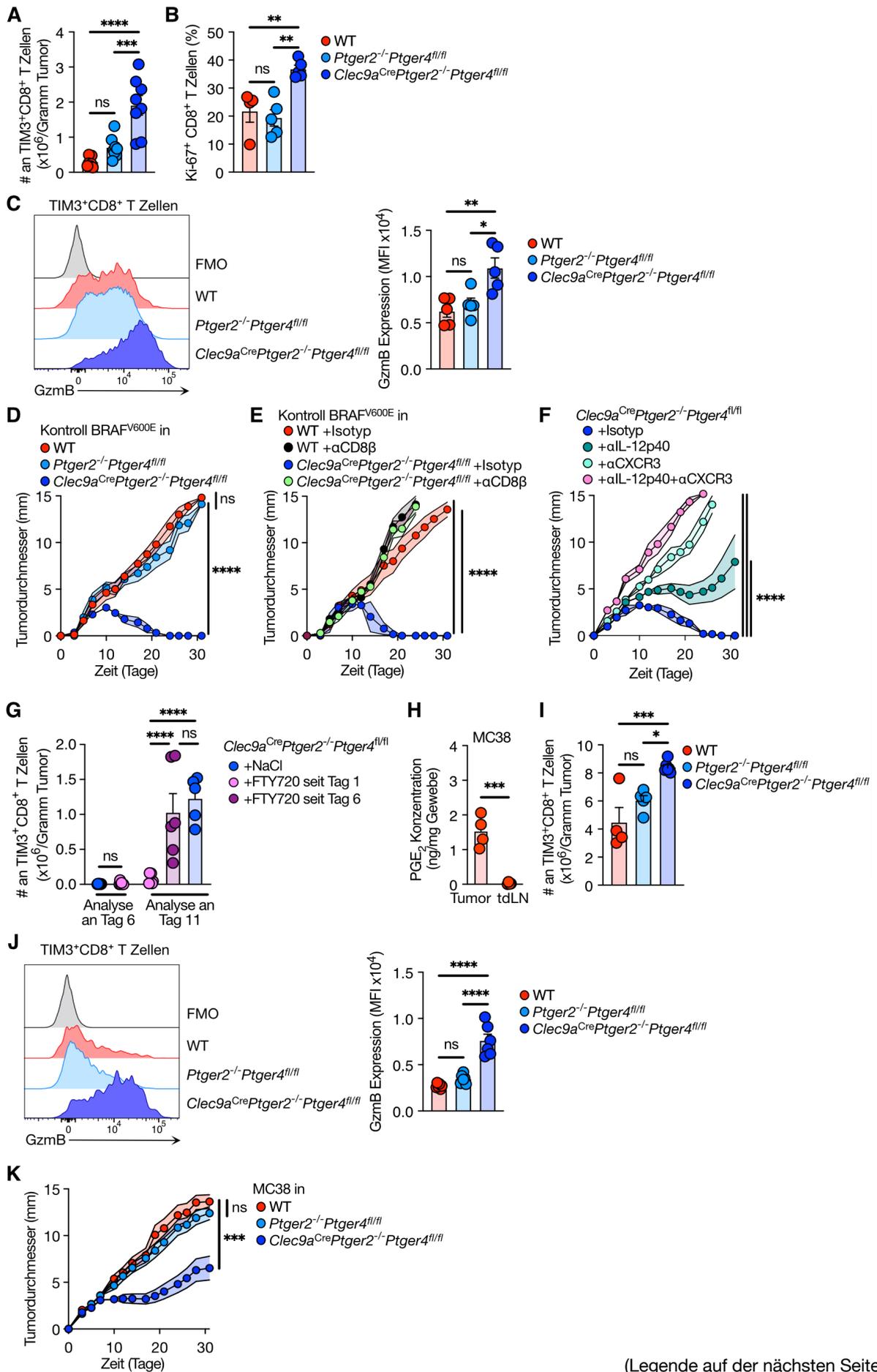
**Abbildung 24: EP2/EP4 defiziente cDC1 können die Positionierung und Aktivierung intratumoraler CD8<sup>+</sup> T Zell Antworten in PGE<sub>2</sub>-produzierenden Tumoren steuern.**

(A-D) Analyse von cDC1-CD8<sup>+</sup> T Zell Interaktionen in PGE<sub>2</sub>-produzierenden Tumoren, die 6 Tage nach s.c. Injektion von 2x10<sup>6</sup> Kontroll-BRAF<sup>V600E</sup> Zellen in WT, *Ptger2<sup>-/-</sup>Ptger4<sup>fl/fl</sup>* oder *Clec9a<sup>Cre</sup>Ptger2<sup>-/-</sup>Ptger4<sup>fl/fl</sup>* Mäuse mittels konfokaler Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert wurden. (A) Visualisierung intratumoraler cDC1 und CD8<sup>+</sup> T Zellen nach Zellrendering in repräsentativen Tumoren. Gelbe Quadrate kennzeichnen die in (B) gezeigten vergrößerten Tumorregionen. Maßstab 500µm. (B) Vergrößerte Tumorregion aus (A) mit Clustern aus cDC1 und CD8<sup>+</sup> T Zellen. Gelbe Kreise markieren cDC1-CD8<sup>+</sup> T Zell-Cluster, Maßstab 50µm. (C) Quantifizierung der cDC1-CD8<sup>+</sup> T Zell-Clustern (n=5-6). (D) Analyse der intrazellulären Ki-67-Expression in Tumor-infiltrierenden mit cDC1 interagierenden (Interag.) oder nicht-interagierenden (Nicht-int.) CD8<sup>+</sup> T Zellen. Pfeile markieren Ki-67<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen in Kontakt mit cDC1 (n=5-6). Maßstab 20µm. Die Bilder in (A,B,D) sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Die Daten in (C,D) sind als Mittelwert ± SEM angegeben \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, ns, nicht signifikant.

Bei der Analyse PGE<sub>2</sub>-produzierender Tumoren zu einem späteren Zeitpunkt (Tag 11) zeigten diese in Clec9a<sup>Cre</sup>Ptger2<sup>-/-</sup>Ptger4<sup>fl/fl</sup> Mäusen eine deutlich gesteigerte Anzahl an TIM3<sup>+</sup> Effektor CD8<sup>+</sup> T Zellen verglichen mit WT und auch Ptger2<sup>-/-</sup>Ptger4<sup>fl/fl</sup> Mäusen (Abbildung 25A). Anhand der gesteigerten Expression von Ki-67 (Abbildung 25B) und des zytotoxischen Effektormoleküls GzmB (Abbildung 25C) lässt sich auf eine verstärkte Differenzierung und Expansion der Effektor CD8<sup>+</sup> T Zellen innerhalb der TMU schließen. Bemerkenswerterweise führte diese gesteigerte lokale Unterstützung der CD8<sup>+</sup> T Zell Antwort in Clec9a<sup>Cre</sup>Ptger2<sup>-/-</sup>Ptger4<sup>fl/fl</sup> Mäusen nach einer ersten Phase des Tumorwachstums zu einer vollständigen Abstoßung von Kontroll-BRAF<sup>V600E</sup> Tumoren (Abbildung 25D). Diese Immunkontrolle ließ sich durch eine Antikörper-vermittelte Depletion der CD8<sup>+</sup> T Zellen unterbinden (Abbildung 25E), was darauf schließen lässt, dass PGE<sub>2</sub>-produzierende Tumore durch eine effektive CD8<sup>+</sup> T Zell Antwort kontrolliert werden.

Ebenso führte die Antikörper-vermittelte Blockade von IL-12 oder dem CXCL9-Rezeptor CXCR3 zu einer Unterbindung der Abstoßung von PGE<sub>2</sub>-produzierenden BRAF<sup>V600E</sup>-Tumoren in Clec9a<sup>Cre</sup>Ptger2<sup>-/-</sup>Ptger4<sup>fl/fl</sup> Mäusen (Abbildung 25F), was die prominente Rolle dieser Moleküle für die CD8<sup>+</sup> T Zell-vermittelte Immunkontrolle durch cDC1 aufzeigt. Interessanterweise zeigten Clec9a<sup>Cre</sup>Ptger2<sup>-/-</sup>Ptger4<sup>fl/fl</sup> Mäuse, die ab dem sechsten Tag des Tumorwachstums mit dem S1P1R-Antagonisten FTY720<sup>121</sup> behandelt wurden, welcher den tDLK-Austritt geprimter CD8<sup>+</sup> T Zellen verhindert, eine unverminderte intratumorale Expansion von TIM3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen (Abbildung 25G). Dies deutet darauf hin, dass die Differenzierung und Expansion von T Zellen lokal im Tumorgewebe stattfindet. Schließlich dehnten wir unsere Analysen auf ein weiteres PGE<sub>2</sub>-produzierendes Tumormausmodell, MC38-Kolonkarzinomzellen, aus (Abbildung 25H). Ähnlich wie BRAF<sup>V600E</sup>-Tumoren zeigten MC38-Tumoren, die in Clec9a<sup>Cre</sup>Ptger2<sup>-/-</sup>Ptger4<sup>fl/fl</sup> Mäuse transplantiert wurden, eine verstärkte Anzahl an TIM3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen (Abbildung 25I), eine erhöhte GzmB-Expression (Abbildung 25J), sowie ein beeinträchtigtetes Tumorwachstum (Abbildung 25K).

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass der selektive Verlust der EP2/EP4-vermittelten PGE<sub>2</sub>-Signalgebung auf intratumorale cDC1 die Orchestrierung wirksamer CD8<sup>+</sup> T Zell Antworten innerhalb der TMU wiederherstellt und dadurch zu einer schützenden anti-tumoralen Immunantwort führt.



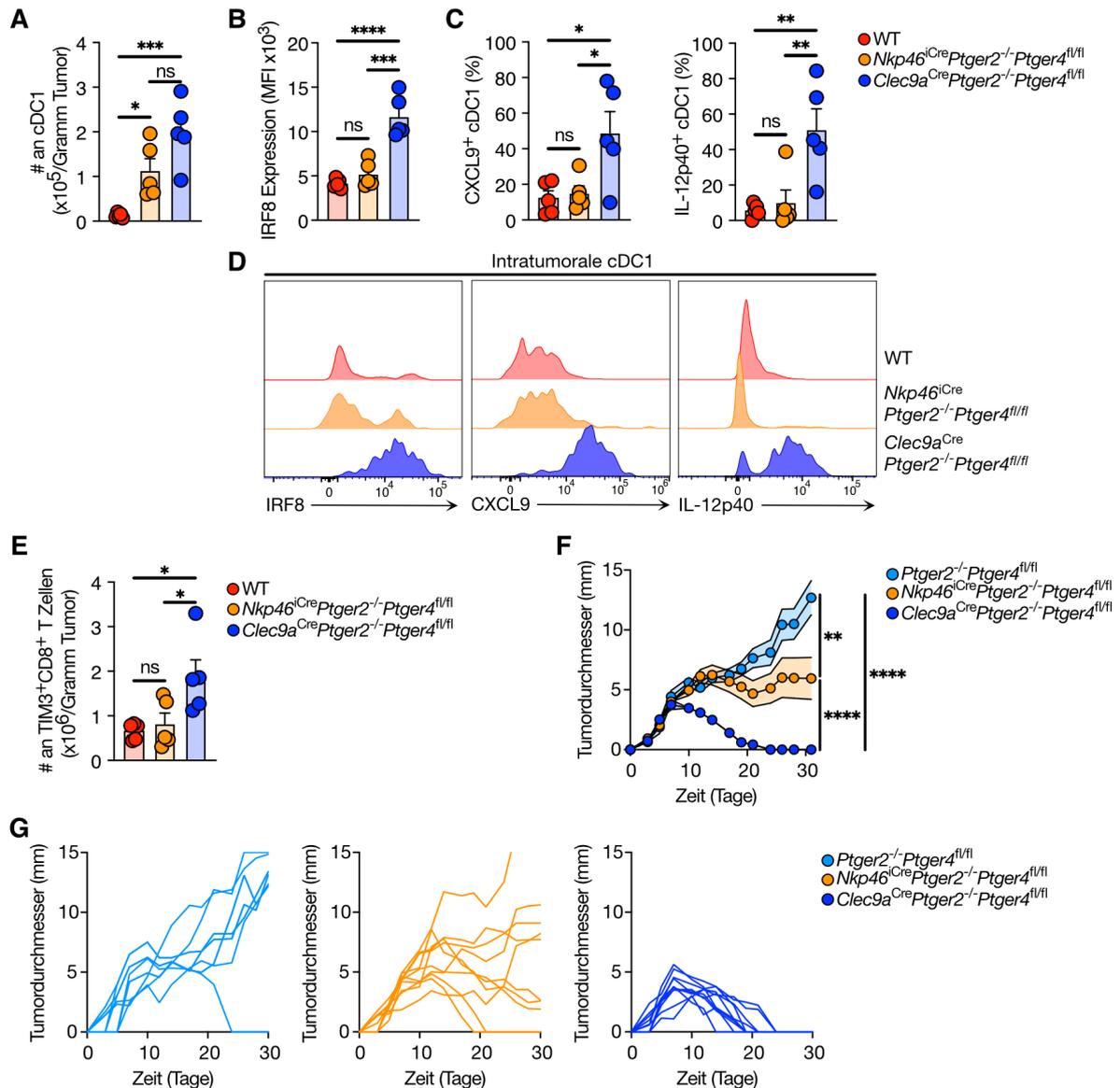
(Legende auf der nächsten Seite)

**Abbildung 25: EP2/EP4-defiziente cDC1 können PGE<sub>2</sub>-produzierende Tumoren effektiv kontrollieren.**

(A-C) WT, Ptger2<sup>-/-</sup>Ptger4<sup>fl/fl</sup> oder Clec9a<sup>Cre</sup>Ptger2<sup>-/-</sup>Ptger4<sup>fl/fl</sup> Mäuse wurden mit 2x10<sup>6</sup> PGE<sub>2</sub>-produzierenden Kontroll-BRAF<sup>V600E</sup> Zellen inokuliert. 11 Tage später wurden die TIM3<sup>+</sup> Effektor CD8<sup>+</sup> T Zellen quantifiziert (A) und auf die Expression von Ki-67<sup>+</sup> (B) oder GzmB (C) hin untersucht (n=4-8). (D) Tumorwachstumsprofile nach s.c. Inokulation von 2x10<sup>5</sup> PGE<sub>2</sub>-produzierenden Kontroll-BRAF<sup>V600E</sup> Tumorzellen in WT, Ptger2<sup>-/-</sup>Ptger4<sup>fl/fl</sup> oder Clec9a<sup>Cre</sup>Ptger2<sup>-/-</sup>Ptger4<sup>fl/fl</sup> Mäuse (n=10). (E) Auswirkung der CD8<sup>+</sup> T Zell-Depletion auf das Wachstum von Kontroll-BRAF<sup>V600E</sup> Tumoren in WT oder Clec9a<sup>Cre</sup>Ptger2<sup>-/-</sup>Ptger4<sup>fl/fl</sup> Mäusen (n=10). (F) Auswirkung der CXCR3- und IL-12-Blockade auf das Wachstum von Kontroll-BRAF<sup>V600E</sup> Tumoren in Clec9a<sup>Cre</sup>Ptger2<sup>-/-</sup>Ptger4<sup>fl/fl</sup> Mäusen (n=6). (G) Clec9a<sup>Cre</sup>Ptger2<sup>-/-</sup>Ptger4<sup>fl/fl</sup> Mäusen mit Kontroll-BRAF<sup>V600E</sup> Tumoren wurden mit FTY720 oder NaCl als Kontrolle behandelt. Intratumorale TIM-3<sup>+</sup> Effektor-CD8<sup>+</sup>-T Zellen wurden 11 Tage nach Tumortransplantation mittels Durchflusszytometrie quantifiziert (n=5-6 pro Gruppe). (H) PGE<sub>2</sub>-Konzentration in Lysaten von Tumoren und tdLK von MC38-Tumor-tragenden WT Mäusen (n=4 pro Gruppe). (I,J) Durchflusszytometrische Analyse der intratumoralen CD8<sup>+</sup> T Zellen in MC38-Tumoren 11 Tage nach Transplantation von Tumorzellen in WT, Ptger2<sup>-/-</sup>Ptger4<sup>fl/fl</sup> oder Clec9a<sup>Cre</sup>Ptger2<sup>-/-</sup>Ptger4<sup>fl/fl</sup> Mäuse. (I) Quantifizierung der TIM3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen. (J) GzmB-Expression durch intratumorale TIM3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T Zellen (n=4-6). (K) Tumorwachstumsprofile nach s.c. Inokulation von 2x10<sup>5</sup> MC38-Tumorzellen in WT, Ptger2<sup>-/-</sup>Ptger4<sup>fl/fl</sup> oder Clec9a<sup>Cre</sup>Ptger2<sup>-/-</sup>Ptger4<sup>fl/fl</sup> Mäuse (n=10). Die Daten sind als Mittelwert ± SEM angegeben. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001; ns, nicht signifikant.

## 2.14 PGE<sub>2</sub> insensitive NK Zellen können eine cDC1-Dysfunktion nur teilweise kompensieren

Neben cDC1 sind auch andere Zellen des Immunsystems dem Einfluss von PGE<sub>2</sub> ausgesetzt. So können NK Zellen beispielsweise cDC1 in Tumoren rekrutieren und unterstützen deren Effektor-Funktion, sind aber in PGE<sub>2</sub>-produzierenden Tumoren oft beeinträchtigt (siehe 1.3.4)<sup>32</sup>. Um den bereits bekannten Effekt der PGE<sub>2</sub>-Signalwegsübertragung auf NK Zellen sowie den in dieser Arbeit beschriebenen Effekt auf cDC1 zu vergleichen, erzeugten wir Nkp46<sup>iCre</sup>Ptger2<sup>-/-</sup>Ptger4<sup>fl/fl</sup> Mäuse, in denen NK Zellen die PGE<sub>2</sub>-Rezeptoren EP2 und EP4 fehlen<sup>122</sup>. In diesen Mäusen ließ sich die Hypothese testen, dass der Verlust der PGE<sub>2</sub>-Signalübertragung auf NK Zellen die cDC1-vermittelte anti-tumorale Immunantwort verstärkt. Bei Injektion PGE<sub>2</sub>-produzierender Kontroll-BRAF<sup>V600E</sup> Tumoren in Nkp46<sup>iCre</sup>Ptger2<sup>-/-</sup>Ptger4<sup>fl/fl</sup> Mäuse stellten wir eine erhöhte cDC1 Akkumulation fest, was auf eine NK Zell-vermittelte cDC1 Rekrutierung hindeutet (Abbildung 26A). Jedoch zeigten diese cDC1 nur eine geringe Expression von IRF8 und waren in ihrer Fähigkeit, CXCL9 und IL-12 zu produzieren, beeinträchtigt (Abbildung 26B-D). In Übereinstimmung mit diesem dysfunktionalen cDC1-Phänotyp konnten wir keine vollständige Rettung der intratumoralen CD8<sup>+</sup> T Zell Antwort beobachten (Abbildung 26E), und Nkp46<sup>iCre</sup>Ptger2<sup>-/-</sup>Ptger4<sup>fl/fl</sup> Mäuse konnten Kontroll-BRAF<sup>V600E</sup> Tumoren weitgehend nicht abstoßen (Abbildung 26F,G). Dennoch war das Tumorwachstum in Nkp46<sup>iCre</sup>Ptger2<sup>-/-</sup>Ptger4<sup>fl/fl</sup> Mäusen im Vergleich zu Ptger2<sup>-/-</sup>Ptger4<sup>fl/fl</sup> Mäusen beeinträchtigt, was dafür spricht, dass eine erhöhte NK Zell vermittelte Immunantwort die cDC1-Dysfunktion zumindest teilweise kompensieren kann.



**Abbildung 26: EP2/EP4-defiziente NK Zellen können PGE<sub>2</sub> produzierende Tumoren nicht effektiv kontrollieren.**

(A-E) WT, *Clec9a<sup>Cre</sup>Ptger2<sup>-/-</sup>Ptger4<sup>fl/fl</sup>* oder *Nkp46<sup>Cre</sup>Ptger2<sup>-/-</sup>Ptger4<sup>fl/fl</sup>* Mäuse wurden mit  $2 \times 10^6$  PGE<sub>2</sub>-produzierenden Kontroll-BRAF<sup>V600E</sup> Zellen inokuliert und intratumorale Immunzellen wurden 11 Tage später mittels Durchflusszytometrie analysiert (n=5). (A) Quantifizierung intratumoraler cDC1 (n=5). (B,C) Quantifizierung der Expression von (B) intrazellulärem IRF8 und (C) der Produktion von CXCL9 und IL-12 durch intratumorale cDC1 (n=5). auf der Grundlage von (L) (n=5). (D) Repräsentative Diagramme auf der Grundlage von (B,C). (E) Quantifizierung intratumoraler TIM3<sup>+</sup> Effektor CD8<sup>+</sup> T Zellen (n=5). (F,G) Analyse des Tumorwachstums und der Tumorabstoßung nach s.c. Inokulation von  $2 \times 10^5$  PGE<sub>2</sub>-produzierenden Kontroll-BRAF<sup>V600E</sup> Tumorzellen in *Ptger2<sup>-/-</sup>Ptger4<sup>fl/fl</sup>*, *Clec9a<sup>Cre</sup>Ptger2<sup>-/-</sup>Ptger4<sup>fl/fl</sup>* oder *Nkp46<sup>Cre</sup>Ptger2<sup>-/-</sup>Ptger4<sup>fl/fl</sup>* Mäusen (n=10). (G) Individuelle Tumorwachstumsprofile. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001.

## 2.15 PGE<sub>2</sub> induziert eine Dysfunktion in humanen cDC1 über EP2 und EP4

Um basierend auf der Identifikation der PGE<sub>2</sub>-vermittelten cDC1-Dysfunktion Aussagen über Tumorpatienten treffen zu können, fragten wir uns, ob dieser Mechanismus in humanen cDC1 konserviert ist und, ähnlich wie bei Mäusen, auf einer EP2/EP4-Signalübertragung beruht. Analog zu murinen cDC1 führte die PGE<sub>2</sub>-Exposition bei humanen cDC1 zu Veränderungen

der Genexpression (Abbildung 27A). Wir stellten fest, dass PGE<sub>2</sub> auch hier selektiv die Hochregulierung von Zytokin- und Chemokin-Signalwegen, einschließlich CXCL9, CXCL10 und IL12B, beeinträchtigte (Abbildung 27B,C). Diese selektive Dysfunktion war unabhängig von der cDC1-Aktivierung reguliert, da andere Moleküle, die mit DC-Aktivierung, Antigenverarbeitung und Migration in Verbindung stehen, weitgehend unbeeinflusst blieben (Abbildung 27C). Wie auch in murinen cDC1, legten unsere Analysen der humanen cDC1 nahe, dass die PGE<sub>2</sub>-vermittelte Beeinträchtigung durch den Verlust der IRF8-Expression verursacht wurde (Abbildung 27D,E). Als Nächstes untersuchten wir, ob auch bei humanen cDC1 die EP2/EP4-Signalübertragung für die PGE<sub>2</sub>-induzierte Dysfunktion verantwortlich ist. Die Aufhebung der hemmenden Wirkung von PGE<sub>2</sub> auf die Fähigkeit humaner cDC1, CXCL9 und IL-12 zu produzieren, durch eine Behandlung mit EP2- und EP4-Inhibitoren (Abbildung 27F) lässt vermuten, dass dies der Fall ist.

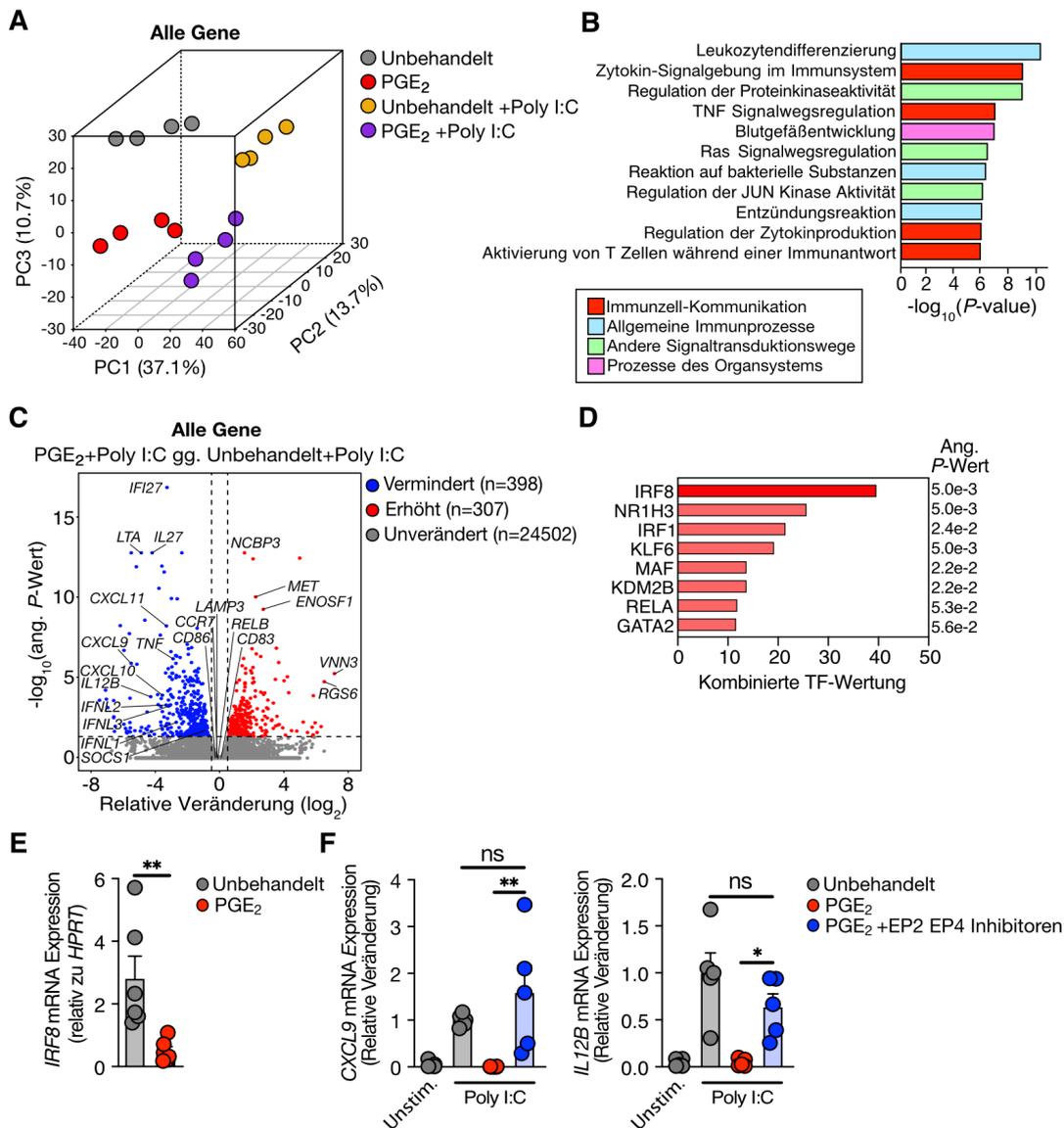
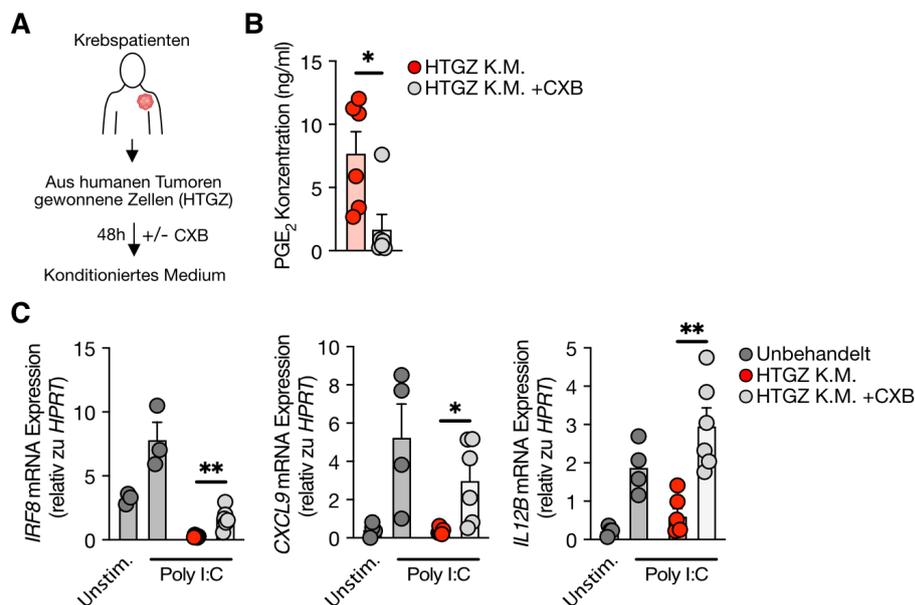


Abbildung 27: PGE<sub>2</sub> induziert in humanen cDC1 über EP2 und EP4 eine Dysfunktion.

(Fortsetzung der Legende auf der nächsten Seite)

**(A-D)** Humane cDC1 wurden aus dem peripheren Blut vier gesunder Personen sortiert, 20 Stunden lang mit PGE<sub>2</sub> inkubiert und anschließend 4 Stunden lang mit dem Poly I:C aktiviert, bevor die Genexpression mittels RNA-seq analysiert wurde. **(A)** PCA auf der Grundlage aller differentiell exprimierten Gene (n=4). **(B)** Signalwege, die in Poly I:C-aktivierten cDC1 nach PGE<sub>2</sub>-Exposition am stärksten beeinträchtigt sind. **(C)** Vulkandiagramm, das die Wirkung der PGE<sub>2</sub>-Exposition vor Poly I:C-Stimulation auf die cDC1-Genexpression zeigt. **(D)** Vorhersage von Upstream-Transkriptionsfaktoren auf der Grundlage von Genen, deren Expression in Poly I:C-stimulierten cDC1 nach PGE<sub>2</sub>-Exposition beeinträchtigt ist. **(E)** Humane cDC1 wurden 20 Stunden lang mit PGE<sub>2</sub> behandelt bevor die IRF8-Expression bestimmt wurde (n=6). **(F)** Humane cDC1 wurden 20 Stunden lang mit PGE<sub>2</sub> in Gegenwart oder Abwesenheit von EP2/EP4-Inhibitoren behandelt und daraufhin 4 Stunden lang mit Poly I:C stimuliert, bevor die Cxcl9 und IL12b Expression quantifiziert wurde (n=5). Die Daten sind als Mittelwert ± SEM angegeben. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, ns, nicht signifikant.

Schließlich wollten wir wissen, inwieweit PGE<sub>2</sub> in humanen Tumoren produziert wird und dort zur Dysfunktion von cDC1 beiträgt. Dazu inkubierten wir humane cDC1 mit K.M. von humanen Tumorzellen (HTGZ). Diese Tumorzellen waren zuvor frisch aus dem Krebsgewebe von 6 behandlungsfreien Patienten mit Melanom- oder Eierstock-Krebs isoliert worden (Abbildung 28A). Durch die Messung der Expression von IRF8, CXCL9 und IL-12B in cDC1, die nach der Exposition mit K.M. mit Poly I:C aktiviert wurden, stellten wir fest, dass das K.M. von HTGZ eine deutliche Dysfunktion der cDC1 auslöste (Abbildung 28C). Diese hemmende Wirkung ging verloren, als wir die PGE<sub>2</sub>-Produktion der HTGZ mit einem selektiven COX-2 Inhibitor, Celecoxib (CXB), blockierten (Abbildung 28B,C). Zusammengenommen zeigen diese Daten, dass die mechanistischen Merkmale, die der PGE<sub>2</sub>-induzierten cDC1-Dysfunktion zugrunde liegen, zwischen Mäusen und Menschen konserviert sind, und deuten auf eine wichtige Rolle von PGE<sub>2</sub> bei der Förderung der cDC1-Dysfunktion bei humanen Krebserkrankungen hin.



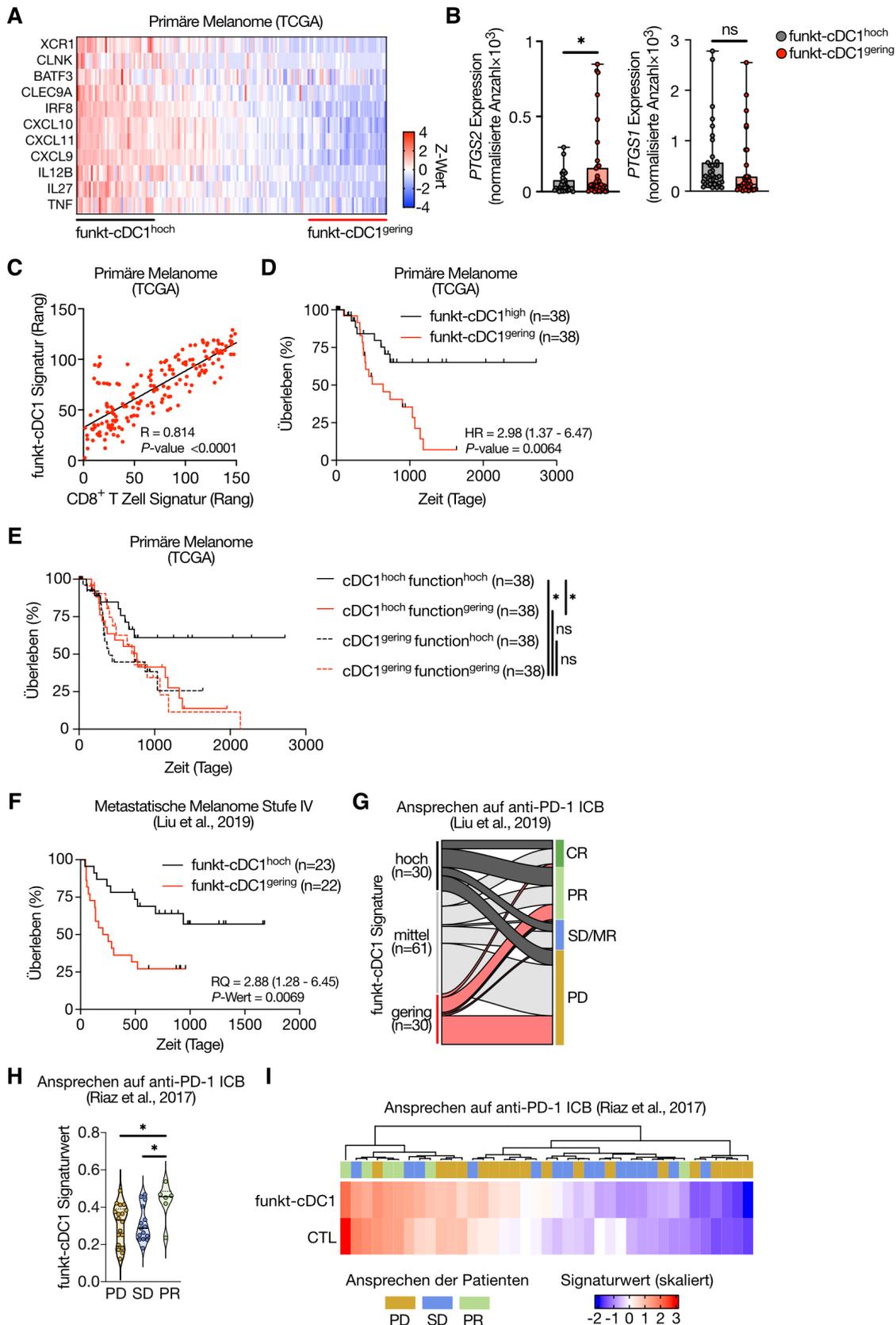
**Abbildung 28: Tumor-PGE<sub>2</sub> in Patientenproben induziert eine Dysfunktion in humanen cDC1.**

**(A)** Aus humanen Tumoren gewonnene Zellen (HTGZ) wurden 48h in Gegenwart oder Abwesenheit von Celecoxib (CXB) inkubiert. **(B)** PGE<sub>2</sub>-Konzentration im CM von HTGZ oder CXB-behandelten HTGZ, die in (G) verwendet wurden. **(C)** Humane cDC1 wurden für 20 Stunden mit HTGZ K.M. behandelt und 4 Stunden lang mit Poly I:C stimuliert, bevor die sie auf die Expression von Irf8, Cxcl9 und IL12b untersucht wurden (n=3-6). Die Daten sind als Mittelwert ± SEM angegeben. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01.

## 2.16 Gensignaturen funktionaler cDC1 in humanen Tumoren korrelieren mit dem Überleben von Patienten und dem Ansprechen auf Anti-PD-1-Immuntherapien

Schließlich untersuchten wir, inwieweit die lokale Funktionalität von cDC1 mit dem Krankheitsverlauf von Krebspatienten zusammenhängt. Auf der Grundlage unserer Genexpressionsanalysen erstellten wir eine humane Gensignatur für uneingeschränkt funktionale cDC1 (Abbildung 29A) und analysierten das Auftreten dieser Signatur in Tumor-Genexpressionsdatensätzen von Hautkrebspatienten aus *'The Cancer Genome Atlas'* (TCGA). Tumoren mit niedriger Expression einer funktionalen cDC1-Gensignatur wiesen höhere Mengen an PTGS2-Transkripten auf, was in Übereinstimmung mit unseren Analysen auf eine funktionale Einschränkung von cDC1 durch COX-2 Aktivität hindeutet (Abbildung 29B). Wir stellten fest, dass die Expression dieser funktionalen cDC1-Signatur in hohem Maße positiv mit einer Gensignatur für CD8<sup>+</sup> T Zellen korreliert (Abbildung 29C), was mit der Vorstellung übereinstimmt, dass sich die Funktionalität von cDC1 im Tumorgewebe positiv auf die Infiltration von Tumoren durch CD8<sup>+</sup> T Zellen auswirkt. Die Korrelation dieser Expression funktionaler cDC1-Gene in Primärtumoren mit der Überlebensdauer der Patienten ergab, dass diese signifikant mit dem Überleben der Patienten verbunden war (Abbildung 29D). Um näher zu untersuchen, inwieweit die funktionale Einschränkung der lokalen cDC1 oder deren generelle Anwesenheit einen größeren Einfluss auf das Überleben der Patienten hat, teilten wir die Patienten weiter auf, in Gruppen mit hoher oder niedriger Expression von cDC1-spezifischen Markern <sup>32</sup>, um Tumoren mit hohem cDC1-Gehalt zu identifizieren. Innerhalb dieser beiden Gruppen definierten wir Subgruppen anhand der Expression funktionaler Gene, die durch PGE<sub>2</sub>-Exposition in cDC1 eingeschränkt sind (siehe Tabelle 13). Dadurch ließ sich feststellen, dass die Expression funktionaler Gene selektiv das Gesamtüberleben in der Patientengruppe mit hohem cDC1-Gehalt, aber nicht in der Gruppe mit niedrigem cDC1-Gehalt, vorhersagte (Abbildung 29E). Da die Funktion von cDC1 insbesondere bei Immuntherapien eine große Rolle spielt, untersuchten wir den Zusammenhang zwischen der Expression der funktionalen cDC1 Signatur und dem Erfolg von anti-PD-1 Immuntherapien. In der Tat fanden wir bei Patienten mit fortgeschrittenem metastasiertem Melanom, die sich einer Anti-PD-1-Therapie unterzogen <sup>123</sup>, eine Korrelation zwischen der Expression der funktionalen cDC1-Signatur mit dem Patientenüberleben (Abbildung 29F). Die Analyse der Expression der funktionalen cDC1-Signatur vor der Behandlung besaß zudem eine hohe Vorhersagekraft für die Therapieergebnisse (Abbildung 29G). Wir bestätigten diese Ergebnisse durch die Analyse einer separaten Kohorte von Melanompatienten, die sich einer Anti-PD-1-Immuntherapie unterzogen (Abbildung 29H,I) <sup>124</sup>. Insgesamt deuten diese Daten darauf hin, dass bei Menschen wie bei Mäusen das Fehlen von funktionalen cDC1 in Tumoren

mit einem verschlechterten Krankheitsverlauf einhergeht und mit einer abgeschwächten antitumoralen CD8<sup>+</sup> T Zell Antwort und Resistenz gegenüber einer T Zell-basierten Immuntherapie korreliert.



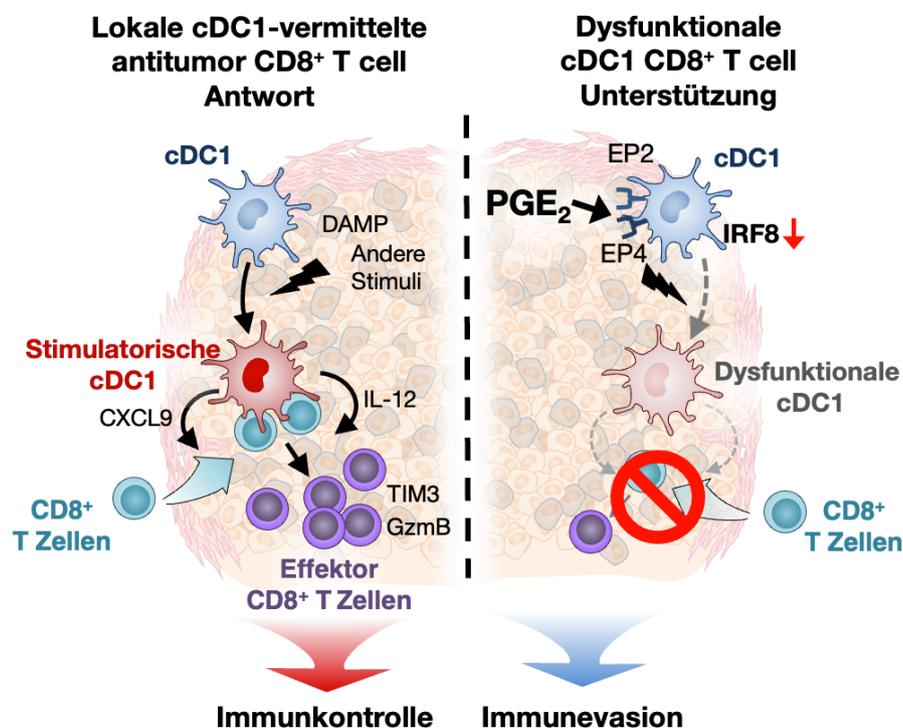
(Legende auf der nächsten Seite)

**Abbildung 29: Die Expression einer Gensignatur funktionaler cDC1 korreliert mit dem Überleben von Patienten und dem Ansprechen auf Anti-PD-1-Immuntherapien.**

**(A)** Heatmap mit z-transformierten Expressionswerten für funktionale cDC1-Gene (siehe Tabelle 13) in Tumorproben geordnet nach Expression (n=153). **(B)** Expression von *PTGS1* und *PTGS2* für die obersten und untersten Quartile der Melanompatienten auf der Grundlage von (A). **(C)** Punktdiagramm, das die Korrelation zwischen der funktionalen cDC1-Gensignatur und einer Gensignatur für CD8<sup>+</sup> T Zellen<sup>32</sup> in Genexpressionsdaten primärer Melanome aus dem TCGA-Datensatz für kutane Hautmelanome (SKCM) zeigt (n=153). **(D)** Kaplan-Meier Kurve für das Gesamtüberleben erstellt anhand des Vergleichs der oberen und unteren Quartile der Patienten des SKCM-TCGA-Datensatzes, welche die funktionalen cDC1-Gensignatur hoch oder niedrig exprimieren. HR, Hazard Ratio. **(E)** Die TCGA SKCM-Patientenkohorte wurde anhand der Expression von cDC1-spezifischen Genen<sup>32</sup> in 50 % obere (cDC1<sup>hoch</sup>) und untere (cDC1<sup>niedrig</sup>) Untergruppen stratifiziert. Die Untergruppen wurden auf den prognostischen Wert der funktionalen Genexpression (siehe Tabelle 13) für das Gesamtüberleben der Krebspatienten untersucht, wobei die obere und die untere Hälfte verglichen wurden. **(F)** Kaplan-Meier Kurve für das Gesamtüberleben erstellt anhand des Vergleichs der oberen und unteren Quartile von Patienten, die eine Anti-PD-1-Checkpoint-Blockade Therapie erhalten<sup>123</sup>, welche die funktionalen cDC1-Gensignatur hoch oder niedrig exprimieren. HR, Hazard Ratio. **(G)** Korrelation der Expressionswerte der funktionalen cDC1-Gensignatur in Tumorbiopsien mit dem Ansprechen der Patienten auf Anti-PD-1-Checkpoint-Blockade für die Patientenkohorte aus<sup>123</sup>. **(H)** Expression der funktionalen cDC1 Gensignatur in Patienten einer humanen Melanom-Patientenkohorte aus<sup>124</sup> geordnet nach dem Ansprechen der Patienten auf eine Anti-PD-1-Therapie. **(I)** Heatmap, die die geordnete, z-transformierte Expression von Gensignaturen für funktionale cDC1 (siehe Tabelle 13) und ihre Assoziation mit einer Gensignatur für zytotoxische CD8<sup>+</sup> T Zellen (CTL)<sup>125</sup> in Tumoren für eine humane Melanompatientenkohorte aus<sup>124</sup> zeigt. Die Daten in (B) sind als Mittelwert ± SEM angegeben. Die Fehlerbalken in (B) entsprechen den Minimal- und Maximalwerten. ). \*p < 0,05; ns, nicht signifikant. CR, komplettes Ansprechen; PR, partielles Ansprechen; SD/MR, stabile Erkrankung und gemischtes Ansprechen; PD, progressive Erkrankung.

### 3 Diskussion

cDC1 sind essentiell für eine erfolgreiche CD8<sup>+</sup> T Zell-vermittelte Immunantwort gegen Krebs<sup>17,32-34</sup>, sowie den Erfolg T Zell basierter Immuntherapien<sup>35,36</sup>. Welche Mechanismen die lokale Unterstützung intratumoraler T Zellen durch cDC1 regulieren ist aber bisher nicht bekannt. In der vorliegenden Arbeit wird ein neuartiger Mechanismus der cDC1 Regulation beschrieben, bei dem intratumorale cDC1 funktional eingeschränkt werden, was zu einer Beeinträchtigung der T Zell Antwort führt. Die Verhinderung dieser PGE<sub>2</sub>-vermittelten Einschränkung führt zu einer effektiven Immunkontrolle progressiv wachsender Tumoren. Die Experimente haben gezeigt, dass die PGE<sub>2</sub>-Signalübertragung in cDC1 zu einer Herunterregulierung des Transkriptionsfaktors IRF8 führt, einem essentiellen Transkriptionsfaktor für die Chemokin- und Zytokinproduktion der cDC1, wodurch diese in ihrer Fähigkeit, CD8<sup>+</sup> T Zell Antworten lokal zu orchestrieren, eingeschränkt wurden. Die Blockierung der PGE<sub>2</sub>-Signalübertragung durch Elimination der PGE<sub>2</sub> Reptoren EP2 und EP4, oder die Überexpression des TF IRF8 konnten die cDC1-Funktion wiederherstellen. PGE<sub>2</sub> unempfindliche cDC1 sind in der Lage, CD8<sup>+</sup> T Zellen effektiv zu unterstützen und das Tumorstadium vollständig zu kontrollieren. Der PGE<sub>2</sub>-Signalweg bewirkt in humanen cDC1 ein sehr ähnliches dysfunktionales Programm und steht mit einer fehlenden Immunkontrolle humaner Tumoren sowie einer schlechten Überlebensprognose der Krebspatienten in Verbindung.



**Abbildung 30: PGE<sub>2</sub>-vermittelte Dysfunktion intratumoraler cDC1 führt zur Immunevasion des Tumors.**

Während eine effektive Immunantwort die lokale Rekrutierung und Restimulation von CD8<sup>+</sup> T Zellen durch stimulatorische cDC1 zu Effektor CD8<sup>+</sup> T Zellen beinhaltet, unterbindet PGE<sub>2</sub> die produktive Orchestrierung der CD8<sup>+</sup> T Zell Antwort, indem es in cDC1 über die Rezeptoren EP2 und EP4 IRF8 herunterreguliert und dadurch einen dysfunktionalen Zustand auslöst. Adaptiert von Bayerl *et al.*<sup>126</sup>

Zusammengenommen decken diese Daten einen Mechanismus auf, der für die cDC1-Dysfunktion in Tumoren verantwortlich ist und für die Krebstherapie genutzt werden könnte. Außerdem unterstreicht diese Studie die Bedeutung intratumoraler cDC1 für die anti-tumorale Immunantwort und deutet darauf hin, dass eine gezielte Prävention der lokalen cDC1-Dysfunktion eine vielversprechende Strategie für Immuntherapien sein könnte.

### **3.1 Die Regulierung des Transkriptionsfaktors IRF8 programmiert die lokale cDC1-Dysfunktion**

Der Transkriptionsfaktor IRF8 ist essentiell für die Entwicklung von cDC1<sup>39</sup>. Inwieweit die Regulierung von IRF8 in vollständig differenzierten cDC1 eine Rolle spielt, war jedoch bisher nicht bekannt. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen auf eine prominente Rolle der Regulierung von IRF8 in cDC1 im Tumorkontext schließen.

Während die Dysfunktion intratumoraler cDC1 und der fehlende Kontakt mit CD8<sup>+</sup> T Zellen stark mit der Herunterregulation von IRF8 assoziiert war, ließ sich diese Funktionseinschränkung PGE<sub>2</sub>-behandelter cDC1 durch eine übermäßig starke Expression von IRF8 kompensieren. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnte auch der Kontakt mit Lymphknotenzellen, oder eine Behandlung der Zellen mit IFN $\gamma$  die Expression von IRF8 retten und cDC1 in Lymphknoten PGE<sub>2</sub>-produzierender Tumoren waren in ihrer Funktion nicht eingeschränkt. Interessanterweise schien diese dynamisch regulierte Dysfunktionalität durch den cAMP Signalweg reguliert zu sein, welcher extrem schnell und dynamisch reguliert ist<sup>127,128</sup> und in cDC1 sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Wirkungen haben kann. Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse auf eine sehr dynamische, reversible und lokal begrenzte Regulation der cDC1 Funktionalität hin, gesteuert durch den Transkriptionsfaktor IRF8.

Während bisherige Studien insbesondere die Bedeutung von IRF8 für die cDC1 Identität aufgeklärt haben<sup>14,18</sup>, zeigt die vorliegende Arbeit zum ersten Mal die zentrale Rolle von IRF8 bei der Regulation einer lokal begrenzten Dysfunktionalität. Dieser neuartige Mechanismus liefert eine mögliche Erklärung für die lokale Begrenzung der PGE<sub>2</sub>-induzierten Immunsuppression und zeigt die Relevanz der Vorgänge innerhalb der TMU für den Ausgang der Krebserkrankung auf.

### 3.2 PGE<sub>2</sub> inhibiert das Potential zur Clusterbildung intratumoraler Immunzellen

Für ein funktionales Zusammenspiel aus cDC1 und CD8<sup>+</sup> T Zellen ist ein positiver Feedbackmechanismus von Nöten, bei dem cDC1 T Zellen stimulieren und dabei gleichzeitig von T Zellen durch deren IFN $\gamma$  Produktion unterstützt werden<sup>42,129,130</sup>. Dass IFN $\gamma$  vorteilhaft für effektive CD8<sup>+</sup> T Zell Antworten ist, ist zwar schon länger bekannt<sup>131,132</sup>, der genaue Wirkmechanismus war aber lange Zeit nicht detailliert beschrieben. Aktuelle Studien haben aufgezeigt, dass IFN $\gamma$  hauptsächlich lokal wirkt, beschränkt auf einen Umkreis von 30-40 $\mu$ m innerhalb der TMU<sup>133</sup>.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass Tumor-PGE<sub>2</sub> die Responsivität von cDC1 gegenüber Interferonen und den von ihnen regulierten Signalwegen einschränkt. Durch die Herunterregulation des Transkriptionsfaktors IRF8 waren cDC1 bei Stimulation nicht in der Lage, Chemokine und Zytokine zu produzieren. Dies hatte zur Folge, dass CD8<sup>+</sup> T Zellen seltener und ineffektiver mit cDC1 interagierten. Dies lässt vermuten, dass die Anzahl produktiver Interaktionen zwischen cDC1 und CD8<sup>+</sup> T Zellen innerhalb der TMU über kurze Distanz durch IFN $\gamma$ -abhängige positive Feedbackmechanismen reguliert wird und in PGE<sub>2</sub>-produzierenden Tumoren aktiv unterbunden wird.

Neben der ausbleibenden Stimulation von CD8<sup>+</sup> T Zellen hat dieser Mangel an cDC1-CD8<sup>+</sup> T Zell Kontakten auch Konsequenzen für cDC1 innerhalb der TMU<sup>134</sup>. Die Folgen solcher Interaktionen für cDC1 sind bisher mangels passender Modellsysteme hauptsächlich in Lymphknoten untersucht worden. Dort beginnen T Zellen bei Stimulation durch cDC1 mit der Ausschüttung von IL-2 und IFN $\gamma$ <sup>135,136</sup>. Dadurch kommt es zu stabileren und länger anhaltenden Wechselwirkungen zwischen T Zellen und DC<sup>137</sup>, welche nach etwa 24 Stunden, einhergehend mit dem Beginn der T Zell Proliferation, von kürzerer Dauer sind, abhängig von Antigenendosis und Bindeaffinität des T Zell Rezeptors<sup>138,139</sup>. Während dieser intensiven, lang anhaltenden Interaktionen kommt es zu umfassenden transkriptionellen Veränderungen der CD8<sup>+</sup> T Zellen als auch der cDC1, bedingt durch Zytoskelett Rearrangements<sup>140</sup>, Signalswegskaskaden kostimulatorischer Moleküle<sup>141</sup>, MHC-II Signaling und auch Zytokinrezeptor Aktivierungen<sup>142</sup>. Es wurde gezeigt, dass cDC1 bei solch lang anhaltenden T Zell Interaktionen, wie sie auch in der TMU von Bedeutung sind, Gene hochregulieren, die Zellmigration<sup>143</sup> und auch das Überleben<sup>144</sup> der Zellen steuern<sup>141</sup>. Es wurde gezeigt, dass cDC1 nach der Migration in den Lymphknoten bei intensiven Wechselwirkungen mit IFN $\gamma$ -produzierenden T Zellen bis zu 15 Tage überleben können<sup>6,145</sup>. Inwieweit intratumorale Zell-Zell Interaktionen das Schicksal aktivierter cDC1 beeinflussen, inklusive ihrem Verbleiben und Überleben in peripheren Geweben, oder ihrer Migration in lymphoide Gewebe, ist aber bisher

leider nicht im Detail untersucht, obwohl es bedeutende therapeutische Implikationen hätte. Da PGE<sub>2</sub> aber das Potential zur Clusterbildung in cDC1 inhibiert, ist zu vermuten, dass dadurch über lange Sicht auch deren weitere Differenzierung und verlängertes Überleben in der TMU beeinflusst wird.

### **3.3 Die Funktionalität intratumoraler cDC1 bestimmt den Ausgang der Krebserkrankung**

Im Kontext neuester Erkenntnisse legen die Ergebnisse dieser Arbeit nahe, dass intratumorale cDC1 eine zentrale Rolle bei der lokalen Unterstützung adaptiver Immunantworten übernehmen, indem sie CD8<sup>+</sup> T Zellen durch Chemokin- und Zytokin- lokal positionieren und restimulieren.

Während cDC1 in PGE<sub>2</sub>-produzierenden Tumoren unbeeinträchtigt in ihrer Aktivierung, der Kreuzpräsentation von Tumorantigenen und der Heraufregulation ko-stimulatorischer Moleküle waren, hatte PGE<sub>2</sub> einen starken Einfluss auf die CXCL9 und IL-12 Produktion von cDC1. Durch die selektive Deletion der PGE<sub>2</sub>-Rezeptoren auf cDC1 wurde ihre Funktionalität selektiv wiederhergestellt. Die wiedererstarke Chemokin- und Zytokin- Produktion durch cDC1 war ausreichend, um in der Folge die CD8<sup>+</sup> T Zell Antwort effektiv zu steuern, was zu einer vollständigen Tumorabstoßung führte. Diese cDC1 vermittelte Immunantwort war charakterisiert durch eine gesteigerte Anzahl an cDC1-CD8<sup>+</sup> T Zell Clustern. Diese Interaktionen steigerten die Proliferation und Differenzierung der T Zellen, sowie die Akquise von Effektorfunktionen und vermittelte dadurch die vollständige Abstoßung der transformierten Zellen. Zusammengefasst lassen die Ergebnisse den Schluss zu, dass die CXCL9 und IL-12 vermittelte Steuerung der CD8<sup>+</sup> T Zellen durch cDC1 innerhalb der TMU von essentieller Bedeutung für den Erfolg anti-tumoraler Immunantworten ist.

Jüngste Ergebnisse haben bereits gezeigt, dass von cDC1 produziertes IL-12 essentiell ist für den Erfolg CD8<sup>+</sup> T Zell basierter Immuntherapien ist <sup>42</sup>. Zudem wurde gezeigt, dass Zell-Zell Interaktionen, wie sie in Immunzell-Clustern auftreten, für die lokale Restimulation und Expansion von CD8<sup>+</sup> T Zellen sowie für die Regulierung des Überlebens und der Effektorfunktion von T Zellen innerhalb der TMU relevant sind <sup>51,53</sup>. Jüngste Studien haben mit Hilfe von Einzelzellsequenzierungen festgestellt, dass es auch innerhalb der cDC1 noch zu einer Arbeitsteilung kommt, bei der CCR7<sup>+</sup> cDC1 den Transport von Neoantigenen in tDLK und die dortige Initiierung von CD8<sup>+</sup> T Zell Antworten übernehmen, während sich CXCL9<sup>+</sup> cDC1 auf die Unterstützung der intratumoralen CD8<sup>+</sup> T Zell Restimulation spezialisieren <sup>53</sup>. Insbesondere CXCL9<sup>+</sup> cDC1 schienen dabei in PGE<sub>2</sub> produzierenden Tumoren eingeschränkt zu sein. Ungeachtet der wichtigen Rolle von cDC1 für anti-tumoralen Immunantworten ist es

trotzdem wichtig zu erwähnen, dass cDC1 für Immunantworten auf einige Krebsarten entbehrlich sein können<sup>146-148</sup>. Zusammengefasst mit den in dieser Arbeit präsentierten Ergebnissen lässt das den Schluss zu, dass es in einigen Tumorarten ausreichend sein kann, die Funktionalität der cDC1 zu steuern, um den Ausgang der Krebserkrankung zu beeinflussen.

### 3.4 Das Verständnis der cDC1-Dysfunktion ermöglicht neue Therapiansätze

Die vorliegende Studie beschreibt einen bisher nicht bekannten intratumoralen Kontrollpunkt für die durch cDC1-vermittelte anti-tumorale Immunantwort, den PGE<sub>2</sub>-produzierende Tumoren ausnutzen, um das Immunsystem zu umgehen, was mehrere therapeutische Implikationen mit sich bringt.

Das Verständnis dieses Mechanismus ermöglicht eine gezieltere Stratifizierung von Tumorpatienten zur Anwendung moderner Immuntherapien, welche in einer PGE<sub>2</sub>-produzierenden TMU wenig erfolgreich sind. Derzeitige Therapieansätze berücksichtigen allerdings noch nicht die tumorspezifischen Unterschiede in der Eicosanoidzusammensetzung der TMU. Solche Analysen, beispielweise mittels Massenspektrometrie, wären ein aussagekräftiger Indikator für die Wirksamkeit geplanter Immuntherapien. Leider lässt sich eine übermäßige PGE<sub>2</sub> Produktion der Tumoren nicht leicht feststellen, wie beispielsweise die Mutation onkogener Signalwege oder die Expression einzelner Gene, da sie neben der Menge und Aktivität der Cyclooxygenasen auch von der Verfügbarkeit der Substrate, wie z.B. Arachidonsäure, abhängt. Wie bereits beschrieben (siehe 1.3.2) unterliegt die Verfügbarkeit dieser Substrate Prozessen die im Tumorkontext meist aberrant reguliert sind, wie Zellteilung, Zelldifferenzierung oder auch Zelltod. Ein standardisiertes Screening großer Patientenkohorten mittels Massenspektrometrie hat sich leider bisher nicht als praktikabel erwiesen, allerdings wird eine erhöhte PGE<sub>2</sub> Produktion mit verschiedenen Sonderformen solider Tumoren in Verbindung gebracht. So gilt die Hochregulierung von PTGS2 als Marker für Lipidperoxidation, welche während Ferroptose auftritt, einer besonderen Form des Tumorzelltods<sup>149</sup>. Inwieweit in ferroptotischen TMU aber auch eine gesteigerte PGE<sub>2</sub> Produktion und Immunsuppression stattfindet ist bisher nicht untersucht. Ein anderes Beispiel ist die Überaktivierung des MAPK Signalwegs in Tumorzellen, einem wichtigen Wachstumssteigernden Signalweg in BRAF mutierten Tumoren<sup>150</sup>. Auch die Aktivität dieses Signalwegs steht mit der Aktivität von Cyclooxygenasen, sowie einer gesteigerten PGE<sub>2</sub> Produktion in Verbindung<sup>151-154</sup>. Es ist gut denkbar, dass es, bedingt durch den Selektionsdruck des Immunsystems, noch weitere Mechanismen gibt, durch die Tumorzellen ihre PGE<sub>2</sub> Produktion steigern. Die Kenntnis über besonders PGE<sub>2</sub>-reiche

Sonderformen solider Tumoren, oder sogar die PGE<sub>2</sub> Mengen innerhalb der TMU selber, würde es Ärzten ermöglichen, Immuntherapien gezielter anzuwenden und Krebspatienten unnötige Nebenwirkungen zu ersparen.

Klinische Studien haben bereits untersucht, inwieweit sich die PGE<sub>2</sub> Produktion mit Cyclooxygenase-Hemmern, wie Diclofenac oder Ibuprofen, unterbinden lässt<sup>155,156</sup>. Leider hatte dieser Ansatz keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patienten, was auf eine unvollständige Hemmung der PGE<sub>2</sub> Produktion zurückzuführen sein könnte. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass die gezielte Beeinflussung von EP2 und EP4 Rezeptoren auf cDC1 die Immunkontrolle der Tumoren vollständig wieder herstellen kann, was EP2 und EP4 als potenzielle therapeutische Ziele identifiziert. Das Ziel sollte sein, mittels gezielter Blockade der Wirkung von PGE<sub>2</sub> auf Immunzellen in der TMU entgegenzuwirken und dadurch eine gezieltere Anwendung potenter Immuntherapien zu ermöglichen. Insbesondere im Kontext aktueller CAR-T Zell (Engl.: *Chimeric antigen receptor T cell*) Therapien oder auch DC-Vakzinierungsstudien sind produktive Interaktionen innerhalb der TMU zwischen cDC1 und CD8<sup>+</sup> T Zellen von großer Bedeutung. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse, dass Strategien, die das Auftreten der intratumoralen Cluster und Interaktionsräume zwischen cDC1 und CD8<sup>+</sup> T Zellen durch eine Stärkung der endogenen Funktionalität der cDC1 bewirken, großes Potential haben. Eine Förderung der intratumoralen Interaktionen durch die kombinierte Blockade der PGE<sub>2</sub>-vermittelten cDC1-Dysfunktion, wie sie in dieser Studie beschrieben ist, stellt eine Möglichkeit dar, solche Therapieansätze zu stärken.

Eine weitere Erkenntnis der vorliegenden Studie ist die Bedeutung von Immunzell-Clustern innerhalb der TMU, in denen die Konzentration inflammatorischer Zytokine einen gewissen Schwellenwert überschreiten kann. Die klassische Unterteilung von Tumoren in immuninfiltriert oder nicht-immuninfiltriert<sup>157,158</sup> sollte demnach erweitert werden durch eine Charakterisierung der möglichen Immunzellinteraktionen innerhalb der TMU. Entsprechende Ansätze werden bereits entwickelt, bei denen computergestützte Analysen die räumliche Orientierung von Immunzellen in Tumorbiopsien automatisiert charakterisieren und interpretieren<sup>53,159</sup> und könnten bald in der Klinik Anwendung finden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in dieser Studie verschiedene Aspekte der Regulation intratumoraler Immunzellinteraktionen bearbeitet werden, welche interessante Aspekte einer erfolgreichen Immuntherapie sind. Diese sollten weiter untersucht werden um eine effektivere und gezieltere Anwendung aktueller Therapieansätze möglich zu machen, sodass Patienten von diesem Wissen profitieren können.

### 3.5 Der Effekt von PGE<sub>2</sub> auf andere Immunzellen in der TMU

Die gezielte Beeinflussung von EP2 und EP4 Rezeptoren selektiv auf cDC1 konnte die Immunkontrolle der Tumoren vollständig wiederherstellen. Auch eine Blockierung des PGE<sub>2</sub> Signaling auf NK Zellen führte zu einer teilweisen Kontrolle des Tumorwachstums. Die NK Zell-vermittelte Kontrolle PGE<sub>2</sub>-produzierender Tumoren ist jedoch trotzdem abhängig von der Anwesenheit von cDC1<sup>32</sup>, obwohl, wie die Ergebnisse vorliegender Arbeit vermuten lassen, die Funktionalität der cDC1 eingeschränkt ist. PGE<sub>2</sub> insensitive NK Zellen sind in der Lage, cDC1 in PGE<sub>2</sub>-produzierende Tumoren zu rekrutieren und innerhalb der TMU zu stimulieren<sup>32</sup>. Die Experimente der vorliegenden Studie zeigen, dass die Mehrheit der cDC1 initial eingeschränkt war, später aber in manchen Tieren eine erfolgreiche Immunabwehr vermitteln konnte. Es lässt sich demnach vermuten, dass die erfolgreiche Restimulation der tumorinfiltrierenden CD8<sup>+</sup> T Zellen in lokalen Nischen innerhalb der TMU geschah, in denen die engen Interaktionen zwischen cDC1 und NK Zellen dazu führten, dass cDC1 ihre Funktionalität behalten, sowohl durch eine übermäßig starke Stimulation durch IFN $\gamma$  von NK Zellen, als auch ein Abschirmen vor Tumor-PGE<sub>2</sub> durch umgebende Zellen. In Anbetracht der Tatsache, dass die Tumorabstoßung in Mäusen mit PGE<sub>2</sub> insensitive cDC1 weitaus effizienter und zuverlässiger abläuft, lässt sich schlussfolgern, dass eine Unterbindung des PGE<sub>2</sub> Signalings auf cDC1 potenter ist, als wenn NK Zellen geschützt sind.

Es ist zudem wichtig zu bedenken, dass auch andere myeloide als auch lymphoide Immunzellen innerhalb der TMU von PGE<sub>2</sub> beeinflusst werden. So gibt es bereits seit 1971 Studien, die zeigen, dass auch T Zellen direkt durch PGE<sub>2</sub> beeinflusst werden<sup>160</sup>. Seitdem haben verschiedene Studien gezeigt, dass PGE<sub>2</sub> in verschiedenen Konzentrationen sowohl positive als auch negative Effekte auf die T Zell Aktivierung, Differenzierung, Proliferation, Migration, und auch Effektorfunktion von CD8<sup>+</sup> T Zellen aber auch regulatorischen T Zellen haben kann<sup>161</sup>. Inwieweit dies die Rolle tumorinfiltrierender Effektor CD8<sup>+</sup> T Zellen innerhalb der TMU PGE<sub>2</sub>-produzierender Tumoren beeinflusst, ist hingegen bisher nicht ausreichend untersucht worden<sup>162,163</sup> und bedarf weiterer Forschung.

### 3.6 PGE<sub>2</sub> als regulatorisches Signalwegsmolekül in der Gewebemhomöostase

Die Abschwächung effektiver CD8<sup>+</sup> T Zell Antworten durch die PGE<sub>2</sub>-vermittelte cDC1-Umprogrammierung ist ein konservierter Regulationsmechanismus, den sich Tumoren zu nutzen machen, um dem Immunsystem zu entkommen. Obwohl er in Tumoren schädlich ist, könnte dieser Mechanismus in anderen Zusammenhängen zu angemessenen Immunantworten beitragen und helfen, Immunpathologien zu verhindern. Insbesondere muköse Barrieren, in denen Immunzellen durch eine ständige Aufnahme potentieller Krankheitserreger aktiv zum Schutz des Gewebes beitragen kommen hier in Frage. Im Zusammenhang mit viralen Infektionen der Lunge kommt es beispielsweise zu einem Anstieg der lokalen PGE<sub>2</sub> Konzentration<sup>90</sup>. Die Immunabwehr ist in diesem Fall durch Makrophagen, insbesondere alveolare Makrophagen, sowie rekrutierte Makrophagen vermittelt<sup>164-166</sup>. Auch deren Funktionalität ist stark von IRF8 abhängig<sup>73</sup> und es wäre interessant inwieweit PGE<sub>2</sub> im Kontext einer viralen Infektion der Lunge eine Rolle bei der Einschränkung der Makrophagen und der Resultion der Inflammation spielt.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Laborgeräte

In der folgenden Tabelle sind die wichtigsten Geräte aufgelistet, die in den in dieser Arbeit gezeigten Experimenten verwendet wurden.

Tabelle 2: Laborgeräte

Gerät	Hersteller	Modell
Zellkultur Inkubator	Thermo Fisher	Heracell 150i
Zentrifugen	Thermo Fisher	Fresco 17 Megafuge 8R Multifuge X3R
Sterile Werkbank	Thermo Fisher	Herasafe
PCR-Plattform	Roche	LC480 II
Durchlichtmikroskop	Zeiss	AX10
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld & Co.KG	Neubauer-improved
Spektralanalysegerät für Zellen	Sony Biotechnology	SA3800 SP6800
Spektrales Zellsortiergerät	Sony Biotechnology	SH800Z
Konfokales Mikroskop	Leica	SP8
Kryostat	Leica	CM3050 S
Transwell Einsatz	Corning	HTS 96-Well-Einsatz 5 $\mu$ m

#### 4.1.2 Allgemeine Lösungen

Allgemeine Lösungen, die für die hier aufgeführten Versuche verwendet wurden sind folgender Tabelle aufgeführt.

Tabelle 3: Allgemeine Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
Ammoniumchlorid-Kalium (ACK) Lysepuffer	150 mM NH <sub>4</sub> Cl 10 mM KHCO <sub>3</sub> 0.1 mM EDTA
RPMI Vollmedium	RPMI 1640 10 % (v/v) fötales Kälberserum 1 % (v/v) L-Glutamin 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin 0.1 % (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol
Verdaupuffer	RPMI 1640 1 % (v/v) L-Glutamin 1 % (v/v) Penicillin / Streptomycin 0.1 % (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol XX Collagenase Typ IV XX DNase Typ I
FACS-Puffer	1x PBS, pH 7.0 1 % (v/v) fötales Kälberserum 2 mM EDTA

Färbe-Puffer für die Mikroskopie	0.1 M Tris 1% BSA 0,3% Triton X-100 1% Normalisiertes Mausserum 1% Eselserum
----------------------------------	--

### 4.1.3 Antikörper

In der folgenden Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper aufgelistet. Alle Antikörper wurden in gesättigter Konzentration verwendet, welche zuvor durch einen Titrationsversuch bestimmt wurde.

Tabelle 4: Antikörper, benannt nach den Epitopen, die sie binden, als auch dem direkt gekoppelten Fluorochrom

Antikörper (Klon)	Hersteller	Identifikationsnummer
Anti-Human CD3 FITC (UCHT1)	Biologend	Kat#300405; RRID:AB_314059
Anti-Human CD141 PerCP/Cy5.5 (M80)	Biologend	Kat#344112; RRID:AB_2561625
Anti-Human CD370 PE (8F9)	Biologend	Kat#353804; RRID:AB_10965546
Anti-Maus CD103 (polyklonal aus der Ziege)	R&D Systems	Kat#AF1990; RRID:AB_2128618
Anti-Maus CD103 FITC (M290)	BD Biosciences	Kat#557494; RRID:AB_396731
Anti-Maus CD11b BV605 (M1/70)	Biologend	Kat#101257; RRID:AB_2565431
Anti-Maus CD11c eFluor450 (N418)	Thermo Fisher	Kat#48-0114-82; RRID:AB_1548654
Anti-Maus CD172a/SIRP $\alpha$ APC (REA1201)	Miltenyi Biotec	Kat#130-123-150; RRID:AB_2802002
Anti-Maus CD24 PE (M1/69)	Thermo Fisher	Kat#12-0242-82; RRID:AB_465602
Anti-Maus CD25 eF450 (PC61.5)	Thermo Fisher	Kat#48-0251-82; RRID:AB_10671550
Anti-Maus CD3 AF647 (17A2)	Biologend	Kat#100209; RRID:AB_389323
Anti-Maus CD3 PerCP/Cy5.5 (145-2C11)	Thermo Fisher	Kat#45-0031-82; RRID:AB_1107000
Anti-Maus CD31 AF594 (MEC13.3)	Biologend	Kat#102520; RRID:AB_2563319
Anti-Maus CD40 PE (3/23)	Biologend	Kat#124610; RRID:AB_1134075
Anti-Maus CD44 BV711 (IM7)	Biologend	Kat#103057; RRID:AB_2564214
Anti-Maus CD45.1 PE/Dazzle (A20)	Biologend	Kat#110748; RRID:AB_2564295
Anti-Maus CD45.2 BV510 (104)	SONY Biotechnology	Kat#1149190
Anti-Maus CD64 BV711 (X54-5/7.1)	Biologend	Kat#139311; RRID:AB_2563846
Anti-Maus CD8 $\alpha$ BV421 (53-6.7)	Biologend	Kat#100738; RRID:AB_11204079

Anti-Maus CD8 $\alpha$ PE/Cy7 (53-6.7)	Thermo Fisher	Kat#25-0081-82; RRID:AB_469584
Anti-Maus CD80 PE (16-10A1)	Thermo Fisher	Kat#12-0801-83; RRID:AB_465753
Anti-Maus CD86 PE/Cy7 (GL1)	Thermo Fisher	Kat#25-0862-82; RRID:AB_2573372
Anti-Maus CLEC9A (1F6)	Abcam	Kat#ab104903; RRID:AB_10859587
Anti-Maus Collagen IV (polyklonal aus dem Kaninchen)	Abcam	Kat#ab6586; RRID:AB_305584
Anti-Maus F4/80 PE/Cy7 (BM8)	Thermo Fisher	Kat#25-4801-82; RRID:AB_469653
Anti-Maus CXCL9 PE (MIG-2F5.5)	Biologend	Kat#515604; RRID:AB_2245489
Anti-Maus GzmB APC (GB11)	Thermo Fisher	Kat#GRB05; RRID:AB_2536539
Anti-Maus H-2K <sup>b</sup> /H2-D <sup>b</sup> FITC (REA932)	Miltenyi	Kat#130-115-585; RRID:AB_2727101
Anti-Maus H-2K <sup>b</sup> bound to SIINFEKL PE (25-D1.16)	Biologend	Kat#141603; RRID:AB_10897938
Anti-Maus I-A/I-E (MHC class II) FITC (M5/114.15.2)	Thermo Fisher	Kat#11-5321-82; RRID:AB_465232
Anti-Maus I-A/I-E (MHC class II) AF700 (M5/114.15.2)	Biologend	Kat#107622; RRID:AB_493727
Anti-Maus IL-12/IL-23 p40 PerCP/Cy5.5 (C15.6)	Biologend	Kat#505212; RRID:AB_2566225
Anti-Maus IRF4 PE (3E4)	Thermo Fisher	Kat#12-9858-80; RRID:AB_10853179
Anti-Maus IRF8 APC (V3GYWCH)	Thermo Fisher	Kat#17-9852-82; RRID:AB_2573318
Anti-Maus Nur-77 PE (12.14)	Thermo Fisher	Kat#12-5965-82; RRID:AB_1257209
Anti-Maus PD-1 BV605 (29F.1A12)	Biologend	Kat#135220; RID:AB_2562616
Anti-Maus pPKA (pS114) AF647 (47/PKA)	BD Biosciences	Kat#560205; RRID:AB_1645434
Anti-Maus TCF1 PE (S33-966)	BD Biosciences	Kat#564217; RRID:AB_2687845
Anti-Maus TCR $\beta$ PerCP/Cy5.5 (H57-597)	Biologend	Kat#109228; RRID:AB_1575173
Anti-Maus TIM3 BV421 (RMT3-23)	Biologend	Kat#119723; RRID:AB_2616908
Anti-Maus XCR1 AF647 (ZET)	Biologend	Kat#148214; RRID:AB_2564369
Anti-Maus/Human Ki-67 APC (SolA15)	Thermo Fisher	Kat#17-5698-82; RRID:AB_2688057
Anti-Maus/Human Ki-67 AF488 (SolA15)	Thermo Fisher	Kat#53-5698-82; RRID:AB_2802330
Anti-Ziege IgG AF680 (polyklonal aus dem Esel)	Jackson ImmunoResearch	Kat#705-625-147; RRID:AB_2340440
Anti-Kaninchen IgG BV510 (polyklonal aus dem Esel)	Biologend	Kat#406419; RRID:AB_2563453
Anti-Ratte IgG AF647 (Esel)	Abcam	Kat#ab150155; RRID:AB_2813835
Anti-Maus IgG1 kappa Isotypkontrolle APC (P3.6.2.8.1)	Thermo Fisher	Kat#17-4714-82; RRID:AB_763649

Anti-Maus CD8 $\beta$ (53-5.8)	BioXCell	Kat#BE0223; RRID:AB_2687706
Anti-Maus CXCR3 (CXCR3-173)	BioXCell	Kat#BE0249; RRID:AB_2687730
Anti-Maus IL-12p40 (C17.8)	BioXCell	Kat#BE0051; RRID:AB_1107698
Anti-Maus IgG2a Isotypkontrolle	BioXCell	Kat#BE0089; RRID:AB_1107769
Anti-Maus IgG Isotypkontrolle polyklonal	BioXCell	Kat#BE0091; RRID:AB_1107773
Anti-Maus IgG1 Isotypkontrolle	BioXCell	Kat#BE0088; RRID:AB_1107775

#### 4.1.4 Chemikalien und Reagenzien

In der folgenden Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Peptide und rekombinanten Proteine aufgelistet.

Tabelle 5: Chemikalien, Peptide und rekombinante Proteine

Reagenzie	Hersteller	Identifikationsnummer
Murines IFN $\gamma$	Biologend	Kat#575308
Brefeldin A	Merck	Kat#B7651
Rekombinantes Flt-3L-Ig (hum/hum)	BioXCell	Kat#BE0098
Antigenfix	Diapath	Kat#P0016
FTY720	Merck	Kat#SML0700
Prostaglandin E2 (PGE $_2$ )	Thermo Fisher	Kat#P0409
Polyinosinische-polycytidylsäure (poly I:C)	Thermo Fisher	Kat#P1530
ODN 1668 (CpG)	Thermo Fisher	Kat#tlrl-1668
2',3'-cGAMP	Thermo Fisher	Kat#SML1229
Adenosin 5'-triphosphat (ATP)	Thermo Fisher	Kat#A1852
$\beta$ -nicotinamid adenin dinucleotid hydrat (NADH)	Thermo Fisher	Kat#NAD100-RO
Forskolin	Thermo Fisher	Kat#F3917
SC-19220 (EP1 Antagonist)	Cayman Chemicals	Kat#14060
PF-04418948 (EP2 Antagonist)	Cayman Chemicals	Kat#P20213
L-826,266 (EP3 Antagonist)	Cayman Chemicals	Kat#18538
L161,982 (EP4 Antagonist)	Cayman Chemicals	Kat#10011565
Dynabeads Maus T-Aktivator CD3/CD28	Thermo Fisher	Kat#11456D
Accutase	PAA	Kat#L11-007
Collagenase IV	Worthington	Kat#LS004189
Hyaluronidase	Thermo Fisher	Kat#H6254
Murines IL-2	Peptotech	Kat#212-12
DNase I	Thermo Fisher	Kat#D5025
Pancoll	PAN Biotech	Kat#P04-60500
Sp-8-Br-cAMPS	Cayman Chemicals	Kat#16002
Rp-8-Br-cAMPS	Cayman Chemicals	Kat#21584
Wortmannin	Thermo Fisher	Kat#10301154
UO-126	Thermo Fisher	Kat#15403859
Celecoxib	Thermo Fisher	Kat#SML3031
$\beta$ -Mercaptoethanol	Thermo Fisher	Kat#31350010
Zählpartikel	Thermo Fisher	Kat#C36950
EDTA	Carl Roth	Kat#8043
Fötale Kälberserum	PAA	Kat#A15-649

Fixierbarer Viabilitätsfarbstoff APC-eF780	Thermo Fisher	Kat#65-0865-14
Isofluran	CP-Pharma	Kat#1214
L-Glutamin	Thermo Fisher	Kat#25-0300-81
Penicillin-Streptomycin	Thermo Fisher	Kat#15-0700-63
RPMI 1640	Thermo Fisher	Kat#11-8750-93
Trypanblau	Thermo Fisher	Kat#T8154
Typsin-EDTA	Thermo Fisher	Kat#25-3000-54
OVA		
SIINFEKL		
Tissue-Tek OCT	Sakura	

#### 4.1.5 Kit Systeme

In der folgenden Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten kommerziell erworbenen Chemikaliensets aufgelistet. Die Sets wurden entsprechend der Herstellerangaben verwendet.

Tabelle 6: Kritische kommerziell erworbene Sets

Chemikalienset	Hersteller	Identifikationsnummer
cAMP-Glo Assay	Promega	Kat#130-096-543
PKH26 Linker-Kit für rot fluoreszierende Zellen	Sigma	Kat#MINI26
Puffer für intrazelluläre Fixierung und Permeabilisierung	Thermo Fisher	Kat#88-8823
True-Nuclear Transkriptionsfaktor Puffer Set	Biologend	Kat#424401
FoxP3 Transkriptionsfaktor Puffer Set	Thermo Fisher	Kat#00-5523-00
Monarch Total RNA Miniprep Kit	NewEngland BioLabs	Kat#T2010
SensiFAST cDNA Synthese Kit	Bioline	Kat#BIO-65053
Taykon ROX SYBR Mastermix Blau dTTP	Eurogentec	Kat# UF-RSMT-B0701
LIVE/DEAD fixierbarer Lebensfähigkeitsfarbstoff	Thermo Fisher	Kat#65-0865-14
PGE <sub>2</sub> ELISA	Cayman Chemicals	Kat#514010
Kit zur Isolation naiver CD8 <sup>+</sup> T Zellen	Miltenyi Biotec	Kat#130-096-543
Kit zur Isolation aller T Zellen II	Miltenyi Biotec	Kat#130-095-130

#### 4.1.6 Bioinformatische Datensets

Alle in dieser Arbeit verwendeten Datensets sind öffentlich zugänglich und in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendete Datensets

Verwendetes Datenset	Quelle	Identifikationsnummer
Murine cDC1 RNA-seq Datenset GSE213205	Diese Arbeit	GSE213205; <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds</a>
Murine Tumor cDC1 RNA-seq Datenset GSE222782	Diese Arbeit	GSE222782; <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds</a>
Humane cDC1 RNA-seq Datenset GSE213691	Diese Arbeit	GSE213691; <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds</a>
Melanompatienten RNA-seq Datenset	Liu et al., 2019	phs000452.v3.p1; Melanoma Sequencing Genome Project
Tumorpatienten RNA-seq Datenset	Riaz et al., 2017	GSE91061; <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds</a>

The Cancer Genome Atlas (TCGA)	Firehose, The Broad Institute	<a href="https://gdac.broadinstitute.org/">https://gdac.broadinstitute.org/</a>
--------------------------------	-------------------------------------	---

#### 4.1.7 Software

In der folgenden Tabelle sind sämtliche zur Analyse der vorliegenden Daten verwendeten Analysesoftware, sowie deren Quellen aufgelistet.

Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Software

Software und Version	Hersteller	Quelle:
Affinity Designer v1.6.0	Serif	<a href="https://affinity.serif.com/de/designer/">https://affinity.serif.com/de/designer/</a>
FlowJo v10	BD	<a href="https://www.flowjo.com/solutions/flowjo/">https://www.flowjo.com/solutions/flowjo/</a>
Imaris v9.7	Oxford Instruments	<a href="https://imaris.oxinst.com">https://imaris.oxinst.com</a>
NumPy	NumPy	<a href="https://www.numpy.org">https://www.numpy.org</a>
Pandas	W. McKinney	<a href="https://pandas.pydata.org">https://pandas.pydata.org</a>
Prism v9	GraphPad	<a href="https://www.graphpad.com">https://www.graphpad.com</a>

#### 4.1.8 Biologische Systeme

In der folgenden Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten experimentellen biologischen Tumormodelle, sowie Mauslinien aufgelistet. Alle in dieser Arbeit verwendeten Tiere wurden am Klinikum Rechts der Isar der Technischen Universität München (TUM) unter spezifisch-pathogenfreien Bedingungen gemäß den Richtlinien der Federation of European Laboratory Animal Science Associations gehalten und gezüchtet. Die Mäuse wurden im Alter von 6-12 Wochen für Experimente verwendet. Bei allen Experimenten wurden die Mäuse geschlechtsspezifisch ausgewählt und Mäuse desselben Geschlechts nach dem Zufallsprinzip den Behandlungs- oder Kontrollgruppen zugewiesen. Alle Tierversuche wurden von den örtlichen Behörden genehmigt und in Übereinstimmung mit nationalen Richtlinien durchgeführt.

Tabelle 9: In dieser Arbeit verwendete experimentelle biologische Modelle

Biologisches Modell	Quelle	Identifikationsnummer
<b>Zelllinien</b>		
Kontroll-BRAF <sup>V600E</sup>	C. Reis e Sousa (Zelenay et al., 2015)	N/A
<i>Ptgs1</i> / <i>Ptgs2</i> <sup>-/-</sup> -BRAF <sup>V600E</sup>	C. Reis e Sousa (Zelenay et al., 2015)	N/A
CT26 WT	The Francis Crick Institute, London, UK	N/A
<i>Ptgs2</i> <sup>-/-</sup> CT26	C. Reis e Sousa (Zelenay et al., 2015)	N/A
4T1	The Francis Crick Institute, London, UK	N/A
<i>Ptgs1</i> / <i>Ptgs2</i> <sup>-/-</sup> 4T1	C. Reis e Sousa (Zelenay et al., 2015)	N/A
MC38	Institute für Molecular Immunology, TUM	N/A
Kontroll-BRAF <sup>V600E</sup> -ZsG	Diese Arbeit	N/A
Kontroll-BRAF <sup>V600E</sup> -OVA	Diese Arbeit	N/A

<i>Ptgs1/Ptgs2</i> <sup>-/-</sup> -BRAF <sup>V600E</sup> -ZsG	Diese Arbeit	N/A
<i>Ptgs1/Ptgs2</i> <sup>-/-</sup> -BRAF <sup>V600E</sup> -OVA	Diese Arbeit	N/A
Mauslinien		
C57BL/6J	Charles River	RRID: IMSR_JAX:000664
OT-I (C57BL/6-Tg(TcraTcrb)1100Mjb/J)	The Jackson Laboratory	RRID: IMSR_JAX:003831
OT-I x CD45.1	Institut für Molekulare Immunologie, TUM	N/A
<i>Batf3</i> <sup>-/-</sup> (B6.129S(C)- <i>Batf3</i> <sup>tm1Kmm</sup> /J)	The Jackson Laboratory	RRID: IMSR_JAX:013755
<i>Ptger2</i> <sup>-/-</sup> - <i>Ptger4</i> <sup>fl/fl</sup>	Institut für Molekulare Immunologie, TUM	N/A
<i>Clec9a</i> <sup>Cre</sup> <i>Ptger2</i> <sup>-/-</sup> - <i>Ptger4</i> <sup>fl/fl</sup>	Institut für Molekulare Immunologie, TUM; <i>Clec9a</i> <sup>Cre</sup> publiziert in <sup>120</sup>	N/A
<i>Nkp46</i> <sup>iCre</sup> <i>Ptger2</i> <sup>-/-</sup> - <i>Ptger4</i> <sup>fl/fl</sup>	Institut für Molekulare Immunologie, TUM; <i>Nkp46</i> <sup>iCre</sup> publiziert in <sup>122</sup>	N/A

## Beschreibung der Mausstämmen:

- C57BL/6J** Der Mausstamm C57BL/6J ist ein Inzuchtstamm, der in dieser Arbeit als Wildtyp Kontrollstamm verwendet wurde. C57BL/6J Mäuse tragen den MHC-I Haplotyp H-2<sup>b</sup>.
- OT-I** OT-I ist ein OVA<sub>257-264</sub> Peptid (SIINFEKL)-spezifischer TCR-transgener Mausstamm auf C57BL/6J Hintergrund. Für die TCR-Transgene wurden die variablen Regionen Va2 und Vβ5 des T Zellrezeptors von CD8<sup>+</sup> OVA-spezifischem T Zellklon 149.42 verwendet. In diesen Mäusen exprimieren CD8<sup>+</sup> T Zellen transgene TCRs, die die von OVA stammenden Peptidkette 257-264 (SIINFEKL) erkennen, die auf MHC-I Molekülen präsentiert werden <sup>167,168</sup>.
- OT-I x CD45.1** Die Kreuzung dieses Stammes mit CD45.1 Mäusen (OT-I x CD45.1) ergab einen Mausstamm, dessen Immunzellen sich durch die Expression eines Allels des Moleküls CD45 (CD45.1) <sup>169</sup>, von Immunzellen aus C57BL/6 Wildtyp Mäusen (CD45.2) unterscheiden. Diese OT-I T Zellen lassen sich demnach nach adaptivem Transfer in C57BL/6 Wildtyp Mäusen durch spezifische Anfärbung von CD45.1 identifizieren.
- Batf3<sup>-/-</sup>** *Batf3*<sup>-/-</sup> Tiere sind C57BL/6J Mäuse, die aufgrund ihrer Defizienz des Transkriptionsfaktors *Batf3* nicht in der Lage sind cDC1 zu entwickeln <sup>17</sup>.

- Ptger2<sup>-/-</sup>Ptger4<sup>fl/fl</sup> Diese Tiere besitzen eine globale Defizienz in Ptger2, dem Gen für den PGE<sub>2</sub>-Rezeptor EP2. Der Ptger4-Locus ist flankiert durch LoxP-Sequenzen.
- Clec9A<sup>cre</sup>Ptger2<sup>-/-</sup>Ptger4<sup>fl/fl</sup> Durch Kreuzung dieses Mausstamms mit Clec9A<sup>cre</sup> Tieren<sup>120</sup> wurde ein Mausstamm mit einer globalen EP2-Defizienz, sowie einer zusätzlichen EP4-Defizienz in Clec9A exprimierenden Zellen, generiert.
- Nkp46<sup>iCre</sup>Ptger2<sup>-/-</sup>Ptger4<sup>fl/fl</sup> Ähnlich ergab die Kreuzung der Ptger2<sup>-/-</sup>Ptger4<sup>fl/fl</sup> Tiere mit Nkp46<sup>iCre</sup> Mäusen einen Mausstamm mit EP4-Defizienz in Nkp46 exprimierenden Zellen auf einem globalen EP2-Defizienten Hintergrund.

#### 4.1.9 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden in dieser Arbeit zur Amplifikation von RNA-Transkripten eingesetzt. Selbst erstellte Primer-Sequenzen wurden hier mit Hilfe von Primer-BLAST (NCBI) auf eine hohe Bindungsgenauigkeit und geringe sonstige Bindungsmöglichkeiten überprüft. In jedem Experiment wurde durch eine Schmelzkurvenanalyse die eindeutige Bindung an das Zieltranskript überprüft.

Tabelle 10: In dieser Arbeit verwendete qRT-PCR Primer

Zielgen	Quelle	Sequenz (5' zu 3')
murines <i>Cxcl9</i> (vorwärts)	S. W. Chensue (Chiu et al., 2003)	CTAGGCTCACGTCACCAAGTC
murines <i>Cxcl9</i> (rückwärts)	S. W. Chensue (Chiu et al., 2003)	GGCTCTAGGCTGACCCAAATG
murines <i>Il12b</i> (vorwärts)	F.E. Yull (W. Barham et al., 2015)	GGAAGCACGGCAGCAGAATA
murines <i>Il12b</i> (rückwärts)	F.E. Yull (W. Barham et al., 2015)	AACTTGAGGGAGAAGTAGGAATG G
murines <i>Hprt</i> (vorwärts)	E. A. Miska (Matsushima et al., 2019)	GCCTAAGATGAGCGCAAGTTG
murines <i>Hprt</i> (rückwärts)	E. A. Miska (Matsushima et al., 2019)	TACTAGGCAGATGGCCACAGG
murines <i>Irf8</i> (vorwärts)	S. I. Abrams (Stewart et al., 2009)	CGTGGAAGACGAGGTTACGCTG
murines <i>Irf8</i> (rückwärts)	S. I. Abrams (Stewart et al., 2009)	GCTGAATGGTGTGTGKATAGGC
murines <i>Crem</i> (vorwärts)	Diese Arbeit	AGTGGCTCTAGATTACCCAG
murines <i>Crem</i> (rückwärts)	Diese Arbeit	CTAAAATGTCGGGAACAGGC
humanes <i>CXCL9</i> (vorwärts)	S. Porter (Marshall et al., 2017)	CCAACACCCCACAGAAGTGC
humanes <i>CXCL9</i> (rückwärts)	S. Porter (Marshall et al., 2017)	GCCAGCACCTGCTCTGAGAC
humanes <i>IL12B</i> (vorwärts)	B. Xia (Song et al., 2013)	AGTAGTTATGGCTAAGGAKATGA
humanes <i>IL12B</i> (rückwärts)	B. Xia (Song et al., 2013)	AGGGATTCCAGATTTTCTTTGCA

humanes <i>IRF8</i> (vorwärts)	W. Fu (Yang et al., 2018)	TGGCTGATCGAGCAGATTGACAGT
humanes <i>IRF8</i> (rückwärts)	W. Fu (Yang et al., 2018)	AAGGGATCCGGAATGCTCTTCT
humanes <i>HPRT</i> (vorwärts)	N. Regev-Rudzki (Sisquella et al., 2017)	CCTGGCGTCGTGATTAGTGAT
humanes <i>HPRT</i> (rückwärts)	N. Regev-Rudzki (Sisquella et al., 2017)	AGACGTTTCAGTCCTGTCKATAA

#### 4.1.10 Plasmide und rekombinante DNA

Die folgende Tabelle enthält alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide und sonstige rekombinante DNA, sowie deren Quellen.

Tabelle 11: In dieser Arbeit verwendete rekombinante DNA

Rekombinante DNA	Quelle	Identifikationsnummer
Plasmid: VSV-G	Wübbenhorst et al., 2010	N/A
Plasmid: ZsGreen1-N1	Michael Davidson, via Addgene	RRID: Addgene_54702
pHIV-7 transfer vector	Wübbenhorst et al., 2010	N/A
pMSCV-IRES-mCherry	Daria Vignali, via Addgene	RRID: Addgene_52114
pFUW-tetO-Irf8	Filipe Pereira, via Addgene	RRID: Addgene_139838
pMSCV-IRES-Irf8-mCherry	Diese Arbeit	N/A

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Humanes Probenmaterial

Periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) wurden gemäß eines von der Ethikkommission der TUM genehmigten Protokolls (564/18S-AS) von gesunden Spendern gewonnen. Krebspatienten wurden am Universitätsspital Basel mit Genehmigung der lokalen Ethikkommission Nordwestschweiz rekrutiert. Alle Blutspender und Patienten gaben ihr Einverständnis, und die Studien wurden in Übereinstimmung mit den Bestimmungen der lokalen Ethikkommission und den ethischen Richtlinien der Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes (WMA) durchgeführt. PBMCs wurden durch Dichtegradientenzentrifugation (Pancoll) isoliert. Für die Präparation humaner Tumorzellen (HTGZ) wurden chirurgische Tumorproben mechanisch dissoziiert und mit Verdauerpuffer (DMEM gemischt mit 50% gebrauchsfertiger Accutase-Lösung, ergänzt mit 1mg/ml Kollagenase IV, 1mg/ml Hyaluronidase, 10U/ml DNase I und 10% FCS) für 60 Minuten bei 37°C verdaut. Daraufhin wurden die Zellen in PBS gewaschen, filtriert und als Einzelzellsuspension zur späteren Verwendung eingefroren. HTGZ konditioniertes Medium wurde durch Kultivierung von  $2,5 \times 10^5$  Zellen in 200µl komplettem RPMI-Medium für 48h in An- oder Abwesenheit des COX-2-Inhibitors Celecoxib (5µM) hergestellt.

#### 4.2.2 Mauskrebs-Zelllinien und primäre Zellkultur

Die Melanomzelllinie BRAF<sup>V600E</sup> wurde in komplettem RPMI-Medium (RPMI 1640 mit 10% fötalem Kälberserum (FCS), 50mM 2-Mercaptoethanol, 100U/ml Penicillin, 100mg/ml Streptomycin, 292µg/ml L-Glutamin) gezüchtet. Die Kolonadenokarzinom-Zelllinie MC38 wurde in komplettem DMEM-Medium (DMEM mit hohem Glukosegehalt und 10% FCS, 50mM 2-Mercaptoethanol, 100U/ml Penicillin, 100mg/ml Streptomycin) kultiviert. Ptg1/Ptg2<sup>-/-</sup>-BRAF<sup>V600E</sup> wurden durch CRISPR/Cas9-vermitteltes Gene Editing wie zuvor beschrieben erzeugt (Zelenay et al., 2015). Für Tumorantigen-Aufnahmeexperimente wurden BRAF<sup>V600E</sup>-Zellen stabil mit ZsGreen (ZsG) transduziert, einem Fluorophor, der gegen intrazellulären Abbau resistent ist (Nakamura et al., 2013; Katayama et al., 2008) und der in cDC1 nach Aufnahme von Bestandteilen ZsG-exprimierender Zellen nachgewiesen werden kann (Roberts et al., 2016). Für Kreuzpräsentationsexperimente wurden BRAF<sup>V600E</sup>-Zellen mit dem Modellantigen Ovalbumin (OVA) transduziert. Für die virale Transduktion der BRAF<sup>V600E</sup>-Zellen wurde die OVA-cDNA aus einem pcDNA3.1OVA-Plasmid in einen pHIV-7-Transfervektor unter Kontrolle des Phosphoglyceratkinase (PGK)-Promotors subkloniert, der das Puromycin-Resistenzgen über IRES mitexprimiert. ZsGreen1 cDNA wurde aus ZsGreen1-N1 (Addgene, #54702) ausgeschnitten und in den lentiviralen pHIV-7-Transfervektor unter der Kontrolle des Spleen Focus Forming Virus (SF)-Promotors (Wübbenhorst et al., 2010) subkloniert. VSV.G-pseudotypisierte, selbstinaktivierende lentivirale Vektoren der dritten Generation wurden wie zuvor beschrieben hergestellt (Wübbenhorst et al., 2010). Kurz gesagt: 2 Tage nach der Transfektion von Verpackungszellen wurde der Zellüberstand geerntet, gefiltert und für die Transduktion von Tumorzelllinien in Gegenwart von 8 µg/ml Polybren (Merck) verwendet. Die Zielzellen wurden nach der Transduktion mindestens dreimal passagiert. OVA-exprimierende Zellen wurden mit Puromycin selektiert, ZsG-exprimierende Zellen wurden durch fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS) anhand der ZsG-Expression aufgereinigt. Die In-vitro-Differenzierung von cDC1 wurde, angepasst an bereits publizierte Protokolle, durchgeführt (Mayer et al., 2014). Hierbei wurden Knochenmarkzellen aus murinen Ober- und Unterschenkelknochen isoliert. Nach der Lyse der roten Blutkörperchen mit ACK-Lysepuffer für 2min bei Raumtemperatur (RT) wurden 1,5x10<sup>6</sup> Zellen/ml mit GM-CSF (300pg/ml) und FLT3L (55ng/ml) in komplettem RPMI Medium inkubiert. Nach 9 Tagen wurden die kultivierten Zellen gewaschen und für weitere 5 Tage in frischem Medium mit GM-CSF und FLT3L inkubiert, bevor vollständig differenzierte cDC1 anhand ihrer CD103- und XCR1-Expression durch eine FACS-Sortierung aufgereinigt wurden. Um CD8<sup>+</sup> Effektor-T Zellen für In-vitro-Experimente zu generieren, wurden CD8<sup>+</sup> T Zellen aus der Milz durch MACS-Separation mit anti-CD8-Mikropartikeln (Miltenyi) isoliert und 3 Tage lang mit Anti-CD3/Anti-CD28-Dynabeads plus IL-12 (1ng/ml) stimuliert.

### 4.2.3 Injektion von Tumorzellen

Tumorzellen wurden zur Injektion durch Trypsinierung geerntet und dreimal in PBS gewaschen. Die Zellen wurden subkutan (s.c.) in 100µl endotoxinfreiem PBS in die Flanke der Empfängermäuse injiziert, wobei  $2 \times 10^5$  Zellen für Tumorwachstumsstudien und  $2 \times 10^6$  Zellen für alle anderen Experimente verwendet wurden. Das Tumorwachstum wurde mit einer digitalen Schieblehre gemessen. Die in den Abbildungen angegebenen Tumordurchmesser beziehen sich auf den Durchschnitt des längsten Durchmessers und seiner Senkrechten jedes Tumors.

### 4.2.4 In-vivo Behandlung mit FLT3-L

Zur Induktion der cDC1-Akkumulation in den Tumoren erhielten die Mäuse ab dem dritten Tag nach Tumorzellinokulation täglich intraperitoneale (i.p.) Injektionen von 30µg/100µl FLT3-L (Celldex) oder PBS als Kontrolle.

### 4.2.5 In-vivo-Depletion von CD8<sup>+</sup> T Zellen

Zur Depletion von CD8<sup>+</sup> T Zellen wurden den Mäusen 200 µg/100 µl des Antikörpers anti-CD8β (Klon 53-5.8) i.p. injiziert. Die Injektionen wurden alle 3 Tage wiederholt.

### 4.2.6 Adaptiver OT-I T Zell-Transfer

Für die Analyse des CD8<sup>+</sup> T Zell-Primings in tdLK wurden OT-I CD8<sup>+</sup> T Zellen aus der Milz von OT-I x CD45.1 Spendermäusen mit dem Kit zur Isolierung naiver CD8<sup>+</sup> T Zellen (Miltenyi Biotec) isoliert.  $1 \times 10^3$  Zellen wurden 6 Stunden vor der s.c.-Transplantation von Kontroll- oder Ptg1/Ptgs2<sup>-/-</sup>-BRAF<sup>V600E</sup>-OVA-Melanomzellen intravenös (i.v.) in sterilem PBS in Empfängermäuse übertragen.

### 4.2.7 CXCR3-Blockade in vivo

Zur Blockade der CXCR3-Signalübertragung wurde den Mäusen zwei Tage nach der Tumortransplantation i.p. 50 µl des Anti-CXCR3-Antikörpers (300 µg/Maus, Klon CXCR3-173) oder eines isotyp-spezifischen Kontrollantikörpers injiziert. Die Antikörperinjektionen wurden im Verlauf des Experiments alle 2 Tage durchgeführt.

### 4.2.8 IL-12-Blockade in vivo

Zur Blockade der IL-12-Signalübertragung wurde den Mäusen zwei Tage nach der Tumortransplantation i.p. 50 µl des Anti-IL-12p40-Antikörpers (300 µg/Maus, Klon C17.8)

oder eines isotyp-spezifischen Kontrollantikörpers injiziert. Die Antikörperinjektionen wurden im Verlauf des Experiments alle 2 Tage durchgeführt.

#### 4.2.9 FTY720-Behandlung in vivo

Zur Blockade des Lymphknotenaustritts der CD8<sup>+</sup> T Zellen wurde den Mäusen i.p. 100µl FTY720 (20µg/Maus in 0,9% NaCl in H<sub>2</sub>O) injiziert. Je nach Behandlungsgruppe erfolgten die Injektionen an Tag 6 oder an Tag 1 und Tag 6 nach Tumorzellinjektion. Die Mäuse in den Kontrollgruppen erhielten Injektionen mit 100µl NaCl-Lösung.

#### 4.2.10 Aufbereitung von Mausgeweben

Tumoren sowie tumordrainierende Lymphknoten (tdLK) wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen. Die Masse der einzelnen Tumoren oder tdLK wurde mit einer Waage gemessen. Für die anschließende Isolierung der Immunzellen wurden Tumoren und tdLK in Stücke geschnitten und 40 Minuten lang bei 37°C mit Kollagenase IV (200U/ml) und DNase I (100µg/ml) enzymatisch verdaut. Die Gewebe wurden durch ein 70-µm-Zellsieb (Miltenyi Biotec) gerieben und mit FACS-Puffer gewaschen, bevor die Antikörperfärbung durchgeführt wurde. Für die Analyse des PGE<sub>2</sub>-Gehalts wurden die Tumoren oder Organe in 0,1 M PBS mit 1 mM EDTA und 10 µM Indomethacin homogenisiert. Der PGE<sub>2</sub>-Gehalt in den Lysaten wurde mittels ELISA (Cayman) quantifiziert.

#### 4.2.11 Ex-vivo-Analyse der cDC1-Funktionen

Die Aufnahme von Tumorantigenen in vivo wurde durch die durchflusszytometrische Quantifizierung der intrazellulären ZsG-Proteine in cDC1, stammend aus Kontroll-BRAF<sup>V600E</sup>-ZsG-tumoren oder Ptgs1/Ptgs2<sup>-/-</sup>-BRAF<sup>V600E</sup>-ZsG-Tumoren, bestimmt. Zur Analyse der Kreuz-Präsentation von cDC1 aus BRAF<sup>V600E</sup>-OVA-Tumoren wurden cDC1 mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper gegen das an das MHC-Klasse-I-Molekül H-2Kb gebundene OVA-Peptid SIINFEKL (S8:H-2Kb) angefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Zur Analyse der cDC1-Zytokinproduktion wurden Mäuse 6 Stunden vor der Entnahme der Kontroll-BRAF<sup>V600E</sup> Tumoren oder Ptgs1/Ptgs2<sup>-/-</sup>-BRAF<sup>V600E</sup> Tumoren i.v. mit Brefeldin A (10 µg/g Körpergewicht; Thermo Fisher) injiziert. Die Produktion von CXCL9 und IL-12p40 wurde durch intrazelluläre Färbung bestimmt und durchflusszytometrisch analysiert.

#### 4.2.12 *In vitro* cDC1-Experimente

Für die *in vitro* PGE<sub>2</sub>-Behandlung wurden murine CD103<sup>+</sup> cDC1 mit 1 - 100ng/ml PGE<sub>2</sub> bei 37°C für 4 oder 20 Stunden kultiviert, bevor sie analysiert oder in funktionalen Assays weiterverwendet wurden, wie in den Legenden der Abbildungen angegeben. Humane cDC1 wurden mit 1mg/ml PGE<sub>2</sub> bei 37°C für 20h kultiviert. Wo angegeben, wurden cDC1 vor der Behandlung mit PGE<sub>2</sub> 1 Stunde lang mit EP-Inhibitoren (5 µM) vorbehandelt. Die intrazellulären cAMP-Konzentrationen wurden mit dem cAMP-Glo-Assay-Kit (Promega) gemessen. Zur Bewertung der PKA-Phosphorylierung wurden cDC1 mit RP-8-br-cAMPS (10µM) vorbehandelt, um eine niedrige Basis-PKA-Phosphorylierung zu erreichen, und dreimal in PBS gewaschen, bevor das Experiment fortgesetzt wurde. Zur Untersuchung der Aufnahme toter Zellen, wurden Ptgs1/Ptgs2<sup>-/-</sup>-BRAF<sup>V600E</sup>-Zellen mit UV-Licht bestrahlt (250mJ/cm<sup>2</sup>), über Nacht bei 37°C inkubiert, um eine sekundäre Nekrose zu erreichen, und mit dem PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit (Sigma) markiert. Die Zellen wurden anschließend mit cDC1 in verschiedenen Verhältnissen (10:1, 3:1, 1:1, 0,3:1, 0,1:1) kultiviert, zusammen mit dem TLR3-Liganden Poly I:C (10µg/ml). Nach 4 Stunden wurde die Aufnahme toter Tumorzellen durch cDC1 durch Messung der PKH26-Konzentration mittels Durchflusszytometrie analysiert. Zur Untersuchung aktivierter cDC1 wurden diese 4 Stunden lang mit Poly I:C (10 µg/ml) stimuliert. Bei mit PGE<sub>2</sub> vorbehandelten cDC1 wurde die Stimulation in Gegenwart von PGE<sub>2</sub> durchgeführt, sofern nicht anders angegeben. Zur Untersuchung der Zytokin- und Chemokinproduktion wurde für die letzten 3 Stunden der Stimulation Brefeldin A (5 µg/ml) zugegeben, bevor mit der Antikörperfärbung für durchflusszytometrische Analysen fortgefahren wurde. In einigen Experimenten wurden cDC1 mit CpG (5µg/ml), IFN $\gamma$  (10ng/ml), 2',3'-cGAMP (10µM), NAD (10µM), ATP (100µM) und/oder Ptgs1/Ptgs2<sup>-/-</sup>-BRAF<sup>V600E</sup>-Tumorzellen (cDC1:Tumorzellverhältnis 1:2,5) stimuliert. Zur Analyse der Kreuzpräsentation von Antigenen toter Tumorzellen wurden cDC1 gemeinsam mit UV-bestrahlten Ptgs1/Ptgs2<sup>-/-</sup>-BRAF<sup>V600E</sup>-OVA-Zellen (Verhältnis 1:2,5) für 4 Stunden inkubiert. Die Kreuzrepräsentation wurde durch Färbung mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper gegen das an H-2Kb gebundene OVA257-264-Peptid SIINFEKL (S8:H-2Kb) analysiert. Für die Ko-Kultur von cDC1 mit Zellen aus dem Lymphknoten wurden Letztere aus tdLK von WT Mäusen mit Kontroll-BRAF<sup>V600E</sup>-Tumoren isoliert und mit Hilfe des Pan-T Zell-Isolationskits (Miltenyi) in T Zellen sowie sonstige Zellen getrennt. Die Ko-Kultur geschah anschließend in Anwesenheit von Anti-CD3/CD28-Dynabeads (Verhältnis 1:1) und 100 U/ml IL-2 (Peprotech) und cDC1 wurde wie in den Legenden angegeben analysiert.

#### 4.2.13 Retrovirale Transduktion von cDC1

GP2-293-Verpackungszellen wurden mit einer Mischung aus Lipofectamin 3000 (ThermoFisher), einem für das VSV-G-Hüllprotein kodierenden Plasmid und einem pMSCV-IRES-mCherry-Plasmid, das für IRF8 kodiert (cDNA isoliert aus pFUW-tetO-Irf8, Addgene, #139838), oder einem Leervektor als Mock-Kontrolle (Addgene, #52114) transfiziert. An zwei aufeinanderfolgenden Tagen nach der Transfektion wurde das virushaltige Kulturmedium geerntet, gefiltert, mit 8µg/ml Polybren (Sigma-Aldrich) versetzt und zur stabilen Transduktion von PlatE-Produktionszellen mittels Spinfektion durch Zentrifugation (90min, 2000xg bei RT) verwendet. Die transduzierten Produktionszellen wurden anschließend mindestens dreimal passagiert, mCherry exprimierende Zellen durch FAC-Sortierung aufgereinigt und daraufhin kultiviert, um einen Virus-enthaltenden Überstand für die cDC1-Transduktion zu erzeugen. Zur Transduktion der cDC1 wurden die Überstände auf Retronectin-beschichtete (20µg/ml in PBS) 24-Well-Zellkulturplatten herunterzentrifugiert (120min, 3000xg bei 32°C). Pro Vertiefung wurden  $5 \times 10^5$  Zellen aus cDC1-Kulturen (Tag 2) durch Spinfektion transduziert (120min, 800xg bei 32°C). cDC1 wurden daraufhin 7 Tage lang in den 24-Well-Platten in Gegenwart von FLT3L und GM-CSF kultiviert, bevor das cDC1-Differenzierungsprotokoll an Tag 9 fortgesetzt wurde. Für Experimente wurden CD103<sup>+</sup> cDC1 anhand der mCherry-Expression sortiert, um eine gleichmäßige Transduktion sicherzustellen.

#### 4.2.14 In-vitro Analyse der CD8<sup>+</sup> T Zell Interaktion

Zur Analyse der CD8<sup>+</sup> T Zell Rekrutierung durch cDC1 wurden  $5 \times 10^4$  CD8<sup>+</sup> Effektor T Zellen in Transwell-Platten (Corning) mit einer Porengröße von 5µm platziert. Diese migrierten für 2 Stunden bei 37°C in Richtung konditionierten Mediums (KM) von je  $5 \times 10^5$  PGE<sub>2</sub>-vorbehandelten, gewaschenen cDC1, die zuvor für 4 Stunden mit Poly I:C (10µg/ml) stimuliert wurden. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden wurden die migrierten T Zellen im Zielkompartiment des Transwells abgenommen und mittels Durchflusszytometrie quantifiziert.

Um die Fähigkeit von cDC1 zur Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T Zellen unabhängig von der Antigenverarbeitung zu beurteilen, wurden cDC1 mit OVA257-264-Peptid (100pM) gepulst und 30 Minuten lang mit Poly I:C (10µg/ml) stimuliert. Die mit Peptid beladenen cDC1 wurden dreimal gewaschen und mit Effektor OT-I T Zellen (Verhältnis 1:1) ko-kultiviert. 48 Stunden später wurde die Expansion der OT-I-T Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Um die Wirkung der von cDC1 produzierten löslichen Mediatoren auf die Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T Zellen zu analysieren, wurden cDC1 20 Stunden lang mit PGE<sub>2</sub> behandelt, dreimal gewaschen und weitere 4 Stunden lang mit Poly I:C (10 µg/ml) stimuliert. Das hierdurch konditionierte Medium wurde gesammelt und zu CD8<sup>+</sup> Effektor T Zellen gegeben, die mit Anti-

CD3/CD28-Dynabeads (Verhältnis 1:1) kultiviert wurden. Die T Zell-Expansion wurde 48 Stunden später mittels Durchflusszytometrie quantifiziert.

#### 4.2.15 Durchflusszytometrie und fluoreszenzaktivierte Zellsortierung

Durchflusszytometrische Analysen wurden mit einem SP6800 Spektralanalysegerät für Zellen (SONY Biotechnology) durchgeführt. Die Daten wurden mit FlowJo (BD) ausgewertet. In allen Experimenten wurde ein fixierbarer Viabilitätsfarbstoff (Thermo Fisher) verwendet, um tote Zellen auszuschließen. Die Färbung von Zelloberflächenmarkern mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern wurde 15 Minuten lang bei 4 °C in FACS-Puffer durchgeführt. Die Färbung mit anti-Maus H-2K<sup>b</sup> bound to SIINFEKL PE Antikörpern wurde auf 40 Minuten ausgedehnt. Die intrazelluläre Färbung von CXCL9 oder IL-12 wurde mit dem intrazellulären Fixierungs- und Permeabilisierungspufferset (Thermo Fisher) durchgeführt. Für die intrazelluläre Färbung von IRF8 wurde das True-Nuclear Transcription Factor Buffer Set (Biolegend) verwendet. Der Nachweis von intrazellulärem TCF1, Ki-67 und GzmB in CD8<sup>+</sup> T Zellen erfolgte mit dem FOXP3 Transkriptionsfaktor-Färbepufferset (Thermo Fisher). Die Quantifizierung der Zellzahlen durch Durchflusszytometrie erfolgte mit fluoreszierenden Zählpartikeln (Thermo Fisher). Nach Gating auf lebende Einzelzellen wurden folgende Immunzellpopulationen identifiziert: intratumorale cDC1 (CD45<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>), migrierende cDC1 im tdLK (CD45<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>), Effektor CD8<sup>+</sup> T Zellen im Tumor (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>TIM3<sup>+</sup>). Die Sortierung von cDC1 aus Mäusetumoren (lebende CD45<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>), cDC1 aus Mäuseknochenmarkskulturen (lebende CD103<sup>+</sup>XCR1<sup>+</sup>) oder humanen cDC1 (lebende CD141<sup>+</sup>CLEC9A<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>) aus PBMCs erfolgte mit einem FACSAria-Sorter (BD) oder SH800 spektralen Zellsortiergerät (SONY Biotechnology). Die Reinheit der Zellpopulationen wurde durch Reanalyse einer Fraktion der sortierten Zellproben bestimmt.

#### 4.2.16 Antikörper für Durchflusszytometrie und Zellsortierung

Die folgenden Anti-Maus-Antikörper wurden für die Durchflusszytometrie verwendet: Anti-CD3 (Klon 145-2C11), AntiCD8 $\alpha$  (Klon 53-6.7), Anti-CD11b (Klon M1/70), Anti-CD11c (Klon N418), Anti-CD24 (Klon M1/69), Anti-CD25 (Klon PC61. 5), anti-CD40 (Klon 3/23), anti-CD44 (IM7), anti-CD45.1 (Klon A20), anti-CD45.2 (Klon 104), anti-CD64 (Klon X54-5/7. 1), anti-CD80 (Klon 16-10A1), anti-CD86 (Klon GL1), anti-CD103 (Klon M290), antiSIRP $\alpha$  (Klon REA1201), anti-CLEC9A (Klon 1F6), anti-CXCL9 (Klon MIG-2F5. 5), anti-F4/80 (Klon BM8), anti-GzmB (Klon GB11), anti-IRF4 (Klon 3E4), anti-IRF8 (Klon V3GYWCH), anti-H-2Kb gebunden an SIINFEKL (Klon 25-D1. 16), anti-H2-Kb (Klon REA932), anti-MHC Klasse II (MHC II) I-A/I-E (Klon M5/114.15.2), anti-Nur77 (Klon 12.14), anti-IL-12/IL-23p40 (Klon C15.6), anti-PD1

(29F.1 A12), anti-pPKA (pS114, Klon 47/PKA), anti-S8:H2-Kb (Klon 25-D1.16), anti-TCF1 (Klon S33-966), anti-TCR $\beta$  (Klon H57-597), anti-TIM3 (Klon RMT3-23), anti-Ki-67 (Klon SolA15), anti-XCR1 (Klon ZET). Die folgenden Anti-Human Antikörper wurden für die Durchflusszytometrie verwendet: Anti-Human CLEC9A (Klon 8F9), Anti-Human CD141 (Klon M80), Anti-Human CD3 (Klon UCHT1). Alle in dieser Studie verwendeten durchflusszytometrischen Antikörper wurden vom Hersteller für Durchflusszytometrie validiert.

### 4.2.17 Volumetrische Immunfluoreszenzmikroskopie und Bildanalyse

Die volumetrische Mikroskopie der Tumorgewebe wurde durchgeführt wie kürzlich beschrieben (Bayerl et al., 2023). Kurz zusammengefasst wurden Tumoren in Antigenfix-Lösung (Diapath) fixiert, die Proben in 30%iger Saccharose dehydriert, in TissueTek OCT-Gefriermedium (Sakura Finetek) eingebettet und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Mit einem Leica CM3050 S Kryostat wurden aufeinanderfolgende Schnitte mit einer Dicke von  $50\mu\text{m}$  erstellt. Die Schnitte wurden permeabilisiert, in Färbepuffer geblockt und in 0.1 M Tris (Carl Roth) mit 1% BSA, 0,3% Triton X-100 (Merck), 1% normalem Mausserum (Merck) und 1% Eselserum (Merck) gefärbt. Die gefärbten Schnitte wurden in Mowiol (Merck) eingebettet und auf einem konfokalen TCS SP8 Mikroskop (Leica) mit einem HC PL APO CS2 20x/0.75NA Objektiv analysiert. Der Z-Abstand der einzelnen Bildstapel der gekachelten Bilder betrug  $2\mu\text{m}$ . Durch ein Zusammensetzen der Bildkacheln war es anschließend möglich, große dreidimensionale Bildvolumina von mindestens  $20\mu\text{m}$  Tiefe zu erhalten. Für die Bildanalyse wurden die Bilder durch adaptive Bilddekonvolution mit dem Leica TCS SP8 LIGHTNING Tool digital bearbeitet und mit der Imaris 9.7 Software (Oxford Instruments) analysiert. Das Imaris-Tool zur Oberflächenerzeugung wurde zur Rekonstruktion und Visualisierung von 3D-Objekten für einzelne Zellen verwendet. In einigen Experimenten wurden die Fluoreszenzsignale außerhalb der gerenderten Zellen maskiert, um intrazelluläre Proteine sichtbar zu machen. Für die Analyse der Ki-67-Expression in  $\text{CD8}^+$  T Zellen durch Histozytometrie wurden Statistiken für T Zell-Objekte in Excel (Microsoft) exportiert und mit der Software GraphPad Prism (GraphPad) analysiert oder in CSV-Dateien zur Analyse in FlowJo (BD) konvertiert. Cluster von interagierenden  $\text{cDC1}$  und  $\text{CD8}^+$  T Zellen wurden in einem mehrstufigen Prozess anhand der Positionsinformationen der Zellobjekte identifiziert.  $\text{CD8}^+$  T Zell-Cluster wurden mit Hilfe der in Imaris integrierten Funktion "Abstand zu 5 nächsten Nachbarn" definiert als Gruppen von minimal fünf Zellen innerhalb eines Radius von  $20\mu\text{m}$ , gemessen ab der äußeren Oberfläche jeder Zelle.  $\text{cDC1}$ , die mit  $\text{CD8}^+$  T Zell-Clustern interagierten ("interagierende  $\text{cDC1}$ "), wurden mit Hilfe der „minimaler Objekt-Objekt-Abstand“ Funktion (Abstand  $\leq 5\mu\text{m}$ ) identifiziert. Zur Identifizierung von  $\text{CD8}^+$  T Zell-Clustern, die mit  $\text{cDC1}$  interagierten ("Interagierende  $\text{CD8}^+$  T

Zellen"), wurden CD8<sup>+</sup> T Zellen, die mehr als 15µm von interagierenden cDC1 entfernt waren, durch Abstandsschwellenwertbildung mit der Imaris-Filterfunktion entfernt. Die Quantifizierung von Zell-Clustern oder der Anzahl an nicht-interagierenden Zellen wurde relativ zum Volumen des abgebildeten Abschnitts durchgeführt.

#### **4.2.18 Antikörper für die Immunfluoreszenzmikroskopie**

Die folgenden Antikörper wurden für die Färbung von Mausgewebe verwendet: Anti-CD3 (Klon 17A2), AntiCD8 $\alpha$  (Klon 53-6.7), Anti-CD31 (Klon MEC13.3), Anti-CD103 (Ziege polyklonal), Anti-Collagen IV (Kaninchen polyklonal), Anti-MHCII I-A/I-E (Klon M5/114.15.2), Anti-Ki-67 (Klon SolA15), Anti-IRF8 (Klon V3GYWCH). Alle Antikörper wurden entweder vom Hersteller für die Verwendung zur Immunfluoreszenzmikroskopie validiert oder waren bereits für die Verwendung zur Immunfluoreszenzmikroskopie bekannt.

#### **4.2.19 RNA-Isolierung und quantitative RT-PCR**

RNA wurde mit Hilfe des Monarch Total RNA Miniprep Kits (New England Biolabs) isoliert und mit Hilfe des SensiFAST cDNA-Synthesekits (Bioline) in cDNA umgeschrieben. Die quantitative RT-PCR (qRT-PCR) wurde mit dem TAKYON qPCR SYBR green Assay auf einem LightCycler 480 (Roche) durchgeführt. Zur Bestimmung der relativen Genexpression  $\Delta C_t$  wurde die Expression des Zielgens in Relation zur Expression des Referenzgens HPRT berechnet. Die Primersequenzen sind in Tabelle 10 zu finden. Alle Primer wurden von Eurofins bezogen.

#### **4.2.20 RNA-seq Analysen von murinen cDC1 aus *in vitro* DC-Kulturen**

RNA-Extrakt aus murinen cDC1 wurde für die Konstruktion von 3'-mRNA-seq-Bibliotheken verwendet (Macosko et al., 2015). Kurz zusammengefasst wurde die RNA der einzelnen Proben mit einer Maxima RT-Polymerase (Thermo Fisher) unter Verwendung von Oligo-dT-Primern, die Barcodes und eindeutige molekulare Identifikatoren enthalten (UMI, Integrated DNA Technologies), zu cDNA revers transkribiert. Die Adapter-5'-Enden der cDNAs wurden mit einem Template-Switch-Oligo (TSO) verlängert. Die Proben wurden gepoolt und die cDNA in voller Länge mit Hilfe der TSO- und Adapter-spezifischen Primern amplifiziert. Anschließend wurde die cDNA mit dem Nextera XT Kit (Illumina), 3'-End-Fragmenten sowie P5- und P7-Illumina-Überhängen ergänzt. Die mit Barcodes versehene cDNA-Bibliothek wurde daraufhin mit einem NextSeq 500-System (Illumina) sequenziert. UMI-Tabellen wurden für Proben und Gene mithilfe der Drop-Seq-Pipeline ([https://github.com/broadinstitute/Drop-](https://github.com/broadinstitute/Drop-Seq)

seq) erstellt. Die Rohsequenzierdaten wurden bei GEO unter der Zugangsnummer GSE213205 hinterlegt.

#### 4.2.21 RNA-seq-Analyse von murinen Tumor cDC1

WT Mäusen wurden s.c.  $2 \times 10^6$  Kontroll- oder Ptgs1/Ptgs2<sup>-/-</sup>-BRAF<sup>V600E</sup>-Zellen transplantiert. Nach 6 Tagen wurden Immuncellen durch Dichtezentrifugation (Pancoll, PAN Biotech) aus den Tumoren isoliert. Aus dieser Zellsuspension wurden intratumorale cDC1 direkt in RNA-Lysepuffer sortiert, wobei 10 Zellen pro Tumor gesammelt wurden und mit Hilfe des SMART-Seq3 Protokolls sequenziert. RNA-Extraktion, Bibliotheksvorbereitung und Sequenzierung wurden von der VBCF.NGS Core Facility unter Verwendung des Smart-Seq3-Protokolls (Hagemann-Jenssen et al., 2020) durchgeführt. Die Konstruktion der Bibliothek wurde gemäß den Anweisungen des Herstellers unter Verwendung des Nextera-Kits durchgeführt. Die Sequenzierung wurde mit Illumina NextSeq 550 (Illumina) durchgeführt, um 72-bp paired-end Sequenzierungs-Reads zu erhalten. Die nicht demultiplexierten fastq-Dateien wurden mit zUMIs (Version 2.4.1) und STAR (Version 2.5.4b) verarbeitet, um Expressionsprofile zu erstellen. Die Ergebnisse wurden gegen das GrCm38 (mm10)-Referenzgenom (Ensembl GRCh38.91) gemappt. Proben mit geringer Sequenzierabdeckung wurden für die weitere Analyse ausgeschlossen. Die Rohsequenzierdaten wurden bei GEO unter der Zugriffsnummer GSE222782 hinterlegt.

#### 4.2.22 RNA-seq-Analyse von humanen cDC1

Für die Vorbereitung der RNA-seq Bibliotheken wurde die aus humanen cDC1 isolierte mRNA fragmentiert und der erste Strang der cDNA mit Hilfe von Random-Hexamer-Primern synthetisiert, gefolgt von der Synthese des zweiten Strangs der cDNA mit dTTP-Primern. Nach Single-End-Repair, A-Tailing, Adapter-Ligation, Größenselektion, Amplifikation und Reinigung wurde die Bibliothek mit Qubit und Real-Time-PCR zur Quantifizierung sowie mit dem Bioanalyzer zur Bestimmung der Größenverteilung überprüft. Quantifizierte Bibliotheken wurden gepoolt und auf einer Illumina NovaSeq 6000-Plattform sequenziert. Die Reads wurden gegen das humane Referenzgenom (Ensembl GRCh38/hg38) gemappt. Transkripte und Gendefinitionen wurden gemäß der ENSEMBL-Annotation Release 75 definiert. Indizes des Referenzgenoms wurden mit STAR (v2.5) erstellt und gepaarte, saubere Reads wurden mit der STAR Maximal Mappable Prefix (MMP)-Methode gemappt. Die Alignments wurden mit dem Programm Tophat geparkt, HTSeq v0.6.1 wurde verwendet, um die Anzahl der jedem Gen zugeordneten Reads zu zählen. Die Fragmente pro Kilobase des Transkripts pro Millionen zugeordneter Reads (FPKM) wurden auf der Grundlage der Länge des Gens und

der Anzahl der diesem Gen zugeordneten Reads berechnet. Die Rohsequenzdaten wurden bei GEO unter der Zugriffsnummer GSE213691 hinterlegt.

#### 4.2.23 Bioinformatische Analysen der RNA-seq-Daten

Differenziell exprimierte Gene (DEGs) wurden mit dem DESeq2 R-Paket 2\_1.6.3 (Love et al., 2014) berechnet mit einem Fold Change (FC) von 1.5 und einem angepassten p-Wert (p.adj) kleiner als 0.05. Die Visualisierung der DEGs in Vulkanplots erfolgte mit dem R-Paket ggplot2. Die Hauptkomponentenanalyse (PCA) wurde mit der Funktion prcomp in R durchgeführt und mit ggplot2 und ggrepel visualisiert. Die Gene Ontology (GO) Anreicherungsanalyse für biologische Prozesse auf DEGs wurde mit METASCAPE (Y. Zhou et al., 2019) durchgeführt. Biologische Prozesse wurden ab einem p-Wert kleiner als 0.05 als statistisch signifikant angesehen.

#### 4.2.24 Analyse des Transkriptionsfaktor-Netzwerks

Die Vorhersageanalyse für Upstream-Transkriptionsfaktoren (TF) basierte auf aktivierungsinduzierten Genen, die in Poly I:C-aktivierten cDC1 durch vorherige PGE<sub>2</sub>-Exposition signifikant herunterreguliert wurden. Die Analysen wurden mit ENRICH (E. Y. Chen et al., 2013) durchgeführt. Die hierarchische TF-Netzwerkanalyse basierte auf Genen, die zwischen den beiden Behandlungsgruppen "Unbehandelt" vs. "PGE<sub>2</sub>-behandelt" und zwischen "Ptgs1/Ptgs2<sup>-/-</sup>-BRAF<sup>V600E</sup> K.M." vs. "Kontroll-BRAF<sup>V600E</sup> K.M." differenziell exprimiert wurden. Regulierte TF wurden mithilfe des Maus-TF-Atlas (Q. Zhou et al., 2017) identifiziert, und die Daten für TF, die in beiden Vergleichen reguliert wurden, wurden verwendet, um das ko-regulatorische TF-Netzwerk mithilfe des h-LICORN-Algorithmus zu konstruieren (Teil des CoRegNet-Pakets (Nicolle et al., 2015; Chebil et al., 2014)). Kurz zusammengefasst wurde das TF-Netzwerk auf Grundlage des "TF-Einflusses", als Stellvertreter für die TF-Aktivität, und der Anzahl der regulierten TF-Zielgene unter Verwendung des Jaccard-Ähnlichkeitskoeffizienten (J) konstruiert. Der "TF-Einfluss" wurde probenspezifisch berechnet, indem die Genexpressionswerte für TF-induzierte und TF-unterdrückte Ziele verglichen wurden. Die Korrelation zwischen den TF-Expressionsniveaus wurde unter Verwendung der Pearson-Korrelation als Maß für TF-Interaktionen berechnet und zusammen mit den Werten für gemeinsame TF-Ziele zur Bestimmung des Jaccard-Ähnlichkeitskoeffizienten (J) verwendet, berechnet nach folgender Formel

$$J = \frac{TF_i \cap TF_j}{TF_i \cup TF_j}$$

wobei TF<sub>i</sub> die Anzahl der Targets für einen bestimmten TF im TF-Target-Netzwerk 1 und TF<sub>j</sub> die Anzahl der Targets für einen bestimmten TF im TF-Target-Netzwerk 2 ist. Schließlich

wurde die Hierarchie des TF-Netzwerks auf der Grundlage des "TF-Einflusses" und der Anzahl der regulierten TF-Zielgene konstruiert, wobei die wichtigsten TFs an die Spitze des TF-TF-Netzwerks gesetzt wurden. Die Netzwerkdiagramme wurden in Cytoscape 3.8.2 (Shannon et al., 2003) gerendert.

#### **4.2.25 Analyse der Anreicherung von Gensätzen**

Die Gensatzanreicherungsanalyse (gene enrichment analysis, GSEA) wurde für DEGs aus Vergleichen zwischen den cDC1-Gruppen " PGE<sub>2</sub>-behandelt + poly I:C" und "unbehandelt + poly I:C" bzw. "unbehandelt" und " PGE<sub>2</sub>-behandelt" durchgeführt. Die DEGs wurden nach log<sub>2</sub>-Fold-Change-Werten geordnet und mit GSEA v3.0 auf Anreicherung von veröffentlichten Gensätzen analysiert. Die Gensätze für zelluläre Prozesse umfassten Gensätze für Zytokinsignalisierung, Zellmigration und DC-Reifung (Subramanian et al., 2005) sowie einen Gensatz für Antigenaufnahme und Kreuzpräsentation (Kelly und Trowsdale, 2019). Die GSEA-Analyse der TF-Zielgene wurde mit Gensätzen für IRF8 (Langlais et al., 2016), PU.1 (Jones et al., 2021), BATF3 (Theisen et al., 2019), ID2 (Mercer et al., 2011), IRF1 (Langlais et al., 2016) und NFκB (Han et al., 2018) durchgeführt. Das PreRanked-Tool von GSEA 3.0 wurde verwendet, um den normalisierten Anreicherungs-Score (NES) zu bewerten, und die statistische Signifikanz des NES wurde anhand der Falschpositivrate (False discovery rate, FDR) bemessen.

#### **4.2.26 Bioinformatische Analysen der Daten von Krebspatienten**

RSEM-normalisierte Genexpressionsdatensätze aus dem The Cancer Genome Atlas (TCGA) wurden von Firehose (<https://gdac.broadinstitute.org/>) heruntergeladen und nach Daten für Primärtumorbiopsien gefiltert. Analysen für zwei Kohorten von Melanompatienten, die sich einer Immun-Checkpoint-Blockade-Therapie unterzogen hatten, wurden auf Grundlage von Genexpressionsdaten aus (Riaz et al., 2017) und (Liu et al., 2019) durchgeführt. Für die Analysen der Genexpressionssignaturen wurden die normalisierten Expressionsgene log<sub>2</sub>-transformiert und nach dem mittleren Expressionswert der Signaturgene geordnet. Gesamtüberlebensanalysen wurden für Patienten mit hohen und niedrigen Signatur-Expressionswerte durchgeführt, wie in den Legenden der Abbildungen angegeben, und für Kaplan-Meier-Kurven mit GraphPad Prism (GraphPad) aufgetragen. Der Signatur-Score zur Bewertung der Immunzellinfiltration in Krebsproben von Patienten, die sich einer Anti-PD1-Therapie unterziehen (Abbildungen 21G und 21I), wurde auf der Grundlage des durchschnittlichen Rangs der Expressionswerte der einzelnen Signaturgene berechnet, wie zuvor beschrieben (Cursons et al., 2019). Hierzu wurden alle Transkripte für jede Probe nach

abnehmender Expression geordnet und der Signatur-Score wurde definiert als "1- (mittlerer Rang der Signatur-Transkripte / Anzahl aller Transkripte)". Es wurden nur Patienten mit sowohl Vor- als auch Nachbehandlungsproben und dokumentiertem Therapieverlauf analysiert.

#### **4.2.27 Quantifizierung und statistische Analyse**

Alle statistischen Analysen wurden mit der Software GraphPad Prism (GraphPad) durchgeführt. Die statistische Signifikanz wurde mit einem ungepaarten zweiseitigen Student's t-Test ermittelt. Statistische Analysen für drei oder mehr Gruppen und Tumorwachstumsprofile wurden mittels ANOVA durchgeführt. Korrelationsanalysen wurden mit der Pearson-Korrelation durchgeführt. Wenn nicht anders angegeben, sind die Daten als Mittelwert  $\pm$  SD oder Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. Signifikanz wurde angenommen bei \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ . Die statistischen Parameter für jedes Experiment sind in der jeweiligen Abbildungslegende angegeben.

## 5 Quellenangaben

1. Steinman, R.M., and Idoyaga, J. (2010). Features of the dendritic cell lineage. *Immunol Rev* 234, 5-17. 10.1111/j.0105-2896.2009.00888.x.
2. Lewis, K.L., and Reizis, B. (2012). Dendritic cells: arbiters of immunity and immunological tolerance. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4, a007401. 10.1101/cshperspect.a007401.
3. Shakhar, G., Lindquist, R.L., Skokos, D., Dudziak, D., Huang, J.H., Nussenzweig, M.C., and Dustin, M.L. (2005). Stable T cell–dendritic cell interactions precede the development of both tolerance and immunity in vivo. *Nature Immunology* 6, 707-714. 10.1038/ni1210.
4. Chong, S.Z., Wong, K.L., Lin, G., Yang, C.M., Wong, S.-C., Angeli, V., MacAry, P.A., and Kemeny, D.M. (2011). Human CD8+ T cells drive Th1 responses through the differentiation of TNF/iNOS-producing dendritic cells. *European Journal of Immunology* 41, 1639-1651. <https://doi.org/10.1002/eji.201041022>.
5. Guilliams, M., Ginhoux, F., Jakubzick, C., Naik, S.H., Onai, N., Schraml, B.U., Segura, E., Tussiwand, R., and Yona, S. (2014). Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nature Reviews Immunology* 14, 571-578. 10.1038/nri3712.
6. Kamath, A.T., Henri, S., Battye, F., Tough, D.F., and Shortman, K. (2002). Developmental kinetics and lifespan of dendritic cells in mouse lymphoid organs. *Blood* 100, 1734-1741.
7. Hoeffel, G., Wang, Y., Greter, M., See, P., Teo, P., Malleret, B., Leboeuf, M., Low, D., Oller, G., Almeida, F., et al. (2012). Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *J Exp Med* 209, 1167-1181. 10.1084/jem.20120340.
8. Langerhans, P. (1868). Ueber die Nerven der menschlichen Haut. *Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medicin* 44, 325-337. 10.1007/bf01959006.
9. Fogg, D.K., Sibon, C., Miled, C., Jung, S., Aucouturier, P., Littman, D.R., Cumano, A., and Geissmann, F. (2006). A Clonogenic Bone Marrow Progenitor Specific for Macrophages and Dendritic Cells. *Science* 311, 83-87. 10.1126/science.1117729.
10. Naik, S.H., Sathe, P., Park, H.Y., Metcalf, D., Proietto, A.I., Dakic, A., Carotta, S., O'Keeffe, M., Bahlo, M., Papenfuss, A., et al. (2007). Development of plasmacytoid

- and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nat Immunol* 8, 1217-1226. 10.1038/ni1522.
11. Liu, K., Victora, G.D., Schwickert, T.A., Guermonprez, P., Meredith, M.M., Yao, K., Chu, F.-F., Randolph, G.J., Rudensky, A.Y., and Nussenzweig, M. (2009). In Vivo Analysis of Dendritic Cell Development and Homeostasis. *Science* 324, 392-397. 10.1126/science.1170540.
  12. Liu, Z., Wang, H., Li, Z., Dress, R.J., Zhu, Y., Zhang, S., De Feo, D., Kong, W.T., Cai, P., Shin, A., et al. (2023). Dendritic cell type 3 arises from Ly6C<sup>+</sup> monocyte-dendritic cell progenitors. *Immunity* 56, 1761-1777.e1766. 10.1016/j.immuni.2023.07.001.
  13. Omatsu, Y., Iyoda, T., Kimura, Y., Maki, A., Ishimori, M., Toyama-Sorimachi, N., and Inaba, K. (2005). Development of murine plasmacytoid dendritic cells defined by increased expression of an inhibitory NK receptor, Ly49Q. *J Immunol* 174, 6657-6662. 10.4049/jimmunol.174.11.6657.
  14. Anderson, D.A., Murphy, K.M., and Briseño, C.G. (2018). Development, Diversity, and Function of Dendritic Cells in Mouse and Human. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 10, a028613. 10.1101/cshperspect.a028613.
  15. Robbins, S.H., Walzer, T., Dembélé, D., Thibault, C., Defays, A., Bessou, G., Xu, H., Vivier, E., Sellars, M., Pierre, P., et al. (2008). Novel insights into the relationships between dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling. *Genome Biology* 9, R17. 10.1186/gb-2008-9-1-r17.
  16. Zilionis, R., Engblom, C., Pfirschke, C., Savova, V., Zemmour, D., Saatcioglu, H.D., Krishnan, I., Maroni, G., Meyerovitz, C.V., Kerwin, C.M., et al. (2019). Single-Cell Transcriptomics of Human and Mouse Lung Cancers Reveals Conserved Myeloid Populations across Individuals and Species. *Immunity* 50, 1317-1334.e1310. 10.1016/j.immuni.2019.03.009.
  17. Hildner, K., Edelson, B.T., Purtha, W.E., Diamond, M., Matsushita, H., Kohyama, M., Calderon, B., Schraml, B.U., Unanue, E.R., Diamond, M.S., et al. (2008). *Batf3* deficiency reveals a critical role for CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science* 322, 1097-1100. 10.1126/science.1164206.
  18. Lança, T., Ungerback, J., Da Silva, C., Joeris, T., Ahmadi, F., Vandamme, J., Svensson-Frej, M., Mowat, A.M., Kotarsky, K., Sigvardsson, M., and Agace, W.W. (2022). IRF8 deficiency induces the transcriptional, functional, and epigenetic reprogramming of cDC1 into the cDC2 lineage. *Immunity* 55, 1431-1447.e1411. 10.1016/j.immuni.2022.06.006.

19. Zhang, S., Coughlan, H.D., Ashayeripannah, M., Seizova, S., Kueh, A.J., Brown, D.V., Cao, W., Jacquelot, N., D'Amico, A., Lew, A.M., et al. (2021). Type 1 conventional dendritic cell fate and function are controlled by DC-SCRIPT. *Sci Immunol* 6. 10.1126/sciimmunol.abf4432.
20. Chopin, M., Lun, A.T., Zhan, Y., Schreuder, J., Coughlan, H., D'Amico, A., Mielke, L.A., Almeida, F.F., Kueh, A.J., Dickins, R.A., et al. (2019). Transcription Factor PU.1 Promotes Conventional Dendritic Cell Identity and Function via Induction of Transcriptional Regulator DC-SCRIPT. *Immunity* 50, 77-90.e75. 10.1016/j.immuni.2018.11.010.
21. Bachem, A., Güttler, S., Hartung, E., Ebstein, F., Schaefer, M., Tannert, A., Salama, A., Movassaghi, K., Opitz, C., Mages, H.W., et al. (2010). Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine* 207, 1273-1281. 10.1084/jem.20100348.
22. Schlitzer, A., McGovern, N., Teo, P., Zelante, T., Atarashi, K., Low, D., Adrian, See, P., Shin, A., Pavandip, et al. (2013). IRF4 Transcription Factor-Dependent CD11b+ Dendritic Cells in Human and Mouse Control Mucosal IL-17 Cytokine Responses. *Immunity* 38, 970-983. 10.1016/j.immuni.2013.04.011.
23. Scott, C.L., Soen, B., Martens, L., Skrypek, N., Saelens, W., Taminau, J., Blancke, G., Van Isterdael, G., Huylebroeck, D., Haigh, J., et al. (2016). The transcription factor Zeb2 regulates development of conventional and plasmacytoid DCs by repressing Id2. *Journal of Experimental Medicine* 213, 897-911. 10.1084/jem.20151715.
24. Bourdely, P., Anselmi, G., Vaivode, K., Ramos, R.N., Missolo-Koussou, Y., Hidalgo, S., Tosselo, J., Nuñez, N., Richer, W., Vincent-Salomon, A., et al. (2020). Transcriptional and Functional Analysis of CD1c+ Human Dendritic Cells Identifies a CD163+ Subset Priming CD8+CD103+ T Cells. *Immunity* 53, 335-352.e338. 10.1016/j.immuni.2020.06.002.
25. Dutertre, C.-A., Becht, E., Irac, S.E., Khalilnezhad, A., Narang, V., Khalilnezhad, S., Ng, P.Y., Van Den Hoogen, L.L., Leong, J.Y., Lee, B., et al. (2019). Single-Cell Analysis of Human Mononuclear Phagocytes Reveals Subset-Defining Markers and Identifies Circulating Inflammatory Dendritic Cells. *Immunity* 51, 573-589.e578. 10.1016/j.immuni.2019.08.008.
26. Cisse, B., Caton, M.L., Lehner, M., Maeda, T., Scheu, S., Locksley, R., Holmberg, D., Zweier, C., Den Hollander, N.S., Kant, S.G., et al. (2008). Transcription Factor E2-2 Is an Essential and Specific Regulator of Plasmacytoid Dendritic Cell Development. *Cell* 135, 37-48. 10.1016/j.cell.2008.09.016.

27. Plantinga, M., Guilliams, M., Vanheerswynghele, M., Deswarte, K., Branco-Madeira, F., Toussaint, W., Vanhoutte, L., Neyt, K., Killeen, N., Malissen, B., Hammad, H., and Bart (2013). Conventional and Monocyte-Derived CD11b<sup>+</sup> Dendritic Cells Initiate and Maintain T Helper 2 Cell-Mediated Immunity to House Dust Mite Allergen. *Immunity* 38, 322-335. 10.1016/j.immuni.2012.10.016.
28. Cheong, C., Matos, I., Choi, J.-H., Dandamudi, D.B., Shrestha, E., Longhi, M.P., Jeffrey, K.L., Anthony, R.M., Kluger, C., Nchinda, G., et al. (2010). Microbial Stimulation Fully Differentiates Monocytes to DC-SIGN/CD209<sup>+</sup> Dendritic Cells for Immune T Cell Areas. *Cell* 143, 416-429. 10.1016/j.cell.2010.09.039.
29. Bosteels, V., Maréchal, S., De Nolf, C., Rennen, S., Maelfait, J., Tavernier, S.J., Vettters, J., Van De Velde, E., Fayazpour, F., Deswarte, K., et al. (2023). LXR signaling controls homeostatic dendritic cell maturation. *Science Immunology* 8. 10.1126/sciimmunol.add3955.
30. Sulczewski, F.B., Maqueda-Alfaro, R.A., Alcántara-Hernández, M., Perez, O.A., Saravanan, S., Yun, T.J., Seong, D., Arroyo Hornero, R., Raquer-McKay, H.M., Esteva, E., et al. (2023). Transitional dendritic cells are distinct from conventional DC2 precursors and mediate proinflammatory antiviral responses. *Nature Immunology* 24, 1265-1280. 10.1038/s41590-023-01545-7.
31. Wculek, S.K., Cueto, F.J., Mujal, A.M., Melero, I., Krummel, M.F., and Sancho, D. (2020). Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 20, 7-24. 10.1038/s41577-019-0210-z.
32. Böttcher, J.P., Bonavita, E., Chakravarty, P., Blees, H., Cabeza-Cabrerizo, M., Sammicheli, S., Rogers, N.C., Sahai, E., Zelenay, S., and Reis E Sousa, C. (2018). NK Cells Stimulate Recruitment of cDC1 into the Tumor Microenvironment Promoting Cancer Immune Control. *Cell* 172, 1022-1037.e1014. 10.1016/j.cell.2018.01.004.
33. Böttcher, J.P., and Reis E Sousa, C. (2018). The Role of Type 1 Conventional Dendritic Cells in Cancer Immunity. *Trends in Cancer* 4, 784-792. 10.1016/j.trecan.2018.09.001.
34. Barry, K.C., Hsu, J., Broz, M.L., Cueto, F.J., Binnewies, M., Combes, A.J., Nelson, A.E., Loo, K., Kumar, R., Rosenblum, M.D., et al. (2018). A natural killer-dendritic cell axis defines checkpoint therapy-responsive tumor microenvironments. *Nat Med* 24, 1178-1191. 10.1038/s41591-018-0085-8.
35. Salmon, H., Idoyaga, J., Rahman, A., Leboeuf, M., Remark, R., Jordan, S., Casanova-Acebes, M., Khudoynazarova, M., Agudo, J., Tung, N., et al. (2016). Expansion and Activation of CD103<sup>+</sup> Dendritic Cell Progenitors at the Tumor Site Enhances Tumor Responses to Therapeutic PD-L1 and BRAF Inhibition. *Immunity* 44, 924-938. 10.1016/j.immuni.2016.03.012.

36. Spranger, S., Dai, D., Horton, B., and Gajewski, T.F. (2017). Tumor-Residing Batf3 Dendritic Cells Are Required for Effector T Cell Trafficking and Adoptive T Cell Therapy. *Cancer Cell* 31, 711-723.e714. 10.1016/j.ccell.2017.04.003.
37. Broz, M.L., Binnewies, M., Boldajipour, B., Nelson, A.E., Pollack, J.L., Erle, D.J., Barczak, A., Rosenblum, M.D., Daud, A., Barber, D.L., et al. (2014). Dissecting the tumor myeloid compartment reveals rare activating antigen-presenting cells critical for T cell immunity. *Cancer Cell* 26, 638-652. 10.1016/j.ccell.2014.09.007.
38. See, P., Dutertre, C.A., Chen, J., Günther, P., McGovern, N., Irac, S.E., Gunawan, M., Beyer, M., Händler, K., Duan, K., et al. (2017). Mapping the human DC lineage through the integration of high-dimensional techniques. *Science* 356. 10.1126/science.aag3009.
39. Durai, V., Bagadia, P., Granja, J.M., Satpathy, A.T., Kulkarni, D.H., Davidson, J.T., Wu, R., Patel, S.J., Iwata, A., Liu, T.-T., et al. (2019). Cryptic activation of an Irf8 enhancer governs cDC1 fate specification. *Nature Immunology* 20, 1161-1173. 10.1038/s41590-019-0450-x.
40. Harty, J.T., and Badovinac, V.P. (2008). Shaping and reshaping CD8+ T-cell memory. *Nature Reviews Immunology* 8, 107-119. 10.1038/nri2251.
41. Kaech, S.M., and Cui, W. (2012). Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nature Reviews Immunology* 12, 749-761. 10.1038/nri3307.
42. Garris, C.S., Arlauckas, S.P., Kohler, R.H., Trefny, M.P., Garren, S., Piot, C., Engblom, C., Pfirschke, C., Siwicki, M., Gungabeesoon, J., et al. (2018). Successful Anti-PD-1 Cancer Immunotherapy Requires T Cell-Dendritic Cell Crosstalk Involving the Cytokines IFN- $\gamma$  and IL-12. *Immunity* 49, 1148-1161.e1147. 10.1016/j.immuni.2018.09.024.
43. Hubert, M., Gobbini, E., Couillault, C., Manh, T.-P.V., Doffin, A.-C., Berthet, J., Rodriguez, C., Ollion, V., Kielbassa, J., Sajous, C., et al. (2020). IFN-III is selectively produced by cDC1 and predicts good clinical outcome in breast cancer. *Science Immunology* 5, eaav3942. 10.1126/sciimmunol.aav3942.
44. Ruffell, B., Chang-Strachan, D., Chan, V., Rosenbusch, A., Christine, Pryer, N., Daniel, D., E, Hope, and Lisa (2014). Macrophage IL-10 Blocks CD8+ T Cell-Dependent Responses to Chemotherapy by Suppressing IL-12 Expression in Intratumoral Dendritic Cells. *Cancer Cell* 26, 623-637. 10.1016/j.ccell.2014.09.006.
45. Roberts, E.W., Broz, M.L., Binnewies, M., Headley, M.B., Nelson, A.E., Wolf, D.M., Kaisho, T., Bogunovic, D., Bhardwaj, N., and Krummel, M.F. (2016). Critical Role for CD103+/CD141+ Dendritic Cells Bearing CCR7 for Tumor Antigen Trafficking and

- Priming of T Cell Immunity in Melanoma. *Cancer Cell* 30, 324-336. 10.1016/j.ccell.2016.06.003.
46. Canton, J., Blees, H., Henry, C.M., Buck, M.D., Schulz, O., Rogers, N.C., Childs, E., Zelenay, S., Rhys, H., Domart, M.-C., et al. (2021). The receptor DNGR-1 signals for phagosomal rupture to promote cross-presentation of dead-cell-associated antigens. *Nature Immunology* 22, 140-153. 10.1038/s41590-020-00824-x.
47. Henry, C.M., Castellanos, C.A., and Reis e Sousa, C. (2023). DNGR-1-mediated cross-presentation of dead cell-associated antigens. *Seminars in Immunology* 66, 101726. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2023.101726>.
48. Iwasaki, A., and Medzhitov, R. (2015). Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature Immunology* 16, 343-353. 10.1038/ni.3123.
49. León, B., and Lund, F.E. (2019). Compartmentalization of dendritic cell and T - cell interactions in the lymph node: Anatomy of T - cell fate decisions. *Immunological Reviews* 289, 84-100. 10.1111/imr.12758.
50. Weigelin, B., and Friedl, P. (2022). T cell-mediated additive cytotoxicity – death by multiple bullets. *Trends in Cancer* 8, 980-987. 10.1016/j.trecan.2022.07.007.
51. Prokhnevskaya, N., Cardenas, M.A., Valanparambil, R.M., Sobierajska, E., Barwick, B.G., Jansen, C., Reyes Moon, A., Gregorova, P., delBalzo, L., Greenwald, R., et al. (2023). CD8(+) T cell activation in cancer comprises an initial activation phase in lymph nodes followed by effector differentiation within the tumor. *Immunity* 56, 107-124.e105. 10.1016/j.immuni.2022.12.002.
52. Mikucki, M.E., Fisher, D.T., Matsuzaki, J., Skitzki, J.J., Gaulin, N.B., Muhitch, J.B., Ku, A.W., Frelinger, J.G., Odunsi, K., Gajewski, T.F., Luster, A.D., and Evans, S.S. (2015). Non-redundant requirement for CXCR3 signalling during tumoricidal T-cell trafficking across tumour vascular checkpoints. *Nature Communications* 6, 7458. 10.1038/ncomms8458.
53. Meiser, P., Knolle, M.A., Hirschberger, A., de Almeida, G.P., Bayerl, F., Lacher, S., Pedde, A.-M., Flommersfeld, S., Hönninger, J., Stark, L., et al. (2023). A distinct stimulatory cDC1 subpopulation amplifies CD8+ T cell responses in tumors for protective anti-cancer immunity. *Cancer Cell* 41, 1498-1515.e1410. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2023.06.008>.
54. Dangaj, D., Bruand, M., Grimm, A.J., Ronet, C., Barras, D., Dutttagupta, P.A., Lanitis, E., Duraiswamy, J., Tanyi, J.L., Benencia, F., et al. (2019). Cooperation between Constitutive and Inducible Chemokines Enables T Cell Engraftment and Immune Attack in Solid Tumors. *Cancer Cell* 35, 885-900.e810. 10.1016/j.ccell.2019.05.004.

55. Chow, M.T., Ozga, A.J., Servis, R.L., Frederick, D.T., Lo, J.A., Fisher, D.E., Freeman, G.J., Boland, G.M., and Luster, A.D. (2019). Intratumoral Activity of the CXCR3 Chemokine System Is Required for the Efficacy of Anti-PD-1 Therapy. *Immunity* 50, 1498-1512.e1495. 10.1016/j.immuni.2019.04.010.
56. Ferris, S.T., Durai, V., Wu, R., Theisen, D.J., Ward, J.P., Bern, M.D., Davidson, J.T.t., Bagadia, P., Liu, T., Briseño, C.G., et al. (2020). cDC1 prime and are licensed by CD4(+) T cells to induce anti-tumour immunity. *Nature* 584, 624-629. 10.1038/s41586-020-2611-3.
57. Wu, R., and Murphy, K.M. (2022). DCs at the center of help: Origins and evolution of the three-cell-type hypothesis. *J Exp Med* 219. 10.1084/jem.20211519.
58. Soares, H., Waechter, H., Glaichenhaus, N., Mougneau, E., Yagita, H., Mizenina, O., Dudziak, D., Nussenzweig, M.C., and Steinman, R.M. (2007). A subset of dendritic cells induces CD4+ T cells to produce IFN-gamma by an IL-12-independent but CD70-dependent mechanism in vivo. *J Exp Med* 204, 1095-1106. 10.1084/jem.20070176.
59. Wu, R., Ohara, R.A., Jo, S., Liu, T.T., Ferris, S.T., Ou, F., Kim, S., Theisen, D.J., Anderson, D.A., 3rd, Wong, B.W., et al. (2022). Mechanisms of CD40-dependent cDC1 licensing beyond costimulation. *Nat Immunol* 23, 1536-1550. 10.1038/s41590-022-01324-w.
60. Hargadon, K.M., Bishop, J.D., Brandt, J.P., Hand, Z.C., Ararso, Y.T., and Forrest, O.A. (2016). Melanoma-derived factors alter the maturation and activation of differentiated tissue-resident dendritic cells. *Immunol Cell Biol* 94, 24-38. 10.1038/icb.2015.58.
61. Balan, S., Arnold-Schrauf, C., Abbas, A., Couespel, N., Savoret, J., Imperatore, F., Villani, A.C., Vu Manh, T.P., Bhardwaj, N., and Dalod, M. (2018). Large-Scale Human Dendritic Cell Differentiation Revealing Notch-Dependent Lineage Bifurcation and Heterogeneity. *Cell Rep* 24, 1902-1915.e1906. 10.1016/j.celrep.2018.07.033.
62. Matsuo, K., Kitahata, K., Kawabata, F., Kamei, M., Hara, Y., Takamura, S., Oiso, N., Kawada, A., Yoshie, O., and Nakayama, T. (2018). A Highly Active Form of XCL1/Lymphotactin Functions as an Effective Adjuvant to Recruit Cross-Presenting Dendritic Cells for Induction of Effector and Memory CD8(+) T Cells. *Front Immunol* 9, 2775. 10.3389/fimmu.2018.02775.
63. Kelner, G.S., Kennedy, J., Bacon, K.B., Kleyensteuber, S., Largaespada, D.A., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Bazan, J.F., Moore, K.W., Schall, T.J., and et al. (1994). Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science* 266, 1395-1399. 10.1126/science.7973732.

64. Hammerich, L., Marron, T.U., Upadhyay, R., Svensson-Arvelund, J., Dhainaut, M., Hussein, S., Zhan, Y., Ostrowski, D., Yellin, M., Marsh, H., et al. (2019). Systemic clinical tumor regressions and potentiation of PD1 blockade with in situ vaccination. *Nat Med* 25, 814-824. 10.1038/s41591-019-0410-x.
65. Cueto, F.J., and Sancho, D. (2021). The Flt3L/Flt3 Axis in Dendritic Cell Biology and Cancer Immunotherapy. *Cancers (Basel)* 13. 10.3390/cancers13071525.
66. Nutt, S.L., and Chopin, M. (2020). Transcriptional Networks Driving Dendritic Cell Differentiation and Function. *Immunity* 52, 942-956. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.05.005>.
67. Murphy, T.L., Grajales-Reyes, G.E., Wu, X., Tussiwand, R., Briseño, C.G., Iwata, A., Kretzer, N.M., Durai, V., and Murphy, K.M. (2016). Transcriptional Control of Dendritic Cell Development. *Annual Review of Immunology* 34, 93-119. 10.1146/annurev-immunol-032713-120204.
68. Hammer, G.E., and Ma, A. (2013). Molecular Control of Steady-State Dendritic Cell Maturation and Immune Homeostasis. *Annual Review of Immunology* 31, 743-791. 10.1146/annurev-immunol-020711-074929.
69. Rakoff-Nahoum, S., and Medzhitov, R. (2009). Toll-like receptors and cancer. *Nat Rev Cancer* 9, 57-63. 10.1038/nrc2541.
70. Cho, H.Y., Lee, S.W., Seo, S.K., Choi, I.W., Choi, I., and Lee, S.W. (2008). Interferon-sensitive response element (ISRE) is mainly responsible for IFN-alpha-induced upregulation of programmed death-1 (PD-1) in macrophages. *Biochim Biophys Acta* 1779, 811-819. 10.1016/j.bbagr.2008.08.003.
71. Kim, S., Bagadia, P., Anderson, D.A., 3rd, Liu, T.T., Huang, X., Theisen, D.J., O'Connor, K.W., Ohara, R.A., Iwata, A., Murphy, T.L., and Murphy, K.M. (2020). High Amount of Transcription Factor IRF8 Engages AP1-IRF Composite Elements in Enhancers to Direct Type 1 Conventional Dendritic Cell Identity. *Immunity* 53, 759-774.e759. 10.1016/j.immuni.2020.07.018.
72. Masuda, T., Iwamoto, S., Mikuriya, S., Tozaki-Saitoh, H., Tamura, T., Tsuda, M., and Inoue, K. (2015). Transcription factor IRF1 is responsible for IRF8-mediated IL-1  $\beta$  expression in reactive microglia. *Journal of Pharmacological Sciences* 128, 216-220. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2015.08.002>.
73. Langlais, D., Barreiro, L.B., and Gros, P. (2016). The macrophage IRF8/IRF1 regulome is required for protection against infections and is associated with chronic inflammation. *J Exp Med* 213, 585-603. 10.1084/jem.20151764.

74. Lachmann, A., Xu, H., Krishnan, J., Berger, S.I., Mazloom, A.R., and Ma'ayan, A. (2010). ChEA: transcription factor regulation inferred from integrating genome-wide ChIP-X experiments. *Bioinformatics* 26, 2438-2444. 10.1093/bioinformatics/btq466.
75. Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674. 10.1016/j.cell.2011.02.013.
76. Nakamura, K., and Smyth, M.J. (2020). Myeloid immunosuppression and immune checkpoints in the tumor microenvironment. *Cellular & Molecular Immunology* 17, 1-12. 10.1038/s41423-019-0306-1.
77. Arner, E.N., and Rathmell, J.C. (2023). Metabolic programming and immune suppression in the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 41, 421-433. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2023.01.009>.
78. Gabrilovich, D.I., Ostrand-Rosenberg, S., and Bronte, V. (2012). Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol* 12, 253-268. 10.1038/nri3175.
79. Sica, A., and Mantovani, A. (2012). Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 122, 787-795. 10.1172/jci59643.
80. Gabrilovich, D.I. (2017). Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Immunol Res* 5, 3-8. 10.1158/2326-6066.Cir-16-0297.
81. Del Prete, A., Salvi, V., Soriani, A., Laffranchi, M., Sozio, F., Bosisio, D., and Sozzani, S. (2023). Dendritic cell subsets in cancer immunity and tumor antigen sensing. *Cellular & Molecular Immunology* 20, 432-447. 10.1038/s41423-023-00990-6.
82. Gupta, Y.H., Khanom, A., and Acton, S.E. (2022). Control of Dendritic Cell Function Within the Tumour Microenvironment. *Front Immunol* 13, 733800. 10.3389/fimmu.2022.733800.
83. Labani-Motlagh, A., Ashja-Mahdavi, M., and Loskog, A. (2020). The Tumor Microenvironment: A Milieu Hindering and Obstructing Antitumor Immune Responses. *Front Immunol* 11, 940. 10.3389/fimmu.2020.00940.
84. Diao, J., Zhao, J., Winter, E., and Cattral, M.S. (2010). Recruitment and differentiation of conventional dendritic cell precursors in tumors. *J Immunol* 184, 1261-1267. 10.4049/jimmunol.0903050.
85. Ghislat, G., Cheema, A.S., Baudoin, E., Verthuy, C., Ballester, P.J., Crozat, K., Attaf, N., Dong, C., Milpied, P., Malissen, B., et al. (2021). NF- $\kappa$ B-dependent IRF1 activation programs cDC1 dendritic cells to drive antitumor immunity. *Sci Immunol* 6. 10.1126/sciimmunol.abg3570.
86. Kobie, J.J., Wu, R.S., Kurt, R.A., Lou, S., Adelman, M.K., Whitesell, L.J., Ramanathapuram, L.V., Arteaga, C.L., and Akporiaye, E.T. (2003). Transforming

- growth factor beta inhibits the antigen-presenting functions and antitumor activity of dendritic cell vaccines. *Cancer Res* 63, 1860-1864.
87. Zelenay, S., van der Veen, A.G., Böttcher, J.P., Snelgrove, K.J., Rogers, N., Acton, S.E., Chakravarty, P., Girotti, M.R., Marais, R., Quezada, S.A., Sahai, E., and Reis e Sousa, C. (2015). Cyclooxygenase-Dependent Tumor Growth through Evasion of Immunity. *Cell* 162, 1257-1270. 10.1016/j.cell.2015.08.015.
  88. Quehenberger, O., and Dennis, E.A. (2011). The Human Plasma Lipidome. *New England Journal of Medicine* 365, 1812-1823. 10.1056/nejmra1104901.
  89. Buczynski, M.W., Dumlao, D.S., and Dennis, E.A. (2009). Thematic Review Series: Proteomics. An integrated omics analysis of eicosanoid biology. *Journal of Lipid Research* 50, 1015-1038. 10.1194/jlr.r900004-jlr200.
  90. Tam, V.C., Quehenberger, O., Oshansky, C.M., Suen, R., Armando, A.M., Treuting, P.M., Thomas, P.G., Dennis, E.A., and Aderem, A. (2013). Lipidomic profiling of influenza infection identifies mediators that induce and resolve inflammation. *Cell* 154, 213-227. 10.1016/j.cell.2013.05.052.
  91. Serhan, C.N., Chiang, N., and Van Dyke, T.E. (2008). Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol* 8, 349-361. 10.1038/nri2294.
  92. Serhan, C.N., Clish, C.B., Brannon, J., Colgan, S.P., Chiang, N., and Gronert, K. (2000). Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing. *J Exp Med* 192, 1197-1204. 10.1084/jem.192.8.1197.
  93. Chiang, N., Fredman, G., Bäckhed, F., Oh, S.F., Vickery, T., Schmidt, B.A., and Serhan, C.N. (2012). Infection regulates pro-resolving mediators that lower antibiotic requirements. *Nature* 484, 524-528. 10.1038/nature11042.
  94. Morita, M., Kuba, K., Ichikawa, A., Nakayama, M., Katahira, J., Iwamoto, R., Watanebe, T., Sakabe, S., Daidoji, T., Nakamura, S., et al. (2013). The lipid mediator protectin D1 inhibits influenza virus replication and improves severe influenza. *Cell* 153, 112-125. 10.1016/j.cell.2013.02.027.
  95. Tobin, D.M., Roca, F.J., Oh, S.F., McFarland, R., Vickery, T.W., Ray, J.P., Ko, D.C., Zou, Y., Bang, N.D., Chau, T.T., et al. (2012). Host genotype-specific therapies can optimize the inflammatory response to mycobacterial infections. *Cell* 148, 434-446. 10.1016/j.cell.2011.12.023.
  96. Kalinski, P. (2012). Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *J Immunol* 188, 21-28. 10.4049/jimmunol.1101029.

97. Hangai, S., Ao, T., Kimura, Y., Matsuki, K., Kawamura, T., Negishi, H., Nishio, J., Kodama, T., Taniguchi, T., and Yanai, H. (2016). PGE2 induced in and released by dying cells functions as an inhibitory DAMP. *Proc Natl Acad Sci U S A* *113*, 3844-3849. 10.1073/pnas.1602023113.
98. Balsinde, J., Winstead, M.V., and Dennis, E.A. (2002). Phospholipase A(2) regulation of arachidonic acid mobilization. *FEBS Lett* *531*, 2-6. 10.1016/s0014-5793(02)03413-0.
99. Park, J.Y., Pillinger, M.H., and Abramson, S.B. (2006). Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases. *Clin Immunol* *119*, 229-240. 10.1016/j.clim.2006.01.016.
100. Crofford, L.J. (1997). COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *J Rheumatol Suppl* *49*, 15-19.
101. Rigas, B., Goldman, I.S., and Levine, L. (1993). Altered eicosanoid levels in human colon cancer. *J Lab Clin Med* *122*, 518-523.
102. Wang, D., and Dubois, R.N. (2004). Cyclooxygenase-2: a potential target in breast cancer. *Semin Oncol* *31*, 64-73. 10.1053/j.seminoncol.2004.01.008.
103. McLemore, T.L., Hubbard, W.C., Litterst, C.L., Liu, M.C., Miller, S., McMahon, N.A., Eggleston, J.C., and Boyd, M.R. (1988). Profiles of prostaglandin biosynthesis in normal lung and tumor tissue from lung cancer patients. *Cancer Res* *48*, 3140-3147.
104. Hambek, M., Baghi, M., Wagenblast, J., Schmitt, J., Baumann, H., and Knecht, R. (2007). Inverse correlation between serum PGE2 and T classification in head and neck cancer. *Head Neck* *29*, 244-248. 10.1002/hed.20503.
105. Wang, D., and DuBois, R.N. (2007). Measurement of eicosanoids in cancer tissues. *Methods Enzymol* *433*, 27-50. 10.1016/s0076-6879(07)33002-4.
106. Tai, H.H., Ensor, C.M., Tong, M., Zhou, H., and Yan, F. (2002). Prostaglandin catabolizing enzymes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* *68-69*, 483-493. 10.1016/s0090-6980(02)00050-3.
107. Backlund, M.G., Mann, J.R., Holla, V.R., Buchanan, F.G., Tai, H.H., Musiek, E.S., Milne, G.L., Katkuri, S., and DuBois, R.N. (2005). 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase is down-regulated in colorectal cancer. *J Biol Chem* *280*, 3217-3223. 10.1074/jbc.M411221200.
108. Wolf, I., O'Kelly, J., Rubinek, T., Tong, M., Nguyen, A., Lin, B.T., Tai, H.H., Karlan, B.Y., and Koeffler, H.P. (2006). 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase is a tumor suppressor of human breast cancer. *Cancer Res* *66*, 7818-7823. 10.1158/0008-5472.Can-05-4368.

109. Thiel, A., Ganesan, A., Mrena, J., Junnila, S., Nykänen, A., Hemmes, A., Tai, H.H., Monni, O., Kokkola, A., Haglund, C., Petrova, T.V., and Ristimäki, A. (2009). 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase is down-regulated in gastric cancer. *Clin Cancer Res* 15, 4572-4580. 10.1158/1078-0432.Ccr-08-2518.
110. Hughes, D., Otani, T., Yang, P., Newman, R.A., Yantiss, R.K., Altorki, N.K., Port, J.L., Yan, M., Markowitz, S.D., Mazumdar, M., et al. (2008). NAD<sup>+</sup>-dependent 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase regulates levels of bioactive lipids in non-small cell lung cancer. *Cancer Prev Res (Phila)* 1, 241-249. 10.1158/1940-6207.Capr-08-0055.
111. Sugimoto, Y., and Narumiya, S. (2007). Prostaglandin E receptors. *J Biol Chem* 282, 11613-11617. 10.1074/jbc.R600038200.
112. Nishigaki, N., Negishi, M., and Ichikawa, A. (1996). Two Gs-coupled prostaglandin E receptor subtypes, EP2 and EP4, differ in desensitization and sensitivity to the metabolic inactivation of the agonist. *Mol Pharmacol* 50, 1031-1037.
113. Fujino, H., Salvi, S., and Regan, J.W. (2005). Differential regulation of phosphorylation of the cAMP response element-binding protein after activation of EP2 and EP4 prostanoid receptors by prostaglandin E2. *Mol Pharmacol* 68, 251-259. 10.1124/mol.105.011833.
114. Walker, W.H., and Habener, J.F. (1996). Role of transcription factors CREB and CREM in cAMP-regulated transcription during spermatogenesis. *Trends Endocrinol Metab* 7, 133-138. 10.1016/1043-2760(96)00035-5.
115. Muñiz, L.C., and Molina, C.A. (2016). The transcriptional repressor ICER binds to multiple loci throughout the genome. *Biochem Biophys Res Commun* 478, 1462-1465. 10.1016/j.bbrc.2016.08.147.
116. Kaliński, P., Hilkens, C.M., Wierenga, E.A., and Kapsenberg, M.L. (1999). T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today* 20, 561-567. 10.1016/s0167-5699(99)01547-9.
117. Bayerl, F., Bejarano, D.A., Bertacchi, G., Doffin, A.C., Gobbini, E., Hubert, M., Li, L., Meiser, P., Pedde, A.M., Posch, W., et al. (2023). Guidelines for visualization and analysis of DC in tissues using multiparameter fluorescence microscopy imaging methods. *European Journal of Immunology*, 2249923. 10.1002/eji.202249923.
118. Sinha, P., Clements, V.K., Fulton, A.M., and Ostrand-Rosenberg, S. (2007). Prostaglandin E2 promotes tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res* 67, 4507-4513. 10.1158/0008-5472.Can-06-4174.
119. Rodríguez-Ubreva, J., Català-Moll, F., Obermajer, N., Álvarez-Errico, D., Ramirez, R.N., Company, C., Vento-Tormo, R., Moreno-Bueno, G., Edwards, R.P., Mortazavi,

- A., Kalinski, P., and Ballestar, E. (2017). Prostaglandin E2 Leads to the Acquisition of DNMT3A-Dependent Tolerogenic Functions in Human Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cell Rep* 21, 154-167. 10.1016/j.celrep.2017.09.018.
120. Schraml, B.U., van Blijswijk, J., Zelenay, S., Whitney, P.G., Filby, A., Acton, S.E., Rogers, N.C., Moncaut, N., Carvajal, J.J., and Reis e Sousa, C. (2013). Genetic tracing via DNGR-1 expression history defines dendritic cells as a hematopoietic lineage. *Cell* 154, 843-858. 10.1016/j.cell.2013.07.014.
121. Mandala, S., Hajdu, R., Bergstrom, J., Quackenbush, E., Xie, J., Milligan, J., Thornton, R., Shei, G.J., Card, D., Keohane, C., et al. (2002). Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. *Science* 296, 346-349. 10.1126/science.1070238.
122. Narni-Mancinelli, E., Chaix, J., Fenis, A., Kerdiles, Y.M., Yessaad, N., Reynders, A., Gregoire, C., Luche, H., Ugolini, S., Tomasello, E., Walzer, T., and Vivier, E. (2011). Fate mapping analysis of lymphoid cells expressing the NKp46 cell surface receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 18324-18329. 10.1073/pnas.1112064108.
123. Liu, D., Schilling, B., Liu, D., Sucker, A., Livingstone, E., Jerby-Arnon, L., Zimmer, L., Gutzmer, R., Satzger, I., Loquai, C., et al. (2019). Integrative molecular and clinical modeling of clinical outcomes to PD1 blockade in patients with metastatic melanoma. *Nat Med* 25, 1916-1927. 10.1038/s41591-019-0654-5.
124. Riaz, N., Havel, J.J., Makarov, V., Desrichard, A., Urba, W.J., Sims, J.S., Hodi, F.S., Martín-Algarra, S., Mandal, R., Sharfman, W.H., et al. (2017). Tumor and Microenvironment Evolution during Immunotherapy with Nivolumab. *Cell* 171, 934-949.e916. 10.1016/j.cell.2017.09.028.
125. Tirosh, I., Izar, B., Prakadan, S.M., Wadsworth, M.H., 2nd, Treacy, D., Trombetta, J.J., Rotem, A., Rodman, C., Lian, C., Murphy, G., et al. (2016). Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science* 352, 189-196. 10.1126/science.aad0501.
126. Bayerl, F., Meiser, P., Donakonda, S., Hirschberger, A., Lacher, S.B., Pedde, A.M., Hermann, C.D., Elewaut, A., Knolle, M., Ramsauer, L., et al. (2023). Tumor-derived prostaglandin E2 programs cDC1 dysfunction to impair intratumoral orchestration of anti-cancer T cell responses. *Immunity* 56, 1341-1358.e1311. 10.1016/j.immuni.2023.05.011.
127. Chinn, A.M., and Insel, P.A. (2020). Cyclic AMP in dendritic cells: A novel potential target for disease-modifying agents in asthma and other allergic disorders. *Br J Pharmacol* 177, 3363-3377. 10.1111/bph.15095.

128. Lee, J., Kim, T.H., Murray, F., Li, X., Choi, S.S., Broide, D.H., Corr, M., Lee, J., Webster, N.J.G., Insel, P.A., and Raz, E. (2015). Cyclic AMP concentrations in dendritic cells induce and regulate Th2 immunity and allergic asthma. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *112*, 1529-1534. doi:10.1073/pnas.1417972112.
129. Nastala, C.L., Edington, H.D., McKinney, T.G., Tahara, H., Nalesnik, M.A., Brunda, M.J., Gately, M.K., Wolf, S.F., Schreiber, R.D., Storkus, W.J., and et al. (1994). Recombinant IL-12 administration induces tumor regression in association with IFN- $\gamma$  production. *J Immunol* *153*, 1697-1706.
130. Gao, J., Shi, L.Z., Zhao, H., Chen, J., Xiong, L., He, Q., Chen, T., Roszik, J., Bernatchez, C., Woodman, S.E., et al. (2016). Loss of IFN- $\gamma$  Pathway Genes in Tumor Cells as a Mechanism of Resistance to Anti-CTLA-4 Therapy. *Cell* *167*, 397-404.e399. 10.1016/j.cell.2016.08.069.
131. Kaplan, D.H., Shankaran, V., Dighe, A.S., Stockert, E., Aguet, M., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (1998). Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 7556-7561. 10.1073/pnas.95.13.7556.
132. Ivashkiv, L.B. (2018). IFN  $\gamma$  : signalling, epigenetics and roles in immunity, metabolism, disease and cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol* *18*, 545-558. 10.1038/s41577-018-0029-z.
133. Centofanti, E., Wang, C., Iyer, S., Krichevsky, O., Oyler-Yaniv, A., and Oyler-Yaniv, J. (2023). The spread of interferon- $\gamma$  in melanomas is highly spatially confined, driving nongenetic variability in tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *120*, e2304190120. 10.1073/pnas.2304190120.
134. Calzada-Fraile, D., and Sánchez-Madrid, F. (2023). Reprogramming dendritic cells through the immunological synapse: A two-way street. *Eur J Immunol*, e2350393. 10.1002/eji.202350393.
135. Mempel, T.R., Henrickson, S.E., and Von Andrian, U.H. (2004). T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* *427*, 154-159. 10.1038/nature02238.
136. Miller, M.J., Safrina, O., Parker, I., and Cahalan, M.D. (2004). Imaging the single cell dynamics of CD4+ T cell activation by dendritic cells in lymph nodes. *J Exp Med* *200*, 847-856. 10.1084/jem.20041236.
137. Beltman, J.B., Henrickson, S.E., von Andrian, U.H., de Boer, R.J., and Marée, A.F. (2009). Towards estimating the true duration of dendritic cell interactions with T cells. *J Immunol Methods* *347*, 54-69. 10.1016/j.jim.2009.05.013.

138. Henrickson, S.E., Perro, M., Loughhead, S.M., Senman, B., Stutte, S., Quigley, M., Alexe, G., Iannacone, M., Flynn, M.P., Omid, S., et al. (2013). Antigen availability determines CD8<sup>+</sup> T cell-dendritic cell interaction kinetics and memory fate decisions. *Immunity* 39, 496-507. 10.1016/j.immuni.2013.08.034.
139. Johansen, P., Storni, T., Rettig, L., Qiu, Z., Der-Sarkissian, A., Smith, K.A., Manolova, V., Lang, K.S., Senti, G., Müllhaupt, B., et al. (2008). Antigen kinetics determines immune reactivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 5189-5194. 10.1073/pnas.0706296105.
140. Al-Alwan, M.M., Rowden, G., Lee, T.D., and West, K.A. (2001). The dendritic cell cytoskeleton is critical for the formation of the immunological synapse. *J Immunol* 166, 1452-1456. 10.4049/jimmunol.166.3.1452.
141. Ma, D.Y., and Clark, E.A. (2009). The role of CD40 and CD154/CD40L in dendritic cells. *Semin Immunol* 21, 265-272. 10.1016/j.smim.2009.05.010.
142. Rodríguez-Fernández, J.L., Riol-Blanco, L., and Delgado-Martín, C. (2010). What is the function of the dendritic cell side of the immunological synapse? *Sci Signal* 3, re2. 10.1126/scisignal.3105re2.
143. Alcaraz-Serna, A., Bustos-Morán, E., Fernández-Delgado, I., Calzada-Fraile, D., Torralba, D., Marina-Zárate, E., Lorenzo-Vivas, E., Vázquez, E., de Albuquerque, J.B., Ruef, N., et al. (2021). Immune synapse instructs epigenomic and transcriptomic functional reprogramming in dendritic cells. *Sci Adv* 7. 10.1126/sciadv.abb9965.
144. Riol-Blanco, L., Delgado-Martín, C., Sánchez-Sánchez, N., Alonso, C.L., Gutiérrez-López, M.D., Del Hoyo, G.M., Navarro, J., Sánchez-Madrid, F., Cabañas, C., Sánchez-Mateos, P., and Rodríguez-Fernández, J.L. (2009). Immunological synapse formation inhibits, via NF-kappaB and FOXO1, the apoptosis of dendritic cells. *Nat Immunol* 10, 753-760. 10.1038/ni.1750.
145. Garg, S., Oran, A., Wajchman, J., Sasaki, S., Maris, C.H., Kapp, J.A., and Jacob, J. (2003). Genetic tagging shows increased frequency and longevity of antigen-presenting, skin-derived dendritic cells in vivo. *Nat Immunol* 4, 907-912. 10.1038/ni962.
146. Duong, E., Fessenden, T.B., Lutz, E., Dinter, T., Yim, L., Blatt, S., Bhutkar, A., Wittrup, K.D., and Spranger, S. (2022). Type I interferon activates MHC class I-dressed CD11b(+) conventional dendritic cells to promote protective anti-tumor CD8(+) T cell immunity. *Immunity* 55, 308-323.e309. 10.1016/j.immuni.2021.10.020.
147. Asano, K., Nabeyama, A., Miyake, Y., Qiu, C.H., Kurita, A., Tomura, M., Kanagawa, O., Fujii, S., and Tanaka, M. (2011). CD169-positive macrophages dominate antitumor

- immunity by crosspresenting dead cell-associated antigens. *Immunity* 34, 85-95. 10.1016/j.immuni.2010.12.011.
148. Ma, Y., Adjemian, S., Mattarollo, S.R., Yamazaki, T., Aymeric, L., Yang, H., Portela Catani, J.P., Hannani, D., Duret, H., Steegh, K., et al. (2013). Anticancer chemotherapy-induced intratumoral recruitment and differentiation of antigen-presenting cells. *Immunity* 38, 729-741. 10.1016/j.immuni.2013.03.003.
149. Yang, Wan S., SriRamaratnam, R., Welsch, Matthew E., Shimada, K., Skouta, R., Viswanathan, Vasanthi S., Cheah, Jaime H., Clemons, Paul A., Shamji, Alykhan F., Clish, Clary B., et al. (2014). Regulation of Ferroptotic Cancer Cell Death by GPX4. *Cell* 156, 317-331. 10.1016/j.cell.2013.12.010.
150. Paton, E.L., Turner, J.A., and Schlaepfer, I.R. (2020). Overcoming Resistance to Therapies Targeting the MAPK Pathway in BRAF-Mutated Tumours. *J Oncol* 2020, 1079827. 10.1155/2020/1079827.
151. Xia, Q., Hu, Q., Wang, H., Yang, H., Gao, F., Ren, H., Chen, D., Fu, C., Zheng, L., Zhen, X., Ying, Z., and Wang, G. (2015). Induction of COX-2-PGE2 synthesis by activation of the MAPK/ERK pathway contributes to neuronal death triggered by TDP-43-depleted microglia. *Cell Death & Disease* 6, e1702-e1702. 10.1038/cddis.2015.69.
152. Yoshitake, R., Saeki, K., Eto, S., Shinada, M., Nakano, R., Sugiyama, H., Endo, Y., Fujita, N., Nishimura, R., and Nakagawa, T. (2020). Aberrant expression of the COX2/PGE(2) axis is induced by activation of the RAF/MEK/ERK pathway in BRAF(V595E) canine urothelial carcinoma. *Sci Rep* 10, 7826. 10.1038/s41598-020-64832-5.
153. Caputo, F., Santini, C., Bardasi, C., Cerma, K., Casadei-Gardini, A., Spallanzani, A., Andrikou, K., Cascinu, S., and Gelsomino, F. (2019). BRAF-Mutated Colorectal Cancer: Clinical and Molecular Insights. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 5369.
154. Kosumi, K., Hamada, T., Zhang, S., Liu, L., da Silva, A., Koh, H., Twombly, T.S., Mima, K., Morikawa, T., Song, M., et al. (2019). Prognostic association of *PTGS2* (COX-2) over-expression according to *BRAF* mutation status in colorectal cancer: Results from two prospective cohorts and CALGB 89803 (Alliance) trial. *European Journal of Cancer* 111, 82-93. 10.1016/j.ejca.2019.01.022.
155. Wang, D.Y., McQuade, J.L., Rai, R.R., Park, J.J., Zhao, S., Ye, F., Beckermann, K.E., Rubinstein, S.M., Johnpulle, R., Long, G.V., et al. (2020). The Impact of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs, Beta Blockers, and Metformin on the Efficacy of Anti-PD-1 Therapy in Advanced Melanoma. *Oncologist* 25, e602-e605. 10.1634/theoncologist.2019-0518.

156. Wang, S.J., Khullar, K., Kim, S., Yegya-Raman, N., Malhotra, J., Groisberg, R., Crayton, S.H., Silk, A.W., Noshier, J.L., Gentile, M.A., Mehnert, J.M., and Jabbour, S.K. (2020). Effect of cyclo-oxygenase inhibitor use during checkpoint blockade immunotherapy in patients with metastatic melanoma and non-small cell lung cancer. *J Immunother Cancer* 8. 10.1136/jitc-2020-000889.
157. Binnewies, M., Roberts, E.W., Kersten, K., Chan, V., Fearon, D.F., Merad, M., Coussens, L.M., Gabrilovich, D.I., Ostrand-Rosenberg, S., Hedrick, C.C., et al. (2018). Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat Med* 24, 541-550. 10.1038/s41591-018-0014-x.
158. Waldman, A.D., Fritz, J.M., and Lenardo, M.J. (2020). A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nat Rev Immunol* 20, 651-668. 10.1038/s41577-020-0306-5.
159. Lin, J.R., Chen, Y.A., Campton, D., Cooper, J., Coy, S., Yapp, C., Tefft, J.B., McCarty, E., Ligon, K.L., Rodig, S.J., et al. (2023). High-plex immunofluorescence imaging and traditional histology of the same tissue section for discovering image-based biomarkers. *Nat Cancer* 4, 1036-1052. 10.1038/s43018-023-00576-1.
160. Smith, J.W., Steiner, A.L., Newberry, W.M., Jr., and Parker, C.W. (1971). Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in human lymphocytes. Alterations after phytohemagglutinin stimulation. *J Clin Invest* 50, 432-441. 10.1172/jci106510.
161. Sreeramkumar, V., Fresno, M., and Cuesta, N. (2012). Prostaglandin E2 and T cells: friends or foes? *Immunol Cell Biol* 90, 579-586. 10.1038/icb.2011.75.
162. Chen, J.H., Perry, C.J., Tsui, Y.-C., Staron, M.M., Parish, I.A., Dominguez, C.X., Rosenberg, D.W., and Kaech, S.M. (2015). Prostaglandin E2 and programmed cell death 1 signaling coordinately impair CTL function and survival during chronic viral infection. *Nature Medicine* 21, 327-334. 10.1038/nm.3831.
163. Su, Y., Jackson, E.K., and Gorelik, E. (2011). Receptor desensitization and blockade of the suppressive effects of prostaglandin E2 and adenosine on the cytotoxic activity of human melanoma-infiltrating T lymphocytes. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 60, 111-122. 10.1007/s00262-010-0924-z.
164. Aegerter, H., Lambrecht, B.N., and Jakubzick, C.V. (2022). Biology of lung macrophages in health and disease. *Immunity* 55, 1564-1580. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2022.08.010>.
165. Allard, B., Panariti, A., and Martin, J.G. (2018). Alveolar Macrophages in the Resolution of Inflammation, Tissue Repair, and Tolerance to Infection. *Front Immunol* 9, 1777. 10.3389/fimmu.2018.01777.

- 
166. Bain, C.C., and MacDonald, A.S. (2022). The impact of the lung environment on macrophage development, activation and function: diversity in the face of adversity. *Mucosal Immunology* 15, 223-234. 10.1038/s41385-021-00480-w.
  167. Hogquist, K.A., Gavin, M.A., and Bevan, M.J. (1993). Positive selection of CD8+ T cells induced by major histocompatibility complex binding peptides in fetal thymic organ culture. *J Exp Med* 177, 1469-1473. 10.1084/jem.177.5.1469.
  168. Clarke, S.R., Barnden, M., Kurts, C., Carbone, F.R., Miller, J.F., and Heath, W.R. (2000). Characterization of the ovalbumin-specific TCR transgenic line OT-I: MHC elements for positive and negative selection. *Immunol Cell Biol* 78, 110-117. 10.1046/j.1440-1711.2000.00889.x.
  169. Mardiney, M., 3rd, and Malech, H.L. (1996). Enhanced engraftment of hematopoietic progenitor cells in mice treated with granulocyte colony-stimulating factor before low-dose irradiation: implications for gene therapy. *Blood* 87, 4049-4056.

## 6 Anhang

### 6.1 Glossar

Tabelle 12: In dieser Arbeit verwendete Fremdbegriffe und Abkürzungen sind in dieser Tabelle erläutert.

<b>Begriff</b>	<b>Erläuterung</b>
AICE	AP1-IRF Transkriptionsfaktor ( <i>AP1-IRF Composite Element</i> )
Ang.	Angepasst
ANOVA	Analyse der Varianz ( <i>Analysis of variance</i> )
AP1	Transkriptionsfaktor ( <i>Activator protein 1</i> )
Batf3	Transkriptionsfaktor ( <i>Basic leucine zipper ATF-like transcription factor 3</i> )
BRAF	Serin/Threonin Kinase ( <i>v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i> )
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat ( <i>Cyclic adenosine monophosphate</i> )
CAR	Chimärer Antigenrezeptor
CD	Erkennungsrezeptor ( <i>Cluster of differentiation</i> )
cDC1	Konventionelle dendritische Zellen Typ 1 ( <i>Type 1 Conventional dendritic cells</i> )
Cluster	Ansammlung (von Zellen)
CREB	cAMP-abhängiger TF ( <i>cAMP-response element binding protein</i> )
CREM	cAMP-abhängiger TF ( <i>cAMP-responsive element modulator</i> )
CTL	Zytotoxische Lymphozyten ( <i>Cytotoxic lymphocytes</i> )
CXCL	Chemokin ( <i>C-X-C motif ligand</i> )
DC	Dendritische Zelle ( <i>Dendritic cell</i> )
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>Desoxyribonucleic acid</i> )
EICE	Ets-IRF Transkriptionsfaktor ( <i>Ets-IRF Composite Element</i> )
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (Enzyme-linked immunosorbent assay)
Ets	Transkriptionsfaktor ( <i>E26 transformation specific</i> )
FMO	Negativkontrolle der Immunfluoreszenzfärbung ( <i>Fluorescence minus one</i> )
FSC	Vorwärtsstreuung ( <i>Forwards scatter</i> )
Fsk	Forskolin
Gain of Function	Funktionsgewinn
gg.	Gegenüber
GSEA	Genset Anreicherungsanalyse ( <i>Gene set enrichment analysis</i> )
GzmB	Granzym B
ho	hoch
i.p.	intraperitoneal

i.v.	Intravenös
ICB	Immun-Checkpoint-Blockade
ICER	cAMP-abhängiger TF ( <i>Inducible cAMP early repressor</i> )
ID2	Transkriptionsfaktor ( <i>Inhibitor of DNA-binding 2</i> )
IFN	Interferon
IL	Interleukin
iLK	Inguinaler Lymphknoten
Intr.	Intrinsisch
IRF	Familie Interferon-stimulierter Transkriptionsfaktoren ( <i>Interferon regulatory factor</i> )
ISRE	Interferon-stimulierter Transkriptionsfaktor ( <i>Interferon-stimulated response element</i> )
K.M.	Konditioniertes Medium
LDTF	Abstammungs-spezifischer Transkriptionsfaktor ( <i>Lineage-defining transcription factor</i> )
Lineage	Abstammung
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
Metascape	Online-Ressource zur Annotation und Analyse von Gensets
MFI	Mittlerwe Fluoreszenzintensität
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
Mock	Attrappe
n.a.	Nicht analysiert
n.d.	Nicht definiert
n.s.	Nicht signifikant
NFκB	Transkriptionsfaktor ( <i>Nuclear factor kappa B</i> )
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
pPKA, PKA	(Phosphorylierte) Proteinkinase A
Priming	Aktivierung und Expansion naiver T Zellen durch den ersten Kontakt mit Antigen
Ptger	Prostaglandin E Rezeptor
Ptgs	Prostaglandin-endoperoxid Synthase, Cyclooxygenase
PU.1	Transkriptionsfaktor der Ets Familie ( <i>PU-box binding protein 1</i> )
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RNA-Seq	RNA Sequenzierung
RQ	Risikoquotient ( <i>Hazard ratio, HR</i> )
s.c.	Subkutan ( <i>subcutaneous</i> )
S1P1R	Sphingosin-1 Phosphat Rezeptor

---

Signaling	Signalwegsübertragung
SIINFEKL	Aminosäuresequenz 257-264 des Modellantigens Ovalbumin, welches an H2-K <sup>b</sup> bindet
SITF	Stimulations-induzierter Transkriptionsfaktor ( <i>Stimulation induced transcription factor</i> )
SSC	Seitliche Streuung ( <i>Sidewards Scatter</i> )
STAT	Transpionsfaktorfamilie ( <i>Signal transducer and activator of transcription</i> )
TCF1	T Zell Transkriptionsfaktor 1 ( <i>T cell factor 1</i> )
TCGA	Online-Ressource, welche Molekulare Daten von Tumorpatienten zur Verfügung stellt ( <i>The Cancer Genome Atlas</i> )
tdLK	Tumor-drainierender Lymphknoten
TF	Transkriptionsfaktor
TF	Transkriptionsfaktor
TGF- $\beta$	Transformierender Wachstumsfaktor ( <i>Transforming growth factor beta</i> )
TIM-3	T Zell Immunoglobulin und Mucin Domäne 3
Unbeh.	Unbehandelt
WT	Wildtyp
ZsG	Grün fluoreszierendes Protein der Krustenanemone ( <i>ZsGreen</i> )

## 6.2 Tabellen

**Tabelle 13: Expression funktionaler Gene, die durch PGE<sub>2</sub> Exposition in humanen cDC1 eingeschränkt sind.**  
Bezogen auf **Abbildung 29**.

Gensymbol	Mittlere Expression log <sub>2</sub> RSEM (humane cDC1 unbehandelt+Poly I:C)	Mittlere Expression log <sub>2</sub> RSEM (humane cDC1 PGE <sub>2</sub> +Poly I:C)	Relative Änderung log <sub>2</sub> (humane cDC1 PGE <sub>2</sub> +Poly I:C vs. unbehandelt+Poly I:C)
XCR1	7.243	8.872	1.632
CLNK	4.292	2.878	-1.413
BATF3	11.232	9.254	-1.978
CLEC9A	3.823	2.114	-1.743
IRF8	16.060	13.869	-2.191
CXCL9	16.481	11.010	-5.470
CXCL10	16.256	12.436	-3.820
CXCL11	14.486	10.829	-3.657
IL12B	10.257	5.779	-4.476
IL27	10.878	6.713	-4.168
TNF	11.973	9.037	-2.936

## 6.3 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### 6.3.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Dendritische Zellen (DC). .....	13
Abbildung 2: Hierarchisches Modell der Hämatopoese dendritischer Zellen.....	15
Abbildung 3: Stimulation von CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T Zellen durch cDC1. ....	17
Abbildung 4: Kreuzpräsentation transformierter Tumorantigene durch cDC1. ....	18
Abbildung 5: Die lokale Rolle von cDC1 in der TMU. ....	20
Abbildung 6: Transkriptionsfaktornetzwerk, das die Funktionalität der cDC1 bei Aktivierung bestimmt. ....	21
Abbildung 7: Prostaglandinsynthese. ....	24
Abbildung 8: EP2 und EP4 induzieren den cAMP Signalweg.....	25
Abbildung 9: Intratumorale cDC1 in PGE <sub>2</sub> -produzierenden Tumoren. ....	30
Abbildung 10: Die Erhöhung der Anzahl intratumoraler cDC1 fördert nicht die Immunkontrolle PGE <sub>2</sub> -produzierender Tumoren.....	31
Abbildung 11: cDC1 in PGE <sub>2</sub> -produzierenden Tumoren sind aktiviert. ....	34
Abbildung 12: cDC1 sind lokal in PGE <sub>2</sub> -produzierenden Tumoren dysfunktional und produzieren weniger IL-12 und CXCL9.....	36
Abbildung 13: Dysfunktionale cDC1 interagieren nicht produktiv mit CD8 <sup>+</sup> T Zellen in der TMU PGE <sub>2</sub> -produzierender Tumoren.....	38
Abbildung 14: Der PGE <sub>2</sub> -Signalweg induziert einen dysfunktionalen Zustand in aktivierten cDC1. ....	40
Abbildung 15: Dysfunktionale cDC1 können CD8 <sup>+</sup> T Zellen nicht effektiv rekrutieren und restimulieren.....	41
Abbildung 16: PGE <sub>2</sub> programmiert die cDC1-Dysfunktion auf transkriptioneller Ebene. ....	43
Abbildung 17: PGE <sub>2</sub> Exposition reguliert in cDC1 den Transkriptionsfaktor IRF8 herunter...	45
Abbildung 18: PGE <sub>2</sub> -produzierende Tumoren regulieren cDC1-Dysfunktion durch IRF8 Herunterregulation. ....	47
Abbildung 19: IRF8-überexprimierende cDC1 sind teilweise resistent gegenüber einer PGE <sub>2</sub> -vermittelten Dysfunktion. ....	48
Abbildung 20: Die PGE <sub>2</sub> -induzierte Dysfunktion in cDC1 wird über den cAMP Signalweg vermittelt. ....	50
Abbildung 21: PGE <sub>2</sub> wirkt auf cDC1 sowohl über EP2 als auch EP4.....	52
Abbildung 22: EP2/EP4-defiziente cDC1 sind resistent gegenüber PGE <sub>2</sub> .....	53
Abbildung 23: cDC1 in Clec9a <sup>Cre</sup> Ptger2 <sup>-/-</sup> Ptger4 <sup>fl/fl</sup> Mäusen sind Resistent gegenüber PGE <sub>2</sub> in vivo.....	55

---

Abbildung 24: EP2/EP4 defiziente cDC1 können die Positionierung und Aktivierung intratumoraler CD8 <sup>+</sup> T Zell Antworten in PGE <sub>2</sub> -produzierenden Tumoren steuern. ....	57
Abbildung 25: EP2/EP4-defiziente cDC1 können PGE <sub>2</sub> -produzierende Tumoren effektiv kontrollieren.....	60
Abbildung 26: EP2/EP4-defiziente NK Zellen können PGE <sub>2</sub> produzierende Tumoren nicht effektiv kontrollieren.....	61
Abbildung 27: PGE <sub>2</sub> induziert in humanen cDC1 über EP2 und EP4 eine Dysfunktion.....	62
Abbildung 28: Tumor-PGE <sub>2</sub> in Patientenproben induziert eine Dysfunktion in humanen cDC1. ....	63
Abbildung 29: Die Expression einer Gensignatur funktionaler cDC1 korreliert mit dem Überleben von Patienten und dem Ansprechen auf Anti-PD-1-Immuntherapien.....	66
Abbildung 30: PGE <sub>2</sub> -vermittelte Dysfunktion intratumoraler cDC1 führt zur Immunevasion des Tumors. ....	67

### 6.3.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Wichtige Transkriptionsfaktoren, Oberflächenmarker und Funktionen der Untergruppen dendritischer Zellen. ....	16
Tabelle 2: Laborgeräte .....	75
Tabelle 3: Allgemeine Lösungen .....	75
Tabelle 4: Antikörper, benannt nach den Epitopen, die sie binden, als auch dem direkt gekoppelten Fluorochrom.....	76
Tabelle 5: Chemikalien, Peptide und rekombinante Proteine .....	78
Tabelle 6: Kritische kommerziell erworbene Sets .....	79
Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendete Datensets.....	79
Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Software .....	80
Tabelle 9: In dieser Arbeit verwendete experimentelle biologische Modelle .....	80
Tabelle 10: In dieser Arbeit verwendete qRT-PCR Primer.....	82
Tabelle 11: In dieser Arbeit verwendete rekombinante DNA .....	83
Tabelle 12: In dieser Arbeit verwendete Fremdbegriffe und Abkürzungen sind in dieser Tabelle erläutert. ....	114
Tabelle 13: Expression funktionaler Gene, die durch PGE <sub>2</sub> Exposition in humanen cDC1 eingeschränkt sind. ....	117

## 7 Erklärung zu Beiträgen anderer Wissenschaftler

Die folgenden Personen haben mich bei den experimentellen Arbeiten meiner Dissertation unterstützt und ich möchte mich bei ihnen herzlich für ihre Unterstützung bedanken:

### *Kapitel 2.1:*

Jan Böttcher für die Unterstützung bei der Bestimmung des Tumorwachstums in *Batf3*<sup>-/-</sup> Mäusen.

### *Kapitel 2.2:*

Anna Hirschberger für die Bereitstellung von genetisch veränderten Tumorzellen (*BRAF*<sup>V600E</sup>-Zsg, *BRAF*<sup>V600E</sup>*Ptgs1/Ptgs2*<sup>-/-</sup>-Zsg, *BRAF*<sup>V600E</sup>-OVA, *BRAF*<sup>V600E</sup>*Ptgs1/Ptgs2*<sup>-/-</sup>-OVA).

### *Kapitel 2.3:*

Anna Hirschberger für die Hilfe bei der Messung der lokalen PGE<sub>2</sub> Level mittels ELISA.

### *Kapitel 2.4:*

Philippa Meiser für die Mitarbeit bei der Identifizierung interagierender Zellen.

### *Kapitel 2.5:*

Anna Hirschberger für die Hilfe bei der Quantifizierung der Aufnahme toter Tumorzellen durch cDC1.

### *Kapitel 2.6:*

Sainitin Donakonda für die Hilfe bei der Auswertung der Transkriptionsanalysen.

### *Kapitel 2.8:*

Martina Anton für die Hilfe bei der Transduktion von cDC1.

### *Kapitel 2.15:*

Den freiwilligen Spendern für die großzügigen Blutspenden.

Anna-Marie Pedde für die Hilfe bei der Herstellung von konditioniertem Medium von aus humanen Tumoren gewonnenen Zellen.

### *Kapitel 2.16:*

Chris Herrmann für die Hilfe bei der Analyse von TCGA Daten.

Anne Zaremba für die Unterstützung bei der Analyse der Patientendaten (Liu et al., 2019).

Nicole Kirchhammer und Marcel Trefny für die Unterstützung bei der Genexpressionsanalyse von Patientendaten (Liu et al., 2019).

## 8 Danksagung

Ich möchte den Platz an dieser Stelle noch nutzen um den Menschen zu danken, die es mir ermöglicht haben diese Arbeit anzufertigen.

Zuerst möchte ich hier Jan danken. Vielen Dank für diesen spannenden und aufregenden Start in das akademische Leben. Ich habe viel gelernt und fühle mich bereit für die kommenden Herausforderungen in der Wissenschaft. Ich bin privilegiert ein Teil dieser jungen Arbeitsgruppe gewesen zu sein und kann in der Zukunft hoffentlich viel von dem was ich hier gelernt habe anwenden. Ich freue mich auf kommende gemeinsame Projekte und hoffe, dass wir auch in Zukunft noch oft zusammenarbeiten können.

Weiterer Dank gebührt meinem Mentor, Percy, für die vielen Ratschläge und die warmherzige Aufnahme in dieses tolle Institut.

Außerdem danke ich all meinen Kollegen und Freunden im Labor, die jederzeit für eine produktive und motivierende Arbeitsatmosphäre gesorgt haben. Danke an Philippa, Miriam, Hannah, Tobi, Anna, Silke, Basti, Anna-Marie, Lukas, Thomas, Jonas und Maxi für die gute Zeit im Labor und nach der Arbeit. Hat Spaß gemacht!

Außerdem danke ich meiner Familie und meinen Freunden, die immer für mich da sind und mir auch in schlechten Zeiten so Einiges verzeihen.

Am Schluss danke ich noch Hannah für den Support in stressigen Phasen, die vielen Korrekturen und die Anerkennung, die es mir ermöglicht die Begeisterung für die Wissenschaft auszuleben.