

Die Orchestrierung der CD8⁺ T-Zell-vermittelten Antitumor-Immunantwort durch eine immunostimulatorische cDC1-Subpopulation

Philippa Paulina Meiser

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

Vorsitz: Prof. Dr. Dirk H. Busch

Prüfende der Dissertation:

1. TUM Junior Fellow Dr. Jan P. Böttcher
2. Prof. Dr. Angelika Schnieke
3. Prof. Dr. Björn E. Clausen

Die Dissertation wurde am 15.01.2024 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die TUM School of Medicine and Health am 05.06.2024 angenommen.

Publikation

Die Daten aus dieser Arbeit gingen in die folgende Publikation ein:

„A distinct stimulatory cDC1 subpopulation amplifies CD8⁺ T cell responses in tumors for protective anti-cancer immunity”

Philippa Meiser, Moritz A. Knolle, Anna Hirschberger, Gustavo P. de Almeida, Felix Bayerl, Sebastian Lacher, Anna-Marie Pedde, Sophie Flommersfeld, Julian Hönninger, Leonhard Stark, Fabian Stögbauer, Martina Anton, Markus Wirth, Dirk Wohlleber, Katja Steiger, Veit R. Buchholz, Barbara Wollenberg, Christina E. Zielinski, Rickmer Braren, Daniel Rückert, Percy A. Knolle, Georgios Kaissis und Jan P. Böttcher

Cancer Cell, Band 41, Ausgabe 8, Seite 1498-1515

DOI: 10.1016/j.ccell.2023.06.008

Erscheinungsdatum: 14. August 2023

Datum der Online-Veröffentlichung: 13. Juli 2023

Inhaltsverzeichnis

Publikation	2
Inhaltsverzeichnis	3
Zusammenfassung	8
Abstract	10
1 Einleitung	12
1.1 Entstehung und Ausbreitung von Krebserkrankungen	12
1.2 Prinzip einer Antitumor-Immunantwort	12
1.3 Konventionelle dendritische Zellen	13
1.3.1 Ontogenese und Phänotyp	13
1.3.2 Immunologische Funktionen	16
1.4 Die Rolle von cDC1 in Antitumor-Immunantworten	20
1.5 Mechanismen der Immunevasion durch den Tumor	23
1.6 Zielsetzung der Arbeit	26
2 Material und Methoden	27
2.1 Material	27
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien	27
2.1.2 Medien und Puffer	27
2.1.3 Antikörper	28
2.1.4 Assay-Kits	29
2.1.5 Tumorzelllinien	30
2.1.6 Rekombinante DNA	30
2.1.7 Single Cell RNA-Sequencing Datensets und Code	30
2.1.8 Software und Algorithmen	30
2.2 Versuchstiere und humane Proben	31
2.2.1 Mäuse	31

2.2.2	Humane Proben	32
2.3	Methoden	33
2.3.1	Tumorzellkultur	33
2.3.2	Klonierung und virale Transduktion	33
2.3.3	Tumortransplantation	34
2.3.4	T-Zell-Depletion <i>in vivo</i>	34
2.3.5	CXCR3-Blockade <i>in vivo</i>	34
2.3.6	FTY720-Behandlung <i>in vivo</i>	35
2.3.7	cDC1-Depletion <i>in vivo</i>	35
2.3.8	Adoptiver Transfer von OT-I CD8 ⁺ T-Zellen	35
2.3.9	Isolation von Immunzellen aus Tumorgewebe	35
2.3.10	<i>In vitro</i> Kultivierung von cDC1 aus Knochenmark	36
2.3.11	Analyse von Tumorantigenaufnahme, Kreuzpräsentation und CXCL9-Produktion von cDC1 <i>ex vivo</i>	36
2.3.12	<i>In vitro</i> Assays zur Untersuchung der Aktivierung und CXCL9-Produktion von cDC1	37
2.3.13	Analyse von CD8 ⁺ T-Zellfunktionen <i>ex vivo</i>	37
2.3.14	Volumetrische Immunofluoreszenz-Mikroskopie	38
2.3.15	Bildanalyse und Histozytometrie	39
2.3.16	Immunhistochemie und Histologie von Patientenproben	40
2.3.17	Durchflusszytometrie und Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS)	41
2.3.18	Einzelzell-RNA-Sequenzierung (scRNA-Seq)	41
2.3.19	Re-Analyse eines publizierten scRNA-Seq-Datensets	42
2.3.20	Bioinformatische Analyse der Krebspatienten-Daten	43
2.3.21	Deep-Learning-Modell und Ausgangs-Vorhersage	44

2.3.22	Deep-Learning-Interpretabilität	44
2.3.23	Ausgangs-Vorhersage mit einem Random-Forest-Modell	45
2.3.24	Statistische Analysen	46
3	Ergebnisse	47
3.1	cDC1-CD8 ⁺ T-Zell-Cluster als Merkmale protektiver Antitumor- Immunantworten	47
3.1.1	Ein Mikroskopie-basiertes Deep-Learning-Modell zur Vorhersage der Antitumor-Immunantwort	47
3.1.2	Die Genauigkeit der Klassifizierung von Progressor- und Regressortumoren basiert auf räumlichen Informationen	51
3.1.3	Identifizierung von cDC1-CD8 ⁺ T-Zell-Clustern als Merkmale von <i>Ptgs1/Ptgs2</i> ^{-/-} -BRAF ^{V600E} -Tumoren	54
3.1.4	cDC1-CD8 ⁺ T-Zell-Cluster sind ein konserviertes Merkmal von Regressortumoren	56
3.2	cDC1-CD8 ⁺ T-Zell-Cluster im Stroma bilden eine Nische für T-Zell-Stimulation	60
3.2.1	cDC1-CD8 ⁺ T-Zell-Cluster sind im Stroma lokalisiert	60
3.2.2	Lokale Stimulation von CD8 ⁺ T-Zellen findet innerhalb der Cluster statt	61
3.3	Die protektive Antitumor-Immunantwort geht von TCF1 ⁺ T-Zellen aus, die in cDC1-CD8 ⁺ T-Zell-Clustern stimuliert werden	63
3.3.1	Charakterisierung der intratumoralen T-Zellen	63
3.3.2	Stem-like CD8 ⁺ T-Zellen sind in cDC1-CD8 ⁺ T-Zell-Clustern lokalisiert	64
3.3.3	Die lokale Stimulation in intratumoralen Clustern ist notwendig für eine protektive Antitumor-Immunantwort	66
3.4	Die räumliche Organisation der cDC1-CD8 ⁺ T-Zell-Interaktionen ist in humanen Tumoren konserviert	68

3.5	Intratumorale cDC1-CD8 ⁺ T-Zell-Cluster werden von einer immunostimulatorischen cDC1-Subpopulation gebildet	71
3.5.1	Charakterisierung der cDCs in <i>Ptgs1/Ptgs2</i> ^{-/-} -BRAF ^{V600E} -Tumoren	71
3.5.2	Immunostimulatorische cDC1 formen Cluster mit CD8 ⁺ T-Zellen	74
3.6	Clusterbildung und T-Zell-Stimulation durch die immunostimulatorische cDC1-Subpopulation	78
3.6.1	Antigenaufnahme und Kreuzpräsentation durch MHCII ^{hi} CCR7 ^{neg} cDC1	78
3.6.2	MHCII ^{hi} CCR7 ^{neg} cDC1 koordinieren die Clusterbildung über die CXCL9/CXCR3-Achse	81
3.7	cDC1-CD8 ⁺ T-Zell-Cluster und die CXCL9 ⁺ cDC1-Gensignatur korrelieren mit dem Überleben von Krebspatienten	85
3.7.1	cDC1-CD8 ⁺ T-Zell-Custer korrelieren mit progressionsfreiem Überleben von Patienten	85
3.7.2	Reife cDC1-Subpopulationen existieren in humanen Tumoren	86
3.7.3	Die CXCL9 ⁺ cDC1-Gensignatur korreliert mit dem Überleben humaner Patienten	88
4	Diskussion	90
4.1	Räumliche Interaktionen von Immunzellen als Parameter für die Tumorklassifizierung	91
4.2	Nutzung von künstlicher Intelligenz zur Interpretation medizinischer Daten	92
4.3	Die stromale Lokalisierung der cDC1-CD8 ⁺ T-Zell-Cluster	93
4.3.1	Vergleich der cDC1-CD8 ⁺ T-Zell-Cluster mit tertiären lymphatischen Strukturen	94
4.4	Heterogenität und Arbeitsteilung intratumoraler cDC1	95
4.5	Unterstützung der protektiven Antitumor-Immunantwort durch die CXCL9/CXCL10-CXCR3-Achse	97
4.6	Abhängigkeit der Funktion der MHCII ^{hi} CCR7 ^{neg} cDC1 von IFN γ	98

4.7	Mögliche Wirkungen von Immuntherapien auf cDC1-CD8 ⁺ T-Zell-Cluster	99
5	Appendix	101
5.1	Ergänzende Daten	101
5.1.1	Liste der 88 ausgewählten immunrelevanten Gene zur Primergenerierung für die Einzelzell-RNA-Sequenzierung	101
5.2	Glossar	104
5.3	Literaturverzeichnis	108
5.4	Abbildungsverzeichnis	124
5.5	Tabellenverzeichnis	126
6	Danksagung	127
7	Eidesstattliche Erklärung	128

Zusammenfassung

Konventionelle dendritische Zellen vom Typ 1 (cDC1) sind für die Orchestrierung der T-Zell-vermittelten Abstoßung von Tumoren essenziell. In der initialen Phase der Antitumor-Immunantwort nehmen cDC1 Tumorantigene auf und kreuzpräsentieren diese im drainierenden Lymphknoten an naive CD8⁺ T-Zellen, die so aktiviert werden. Weniger gut erforscht ist, ob eine lokale Interaktion zwischen den rekrutierten Tumorspezifischen CD8⁺ T-Zellen und cDC1 im Tumorgewebe selbst als eine weitere Phase der Antitumor-Immunantwort für die Tumorabstoßung benötigt wird. Diese Arbeit untersucht, inwieweit die Interaktionen zwischen cDC1 und CD8⁺ T-Zellen im Tumormikromilieu (TMM) den Ausgang einer Antitumor-Immunantwort bestimmen. Mithilfe einer Kombination aus konfokaler Mikroskopie und einem Deep-Learning-Modell wurden in dieser Arbeit erstmals intratumorale cDC1-CD8⁺ T-Zell-Cluster als ein charakteristisches Merkmal protektiver Antitumor-Immunantworten identifiziert. Diese Cluster entstanden präferenziell in stromalen Tumorregionen und dienten dort als Nische für die lokale Stimulation von Stammzell-ähnlichen (stem-like) TCF1⁺ CD8⁺ T-Zellen durch cDC1. Eine Abwesenheit der cDC1-CD8⁺ T-Zell-Cluster ging mit einer Progression des Tumors einher.

Diese Arbeit beschreibt erstmals eine immunostimulatorische, CCR7-negative cDC1-Subpopulation im TMM. Diese cDC1-Subpopulation vermittelte die Bildung der Cluster über die Produktion der Chemokine CXCL9 und CXCL10. Innerhalb der Cluster kreuzpräsentierten immunostimulatorische CCR7^{neg} cDC1 Tumorantigene an stem-like CD8⁺ T-Zellen, was für die intratumorale Expansion und Effektordifferenzierung der T-Zellen notwendig war.

cDC1-CD8⁺ T-Zell-Cluster, in denen CCR7^{neg} cDC1 mit CD8⁺ T-Zellen interagieren, konnten auch in humanen Krebspatienten beobachtet werden und bildeten auch hier eine Nische für eine intratumorale Stimulation der rekrutierten T-Zellen. Sowohl eine hohe Anzahl an Clustern als auch eine hohe Expression der Gensignatur der CCR7^{neg} CXCL9-produzierenden cDC1 waren mit einem progressionsfreien Überleben der Patienten assoziiert.

Somit konnte in dieser Arbeit eine intratumorale Phase der Antitumor-Immunantwort aufgedeckt werden, die von immunostimulatorischen cDC1 im TMM organisiert wird und bestimmt, ob die Immunantwort protektiv oder ineffektiv ausfällt. Diese Entdeckung könnte zukünftig für die Behandlung von Krebspatienten genutzt werden, beispielsweise durch die Entwicklung von Therapien, die die immunostimulatorische cDC1-Subpopulation oder die Clusterbildung unterstützen. Daher bedarf es weiterer Forschung zur Entstehung dieser cDC1-Subpopulation und der Rolle der cDC1-CD8⁺ T-Zell-Cluster während bereits etablierter Immuntherapien wie der Immun-Checkpoint-Inhibierung.

Abstract

Conventional type 1 dendritic cells (cDC1) are essential orchestrators of T cell-mediated tumor rejection. In the initial phase of the anti-cancer immune response, cDC1 take up tumor antigen and cross-present it to naïve CD8⁺ T cells in the tumor-draining lymph node in order to activate tumor-specific CD8⁺ T cells. Whether there is a second phase of anti-cancer immunity during which the infiltrating tumor-specific CD8⁺ T cells interact with intratumoral cDC1 is less well characterized. Therefore, this work examines to which extent local interactions between cDC1 and CD8⁺ T cells within the tumor microenvironment (TME) are required for a protective anti-cancer immune response. Employing a combination of volumetric confocal microscopy and deep learning, this work has identified intratumoral cDC1-CD8⁺ T cell clusters as a characteristic feature of protective anti-cancer immunity. These clusters preferentially developed at the stroma-tumor interface and constituted a niche for the local stimulation of stem-like TCF1⁺ CD8⁺ T cells by cDC1. Absence of these cDC1-CD8⁺ T cell clusters was associated with tumor progression.

This work is the first to describe an immunostimulatory CCR7-negative cDC1 subpopulation within the TME. This cDC1 subpopulation mediated cluster formation via production of the chemokines CXCL9 and CXCL10. Within the clusters, immunostimulatory CCR7^{neg} cDC1 cross-presented tumor antigen to stem-like CD8⁺ T cells, which was required for their intratumoral expansion and effector differentiation. Interactions between CCR7^{neg} cDC1 and CD8⁺ T cells in such cDC1-CD8⁺ T cell clusters could also be identified as a niche for the intratumoral stimulation of recruited T cells in human cancer patients. Both a high abundance of clusters and a high expression of gene signature of the CCR7^{neg} CXCL9-producing cDC1 subpopulation were positively correlated with progression-free survival.

In summary, this work could reveal an intratumoral phase of the anti-cancer immune response, which is orchestrated by immunostimulatory cDC1 within the TME and determines whether anti-cancer immunity is protective or ineffective.

This finding could be leveraged for the treatment of cancer patients in the future, for instance by developing therapies which promote the immunostimulatory cDC1 subpopulation or the formation of cDC1-CD8⁺ T cell clusters. Further research is needed to shed light on the development of the intratumoral cDC1 subpopulations and the role of cDC1-CD8⁺ T cell clusters during already established immunotherapies such as immune checkpoint inhibition.

1 Einleitung

1.1 Entstehung und Ausbreitung von Krebserkrankungen

Im Jahr 2020 waren Krebserkrankungen mit fast zehn Millionen Toten die weltweit häufigste Todesursache, außerdem wurden mehr als 18 Millionen neue Krebserkrankungen registriert, darunter vor allem Brust-, Lungen- und Darmkrebs^{1,2}. Es gibt verschiedene Auslöser für Krebserkrankungen, beispielsweise eine genetische Disposition, eine krebsfördernde Lebensweise oder auch virale Erkrankungen. Allen Krebserkrankungen liegt jedoch zugrunde, dass körpereigene Zellen mutieren und Fähigkeiten für Tumorwachstum und metastatische Verbreitung erlangen. Zu diesen Fähigkeiten zählen unter anderem eine anhaltende Proliferation und Vermeidung des Zelltods, die Induktion der Angiogenese sowie ein invasives Wachstum^{3,4}. Da geschätzt wird, dass die Inzidenz von Krebserkrankungen bis 2040 um 55% steigen wird⁵, ist es zwingend notwendig, Krebserkrankungen auf molekularer und immunologischer Ebene weiter zu erforschen, um neue Methoden zur Prävention und Behandlung entwickeln zu können.

1.2 Prinzip einer Antitumor-Immunantwort

Eine protektive Immunantwort gegen einen Tumor erfordert ein Zusammenspiel verschiedener Zellen des innate und des adaptiven Immunsystems. Dabei spielen besonders zytotoxische CD8⁺ T-Zellen eine wichtige Rolle⁶. CD8⁺ T-Zellen sind adaptive Immunzellen, die Tumorzellen erkennen und gezielt töten können. Für die Initiierung einer solchen CD8⁺ T-Zell-vermittelten Antitumor-Immunantwort müssen zunächst in den Tumor-drainierenden Lymphknoten naive, Tumor-spezifische CD8⁺ T-Zellen aktiviert werden. Diese Aktivierung wird durch die Erkennung von Tumorantigenen induziert, die den naiven CD8⁺ T-Zellen von spezialisierten Zellen des innate Immunsystems präsentiert werden. Diese sogenannten Antigen-präsentierenden Zellen (APCs; engl. *antigen-presenting cells*), die Tumormaterial aufnehmen, prozessieren und zu den CD8⁺ T-Zellen in den Lymphknoten

transportieren können, sind daher essenziell für die Initiierung einer Antitumor-Immunantwort⁷.

Studien mit murinen Tumormodellen und humanen Krebspatienten haben gezeigt, dass innerhalb der APCs vor allem konventionelle dendritische Zellen (cDCs; engl. *conventional dendritic cells*) in der Lage sind, effizient Tumorantigene an naive CD8⁺ T-Zellen zu präsentieren⁸⁻¹⁰. cDCs spielen deshalb eine entscheidende Rolle für die Antitumor-Immunantwort. In den nachfolgenden Kapiteln werden Entwicklung, Phänotyp und Funktion von cDCs genauer beschrieben.

1.3 Konventionelle dendritische Zellen

Seit ihrer Entdeckung vor rund 50 Jahren^{11,12} sind dendritische Zellen (DCs; engl. *dendritic cells*) gemeinhin als professionelle APCs und als wichtiges Bindeglied zwischen dem innatem und dem adaptiven Immunsystem bekannt. DCs bilden eine heterogene Gruppe von Zelltypen, die sowohl in Menschen als auch in Mäusen anhand ihrer Ontogenese, ihres Phänotyps und ihrer Funktionen voneinander unterschieden werden können. Diese Arbeit behandelt aufgrund ihrer Relevanz für Antitumor-Immunantworten vordergründig konventionelle dendritische Zellen (cDCs; engl. *conventional dendritic cells*).

1.3.1 Ontogenese und Phänotyp

DCs können grob in cDCs, plasmazytoide DCs (pDCs; engl. *plasmacytoid DCs*) und DCs mit monozytischem Ursprung (moDCs; engl. *monocyte-derived DCs*) unterteilt werden. Innerhalb der cDCs wird zwischen cDC1 und cDC2 unterschieden.

Die Ontogenese aller DCs findet im Knochenmark statt (Abb. 1). Dort entstehen aus hämatopoietischen Stammzellen (HSC; engl. *hematopoietic stem cells*) multipotente Vorläuferzellen (MPP; engl. *multipotent progenitors*), die dann zu myeloischen Stammzellen (CMP; engl. *common myeloid progenitors*) differenzieren^{13,14}. Aus den CMP entwickeln sich Vorläuferzellen für Makrophagen und dendritische Zellen (MDP; engl. *macrophage-dendritic cell progenitors*), aus denen sowohl Makrophagen und dendritische Zellen als auch Monozyten hervorgehen können¹⁵. MDP differenzieren weiter zu allgemeinen DC-Vorläuferzellen (CDP; engl. *common dendritic cell*

progenitors), aus denen dann pDCs und Vorläufer für konventionelle DCs (engl. *pre-cDCs*) entstehen¹⁶. Pre-cDCs sind eine heterogene Mischpopulation aus pre-cDC1 und pre-cDC2^{17,18}, die aus dem Knochenmark über das periphere Blut in lymphatische und nicht-lymphatische Organe einwandern und dort zu cDC1 und cDC2 differenzieren¹⁹. Mehrere Studien haben gezeigt, dass in humanem Blut eine weitere DC-Population vorliegt, die phänotypisch und funktionell Gemeinsamkeiten sowohl mit cDC2 als auch mit Monozyten aufweist und DC3 genannt wird^{20,21}. DC3 entwickeln sich unabhängig von den cDC1/cDC2-Vorläuferzellen CDP und expandieren vor allem unter inflammatorischen Bedingungen²². Während die Entwicklung von cDC1 und cDC2 von der Rezeptortyrosinkinase Flt3 und ihrem Liganden Flt3L abhängig ist^{23,24}, wird für die Entstehung von DC3 GM-CSF benötigt²².

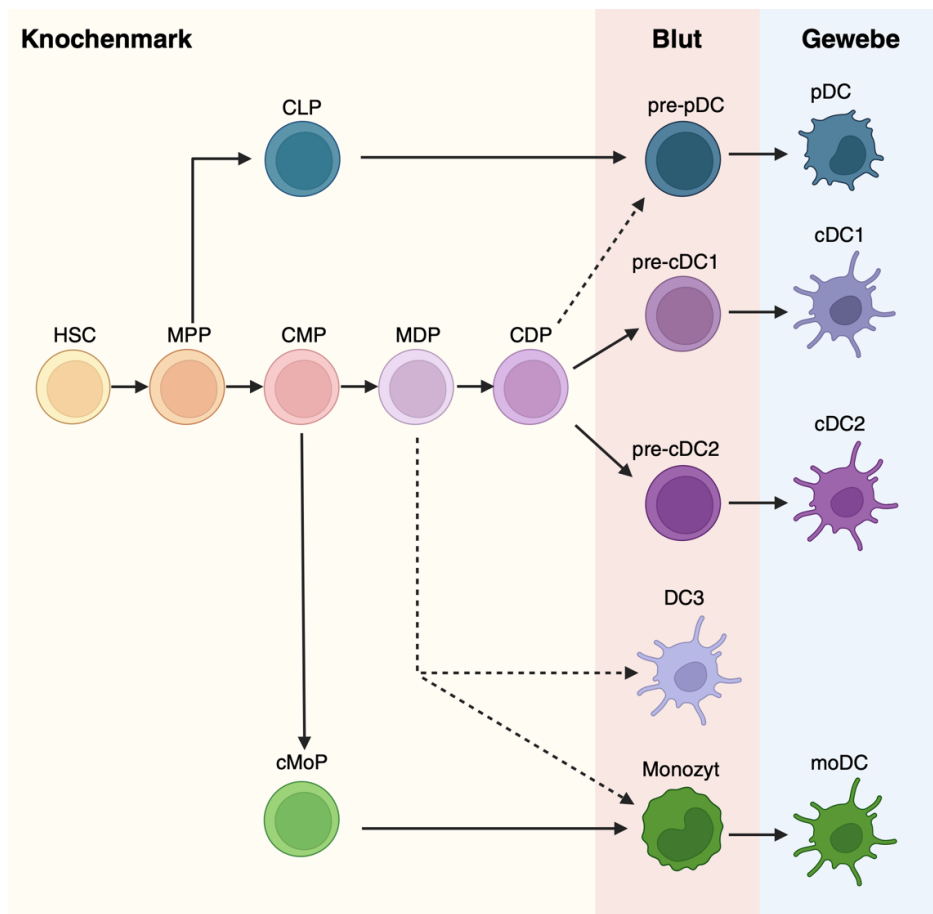


Abbildung 1: Ontogenese dendritischer Zellen. Im Knochenmark entwickeln sich aus der hämatopoietischen Stammzelle (HSC) verschiedene Vorläuferzellen, aus denen schließlich cDC1, cDC2, pDCs und moDCs differenzieren. Die Entwicklung von DC3 wurde bisher nur im humanen System beschrieben. Diese Abbildung wurde mithilfe von BioRender.com erstellt.

Zunächst wurde vermutet, dass pDCs sich neben cDCs aus den myeloischen Vorläuferzellen CMP und CDP entwickeln. Neuere Studien konnten jedoch belegen, dass pDCs auch aus lymphoiden Stammzellen (CLP; engl. *common lymphoid progenitor*) hervorgehen und bereits in diesem frühen Entwicklungsschritt von der Ontogenese der cDCs divergieren können^{25,26}.

CMP können neben CDP auch zu Vorläuferzellen für Monozyten (cMoP; engl. *common monocyte progenitor*) differenzieren²⁷. Die aus cMoP entstandenen Monozyten können unter inflammatorischen Bedingungen zu moDCs differenzieren, die funktionell cDCs ähneln²⁸.

Die Entstehung von humanen und murinen cDC1 ist abhängig von konservierten Transkriptionsfaktoren wie PU.1²⁹, BATF3^{30,31}, IRF8, NFIL3 und ID2^{32,33}. Die für die Entwicklung von cDC2 kritischen Transkriptionsfaktoren sind weniger gut erforscht, jedoch konnte gezeigt werden, dass NOTCH2³⁴, IRF4³⁵ und KLF4³⁶ eine wichtige Rolle spielen.

cDCs kommen als residente Populationen in lymphatischen Organen, aber auch als migratorische Populationen in fast allen nicht-lymphatischen Organen vor³⁷. Die Rekrutierung von pre-cDC1 und pre-cDC2 aus dem Knochenmark in die jeweiligen Organe erfolgt chemotaktisch und kann je nach Organ und inflammatorischem Kontext variieren³⁸⁻⁴⁰.

Die unterschiedlichen cDC1- und cDC2-Populationen können anhand ihrer Expression von Oberflächenproteinen identifiziert werden. Sowohl humane als auch murine cDCs exprimieren den hämatopoietischen Marker CD45, das Integrin α -X (Itgax, auch genannt CD11c) und den Haupthistokompatibilitäts-Klasse II-Komplex (MHCII; engl. *major histocompatibility complex class II*)^{41,42}. Murine cDC1 in lymphatischen Organen wie Milz, Lymphknoten und Thymus exprimieren einen CD8 α -Homodimer^{43,44}, während cDC1 in nicht-lymphatischen Organen das Integrin α -E (Itgae, auch genannt CD103) exprimieren⁴⁵. Diese CD103⁺ cDC1 konnten beispielsweise in der Lunge⁴⁶, der Haut⁴⁷ und im Darm⁴⁸ identifiziert werden. Humane cDC1 sind durch ihre Expression des Oberflächenrezeptors CD141 charakterisiert^{49,50}. Sie exprimieren weder CD8 noch CD103, stimmen darüber hinaus aber in ihrer Gensignatur und Funktion mit murinen cDC1 überein⁵¹. Ähnlich zu murinen cDC1 wurden CD141⁺ cDC1 in humanen lymphatischen Organen und in der Zirkulation und nicht-lymphatischen

Organen wie Lunge und Haut beschrieben^{49,51}. Des Weiteren exprimieren alle humanen und murinen cDC1 den Chemokinrezeptor XCR1⁵²⁻⁵⁴ und den C-Typ-Lektin-Rezeptor CLEC9A (auch genannt DNGR-1)⁵⁵⁻⁵⁷. Murine cDC2 können mithilfe ihrer Expression des Integrins α -M (Itgam, auch genannt CD11b)^{58,59} und des Glykoproteins Sirpa⁶⁰ von cDC1 unterschieden werden. Analog zur CD8-Expression von cDC1 in lymphatischen Organen exprimieren cDC2 in Lymphknoten, Milz und Thymus zusätzlich CD4⁶¹. Humane cDC2 können außerdem durch Expression des Oberflächenproteins CD1c identifiziert werden⁵⁰.

1.3.2 Immunologische Funktionen

cDCs fungieren als Sentinelzellen, die ihre Umgebung ständig nach Pathogenen abtasten und im Falle einer Infektion innate und adaptive Immunzellen aktivieren können. In der Lunge beispielsweise sind cDCs innerhalb des Epithels lokalisiert und weisen trans-epitheliale Fortsätze auf, die bis in den Alveolarraum reichen und es cDCs ermöglichen, dort nach respiratorischen Krankheitserregern zu suchen⁶². Auch in der Darmschleimhaut gibt es cDCs, deren Fortsätze durch die Tight Junctions zwischen den Epithelzellen ins Darmlumen reichen, um dort pathogene Bakterien erkennen zu können⁶³. Bei der Erkennung von Pathogenen durch cDCs spielen spezialisierte Rezeptoren, sogenannte Mustererkennungsrezeptoren (PRRs; engl. *pattern recognition receptors*) eine Rolle (Abb. 2). Diese können anhand von spezifischen konservierten Mustern (PAMPs; engl. *pathogen-associated molecular patterns*) Pathogene erkennen. PRRs können aber auch endogene Moleküle erkennen, die von geschädigten Zellen freigesetzt werden (DAMPs; engl. *danger-associated molecular patterns*)^{64,65}. Zur Gruppe der PRRs gehören Toll-ähnliche Rezeptoren (TLRs, engl. *toll-like receptors*), C-Typ-Lektin-Rezeptoren (CLRs; engl. *C-type lectin receptors*), RIG-I-ähnliche Rezeptoren (RLRs; engl. *RIG-I-like receptors*) und NOD-ähnliche Rezeptoren (NLRs; engl. *NOD-like receptors*)⁶⁶. Beide cDC-Subtypen exprimieren TLR9, der unmethylierte CpG-Dinukleotide in bakterieller und viraler DNA erkennt. Die Expression von TLR3 ist spezifisch für cDC1, die so besonders gut doppelsträngige virale RNA erkennen können. cDC2 dagegen exprimieren TLR5, der spezifisch für bakterielles Flagellin ist, und TLR7, der einzelsträngige virale RNA bindet^{41,67-70}. Der CLR CLEC9A wird wie bereits erwähnt

nur von cDC1 exprimiert und erkennt bestimmte Strukturen in toten Zellen, die in gesunden Zellen nicht zugänglich sind^{71,72}. cDC1 und cDC2 exprimieren die RLRs RIG-I und MDA5, die durch die Erkennung von doppelsträngiger viraler DNA aktiviert werden^{73,74}. Gleichmaßen wird der NLR NOD2 von cDC1 und cDC2 exprimiert, die so den bakteriellen Zellwandbestandteil Muramyl-Dipeptid erkennen können⁷⁵.

Die Aktivierung von PRR-Signalkaskaden resultiert in phänotypischen und funktionellen Veränderungen der cDCs, der sogenannten Reifung (Abb. 2). Diese Reifung ist charakterisiert durch eine gesteigerte Expression von MHCII und den costimulatorischen Molekülen CD80, CD86 und CD40⁷⁶⁻⁷⁹ sowie durch die Fähigkeit zur Antigenpräsentation und T-Zell-Aktivierung^{12,80}. Reife cDCs weisen außerdem eine erhöhte Expression des Chemokinrezeptors CCR7 auf, der die Migration der cDCs aus peripheren Organen in die T-Zell-Zonen von Lymphknoten ermöglicht, wo sie Antigene an naive T-Zellen präsentieren und diese so aktivieren können^{81,82}. Für die Initiierung einer T-Zell-vermittelten Immunantwort ist eine Reifung von cDCs also unerlässlich.

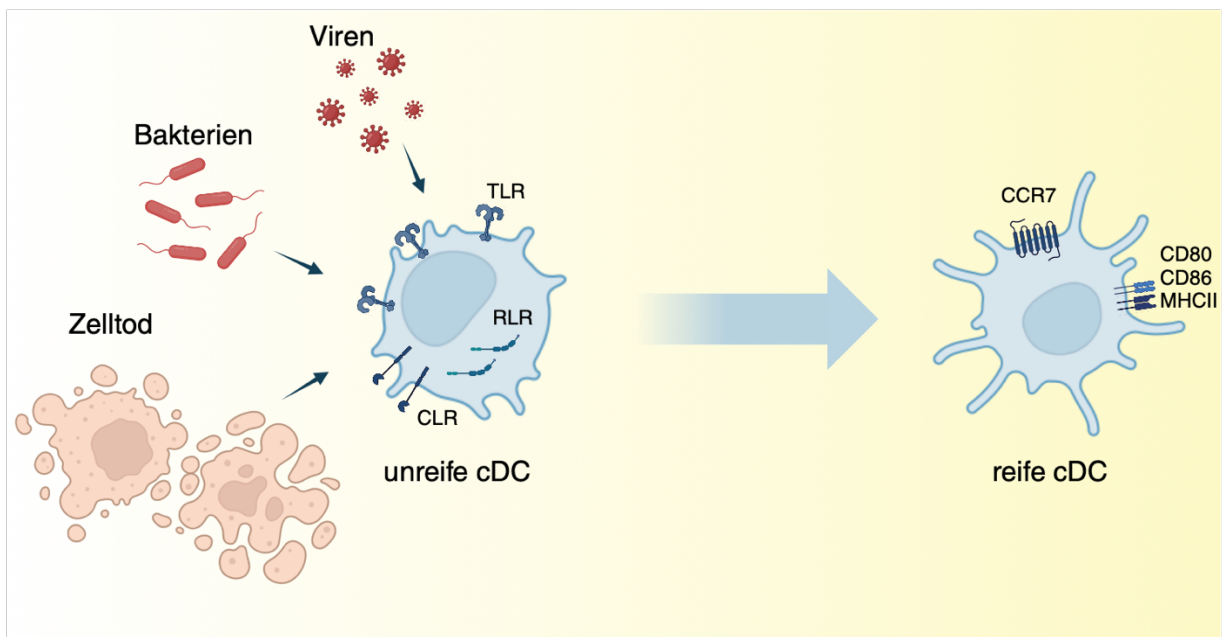


Abbildung 2: Die Reifung von cDCs. Mithilfe von Pattern Recognition Receptors (PRRs) wie TLRs, CLR und RLRs können cDCs konservierte Strukturen von Pathogenen wie Viren und Bakterien, aber auch Muster auf geschädigten oder toten Zellen erkennen. Die von den PRRs in Gang gesetzte Signalkaskade induziert die Reifung der cDCs, die mit einer erhöhten Expression von MHCII, CD80, CD86 und CCR7 und einer verstärkten Motilität einhergeht. Diese Abbildung wurde mithilfe von BioRender.com erstellt.

Die Antigenpräsentation durch reife cDCs kann über MHCI oder MHCII erfolgen. Das von cDCs prozessierte und auf MHCI oder MHCII präsentierte Antigen wird im Lymphknoten von naiven T-Zellen, die spezifisch für dieses Antigen sind, durch eine Bindung zwischen ihrem T-Zell-Rezeptor (TCR; engl. *T cell receptor*) und dem MHCI/MHCII-Antigen-Komplex erkannt (Abb. 3). Durch dieses sogenannte Priming werden die Antigen-spezifischen T-Zellen aktiviert⁸³. Auf MHCI werden zytosolische Antigene an CD8⁺ T-Zellen präsentiert, beispielsweise wenn eine cDC bereits selbst mit einem Virus infiziert ist⁸⁴. Extrazelluläre Antigene wie z.B. Bakterien, die von cDCs über Phagozytose, Endozytose oder Makropinozytose internalisiert wurden, werden auf MHCII an CD4⁺ T-Helfer-Zellen präsentiert⁸⁵. cDCs sind aber auch in der Lage, über den Mechanismus der Kreuzpräsentation extrazelluläre Antigene auf MHCI statt auf MHCII zu präsentieren und so CD8⁺ T-Zellen zu aktivieren, die spezifisch für diese Antigene sind^{86,87}. Für eine erfolgreiche T-Zell-Aktivierung muss neben der Antigenpräsentation auch eine Costimulation mittels Interaktion zwischen CD80/CD86 auf der cDC und CD28 auf der T-Zelle erfolgen⁸⁸ (Abb. 3). Zusätzlich werden von reifen cDCs Zytokine und Chemokine produziert, die die T-Zell-Antwort beeinflussen⁸⁹⁻⁹¹. cDC1 und cDC2 weisen hierbei funktionelle Unterschiede auf und sind auf die Induktion bestimmter T-Zell-Antworten spezialisiert. Die MHCI-abhängigen CD8⁺ T-Zell-Immunantworten werden präferenziell von cDC1 induziert⁹². In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass cDC1 bei viralen Infektionen Antigene an CD8⁺ T-Zellen auf MHCI kreuzpräsentieren^{47,53,93,94} und dass die CD8⁺ T-Zell-vermittelte antivirale Immunantwort in cDC1-defizienten Mäusen stark beeinträchtigt ist^{31,95}. Sowohl murine als auch humane cDC1 – aber nicht cDC2 – weisen diese erhöhte Fähigkeit zur Kreuzpräsentation auf^{54,96}. Gleichzeitig sind reife cDC1 in Mäusen die primäre Quelle für das Zytokin Interleukin-12 (IL-12)^{70,97}, welches neben Antigenpräsentation und Costimulation als zusätzliches Signal für eine produktive CD8⁺ T-Zell-Antwort benötigt wird⁹⁸. Die auf diese Weise aktivierten CD8⁺ T-Zellen expandieren, produzieren proinflammatorische Zytokine wie IFN γ und TNF und können virusinfizierte Zellen mithilfe von Granzymen (Gzm) und Perforinen töten⁹⁹ (Abb. 3). cDC1 interagieren auch mit CD4⁺ T-Zellen, bei deren Aktivierung das von den cDC1 produzierte IL-12 für eine T-Helfer(T_H)1-Differenzierung sorgt^{100,101}. T_H1-Zellen sezernieren ebenfalls IFN γ und TNF und sind für antivirale und antibakterielle Immunantworten wichtig⁸⁹. Des Weiteren aktivieren cDC1 über ihre IL-12-Produktion auch natürliche Killerzellen

(NK-Zellen), die daraufhin ebenfalls IFN γ produzieren und so Immunantworten forcieren können¹⁰². Das von aktivierten CD8⁺ T-Zellen, T_H1-Zellen und NK-Zellen produzierte IFN γ induziert wiederum eine gesteigerte Produktion von IL-12 in cDC1¹⁰³⁻¹⁰⁵. In Menschen konnte diese exklusive Produktion von IL-12 durch cDC1 nicht festgestellt werden, hier können auch cDC2 erhebliche Mengen an IL-12 sezernieren^{106,107}.

cDC2 sind spezialisiert auf die MHCII-vermittelte Präsentation extrazellulärer Antigene an CD4⁺ T-Zellen⁹². So können cDC2 eine T_H2-Differenzierung der T-Zellen induzieren, die bei der Immunantwort gegen parasitäre Infektionen^{36,108}, aber auch bei allergischen Reaktionen und asthmatischen Erkrankungen^{58,109,110} eine wichtige Rolle spielt. Durch die Produktion von IL-6 und IL-23 können cDC2 außerdem die Entwicklung und Funktion von T_H17-Zellen unterstützen, die für die Homöostase des Darmmikrobioms und antifungale Immunantworten wichtig sind^{35,111,112}.

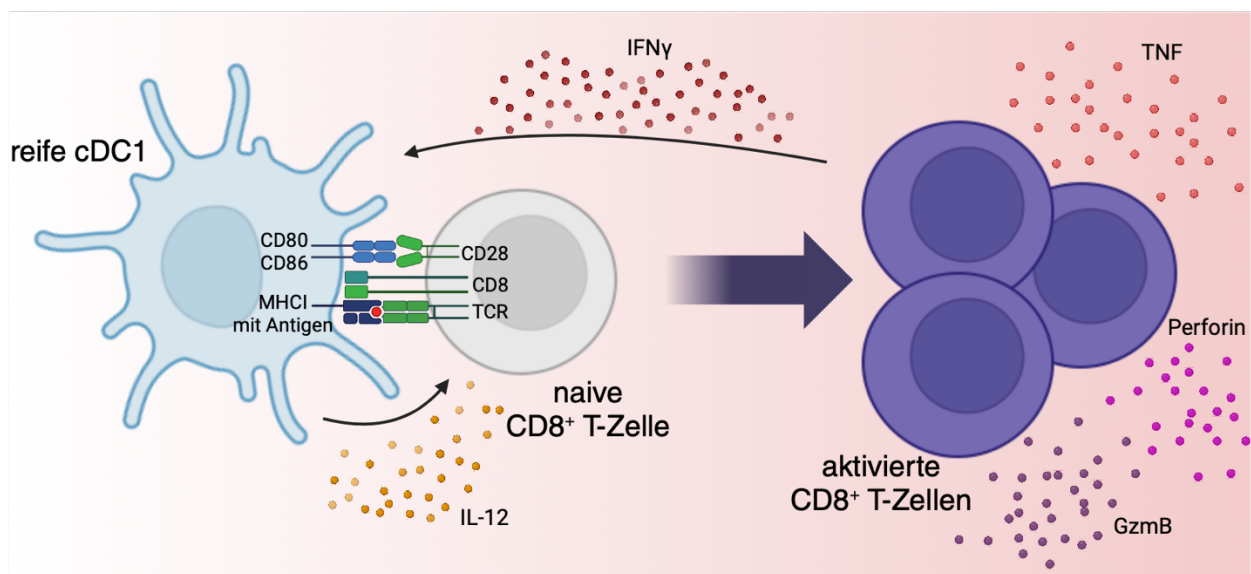


Abbildung 3: Exemplarische Antigenpräsentation einer cDC1 an eine CD8⁺ T-Zelle. Eine reife cDC1 präsentiert mithilfe des MHC I-Proteinkomplexes ein Antigen an eine naive CD8⁺ T-Zelle, deren T-Zell-Rezeptor (TCR) für dieses Antigen spezifisch ist. Gleichzeitig findet über die Bindung zwischen CD80/CD86 auf der cDC1 und CD28 auf der T-Zelle eine Costimulation statt. Das von cDC1 produzierte Zytokin IL-12 dient als zusätzliches Signal zur Aktivierung der T-Zelle. Diese Aktivierung resultiert in der Expansion und Zytokinproduktion der T-Zelle. Die Produktion von IFN γ verstärkt die Ausschüttung von IL-12 durch die cDC1 und fördert so die Stimulation weiterer T-Zellen. Die Sekretion von TNF reguliert inflammatorische Prozesse. Außerdem setzen aktivierte CD8⁺ T-Zellen die lytischen Enzyme Perforin und Granzym B (GzmB) frei, die zytotoxisch wirken und infizierte oder veränderte Zellen töten können. Diese Abbildung wurde mithilfe von BioRender.com erstellt.

1.4 Die Rolle von cDC1 in Antitumor-Immunantworten

cDC1 sind nicht nur für Immunantworten gegen Infektionen unerlässlich, sondern auch für die Orchestrierung von Antitumor-Immunantworten. Im Vergleich mit anderen Immunzellen ist die Anzahl an cDC1 in vielen Tumoren sehr gering^{113,114}, trotzdem ist die Präsenz einer cDC1-Gensignatur in Tumoren von humanen Patienten mit einem besseren Überleben assoziiert¹¹⁵⁻¹¹⁸.

Die Rekrutierung und Retention von cDC1 im Tumormikromilieu erfolgt chemotaktisch. Die relevanten Chemokine können dabei von den Tumorzellen selbst oder von anderen Immunzellen produziert werden. Tumorzellen produzieren häufig Chemokine wie CCL2, CCL20, CCL22 und CXCL1, die pro-tumorigene Immunzellen wie Monozyten, Makrophagen, regulatorische T-Zellen und myeloide Suppressorzellen rekrutieren^{119,120}. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Melanomzellen unter bestimmten Bedingungen das cDC1-rekrutierende Chemokin CCL4 produzieren¹²¹.

In einem immunogenen Melanommodell, in dem die Abstoßung der Tumoren von cDC1 vermittelt wird, wurde gezeigt, dass NK-Zellen die Tumoren zu einem frühen Zeitpunkt infiltrieren und cDC1 rekrutieren, indem sie die Chemokine XCL1 und CCL5 ausschütten¹¹⁵ (Abb. 4). NK-Zellen produzieren außerdem den Wachstumsfaktor Flt3L, der zur Erhaltung der cDC1 im Tumor beiträgt¹¹⁶.

Im Tumorgewebe können cDC1 auf verschiedene Arten Tumormaterial aufnehmen, beispielsweise über ihren Rezeptor CLEC9A, der Bestandteile toter Tumorzellen binden kann^{122,123}. Gleichzeitig sind cDC1 im Tumor PAMPs, DAMPs und inflammatorischen Zytokinen ausgesetzt, die ihre Reifung induzieren^{124,125} (Abb. 4).

Für die Induktion einer zytotoxischen CD8⁺ T-Zell-Antwort gegen die Tumorzellen ist es zwingend notwendig, dass Tumorantigene in drainierende Lymphknoten transportiert und dort den antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen präsentiert werden. Obwohl verschiedene antigenpräsentierende Zellen in der Lage sind, Tumormaterial aufzunehmen und zu prozessieren, wurde in mehreren Studien festgestellt, dass im Lymphknoten hauptsächlich cDC1 Tumorantigene an naive CD8⁺ T-Zellen präsentieren und diese so für die Antitumor-Immunantwort primen¹²⁶⁻¹²⁸ (Abb. 4). Die Überlegenheit von cDC1 gegenüber anderen Zellen ist auch hier auf ihre Fähigkeit zur effizienten Kreuzpräsentation zurückzuführen¹¹⁸. Es konnte allerdings gezeigt werden,

dass cDC1 neben der Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen auch am Priming von CD4⁺ T-Zellen beteiligt sind¹²⁹.

Die Migration von cDC1 in einen drainierenden Lymphknoten ist auch im Tumorkontext abhängig von der Expression des Chemokinrezeptors CCR7, die in reifen cDC1 heraufreguliert wird¹²⁶.

Eine zweite wichtige Funktion von cDC1 im Tumorgewebe ist die Produktion von Zytokinen und Chemokinen. Die Produktion dieser Zytokine und Chemokine wird in vielen Fällen als Antwort auf eine Stimulation mit IFN γ induziert, welches von aktivierten NK- und T-Zellen sezerniert wird¹¹⁷. Wie bereits oben erwähnt, induziert IFN γ in cDC1 die Produktion des Zytokins IL-12, welches die zytotoxischen Fähigkeiten von CD8⁺ T-Zellen im Tumor unterstützt¹³⁰. IFN γ löst in cDC1 außerdem die Produktion der Chemokine CXCL9 und CXCL10 aus^{118,131}. CD8⁺ T-Zellen und T_H1-Zellen exprimieren CXCR3, den Rezeptor für diese Chemokine, und können von cDC1 über die CXCL9/10-CXCR3-Achse aus dem Lymphknoten in den Tumor rekrutiert und im Tumorgewebe positioniert werden¹³²⁻¹³⁴ (Abb. 4).

Aktuelle Studien haben gezeigt, dass aktivierte Tumor-spezifische CD8⁺ T-Zellen, die vom Lymphknoten in den Tumor einwandern, relativ undifferenziert sind und kaum Effektorfunktionen aufweisen^{135,136}. Diese initial rekrutierten CD8⁺ T-Zellen besitzen dagegen ein hohes Proliferationspotenzial, weshalb sie auch Stammzell-ähnliche (engl. *stem-like*) T-Zellen genannt werden. Diese stem-like T-Zellen können über ihre Expression des Transkriptionsfaktors TCF1 identifiziert werden¹³⁷. Die Effektordifferenzierung der stem-like T-Zellen erfolgt erst im Tumorgewebe selbst (Abb. 4). Die Effektor-ähnlichen (engl. *effector-like*) T-Zellen, die aus den stem-like T-Zellen hervorgehen, sind in der Lage, inflammatorische Zytokine wie IFN γ und TNF zu produzieren und mittels lytischer Enzyme wie GzmB und Perforin Tumorzellen zu töten¹³⁸⁻¹⁴⁰. Effector-like T-Zellen exprimieren im Gegensatz zu stem-like T-Zellen kein TCF1, sondern können beispielsweise mithilfe der Oberflächenmarker TIM3 und CXCR6 identifiziert werden^{141,142}.

Für die Differenzierung zu effector-like T-Zellen benötigen stem-like T-Zellen im Tumorgewebe eine Stimulation des T-Zell-Rezeptors sowie eine Interaktion mit costimulatorischen Molekülen wie CD80/CD86^{135,140,143}. Es ist daher naheliegend, dass antigenpräsentierende Zellen wie cDC1 diese Differenzierung unterstützen. Ob und wie cDC1 an diesem Prozess beteiligt sind, ist noch nicht ausreichend erforscht.

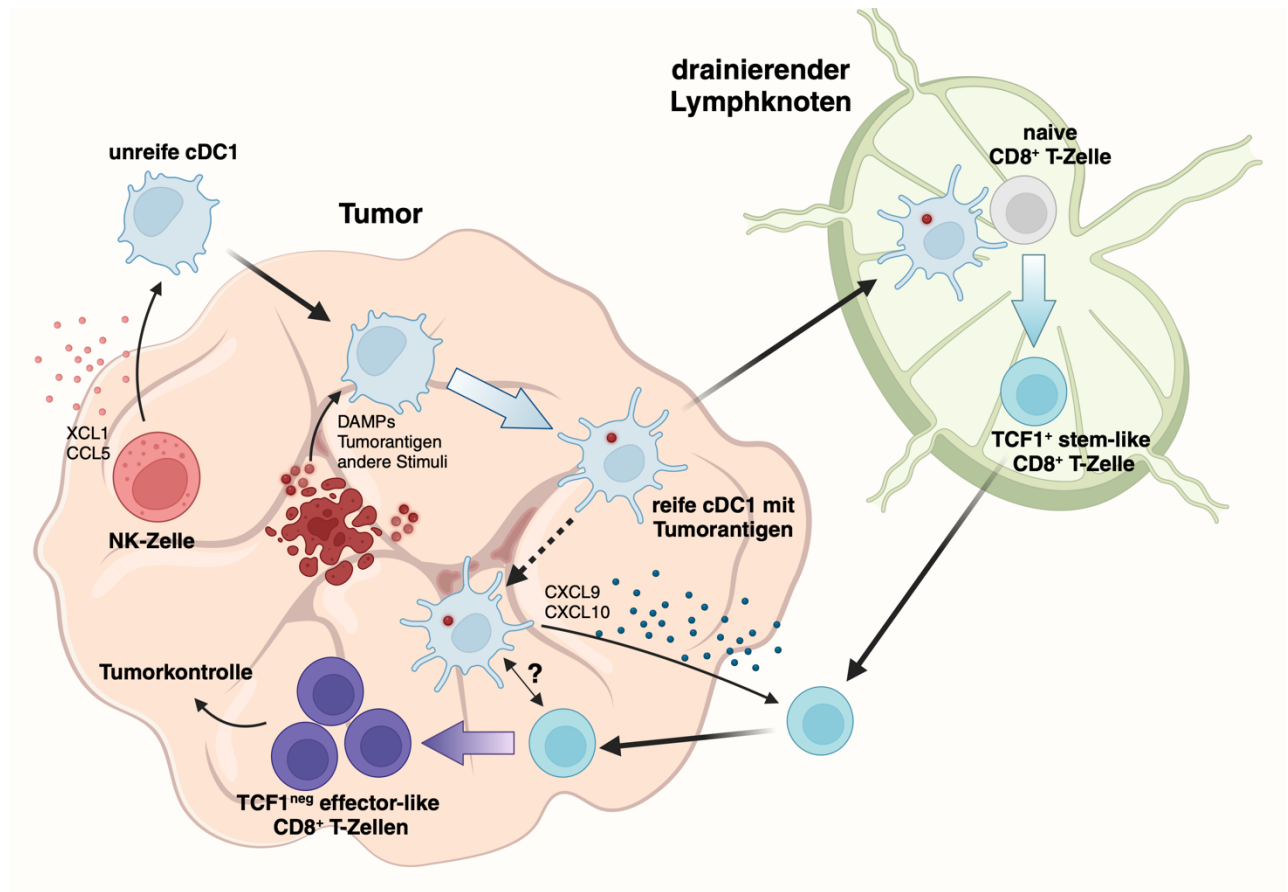


Abbildung 4: Orchestrierung der Antitumor-Immunantwort durch cDC1. NK-Zellen rekrutieren über die Ausschüttung von XCL1 und CCL5 unreife cDC1 ins Tumorgewebe. Dort induzieren Stimuli wie DAMPs und die Aufnahme von Tumorantigenen die Reifung der cDC1. Reife cDC1 können in einen drainierenden Lymphknoten migrieren, um dort das Tumorantigen an naive CD8+ T-Zellen kreuzpräsentieren. Durch die Aktivierung der Tumorantigen-spezifischen CD8+ T-Zellen entstehen zunächst stem-like CD8+ T-Zellen, die das Tumorgewebe infiltrieren. Die von cDC1 produzierten Chemokine CXCL9 und CXCL10 unterstützen dabei die Rekrutierung der stem-like T-Zellen. Durch eine bisher nicht genau beschriebene erneute Stimulation der stem-like T-Zellen im Tumorgewebe wird ihre Effektordifferenzierung induziert. Auch hier könnten cDC1 beteiligt sein. Die entstandenen effector-like CD8+ T-Zellen können Tumorzellen töten und eine Abstoßung des Tumors vermitteln. Diese Abbildung wurde mithilfe von BioRender.com erstellt.

Mithilfe von Techniken wie der Einzelzell-RNA-Sequenzierung (scRNA-Seq; engl. *single cell RNA sequencing*) konnte aufgedeckt werden, dass cDC1 im Tumorgewebe nicht als homogene Population vorliegen, sondern in Subpopulationen unterteilt

werden können^{131,144}. Ob es sich hierbei um unterschiedliche Entwicklungsstufen, funktionelle Zustände oder voneinander unabhängige Zelltypen handelt, ist nicht abschließend geklärt. Beispielsweise konnte in murinen Tumormodellen, aber auch in humanen Krebspatienten, eine Mischpopulation aus cDC1 und cDC2 identifiziert werden, deren Gensignatur mit Reifung und Migration assoziiert ist. Diese Zellen exprimieren in hohem Maße CCR7, IL-12 und PD-L1 und werden je nach Forschungsgruppe mregDC¹⁴⁴, LAMP3⁺ DC^{145,146} oder DC3¹⁴⁷ genannt (nicht zu verwechseln mit der oben beschriebenen cDC2-ähnlichen Population in humanem Blut, die ebenfalls DC3 genannt wird). Es konnte gezeigt werden, dass diese CCR7⁺ cDC im Tumorgewebe in perivaskulären Nischen mit effector-like T-Zellen interagieren und so deren Überleben fördern¹⁴². Inwieweit andere cDC1-Subpopulationen ebenfalls die intratumoralen CD8⁺ T-Zellen unterstützen, ist Gegenstand dieser Arbeit.

1.5 Mechanismen der Immunevasion durch den Tumor

Tumoren nutzen vielfältige Mechanismen, um der Erkennung und Abstoßung durch das Immunsystem zu entgehen. An dieser Immunevasion sind nicht nur die Tumorzellen selbst, sondern alle Zellen im Tumormikromilieu (TMM; engl. *tumor microenvironment*) beteiligt. Neben den Tumorzellen besteht das TMM aus den von ihnen rekrutierten Stromazellen wie Endothelzellen von Blut- und Lymphgefäßen und Tumor-assoziierten Fibroblasten (CAFs; engl. *cancer-associated fibroblasts*)¹⁴⁸. Zellen des TMM können antitumorogene Immunzellen wie cDC1 und CD8⁺ T-Zellen auf verschiedene Arten hemmen, um eine Abstoßung des Tumors zu unterbinden. Gefäßsysteme in Tumoren sind häufig anormal, was die Infiltration von antitumorogenen Immunzellen in das TMM erschwert. Gleichzeitig begünstigt der Influx von Nährstoffen durch die Gefäße in den Tumor das Wachstum der Tumorzellen¹⁴⁹. CAFs produzieren Chemokine und Wachstumsfaktoren, die einerseits protumorogene Immunzellen unterstützen und antitumorogene Immunzellen hemmen und andererseits das Tumorzellwachstum fördern. So können CAFs beispielsweise über CCL2 und CXCL1 protumorogene Makrophagen in das TMM rekrutieren und über die Sekretion von CXCL12 T-Zellen daran hindern, den Tumor zu infiltrieren. Durch die Produktion von Wachstumsfaktoren unterstützen CAFs das Überleben und Wachstum von Tumorzellen¹⁵⁰.

Tumorzellen selbst produzieren hohe Mengen an TGF β , einem Zytokin, welches die Effektorfunktionen von NK-Zellen und CD8⁺ T-Zellen hemmt, die Antigenpräsentation von DCs an T-Zellen beeinträchtigt und die T_H1-Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen verhindert¹⁵¹. Durch die Produktion des Wachstumsfaktors VEGF fördern Tumorzellen nicht nur die Angiogenese, sondern inhibieren gleichzeitig auch die Reifung von DCs¹⁵². In vielen humanen Tumoren ist außerdem die Konzentration des Eikosanoids Prostaglandin E₂ (PGE₂) stark erhöht, welches sowohl von den Tumorzellen selbst als auch von CAFs produziert werden kann¹⁵³⁻¹⁵⁷. Es konnte gezeigt werden, dass PGE₂ die cDC1-vermittelte Antitumor-Immunantwort unterbindet, indem es einerseits deren Rekrutierung in den Tumor durch NK-Zellen inhibiert¹¹⁵ und andererseits die T-Zell-stimulatorischen Fähigkeiten von cDC1 hemmt¹⁵⁸.

Um die Erkennung durch Tumorantigen-spezifische CD8⁺ T-Zellen zu vermeiden, können Tumorzellen die entsprechenden eigenen Antigene depletieren⁷. T-Zellen werden im TMM aber auch über Zell-Zell-Interaktionen inhibiert. T-Zellen, deren T-Zell-Rezeptor mit dem jeweiligen Antigen in Kontakt gekommen ist, exprimieren den Oberflächenrezeptor PD-1, ein sogenanntes Checkpoint-Molekül, das dazu dient, eine überschwängliche T-Zell-Antwort zu verhindern¹⁵⁹. Bei Bindung von PD-1 an seine Liganden PD-L1 und PD-L2 werden Proliferation und Effektorfunktionen von T-Zellen inhibiert, indem die dafür benötigten intrazellulären Signalwege unterbunden werden^{160,161}. Sowohl Tumorzellen als auch das Tumorstroma können PD-L1 und PD-L2 exprimieren und so die Tumorantigen-spezifischen T-Zellen im TMM hemmen¹⁶². Die Expression von PD-L1 in humanen Tumoren korreliert daher auch mit einer schlechten Prognose¹⁶³. Im TMM sind die Tumorantigen-spezifischen T-Zellen über eine lange Zeit geringen Mengen ihres Antigens ausgesetzt, was zu einer sogenannten Erschöpfung (engl. *exhaustion*) der T-Zelle führen kann. Erschöpfte T-Zellen, die auch während chronischer Infektionen auftreten können, sind dysfunktional, d.h. Effektorfunktionen wie die Zytokinsekretion sind stark eingeschränkt^{164,165}. Eine Erschöpfung geht auch mit einer verstärkten Expression von inhibitorischen Rezeptoren wie PD-1 einher, die durch Bindung ihrer Liganden wiederum zur Hemmung der T-Zell-Funktionen beitragen^{166,167}. Um dieser Hemmung entgegenzuwirken, können Antikörper gegen PD-1 eingesetzt werden, die eine Bindung von PD-1 mit PD-L1 oder PD-L2 verhindern.

Auf diese Weise können erschöpfte T-Zellen ihre Proliferationsfähigkeit und Effektorfunktionen wiedererlangen^{139,168}. Diese sogenannte Immun-Checkpoint-Inhibierung (ICI; engl. *immune checkpoint inhibition*) wird bereits zur Behandlung humaner Krebspatienten eingesetzt, der Erfolg dieser Therapieform hängt allerdings stark von der Krebsart und dem jeweiligen TMM des Patienten ab¹⁶². So konnte gezeigt werden, dass Patienten mit vielen cDC1 im TMM besser auf eine ICI-Therapie ansprechen als Patienten mit einer geringen Menge an cDC1^{115,116}. Im Mausmodell wurde bestätigt, dass eine Interaktion zwischen cDC1 und CD8⁺ T-Zellen im Tumor für den Erfolg einer ICI-Therapie notwendig ist¹³⁰.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Diese Arbeit untersucht, inwieweit eine Interaktion zwischen cDC1 und CD8⁺ T-Zellen im Tumorgewebe für eine protektive Antitumor-Immunantwort notwendig ist und ob die räumliche Organisation von cDC1 und CD8⁺ T-Zellen in Tumoren genutzt werden kann, um den Erfolg einer Antitumor-Immunität vorauszusagen.

Es ist bereits bekannt, dass cDC1 während der initialen Phase einer Antitumor-Immunantwort eine essenzielle Rolle spielen, da sie in der Lage sind, Tumorantigenen in die drainierenden Lymphknoten zu transportieren und dort Tumor-spezifische CD8⁺ T-Zellen zu aktivieren. Aktuelle Studien legen nahe, dass Tumor-spezifische CD8⁺ T-Zellen neben dieser initialen Aktivierung eine erneute Stimulation im Tumorgewebe benötigen, um eine Effektordifferenzierung vollziehen zu können. Diese Differenzierung zu Effektor-T-Zellen ist notwendig für die Immunkontrolle über den Tumor. Es ist bisher jedoch nicht bekannt, ob cDC1 CD8⁺ T-Zellen auch während dieser späteren, intratumoralen Phase der Immunantwort unterstützen. Das Ziel dieser Arbeit ist es herauszufinden ob cDC1 auch diese zweite Phase der T-Zell-vermittelten Antitumor-Immunantwort orchestrieren. Dazu werden folgende Fragen beantwortet:

1. Welche Rolle spielt die räumliche Organisation von cDC1 und CD8⁺ T-Zellen im Tumorgewebe für die Antitumor-Immunantwort?
2. Induzieren cDC1 die Effektordifferenzierung der rekrutierten CD8⁺ T-Zellen im Tumorgewebe?
3. Wird die intratumorale Stimulation rekrutierter CD8⁺ T-Zellen von einer bestimmten cDC1-Subpopulation vermittelt?
4. Inwieweit können die Ergebnisse auf Krebspatienten übertragen werden?

Durch die Beantwortung dieser Fragen trägt diese Arbeit zu einem besseren Verständnis der Orchestrierung einer protektiven Antitumor-Immunantwort durch cDC1 bei und deckt potenzielle Ansätze für die Entwicklung zukünftiger Therapiemethoden auf.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 1: Chemikalien und Reagenzien

Produkt	Hersteller
Antigenfix	Diapath
Brefeldin A	Merck
CountBright Counting Beads	Thermo Fisher
Diphtherietoxin	Merck
Dynabeads Maus T-Activator CD3/CD28	Thermo Fisher
Flt3L	Eigene Herstellung
FTY720	Merck
Murines GM-CSF	Eigene Herstellung
Polybren	Merck
Murines IFN γ	Biologend
Murines IL-2	Peptotech
Poly(I:C)	Merck
Treg-Protector (anti-ARTC2 Nanobody)	Biologend

2.1.2 Medien und Puffer

Tabelle 2: Medien und Puffer

Medium/Puffer	Zusammensetzung
ACK-Puffer für Erythrozyten-Lyse	ddH ₂ O + 150mM NH ₄ Cl + 10mM NaHCO ₃ + 2mM EDTA
Blockpuffer für Immunofluoreszenz-Färbungen	ddH ₂ O + 0,1mM Tris + 1% BSA + 1% Mausserum + 1% Eselserum + 0,3% Triton-X
FACS-Puffer	PBS + 1% FCS + 2mM EDTA

PDAC-Kulturmedium	DMEM + 10% FCS + 100U/ml Penicillin + 100mg/ml Streptomycin
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	ddH ₂ O + 3,2mM Na ₂ HPO ₄ + 0,5mM KH ₂ PO ₄ + 1,3mM KCl
Zellkulturmedium	RPMI 1640 + 10% FCS + 50mM β-Mercaptoethanol + 100U/ml Penicillin + 100mg/ml Streptomycin + 292μg/ml L-Glutamin

2.1.3 Antikörper

Tabelle 3: Antikörper

Antikörper (Klon)	Hersteller
Anti-Human CCR7 FITC (3D12)	Thermo Fisher
Anti-Human CD8 α AF594 (RPA-T8)	Biologend
Anti-Human HLA-DR (MHC class II; SC06-78)	Thermo Fisher
Anti-Human XCR1 BV421 (S15046E)	Biologend
Anti-Maus CCR7 PE (4B12)	Biologend
Anti-Maus CD103 (Ziege polyklonal)	R&D Systems
Anti-Maus CD103 APC (M290)	BD Biosciences
Anti-Maus CD11b BV605 (M1/70)	Biologend
Anti-Maus CD11b PE (M1/70)	SONY Biotechnology
Anti-Maus CD11c PerCP/Cy5.5 (N418)	SONY Biotechnology
Anti-Maus CD24 BV605 (M1/69)	Biologend
Anti-Maus CD3 AF594 (17A2)	Biologend
Anti-Maus CD3 PerCP/Cy5.5 (145-2C11)	Thermo Fisher
Anti-Maus CD4 AF647 (GK1.5)	Biologend
Anti-Maus CD44 BV570 (IM7)	Biologend
Anti-Maus CD45.1 BV421 (A20)	Biologend
Anti-Maus CD45.2 BV510 (104)	SONY Biotechnology
Anti-Maus CD62L PerCP/Cy5.5 (MEL-14)	Thermo Fisher
Anti-Maus CD64 PE/Cy7 (H1.2F3)	Thermo Fisher
Anti-Maus CD8 α PE/Cy7 (53-6.7)	Thermo Fisher
Anti-Maus CD8 α PE/Dazzle594 (53-6.7)	Biologend
Anti-Maus CD86 PE/Cy7 (GL1)	Thermo Fisher
Anti-Maus Collagen IV (Kaninchen polyklonal)	Abcam
Anti-Maus CXCL9 PE (MIG-2F5.5)	Biologend
Anti-Maus CXCR3 APC (CXCR3-173)	Biologend
Anti-Maus CXCR6 AF647 (SA051D1)	Biologend
Anti-Maus CXCR6 PE-Dazzle 594 (SA051D1)	Biologend

Anti-Maus FSCN1 AF594 (D-10)	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Maus GzmB APC (GB11)	Thermo Fisher
Anti-Maus H-2K ^b gebunden an SIINFEKL PE (25-D1.16)	Biolegend
Anti-Maus I-A/I-E (MHC class II) AF700 (M5/114.15.2)	Biolegend
Anti-Maus I-A/I-E (MHC class II) BV510 (M5/114.15.2)	Biolegend
Anti-Maus IFN γ PE (XMG1.2)	Thermo Fisher
Anti-Maus PD-1 BV605 (29F.1A12)	Biolegend
Anti-Maus TCF1/TCF7 (C.725.7)	Thermo Fisher
Anti-Maus TCF1 PE (S33-966)	BD Biosciences
Anti-Maus TCR β AF700 (H57-597)	Sony Biotechnology
Anti-Maus TIM-3 BV421 (RMT3-23)	Biolegend
Anti-Maus TNF PE/Cy7 (MP6-XT22)	Thermo Fisher
Anti-Maus TOX eF660 (TXRX10)	Thermo Fisher
Anti-Maus XCR1 BV421 (ZET)	Biolegend
Anti-Maus/Human Ki-67 APC (SolA15)	Thermo Fisher
Anti-Ziege IgG AF680 (Esel polyclonal)	Jackson ImmunoResearch
Anti-Kaninchen IgG AF680 (Esel polyklonal)	Jackson ImmunoResearch
Anti-Kaninchen IgG AF594 (Esel polyklonal)	Biolegend
Anti-Kaninchen IgG BV510 (Esel polyklonal)	Biolegend
Anti-GFP AF488 (Kaninchen polyklonal)	Thermo Fisher
Anti-Human PD-L1 (22C3)	Agilent Dako
Anti-Maus CD4 (GK1.5)	BioXCell
Anti-Maus CD8 α (53.6-7)	BioXCell
Anti-Maus CD8 β (53-5.8)	BioXCell
Anti-Maus CXCR3 (CXCR1-173)	BioXCell
Ratte IgG2b Isotypkontrolle	BioXCell
Armenischer Hamster IgG Isotypkontrolle	BioXCell

2.1.4 Assay-Kits

Tabelle 4: Assay-Kits

Produkt	Hersteller
True-Nuclear Transcription Factor Buffer Set	Biolegend
Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set	Thermo Fisher
Live/Dead Fixable Stain Kit	Thermo Fisher
Naive CD8 α^+ T Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec

2.1.5 Tumorzelllinien

Tabelle 5: Tumorzelllinien

Zelllinie	Quelle (Publikation)
Kontroll-BRAF ^{V600E}	C. Reis e Sousa (Zelenay et al., 2015)
<i>Ptgs1</i> / <i>Ptgs2</i> ^{-/-} -BRAF ^{V600E}	C. Reis e Sousa (Zelenay et al., 2015)
WT-CT26	The Francis Crick Institute, London, UK
<i>Ptgs2</i> ^{-/-} -CT26	C. Reis e Sousa (Zelenay et al., 2015)
<i>Ptgs1</i> / <i>Ptgs2</i> ^{-/-} -4T1	C. Reis e Sousa (Zelenay et al., 2015)
<i>Ptgs1</i> / <i>Ptgs2</i> ^{-/-} -BRAF ^{V600E} -ZsG	M. Anton (Bayerl et al., 2023)
<i>Ptgs1</i> / <i>Ptgs2</i> ^{-/-} -BRAF ^{V600E} -OVA	M. Anton (Bayerl et al., 2023)
MCA-1969	R. Schreiber (Diamond et al., 2011)
PDAC-53578	D. Saur (Falcomata et al., 2022)
PDAC-8028	D. Saur (Falcomata et al., 2022)

2.1.6 Rekombinante DNA

Tabelle 6: Rekombinante DNA

Produkt	Quelle
VSV-G Plasmid	M. Anton, Wübbenhorst et al., 2010
ZsGreen1-N1 Plasmid	M. Davidson via Addgene
pHIV-7 Transfervektor	M. Anton, Wübbenhorst et al., 2010

2.1.7 Single Cell RNA-Sequencing Datensets und Code

Tabelle 7: Datensets und Code

Datenset/Code	Quelle
scRNA-Seq Datenset (GSE200174)	Diese Arbeit/Meiser et al., 2023
scRNA-Seq Datenset (GSE154763)	Cheng et al., 2022
Deep-Learning-Modell Quellcode (https://zenodo.org/record/8017470)	M. A. Knolle; diese Arbeit/Meiser et al., 2023

2.1.8 Software und Algorithmen

Tabelle 8: Software und Algorithmen

Software/Algorithmus	Hersteller/Quelle
Bioanalyzer 2100	Agilent
ComplexHeatmap v2.0.0	Gu et al., 2016
FACSDiva	BD

FlowJo v10	BD
ggplot2 v3.1.0	Wickham, 2016
Imaris v9.7	Oxford Instruments
NumPy	https://numpy.org
pandas	W. McKinney
pheatmap v1.0.12	R. Kolde
Prism v9	GraphPad
QuPath v0.3.1 and v.0.3.3	Bankhead et al., 2017
R v3.5.1, v4.0.4 and v4.2.1	R Core Team, 2020
Rhapsody targeted analysis pipeline v1.8	BD
Scikit-learn	Pedregosa et al., 2011
Sctransform v0.3.2	Hafemeister & Satija, 2019
Seurat v3.1.1, v4.1.1	Stuart et al., 2019; Hao et al., 2021
Seven Bridges Platform	Seven Bridges Genomics
SH800 Cell Sorter Software	SONY Biotechnology
SP6800 Spectral Cell Analyzer Software	SONY Biotechnology
SmoothGrad v1	Smilkov et al., 2017
TensorFlow	Google Brain
tf-explain	Meudec, 2021
xCELLigence RTCA Software	Agilent

2.2 Versuchstiere und humane Proben

2.2.1 Mäuse

Tabelle 9: Mausstämme

Mausstamm	Quelle
C57BL/6J	Charles River
BALB/c	Charles River
<i>Batf3</i> ^{-/-} (B6.129S(C)- <i>Batf3</i> ^{tm1Kmm} /J)	The Jackson Laboratory
<i>Rag1</i> ^{-/-} (B6.129S7- <i>Rag1</i> ^{tm1Mom} /J)	The Jackson Laboratory
CCR7 ^{GFP} (C57BL/6- <i>Ccr7</i> ^{tm1.1Dnc} /J)	The Jackson Laboratory
BRaf ^{CA} (B6.Cg-Tg(Tyr-cre/ERT2)13Bos <i>Braf</i> ^{tm1Mmcm} <i>Pten</i> ^{tm1Hwu} /BosJ)	Tilo Biedermann, Abteilung für Dermatologie und Allergologie, TUM
MMTV-PyMT (FVB/N-Tg(MMTV-PyVT)634Mul/J)	The Jackson Laboratory

Nur77 ^{GFP} x OT-I x CD45.1	Veit Buchholz, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, TUM
XCR1 ^{DTR-Venus} (B6.Cg-Xcr1 ^{tm2(HBEGF/Venus)Ksho})	Veit Buchholz, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, TUM

C57BL/6, BALB/c, CCR7^{GFP}, *Batf3*^{-/-} und *Rag1*^{-/-} Mäuse wurden am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München (TUM) unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen und nach Richtlinien der Federation of European Laboratory Animal Sciences Associations gehalten. Für alle Experimente wurden weibliche und männliche Mäuse im Alter von sechs bis zwölf Wochen gleichmäßig und zufällig auf Kontroll- und Versuchsgruppen verteilt. Zum jeweiligen Endpunkt des Experiments wurden alle Mäuse mittels zervikaler Dislokation unter Isoflurannarkose euthanasiert. Alle Tierversuche wurden durch die Regierung von Oberbayern genehmigt und in Übereinstimmung mit nationalen Richtlinien durchgeführt.

2.2.2 Humane Proben

18 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs (HNSCC) der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde des Klinikums rechts der Isar, TUM, wurden in Absprache mit dem Ethikkomitee der TUM für diese Studie rekrutiert (Ethikantrag 474/20S). Alle Patienten wurden über die Studie aufgeklärt und erteilten ihre schriftliche Einwilligung zur Studienteilnahme. Experimente mit humanen Proben wurden unter Einhaltung der Auflagen des Ethikkomitees und der ethischen Grundsätze der Deklaration von Helsinki der World Medical Association durchgeführt. Für Immunofluoreszenz-mikroskopische Analysen wurden aus den operativ entfernten Primärtumoren Biopsien gewonnen und kryokonserviert. Für die Analyse des progressionsfreien Überlebens wurden die Patienten mithilfe der verteilungsbasierten „Cut-Off“-Methode anhand der intratumoralen Menge an cDC1-CD8⁺ T-Zell-Cluster in zwei Gruppen unterteilt. Die Zeit bis zur Progression beschreibt hier die Anzahl der Tage von der Operation bis zum Tod oder zur Progression definiert nach RECIST-Kriterien.

2.3 Methoden

2.3.1 Tumorzellkultur

BRAF^{V600E}-Melanomzellen, CT26-Darmkrebszellen, 4T1-Brustkrebszellen und MCA-1969-Fibrosarkomzellen wurden in RPMI 1640 mit FCS, β -Mercaptoethanol, Penicillin, Streptomycin und L-Glutamin (Zellkulturmedium) kultiviert. Die Pankreaskarzinomzellen PDAC-53578 und PDAC-8028 wurden in DMEM mit FCS, Penicillin und Streptomycin kultiviert. Die Kultivierung aller Zelllinien fand unter standardisierten Bedingungen bei 37°C und 5% CO₂ statt.

2.3.2 Klonierung und virale Transduktion

Für die experimentelle Untersuchung der Tumorantigen-Aufnahme durch cDC1 wurden *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E} Zellen so genetisch verändert, dass sie das grün-fluoreszierende Protein ZsGreen (ZsG) exprimieren. ZsGreen ist ein besonders heller und langlebiger Fluorophor, der außerdem resistent gegen die Degradierung durch zelluläre Mechanismen (niedriger pH-Wert, lysosomaler Abbau) ist^{169,170}. ZsGreen kann deshalb gut in cDC1 detektiert werden, nachdem diese ZsG-exprimierende Tumorzellen aufgenommen haben¹²⁶. Für die Generierung der *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}-ZsG Zellen wurde zunächst die ZsGreen1 cDNA aus dem ZsGreen1-N1 Plasmid (Addgene) herausgeschnitten und in einen lentiviralen pHIV-7 Transfervektor mit einem spleen focus forming virus (SF)-Promotor subkloniert¹⁷¹.

Ptgs1/Ptgs2^{-/-}-BRAF^{V600E}-Zellen, die das Modellantigen Ovalbumin (OVA) exprimieren, wurden mittels lentiviraler Transduktion für Experimente zur Antigen-Kreuzpräsentation durch cDC1 im Tumorgewebe generiert. Dazu wurde die OVA cDNA in einen pHIV-7 Transfervektor mit einem Phosphoglyceratkinase (PGK)-Promotor und einer IRES-Puromycin-Sequenz subkloniert¹⁷¹. VSV.G-pseudotypisierte, selbst-inaktivierende lentivirale Vektoren der dritten Generation wurden wie bereits beschrieben produziert¹⁷¹. Dazu wurde 48 Stunden nach Transfektion der Verpackungszellen der Zellüberstand gesammelt, gefiltert und für die Transduktion der *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}-Zellen mithilfe des Transfektionsreagenz Polybren (8 μ g/ml; Merck) eingesetzt. Nach der Inkubation

wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und die Zielzellen wurden nach der Transduktion mindestens dreimal passagiert. Die Selektion der OVA-exprimierenden Tumorzellen erfolgte mittels Puromycin. ZsG-exprimierende Tumorzellen wurden durchflusszytometrisch aufgereinigt, um eine gleichmäßige ZsGreen-Expression in allen Zellen zu gewährleisten.

2.3.3 Tumortransplantation

Die Tumorzellen wurden mittels Trypsinierung geerntet und dreimal mit PBS gewaschen. 2×10^6 Tumorzellen wurden in $100 \mu\text{l}$ Endotoxin-freiem PBS subkutan (s.c.) in die Flanke der Empfängermäuse injiziert. Das Tumorstadium wurde mit einem digitalen Messschieber gemessen. Die in den Abbildungen angegebenen Tumordurchmesser beziehen sich auf den Durchschnitt aus dem größten Tumordurchmesser und dessen Lot. Falls nicht anders angegeben, wurden die Tumoren sechs Tage nach der Transplantation für weitere Analysen entnommen.

2.3.4 T-Zell-Depletion *in vivo*

Zur Depletion der CD8^+ T-Zellen wurde den Mäusen $100 \mu\text{l}$ eines anti- $\text{CD8}\alpha$ Antikörpers (Klon 53-6.7, $30 \mu\text{g}/\text{Maus}$) intraperitoneal (i.p.) injiziert. Um sowohl CD8^+ als auch CD4^+ T-Zellen zu depletieren, wurde den Mäusen $100 \mu\text{l}$ eines anti- $\text{CD8}\beta$ Antikörpers (Klon 53-5.8, $200 \mu\text{g}/\text{Maus}$) und eines anti- CD4 Antikörpers (Klon GK1.5, $200 \mu\text{g}/\text{Maus}$) i.p. verabreicht. Die Antikörperinjektionen erfolgten einen Tag nach der Tumorzelltransplantation und wurden alle drei bis sechs Tage wiederholt.

2.3.5 CXCR3-Blockade *in vivo*

Um die Signalübertragung des Rezeptors CXCR3 zu blockieren, wurde den Mäusen $50 \mu\text{l}$ eines anti-CXCR3 Antikörpers (Klon CXCR3-173, $300 \mu\text{g}/\text{Maus}$) i.p. injiziert. Mäusen in der Kontrollgruppe wurde ein Kontrollantikörper des gleichen Isotyps injiziert. Je nach Experiment erfolgte die erste Injektion zwei oder sechs Tage nach der Tumortransplantation. Über die Dauer des Experiments hinweg wurden die Injektionen alle zwei bis drei Tage wiederholt.

2.3.6 FTY720-Behandlung *in vivo*

Mäusen in den Versuchsgruppen wurden 20µg FTY720 (Merck) in 100µl NaCl-Lösung (0,9% NaCl in H₂O) i.p. injiziert. Mäusen in der Kontrollgruppe wurden 100µl NaCl-Lösung injiziert. Je nach Versuchsgruppe erfolgte die Injektion entweder an Tag 1 und Tag 6 oder ausschließlich an Tag 6 nach der Tumortransplantation.

2.3.7 cDC1-Depletion *in vivo*

Zur Depletion der cDC1 während des Tumorwachstums wurde XCR1^{DTR-Venus}-Mäusen 100µl Diphtherietoxin (25ng/g Körpergewicht; Merck) i.p. injiziert. Mäuse in der Kontrollgruppe erhielten 100µl PBS. Die Injektionen erfolgten an Tag 5, Tag 7 und Tag 9 nach Tumortransplantation.

2.3.8 Adoptiver Transfer von OT-I CD8⁺ T-Zellen

Für die Isolation von OT-I T-Zellen wurden die Milzen von Nur77^{GFP} x OT-I x CD45.1 oder OT-I x CD45.1 Mäusen entnommen und durch 70µm-Siebe (Miltenyi Biotec) gedrückt. Die Erythrozyten in der Einzelzellsuspension wurden durch eine zweiminütige Inkubation mit ACK-Puffer lysiert. Die naiven CD8⁺ OT-I T-Zellen wurden über magnetische Zellseparation mithilfe des Naive CD8⁺ T cell isolation kit (Miltenyi Biotec) aus der Suspension aufgereinigt. 1x10³ OT-I T-Zellen wurden intravenös (i.v.) in 100µl sterilem PBS in WT- oder CCR7^{GFP}-Empfängermäuse transferiert. Der Transfer erfolgte sechs Stunden vor der s.c. Transplantation von *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}-OVA Zellen.

2.3.9 Isolation von Immunzellen aus Tumorgewebe

Vor der Isolation von Immunzellen wurde das Gewicht jedes Tumors mit einer Feinwaage bestimmt. Das Tumorgewebe wurde dann einem Tumor-optimierten Aufreinigungsprotokoll entsprechend prozessiert¹¹⁵. Hierfür wurden die Tumoren in kleine Stücke geschnitten und in einer Verdauungslösung aus RPMI 1640 mit Collagenase IV (200U/ml) und DNase I (100µg/ml) für 30min bei 37°C inkubiert.

Danach wurden die Gewebestückchen durch ein 70 μ m-Sieb gedrückt und mit FACS-Puffer gewaschen, um eine Einzelzellsuspension herzustellen. Diese Suspension wurde dann für Antikörperfärbungen weiterverwendet.

2.3.10 *In vitro* Kultivierung von cDC1 aus Knochenmark

Die Gewinnung und Kultivierung von cDC1 aus murinem Knochenmark erfolgte wie bereits beschrieben¹⁷². Hierfür wurde das Knochenmark aus Femur und Tibia männlicher und weiblicher CCR7^{GFP}-Mäuse isoliert, indem die Knochen mithilfe einer Kanüle mit RPMI ausgespült wurden. Nach einer zweiminütigen Erythrozyten-Lyse mit ACK-Puffer bei Raumtemperatur wurden 15x10⁵ Knochenmarkszellen/ml in Zellkulturmedium mit 300pg/ml GM-CSF und 55ng/ml Flt3L ausplattiert und für neun Tage kultiviert. Danach wurden die Zellen gewaschen und in frischem Medium mit GM-CSF und Flt3L für weitere fünf Tage kultiviert. An Tag 14 der Kultur wurden die CD103⁺ cDC1 mittels durchflusszytometrischer Zellsortierung aufgereinigt und für funktionelle Assays verwendet.

2.3.11 Analyse von Tumorantigenaufnahme, Kreuzpräsentation und CXCL9-Produktion von cDC1 *ex vivo*

Für die Untersuchung der Aufnahme von Tumorantigenen durch cDC1 wurde durchflusszytometrisch die intrazelluläre Menge des ZsGreen-Proteins in cDC1 gemessen, die aus *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}-ZsG-Tumoren isoliert wurden. Die Aufnahme ZsGreen-positiven Materials wurde außerdem konfokalmikroskopisch bestätigt.

Die Kreuzpräsentation durch cDC1 wurde analysiert, indem cDC1 isoliert aus *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}-OVA-Tumoren mit einem Fluoreszenz-markierten Antikörper gegen das OVA-Peptid SIINFEKL (S8) gebunden an das MHC-Klasse I-Molekül H-2Kb (S8:H-2Kb) gefärbt wurden.

Zur Analyse der *ex vivo* CXCL9-Produktion wurde Mäusen mit *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}-Tumoren sechs Stunden vor Entnahme der Tumoren Brefeldin A (10 μ g/g Körpergewicht; Thermo Fisher) i.v. injiziert, um die Sekretion von Chemokinen aus den Zellen zu inhibieren. Nach Isolation der Immunzellen aus den

Tumoren erfolgte eine intrazelluläre Antikörperfärbung des von den cDC1 produzierten Chemokins CXCL9, die dann durchflusszytometrisch analysiert wurde.

2.3.12 *In vitro* Assays zur Untersuchung der Aktivierung und CXCL9-Produktion von cDC1

Zur Aktivierung wurden aus Knochenmarkszellen generierte CD103⁺ cDC1 für 16 Stunden mit *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}-Zellen und deren Zellkulturüberstand (cDC1:Tumorzell-Verhältnis 1:2,5) oder mit dem TLR3-Liganden Polyinosinsäure:Polycytidylsäure (poly(I:C); 1µg/ml) inkubiert. Für die Untersuchung der CXCL9-Produktion wurden die aktivierten cDC1 gewaschen, in frischem Zellkulturmedium ausgesät und in Anwesenheit von Brefeldin A mit 100ng/ml Interferon γ (IFNγ) stimuliert. Die Expression von CCR7-GFP und CXCL9 wurde nach Fixierung der Zellen mithilfe einer intrazellulären Färbung durchflusszytometrisch bestimmt.

2.3.13 Analyse von CD8⁺ T-Zellfunktionen *ex vivo*

Zur Ermittlung von Unterschieden in der zytotoxischen Effektorfunktion wurden CD8⁺ T-Zellen mittels FACS-Sortierung an Tag 8 des Tumorwachstums aus *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}-Tumoren isoliert und ihre intrazelluläre GzmB-Expression wurde durchflusszytometrisch gemessen. Für die Bestimmung der Zytokinproduktion wurden die isolierten CD8⁺ T-Zellen für fünf Stunden mit αCD3/αCD28-beschichteten Microbeads (Thermo Fisher, Zell:Bead-Verhältnis 1:1) stimuliert. Nach einer Stunde wurden Brefeldin A und Monensin (Thermo Fisher) zu der Kultur hinzugefügt, um die Sekretion und Degradierung intrazellulärer Proteine zu inhibieren. Nach der Inkubationszeit wurden die CD8⁺ T-Zellen fixiert und intrazellulär mit Antikörpern gefärbt, um die Produktion von IFNγ und TNF durchflusszytometrisch zu analysieren. Um die Proliferationskapazität verschiedener CD8⁺ T-Zellpopulationen zu vergleichen, wurden TIM3^{neg} und TIM3⁺ CD8⁺ T-Zellen aus Tumoren gesortet und in Zellkulturmedium mit 100U/ml IL-2 (PeproTech) mit oder ohne αCD3/αCD28-Mikrobeads inkubiert. 72 Stunden später wurden die T-Zellzahlen durchflusszytometrisch ermittelt.

Für die Analyse der Zytotoxizität der CD8⁺ T-Zellpopulationen wurden acht Tage nach dem adoptiven Transfer von OT-I T-Zellen und der Transplantation von *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}-OVA-Tumoren die TIM-3^{neg} und TIM-3⁺ CD45.1⁺ OT-I T-Zellen mittels FACS-Sortierung isoliert. Ihre Zytotoxizität wurde mithilfe der xCELLigence RTCA-Technologie (Agilent) bestimmt. Die T-Zellen wurden in einem Verhältnis von 1:1 mit zuvor ausgesäten *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}-OVA-Zellen auf einer E-Platte inkubiert und die Zell-Impedanz als Maß für Zytotoxizität der T-Zellen wurde über fünf Stunden quantifiziert.

2.3.14 Volumetrische Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Die Probenherstellung für die volumetrische Immunfluoreszenz-Mikroskopie wurde durchgeführt wie kürzlich beschrieben¹⁷³ (Abb. 5). Falls nicht anders angegeben, wurden murine Tumoren an Tag 6 nach Transplantation entnommen. Tumoren in BRaf^{CA}- und MMTV-PyMT-Mäusen wurden entnommen, sobald sie tastbar waren. Murine Tumoren und humane HNSCC-Biopsien wurden in Antigenfix (Diapath) fixiert, in 30%iger Sukrose dehydriert und in TissueTek OCT Einfriermedium (Sakura Finetek) eingebettet. Eingebettete Tumorproben wurden bei -80°C gelagert. Konsekutive Gewebeschnitte mit einer Dicke von 50µm wurden mit einem Leica CM3050 S Kryostat angefertigt. Nach einer Rehydrierung in 0,1M Tris (Carl Roth) und einer Delipidisierung in Aceton wurden die Schnitte in Blockpuffer permeabilisiert, geblockt und gefärbt. Gefärbte Schnitte wurden mit Mowiol (Merck) eingedeckelt und mit einem invertierten TCS SP8 Konfokalmikroskop (Leica) analysiert. Die folgenden Objektive wurden benutzt: HC PL APO CS2 20x/0,75NA; HC PL APO CS2 40x/1,30NA; HC PL APO CORR CS2 63x/1,30NA. Alle Bilder wurden als z-Stapel aufgenommen, die in der XY-Achse den gesamten Tumorschnitt abdecken und je nach Experiment 1 oder 2µm Abstand zwischen den z-Ebenen aufweisen, um große dreidimensionale (3D) Bilddateien von mindestens 25µm Tiefe zu generieren.

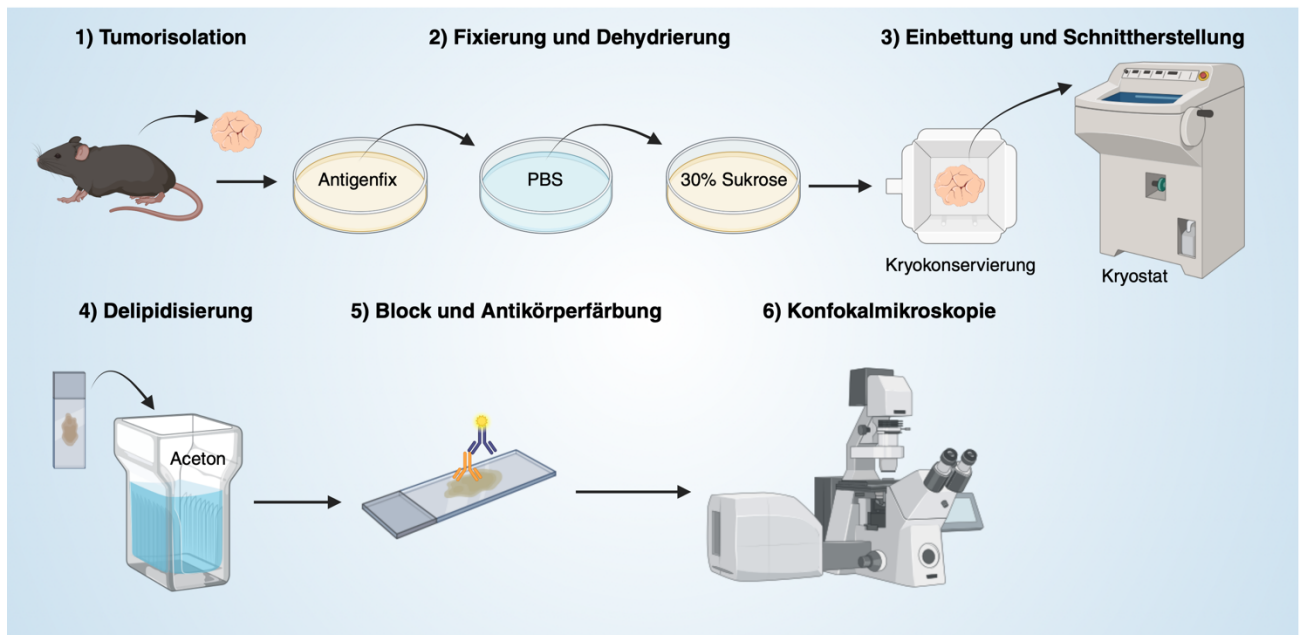


Abbildung 5: Arbeitsablauf zur Probenherstellung für die volumetrische Immunfluoreszenz-Mikroskopie.

2.3.15 Bildanalyse und Histozytometrie

Bildanalyse und 3D-Zell-Rendering wurden durchgeführt wie bereits beschrieben¹⁷³. Adaptive Dekonvolution der 3D-Bilder wurde mithilfe der Leica TCS SP8 LIGHTNING-Funktion angewendet. Dekonvolvierte Bilder wurden mit der Imaris-Software (Version 9.7, Oxford Instruments) analysiert. Falls nicht anders angegeben, wurde die Imaris Surface Generation Funktion genutzt, um 3D-Objekte für Gewebestrukturen und einzelne cDC1 und CD8⁺ T-Zellen zu generieren und zu visualisieren. Eine korrekte Identifizierung von CD103⁺MHCII⁺ Zellen als cDC1 und CD3⁺CD8⁺ Zellen als CD8⁺ T-Zellen durch dieses 3D-Zell-Rendering wurde mithilfe von Tumorbildern aus cDC1-defizienten *Batf3*^{-/-} und T-Zell-defizienten *Rag1*^{-/-}-Mäusen bestätigt (Abb. 6A,B). Beim 3D-Zell-Rendering der cDC1 und CD8⁺ T-Zellen auf Bildern der humanen Tumorbiospien wurden die autofluoreszenten Randregionen der Biospien ausgeschlossen, um zu vermeiden, dass Artefakte, die durch die Gewebeprozessierung entstanden waren, fälschlicherweise als Zellen gerendert werden.

Zur histozytometrischen Analyse der aus den 3D-Objekten gewonnenen Daten wurden diese in FlowJo importiert und dort ausgewertet.

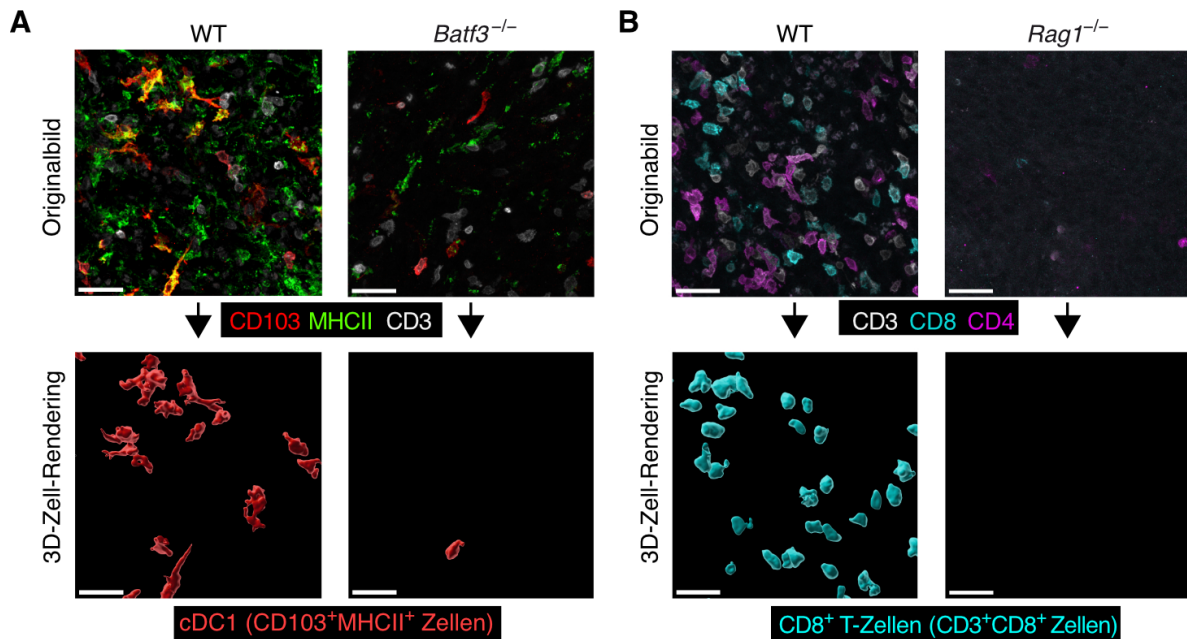


Abbildung 6: 3D-Zell-Rendering für cDC1 und CD8⁺ T-Zellen in volumetrischen Mikroskopiebildern. *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}-Tumorzellen wurden in WT-, *Batf3*^{-/-} oder *Rag1*^{-/-}-Mäuse transplantiert und an Tag 6 analysiert. **(A)** Mikroskopiebilder (oben) und Visualisierung intratumoraler cDC1 durch 3D-Zell-Rendering, identifiziert über Co-Expression von CD103 und MHCII (unten) in WT- und *Batf3*^{-/-}-Mäusen. Scalebar 30 μ m. **(B)** Wie in (A), aber für CD8⁺ T-Zellen, identifiziert durch Co-Expression von CD3 und CD8, in WT- und *Rag1*^{-/-}-Mäusen. Scalebar 30 μ m. (A, B) zeigen einen repräsentativen von drei Tumoren aus zwei unabhängigen Experimenten.

2.3.16 Immunhistochemie und Histologie von Patientenproben

10 μ m dicke Schnitte der kryokonservierten humanen Tumorbiopsien wurden angefertigt, mit einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E-Färbung) nach Standardprotokoll gefärbt und mit einem Aperio AT2 Objektträger-Scanner (Leica) gescannt. Stromale Regionen, Tumor-Parenchym und Blutgefäße wurden anhand ihrer H&E-Charakteristika identifiziert und mit der Polygon-Objektfunktion der QuPath-Software¹⁷⁴ annotiert. TIFF-Dateien der annotierten H&E-Bilder wurden in die Imaris-Software (Oxford Instruments) importiert und deckungsgleich auf den korrelierenden Mikroskopie-Bildern der jeweiligen Tumorbiopsie ausgerichtet.

Der Combined Positive Score (CPS) wurde wie bereits beschrieben berechnet¹⁷⁵. Die PD-L1-Expression im Gewebe wurde nach Standardprotokoll immunhistochemisch ermittelt (anti-PD-L1-Antikörper Klon 22C3, Agilent Dako). Die Färbung wurde mit einem Leica Bond Rxm System durchgeführt. Der CPS wurde nach der folgenden Formel berechnet: $(\text{Anzahl der PD-L1}^+ \text{ Tumorzellen und Immunzellen} / \text{Anzahl aller Tumorzellen}) \times 100$.

2.3.17 Durchflusszytometrie und Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS)

Intratumorale CD8⁺ T-Zellen (lebende CD45⁺CD3⁺CD8⁺ Zellen), OT-I T-Zellen (lebende CD3⁺CD8⁺CD45.1⁺ Zellen) oder cDCs (lebende CD45⁺MHCII⁺CD11c⁺CD24⁺CD64^{neg} Zellen) wurden mit einem FACSAria Sorter (BD) aus den Tumoren gesortet. cDC1 aus *in vitro* Knochenmarkskulturen (lebende CD103⁺CD11b^{neg} Zellen) wurden durch einen Sort mit einem SH800 Cell Sorter (SONY Biotechnology) aufgereinigt. Um das Überleben der CD8⁺ T-Zellen während der Expansions- und Zytotoxizitäts-Experimente nach der Sortierung zu unterstützen, wurde den jeweiligen Mäusen 30min vor der Tumorzellisolation 50µg Treg Protector Nanobody (Biolegend) i.v. verabreicht.

Durchflusszytometrische Analysen wurden mit einem SP6800 Spectral Cell Analyzer (SONY Biotechnology) durchgeführt. Die Färbung von Oberflächenproteinen der isolierten Zellen mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern erfolgte bei 4°C für 20min in FACS-Puffer. Die Färbung mit dem anti-CCR7-Antikörper wurde für eine Dauer von 30min bei 37°C durchgeführt. Für die intrazelluläre Färbung von CXCL9 und GFP wurde das Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set (Thermo Fisher) benutzt. IFN γ und TNF wurden intrazellulär mit dem True-Nuclear Transcription Buffer Set (Biolegend) gefärbt. Die intranukleäre Färbung von TCF1, TOX und Ki-67 und die Färbung von GzmB in zytotoxischen Granula wurde mithilfe des FOXP3 Transcription Factor Buffer Set (Thermo Fisher) durchgeführt. In allen Experimenten wurde ein fixierbarer Lebend/Tot-Farbstoff (Thermo Fisher) eingesetzt, um tote Zellen von der Analyse auszuschließen. Die Zellzahlen in den Einzelzellsuspensionen wurden mithilfe fluoreszenter CountBright Counting Beads (Thermo Fisher) berechnet.

2.3.18 Einzelzell-RNA-Sequenzierung (ScRNA-Seq)

Die ScRNA-Seq wurde in Zusammenarbeit mit Gustavo P. de Almeida (Institute of Animal Physiology and Immunology, TUM School of Life Sciences) durchgeführt.

Aus den cDCs aus 25 *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}-Tumoren wurde mithilfe des BD Rhapsody Single-Cell Analysis Systems eine zielgerichtete scRNA-Seq Library hergestellt. Die gesorteten cDCs wurden mit einem BD Rhapsody Scanner gezählt und dann in einer BD Rhapsody Kartusche nach Herstellerprotokoll prozessiert. Die

Synthese der Einzelzell-cDNA und die Library-Amplifizierung erfolgten nach Anweisungen des Herstellers. Für die Amplifizierung wurden die im BD Mouse Inflammatory Response Panel enthaltenen Primer und eine selbst ausgewählte Zusammenstellung an Primern für 88 immunrelevante Gene genutzt (insgesamt 496 Gene, siehe Kapitel 5.1.1). Die Library wurde mit einem Bioanalyzer 2100 (Agilent) evaluiert und auf einer Illumina HiSeq2500 Plattform im 25bp paired-end Modus sequenziert. Die unbearbeiteten Sequenzierungs-Reads für 778 Einzelzellen wurden auf der Seven Bridges Plattform (Seven Bridges Genomics) mit der BD Rhapsody Targeted Analysis Pipeline v1.8 und den Standardparametern prozessiert. Die ausgezählten Werte für jedes Molekül wurden (nach Ausschluss von Artefakten aus Library-Generierung etc. durch eine verteilungsbasierte Fehlerkorrektur) mithilfe von Seurat v3.1.1¹⁷⁶ analysiert. Zellen mit weniger als fünf detektierten Genen und Zellen mit mehr als 500 ausgezählten Molekülen wurden von der Analyse ausgeschlossen. Die Daten wurden log-normalisiert und ein unbeaufsichtigter Ansatz für die Generierung der Zellcluster wurde gewählt. Die genauen Schritte zur Berechnung der fünf cDC-Cluster aus den Daten sind in Referenz ¹⁷⁷ erklärt. Die Einzelzellen in den individuellen Clustern wurden aufgrund ihrer transkriptionellen Level an kanonischen Immunzellmarkern spezifischen Immunzelltypen zugeschrieben. Zwei Cluster konnten aufgrund ihrer hohen Expression der Gene *Cxcl2*, *Mmp9*, *Trem1*, *Cd14* und *Tlr2* als Makrophagen/Monozyten identifiziert werden, ein weiterer Cluster wurde wegen der hohen Expression von *Igkc*, *Igkc3*, *Ms4a1*, *CD19* und *Ighd* als B-Zell-Cluster identifiziert. Diese drei Cluster wurden von allen weiteren Analysen ausgeschlossen. Die Daten wurden mithilfe der R-Pakete ggplot2 v3.1.0¹⁷⁸ und ComplexHeatmap v2.0.0¹⁷⁹ visualisiert.

2.3.19 Re-Analyse eines publizierten scRNA-Seq-Datensets

Für die Re-Analyse des humanen scRNA-Seq-Datensets mit der GEO-Identifizierungsnummer GSE154763¹⁴⁶ wurden aus den normalisierten Auszählungen der Reads pro Zelle die bereits annotierten „cDC1“ und „LAMP3+ cDCs“ Subsets herausgefiltert. Hierbei wurden nur Tumorproben mit mehr als 20 Zellen berücksichtigt. So konnten die Re-Analysen auf Zellen fokussiert werden, die bereits aufgrund ihrer Expression kanonischer Marker als cDC1 identifiziert worden waren, aber auch auf

alle reifen cDCs („LAMP3⁺ cDCs“), die für kanonische cDC1- und cDC2-Marker negativ waren. Sogenannte Anker zwischen Zellen aus den verschiedenen Krebstypen wurden mithilfe von Seurat v4.1.1¹⁸⁰ identifiziert. Die Einzelschritte zur Identifizierung der humanen cDC1 und cDCs mit hoher Expression der Gensignaturen aus der murinen scRNA-Seq sind in Referenz ¹⁷⁷ beschrieben.

2.3.20 Bioinformatische Analyse der Krebspatienten-Daten

RSEM-normalisierte Datensets zur Genexpression und Tumormutations-Counts aus der Datenbank The Cancer Genome Atlas (TCGA) wurden vom Genomic Data Commons Datenportal (<https://portal.gdc.cancer.gov>) heruntergeladen und nach Tumorproben gefiltert. Das TCGA-SKCM-Datenset wurde weiter nach Hauttumoren gefiltert. Die Analysen des Datensets für Melanompatienten, die mit einer Immun-Checkpoint-Inhibierung therapiert werden, basieren auf den Genexpressionsdaten und Tumormutations-Counts für die „Haut“-Tumorproben aus D. Liu et al.¹⁸¹. Gensignaturen für unreife cDC1, reife CXCL9⁺CCR7^{neg} cDC1 und reife CCR7⁺ cDCs wurden basierend auf den Markergenen der jeweiligen Populationen in der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten scRNA-Seq definiert. Um bei der Analyse der TCGA-Daten spezifisch cDC1 im reifen CXCL9⁺CCR7^{neg} Zustand (und keine anderen Immunzelltypen) zu identifizieren, wurden die cDC1-spezifischen Gene *CLEC9A* und *XCR1* in die CXCL9⁺CCR7^{neg} cDC1-Gensignatur mit aufgenommen. Für die Analyse der Expression einer Gensignatur wurde die normalisierte Expression eines Signaturgens nach Expressionswerten eingeordnet. Die Überlebens-Analysen wurden basierend auf dem mittleren Rang der Expressionswerte der Signatur durchgeführt, und die oberen und unteren Quartile der TCGA-Datensets sowie die obere und untere Hälfte der Melanompatientenkohorte wurden verglichen und mit der Prism-Software (GraphPad) als Kaplan-Meier-Kurven dargestellt. Hazard-Ratios wurden als das Verhältnis des unteren Quartils zum oberen Quartil berechnet. Der CXCL9⁺ cDC1 Signatur-Score, der die Infiltration von CXCL9⁺CCR7^{neg} cDC1 in die Tumoren der Melanompatientenkohorte widerspiegelt, wurde berechnet als $(1 - (\text{mittlerer Rang der Signatur-Transkripte} / \text{Anzahl der eingestufteten Patienten}))$. Nur Patienten, von denen es Proben vor und nach Beginn der Therapie gab und deren Reaktion auf die Therapie evaluiert wurde, wurden analysiert.

2.3.21 Deep-Learning-Modell und Ausgangs-Vorhersage

Die Tumorklassifizierung und Ausgangs-Vorhersage wurde mithilfe des sogenannten Deep-Learnings durchgeführt, einer Technik des maschinellen Lernens, die automatisch die geeignetsten Attribute eines Datensets (sogenannte Merkmale) erlernt und so ein statistisches Modell der Daten erstellt. Die Deep-Learning-Analysen entstanden in Zusammenarbeit mit Moritz A. Knolle und Georgios Kaissis (Institute of Artificial Intelligence in Healthcare and Medicine, TranslaTUM). In den hier gezeigten Analysen wurde Deep-Learning auf einem Datenset bestehend aus volumetrischen Bildern von Kryoschnitten von Kontroll- und *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}-Tumoren (n=68) angewandt. Die Tumoren stammten aus Mäusen gleichen Alters und Geschlechts und die Bilder enthielten Informationen über die Expression der Proteine CD103, MHCII, CCR7, CD8 und Ki-67 in individuellen Kanälen. Um das Modell zu trainieren, wurden zufällig ausgewählte Tumorbilder beider Tumortypen dem Trainingset zugeteilt (n=44). Ein weiterer Satz an Bildern diente als ungesehenes Testset (n=24) zur Validierung des Modells. Details zu den Eigenschaften und der genauen Nutzung des verwendeten probabilistischen neuronalen Netzwerks können der Referenz ¹⁷⁷ entnommen werden.

2.3.22 Deep-Learning-Interpretabilität

Es wurden verschiedene Methoden zur Interpretabilität (Auswertbarkeit; engl. *interpretability*) des Deep-Learning-Modells verwendet. Für das Blurring wurde die räumliche Auflösung in den Bildern schrittweise reduziert, indem graduell 2 bis 16 benachbarte Pixel miteinander verschmolzen („gebinnt“; vom engl. *binning* als Bezeichnung für diesen Prozess) wurden. Dieser Prozess reduzierte die Auflösung auf ~10 bis 80µm.

Sogenannte „Sensitivity Maps“ zur Visualisierung der räumlichen Wichtigkeit wurden über einen iterativen „occlusion sensitivity“-Ansatz nach Zeiler et al.¹⁸² generiert. Bei diesem Ansatz wird ein stetig zunehmender Bereich des Bildes, ausgehend entweder vom Bildrand oder von der Mitte, von der Analyse ausgeschlossen (okkludiert) und der jeweilige Effekt auf die Testset-Messwerte wird gemessen. Die genauen Berechnungen zu dieser Methode sind in Referenz ¹⁷⁷ aufgelistet.

Als zweiter Ansatz wurde die SmoothGrad-Methode¹⁸³ angewandt, die zur Reduzierung von Rauschen bei der Generierung von Sensitivity Maps basierend auf Bilddaten eingesetzt werden kann. SmoothGrad wurde angewendet wie in der Originalpublikation beschrieben¹⁸³.

Die Wichtigkeit der einzelnen Bildbereiche und Kanäle beschreibt hier den linearen Einfluss der Voxel auf die Entscheidung des Deep-Learning-Modells während der Klassifizierung. Wichtigkeit kann dabei einzelnen Voxeln, aber auch ganzen Tumorregionen oder Zellpopulationen zugeschrieben werden. Für die Quantifizierung der Wichtigkeit einzelner von cDC1 exprimierter Marker wurde der Mittelwert der Wichtigkeit in jeder gerenderten cDC1 berechnet. Höhere Werte geben an, dass der untersuchte Marker die Entscheidung des Deep-Learning-Modells bei der Klassifizierung stärker beeinflusst hat.

Für die Identifizierung der RKIs wurde die Summe der Wichtigkeit aller Voxel aus den Sensitivity Maps jedes einzelnen Kanals benutzt.

Für die korrelative Bildanalyse nach Generierung der Sensitivity Maps mit SmoothGrad und der Definition der RKI wurden die jeweiligen Kartografien auf die Dimensionen der Originalbilder skaliert, in die Imaris-Software importiert und an den Originalbilddaten ausgerichtet, um exakte 3D-Überlagerungen zu erhalten.

2.3.23 Ausgangs-Vorhersage mit einem Random-Forest-Modell

Ein Random-Forest-Algorithmus wurde verwendet, um den Ausgang der Antitumor-Immunantwort basierend auf durchflusszytometrisch ermittelten Zellzahlen vorherzusagen. Die Implementierung des Random-Forest-Algorithmus erfolgte wie von Breiman¹⁸⁴ beschrieben. Der Algorithmus wurde auf tabellarischen Daten zur Anzahl und Frequenz der cDC1 und CD8⁺ T-Zellen nach Isolation aus Kontroll- oder *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}-Tumoren (n=57) angewendet. Die genauen Metriken sind in Referenz ¹⁷⁷ beschrieben.

2.3.24 Statistische Analysen

Alle statistischen Analysen wurden mithilfe der Prism-Software (GraphPad) durchgeführt. Statistische Signifikanzen wurden mit einem Zweistichproben-t-Test für unabhängige Stichproben berechnet. Statistische Analysen für drei oder mehr Gruppen und Tumorwachstumsprofile wurden per ANOVA berechnet. Korrelationsanalysen wurden mithilfe einer Pearson-Korrelation oder einer linearen Regressionsanalyse durchgeführt. Der Log-Rang-Test (Mantel-Cox-Test) wurde genutzt, um die statistische Signifikanz des Überlebens aus den Patientendaten der TCGA-Datenbank und dem Datenset aus D. Liu et al.³² zu bestimmen. Die Daten sind, wenn nicht anders angegeben, als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD; engl. *standard deviation*) oder als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM; engl. *standard error of the mean*) gezeigt. Die Signifikanz wurde angenommen bei * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Die statistischen Parameter für jedes einzelne Experiment sind in der jeweiligen Abbildungsbeschriftung angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 cDC1-CD8⁺ T-Zell-Cluster als Merkmale protektiver Antitumor-Immunantworten

3.1.1 Ein Mikroskopie-basiertes Deep-Learning-Modell zur Vorhersage der Antitumor-Immunantwort

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst ein synchronisiertes Tumormodell bestehend aus zwei Tumortypen mit unterschiedlichem Ausgang der Antitumor-Immunantwort etabliert (Abb. 7A). Bei diesem Tumormodell handelt es sich um BRAF^{V600E}-Melanomzellen, wobei die Kontrollzellen unverändert sind und die *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-Zellen einen Knockout (KO) für die Enzyme Zykllooxygenase 1 und 2 (COX1/2; engl. *cyclooxygenase 1/2*) aufweisen. Durch diesen KO sind die *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}-Zellen nicht in der Lage, das immunsuppressive PGE2 zu produzieren^{115,185}. Nach der Transplantation der Tumorzellen in immunkompetente C57BL/6 Wildtyp-Mäuse (WT) zeigten Kontroll-BRAF^{V600E}-Tumoren ein progressives Wachstum, während *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}-Tumoren ab Tag 8 abgestoßen wurden (Abb. 7B,C). Kontroll- und *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}-Tumoren können daher genutzt werden, um eine ineffektive Antitumor-Immunantwort in Progressortumoren mit der protektiven Antwort in Regressortumoren zu vergleichen.

Eine Regression der *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}-Tumoren blieb aus, wenn *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}-Zellen in cDC1-defiziente *Batf3*^{-/-}-Mäuse oder CD8⁺ T-Zell-depletierte WT-Mäuse transplantiert wurden (Abb. 7C). Die protektive Antitumor-Immunantwort wird in den Regressortumoren also von cDC1 und CD8⁺ T-Zellen vermittelt.

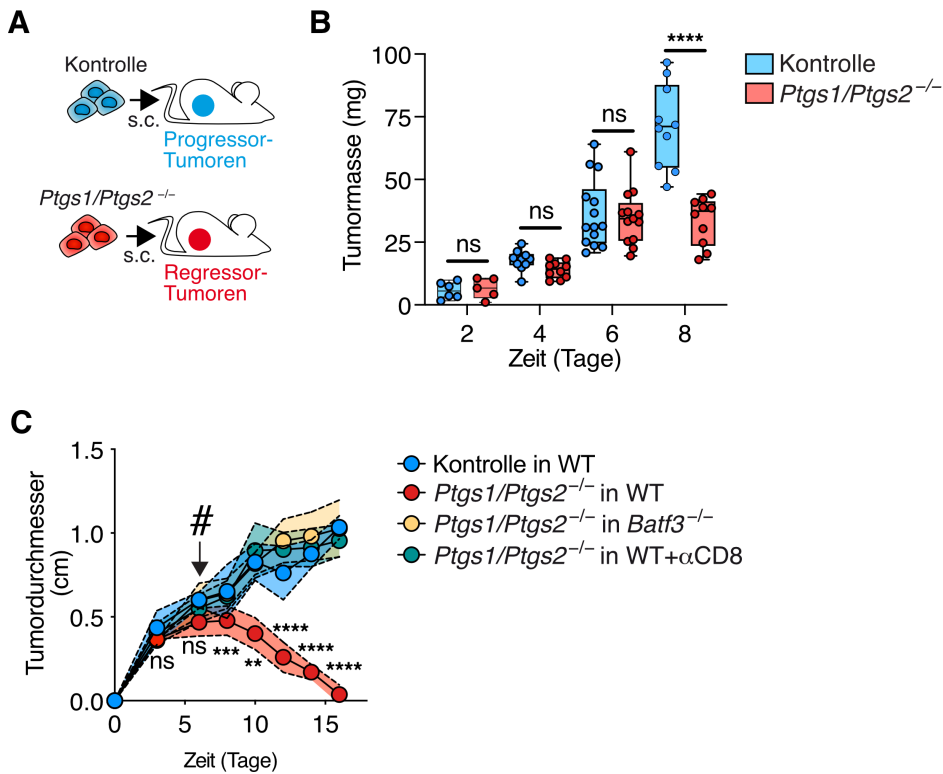


Abbildung 7: Synchronisiertes BRAF^{V600E}-Melanommodell. (A) Schematische Darstellung des Tumormodells bestehend aus Progressor- und Regressortumoren. s.c., subkutan. **(B)** Nachweis über ein identisches Tumorstadium bis Tag 6 (Zeitpunkt der Ausgangsvorhersage) nach Transplantation von 2×10^6 Kontroll- oder *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}-Zellen in WT-Mäuse (n=5-13 Tumoren pro Gruppe). Daten wurden aus drei unabhängigen Experimenten gebündelt, gezeigt sind der Mittelwert, das obere und untere Quartil. Die Whiskers zeigen Minimum und Maximum an. **(C)** Wachstumskurven für Kontroll- und *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}-Tumoren in *Batf3*^{-/-}-Mäusen oder WT-Mäusen mit oder ohne CD8⁺ T-Zell-Depletion (n=5). Gezeigt ist der Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) aus einem von zwei unabhängigen Experimenten. ns, nicht signifikant; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001. #, Tag 6, Zeitpunkt für die Ausgangsvorhersage.

Um zu verstehen, wie die protektive Antitumor-Immunantwort in *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}-Tumoren im TMM orchestriert wird, sollte die räumliche Organisation von cDC1 und CD8⁺ T-Zellen an Tag 6, also vor der Regression der *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}-Tumoren, analysiert werden. Hierfür wurden zunächst Immunofluoreszenz-Färbungen von cDC1- und T-Zell-Parametern auf ganzen Tumorschnitten durchgeführt, von denen dann mittels konfokaler Mikroskopie möglichst große, dreidimensionale (3D) Bilder aufgenommen wurden (Abb. 8A). Folgende Parameter wurden gefärbt: MHCII und CD103 zur Identifizierung der cDC1, CCR7 als Marker für reife migratorische cDC1, CD8 zur Identifizierung der CD8⁺ T-Zellen und Ki-67 als Proliferationsmarker.

Die in den Bildern enthaltenen Informationen über den Phänotyp von cDC1 und CD8⁺ T-Zellen sowie deren Positionierung im TMM wurden dann von einem Deep-Learning-Modell analysiert (Abb. 8A). Das hier verwendete Deep-Learning-Modell und dessen Funktionsweise wurden in Referenz¹⁷⁷ ausführlich beschrieben.

Nachdem das Modell mit gelabelten Bildern von Kontroll- oder *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}-Tumoren trainiert wurde, sollte es die Bilder eines ungesehenen Sets als Progressor- oder Regressortumoren klassifizieren und so eine Vorhersage über den Ausgang der Antitumor-Immunantwort treffen. Interessanterweise war das Deep-Learning-Modell in der Lage, klar zwischen Progressor- und Regressortumoren zu unterscheiden (Abb. 8B), was für die Existenz eindeutiger Merkmale für die jeweiligen Tumortypen sprach, die das Modell im Trainingset identifizieren konnte. Eine statistische Analyse nach Receiver-Operator-Charakteristik zeigte, dass es sich bei der Klassifizierung durch das Deep-Learning-Modell nicht um einen Zufallsprozess handelte, sondern dass die Diskriminierungsfähigkeit des Modells sehr hoch war (Abb. 8C). Die Genauigkeit der Vorhersage des Deep-Learning-Modells lag bei 97% und der Konkordanz-Index, der bewertet, wie zuverlässig ein Vorhersage-Modell ist, erreichte einen Wert von 99,3% (Abb. 8D).

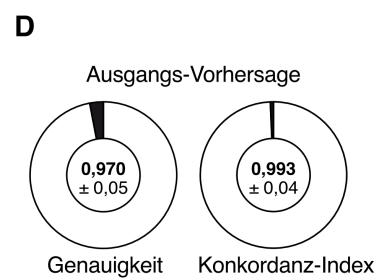
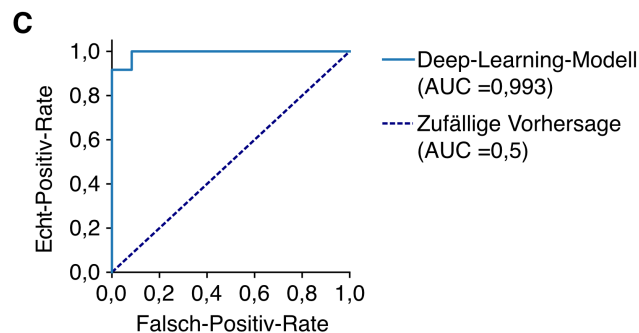
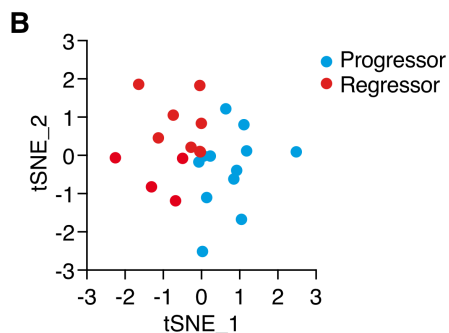
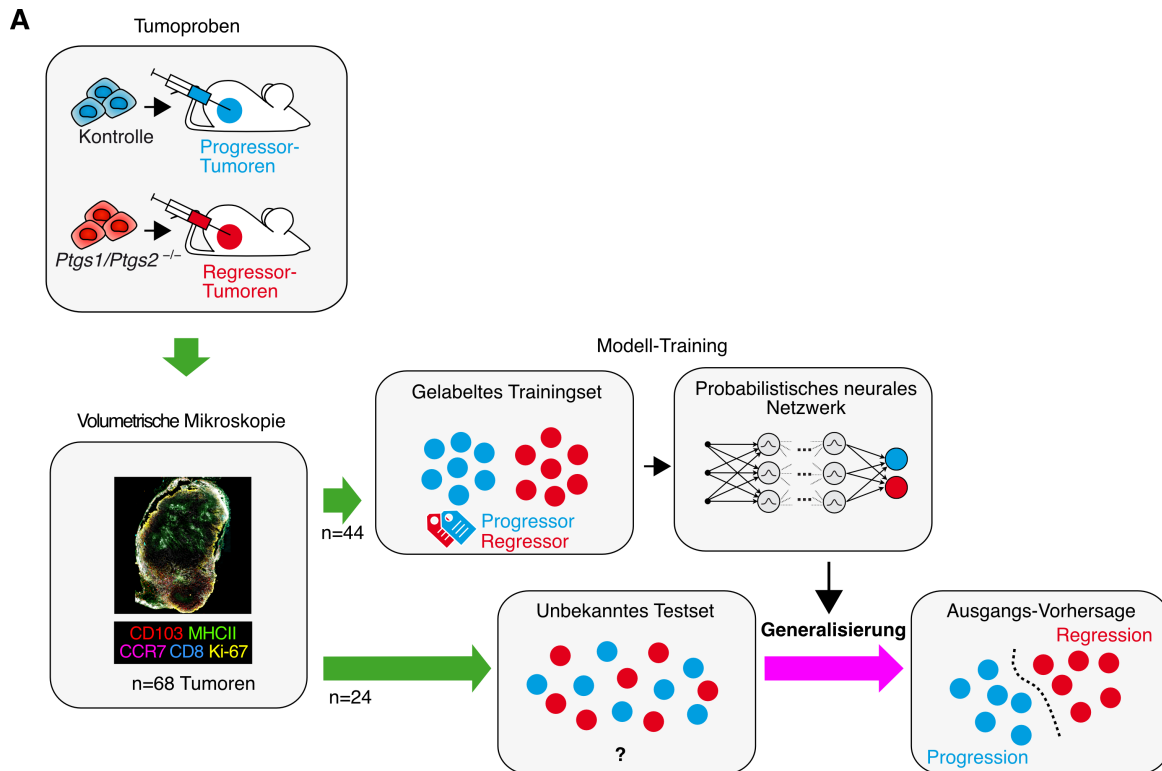


Abbildung 8: Vorhersage des Ausgangs der Antitumor-Immunantwort basierend auf räumlichen Informationen zu cDC1 und CD8⁺ T-Zellen durch ein Deep-Learning-Modell. (A) Arbeitsablauf für die bildbasierte Tumorklassifizierung. (B) tSNE-Analyse zur linearen Separierbarkeit des Testsets. (C) Konkordanz-Analyse nach Receiver-Operator-Charakteristik (ROC). AUC, Area under the curve (Fläche unter der Kurve). (D) Analyse der Performance des Modells auf dem Testset. Angegeben ist der Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) berechnet aus 30 Monte-Carlo-Ziehungen.

3.1.2 Die Genauigkeit der Klassifizierung von Progressor- und Regressortumoren basiert auf räumlichen Informationen

Um einzuschätzen, welche Rolle die räumlichen Informationen in den Tumorbildern für die hohe prognostische Kraft des Deep-Learning-Modells spielen, wurde die Ausgangsvorhersage auf Bildern durchgeführt, die schrittweise unschärfer gemacht wurden (Abb. 9A). Dieser Prozess, bei dem immer mehr Pixel miteinander verschmolzen („gebinnt“; vom engl. *binning* als Bezeichnung für diesen Prozess) werden, wird nachfolgend als Blurring bezeichnet. Mit fortschreitendem Blurring der Bilder wurde so die räumliche Auflösung der Bilder immer weiter verschlechtert, was die Fähigkeit zur Unterscheidung von Progressor- und Regressortumoren des Deep-Learning-Modells verschlechterte (Abb. 9A). In Übereinstimmung mit dieser Erkenntnis verschlechterte sich die Genauigkeit der Vorhersage des Modells ebenfalls, wenn die Tumorbilder nur anhand der Zahlen der intratumoralen Immunzellen, aber ohne deren räumliche Position klassifiziert wurden (Abb. 9B). Hier ist zu erwähnen, dass die Genauigkeit der Vorhersage basierend auf den Zellzahlen in volumetrischen Tumorbildern trotzdem Werte von bis zu 91% erreichen konnte.

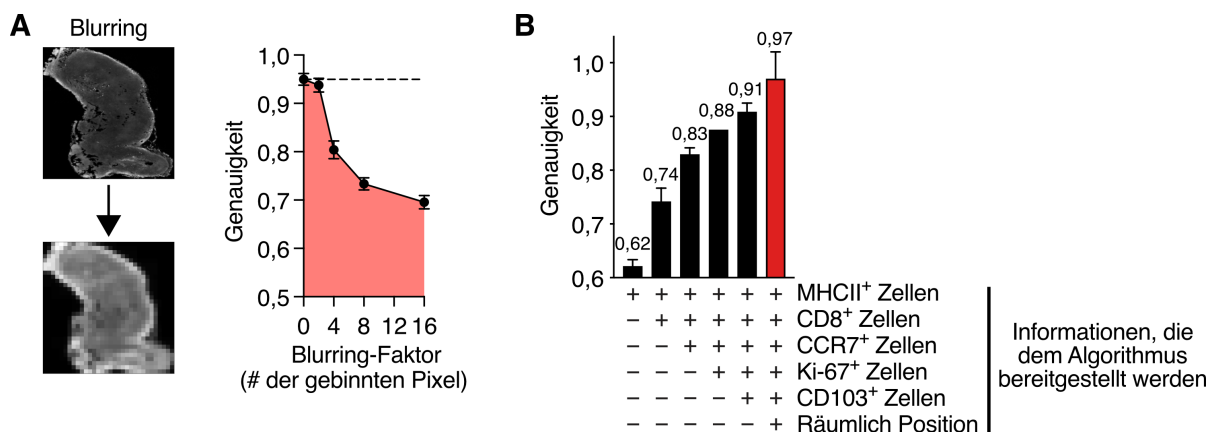


Abbildung 9: Relevanz räumlicher Informationen für die Tumorklassifizierung durch das Deep-Learning-Modell. (A) Auswirkung von Blurring des Bildes auf die Genauigkeit des Modells. **(B)** Beitrag der einzelnen Parameter aus den Bildern (Anzahl der positiven Zellen, räumliche Position) zur Genauigkeit des Modells. Zellzahlen wurden durch automatisches Zell-Rending in den Tumorbildern bestimmt (siehe Abb. 6).

Zur Evaluierung der Antitumor-Immunantwort in verschiedenen Tumortypen werden häufig die intratumoralen Immunzellen aus dem Gewebe isoliert und durchflusszytometrisch quantifiziert. Um zu beurteilen, welche Aussagekraft die Zahlen isolierter cDC1 und CD8⁺ T-Zellen im Gegensatz zu volumetrischen Bildern mit räumlichen Informationen haben, wurden cDC1 und CD8⁺ T-Zellen aus Kontroll- und *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}-Tumoren isoliert und mittels Durchflusszytometrie quantifiziert (Abb. 10A,B). Ein Machine-Learning-Modell, das basierend auf den Zellzahlen vorhersagen sollte, ob es sich um ein Progressor- oder Regressormodell handelt, erreichte lediglich eine Genauigkeit von 72% für cDC1-Zahlen und 79% für CD8⁺ T-Zell-Zahlen (Abb. 10C-E) und war somit der Ausgangs-Vorhersage durch das bildbasierte Deep-Learning-Modell klar unterlegen.

Die beeinträchtigte Performance der Vorhersage-Modelle bei Verlust der räumlichen Informationen wies darauf hin, dass die räumliche Organisation von cDC1 und CD8⁺ T-Zellen im TMM eine Unterscheidung zwischen Progressor- und Regressortumoren ermöglicht und deshalb eine wichtige Rolle in der Antitumor-Immunantwort spielen könnte.

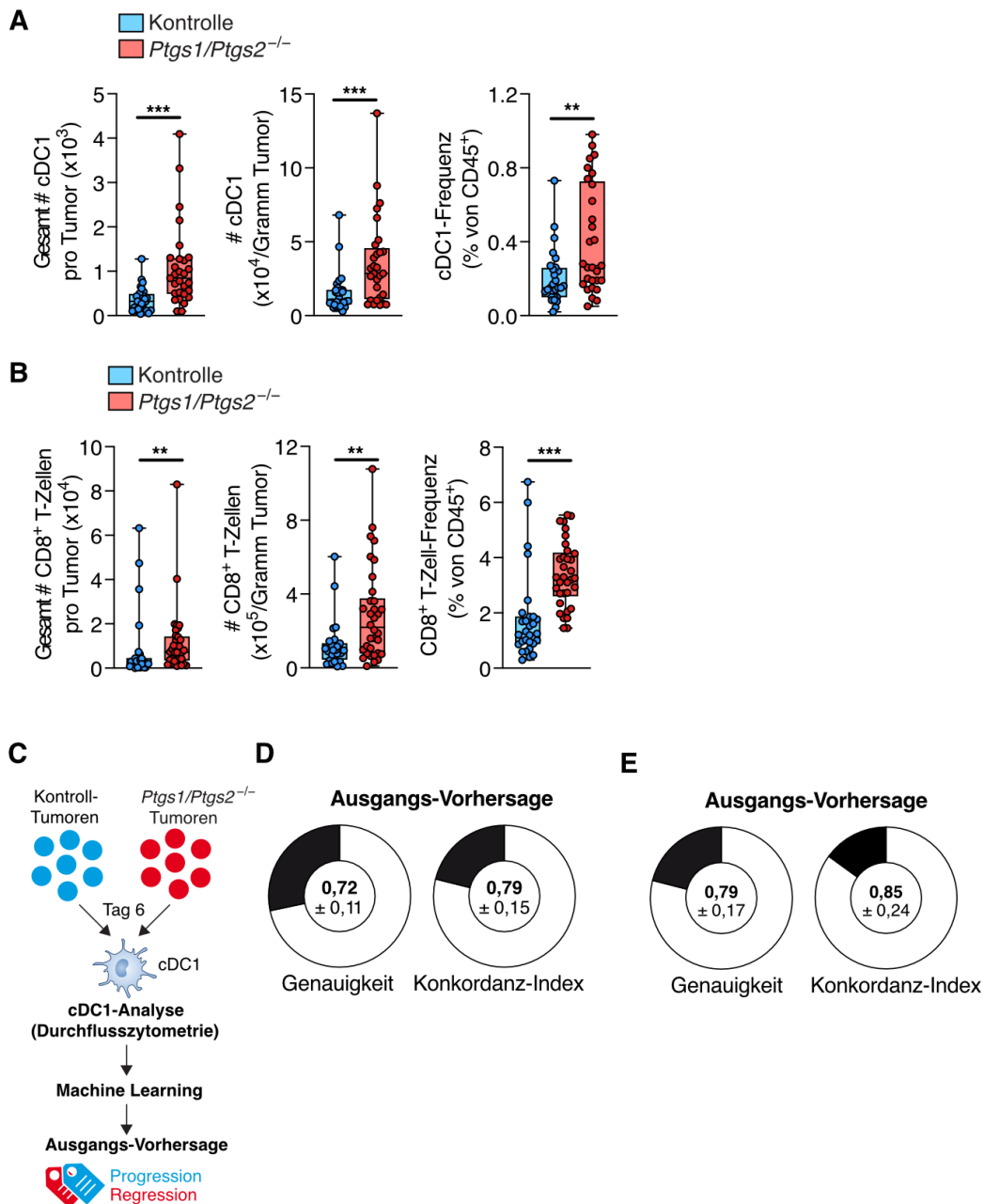


Abbildung 10: Die Quantifizierung intratumoraler Immunzellen ist für die Unterscheidung zwischen Progressor- und Regressortumoren nicht ausreichend. (A, B) Durchflusszytometrische Analyse von Kontroll- und *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}-Tumoren aus WT-Mäusen an Tag 6 (n=28-34 pro Gruppe). **(A)** Quantifizierung von cDC1 pro Tumor, pro Tumormasse und als Anteil der CD45⁺ Immunzellen. **(B)** Quantifizierung der CD8⁺ T-Zellen wie in (A). **(C-E)** Ausgangs-Vorhersage durch ein Random-Forest Machine-Learning-Modell basierend auf den intratumoralen Zellzahlen von cDC1 und CD8⁺ T-Zellen. Zellzahlen aus (A) und (B) wurden verwendet. **(C)** Arbeitsablauf für die zahlenbasierte Ausgangs-Vorhersage. **(D, E)** Analyse der Performance des Modells auf den Daten für **(D)** cDC1 und **(E)** CD8⁺ T-Zellen. **p < 0,01; ***p < 0,001.

3.1.3 Identifizierung von cDC1-CD8⁺ T-Zell-Clustern als Merkmale von *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}-Tumoren

Im Bestreben, die räumlichen Merkmale der intratumoralen Immunzellen zu identifizieren, die das Deep-Learning-Modell befähigen, eine außerordentlich genaue Ausgangs-Vorhersage zu treffen, wurden zwei Techniken aus dem Feld der Deep-Learning-Interpretabilität (Auswertbarkeit; engl. *interpretability*) genutzt: einerseits ein „Occlusion Sensitivity“-Ansatz¹⁸², andererseits ein gradientbasierter Ansatz¹⁸³ (siehe Kapitel 2.3.22). Durch beide Methoden lassen sich sogenannte Sensitivity Maps generieren, die visualisieren, wie wichtig die einzelnen Regionen des Tumorbilds für die Performance des Deep-Learning-Modells sind (Abb. 11A,B). Die Sensitivity Maps generiert von beiden Methoden zeigten, dass die Regionen mit der größten prognostischen Kraft in der Peripherie nah am Tumorrand lagen (Abb. 11A,B). Diese Regionalisierung wurde durch eine zweite Analyse bestätigt, bei der zunehmend größere Bildregionen von der Ausgangs-Vorhersage ausgeschlossen (okkludiert) wurden, entweder von der Tumorpheripherie (Abb. 11C) oder von der Tumormitte (Abb. 11D) ausgehend. Wurden Bildinformationen von der Peripherie her ausgeschlossen, sank die Genauigkeit des Deep-Learning-Modells schneller ab als bei einem Ausschluss der Informationen aus der Tumormitte (Abb. 11C,D).

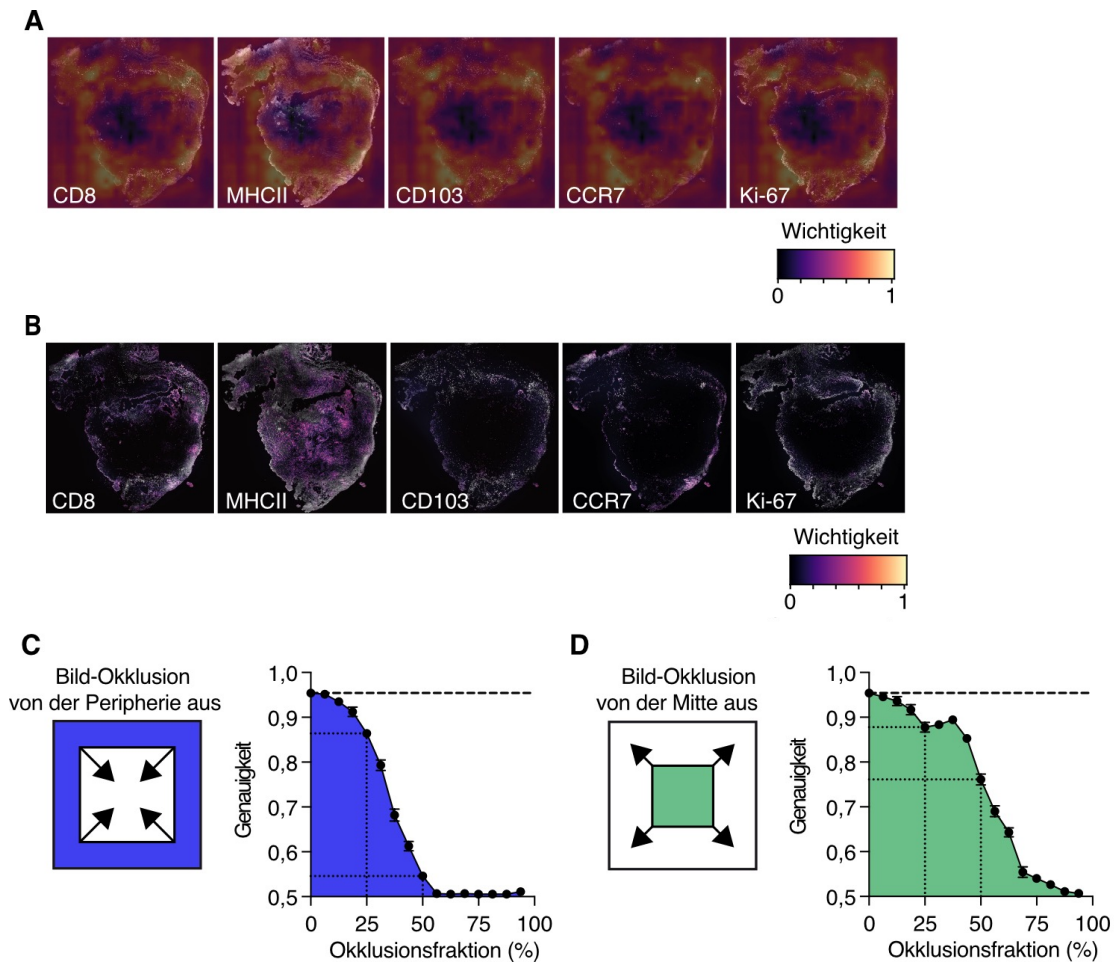


Abbildung 11: Randregionen des Tumors sind wichtig für die Genauigkeit des Deep-Learning-Modells. (A, B) Exemplarische Sensitivity Maps, die die Wichtigkeit jeder Region des Tumors für die Ausgangs-Vorhersage durch das Deep-Learning-Modell visualisieren. In **(A)** wurde ein „Occlusion Sensitivity“-Ansatz gewählt, in **(B)** ein gradientenbasierter „SmoothGrad“-Ansatz. Hellere Regionen sind wichtiger für die Vorhersage. **(C, D)** Bildokklusions-Analyse, die testet, wie eine Einschränkung des Zugangs auf umfassende Informationen sich auf die Performance des Deep-Learning-Modells auswirkt. **(C)** Iterative Okklusion von der Tumor-Peripherie aus. **(D)** Iterative Okklusion von der Mitte des Tumors aus. (A-D) zeigen Daten für einen repräsentativen Tumor aus dem Testset bestehend aus 24 Tumoren.

Um die Annahme zu bestätigen, dass die räumliche Organisation von cDC1 und CD8⁺ T-Zellen in Progressor- und Regressortumoren sich besonders in den peripheren Regionen der Tumoren unterscheidet, wurden auf der Grundlage der gradientbasierten Wichtigkeit aus Abb. 11B kartografische Repräsentationen der Regionen generiert, die die für das Deep-Learning-Modell kritischen Informationen für die Ausgangs-Vorhersage enthielten (RKIs, Regionen mit kritischen Informationen)(Abb. 12A). Als Nächstes wurden die intratumoralen cDC1 und CD8⁺ T-Zellen in den Originalbildern des Testsets basierend auf ihrer Expression charakteristischer Marker mittels 3D-Zell-Rendering identifiziert (Abb. 12B, siehe

Kapitel 2.3.15). Die auf diese Weise generierten dreidimensionalen Repräsentationen jeder einzelnen cDC1 und CD8⁺ T-Zelle in den Tumorbildern können für die Analyse von Lokalisierung und Zell-Zell-Interaktionen genutzt werden. Das 3D-Zell-Rendering zeigte, dass intratumorale cDC1 eine heterogene und äußerst verzweigte Morphologie aufweisen, während CD8⁺ T-Zellen kleiner, eher rund und einheitlich sind (Abb. 12C).

Eine Kombination aus der Visualisierung der RKIs und dem 3D-Zell-Rendering wurde dann genutzt, um zu untersuchen welche Merkmale in der räumlichen Verteilung der Zellen mit einer protektiven oder ineffektiven Antitumor-Immunantwort assoziiert sind. Interaktionsanalysen konnten zeigen, dass cDC1 und CD8⁺ T-Zellen innerhalb der RKIs in Clustern organisiert waren (Abb. 12D,E). Im weiteren Verlauf werden cDC1 und CD8⁺ T-Zellen, die in diesen Clustern miteinander interagieren, als „interagierende“ cDC1/CD8⁺ T-Zellen bezeichnet. Interessanterweise konnten diese cDC1-CD8⁺ T-Zell-Cluster in RKIs ausschließlich in *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}- Tumoren identifiziert werden (Abb. 12D,E). Außerhalb der RKIs war sowohl in *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}- als auch in Kontroll-Tumoren nur eine geringe Anzahl an Clustern zu beobachten (Abb. 12D,E). Diese Erkenntnisse deuteten an, dass die Bildung von peripheren cDC1-CD8⁺ T-Zell-Clustern ein charakteristisches Merkmal einer protektiven Antitumor-Immunantwort sein könnte.

3.1.4 cDC1-CD8⁺ T-Zell-Cluster sind ein konserviertes Merkmal von Regressortumoren

Um die Clusterbildung weiter zu untersuchen, wurde eine bildbasierte Analyse zur räumlichen Interaktion zwischen cDC1 und CD8⁺ T-Zellen in Regressor- und Progressortumoren an Tag 4, Tag 6 und Tag 8 nach Tumorzelltransplantation durchgeführt. Diese Analyse bestätigte, dass Cluster sich in *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}- Tumoren bereits in der initialen Phase des Tumorstadiums bilden und fortbestehen, wenn in etablierten Tumoren die T-Zell-vermittelte Abstoßung eingesetzt hat (Abb. 13A,B). In Kontroll-BRAF^{V600E}-Tumoren war im Verlauf des Tumorstadiums dagegen nur eine äußerst spärliche Clusterbildung zu beobachten (Abb. 13A,B).

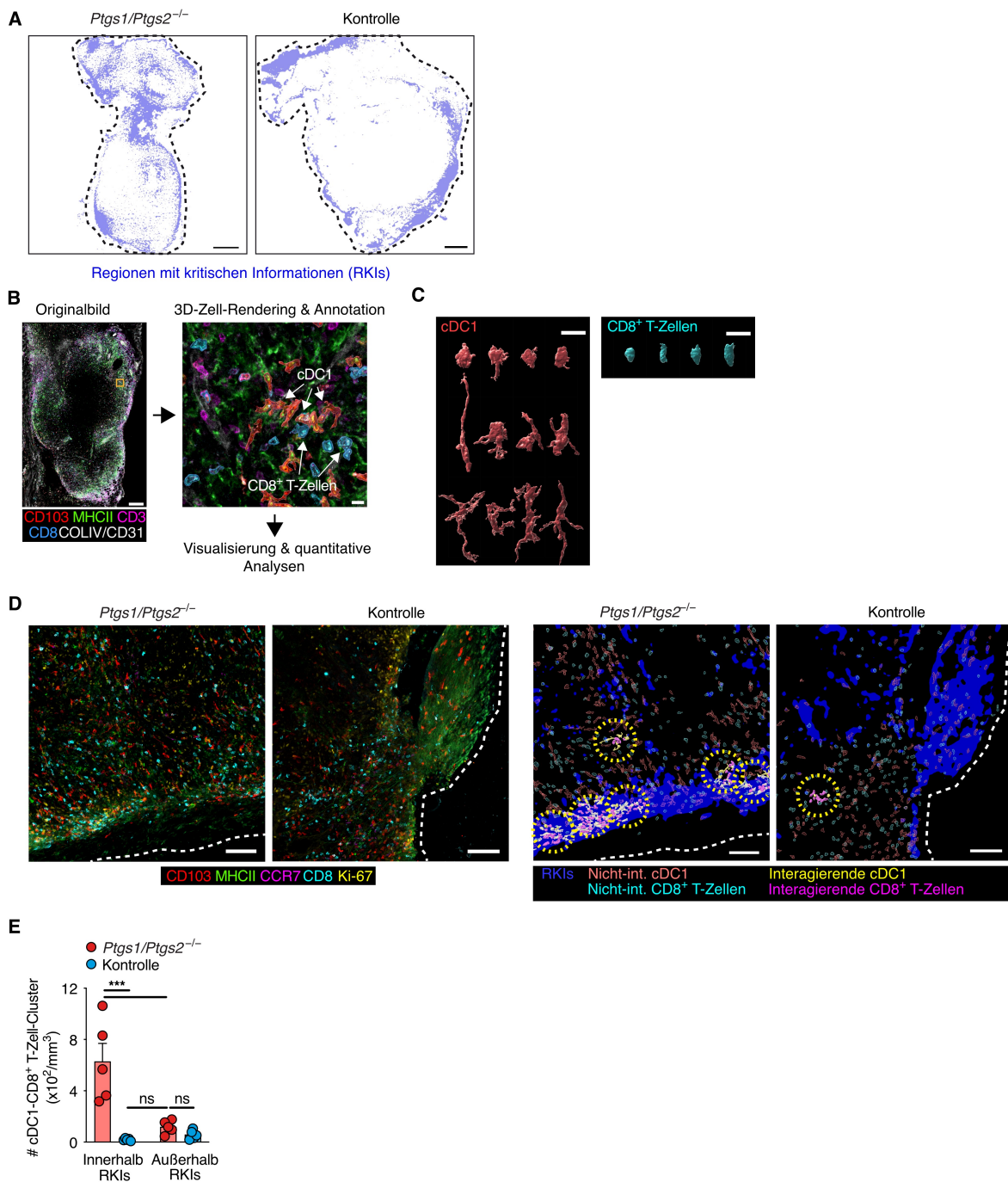


Abbildung 12: Die Bildung von cDC1-CD8⁺ T Zell-Clustern unterscheidet Regressor- von Progressortumoren. (A) Visualisierung der Regionen mit kritischen Informationen (RKIs) auf den Tumorphoben. Scalebar 500 μ m. (B) Arbeitsablauf für die Identifizierung und Quantifizierung von cDC1 und CD8⁺ T-Zellen in Tumorbildern. Das orangene Quadrat zeigt die vergrößerte Region, Scalebars 200 μ m (Übersicht) und 10 μ m (Zoom-In). (C) Beispiele für 3D-Zell-Rendering von cDC1 und CD8⁺ T-Zellen. Scalebar 20 μ m. (D) Repräsentative Mikroskopiebilder (links) und Kombination von 3D-Zell-Rendering und Visualisierung der RKIs auf denselben Bildausschnitten (rechts). Scalebar 100 μ m. Gestrichelte Linien zeigen den Tumorrang, gelbe Kreise heben cDC1-CD8⁺ T-Zell-Cluster hervor. (E) Quantifizierung basierend auf Analysen aus (D). Gezeigt ist der Mittelwert \pm SEM aus einem von zwei unabhängigen Experimenten mit 3-6 Mäusen pro Gruppe. Jeder Punkt repräsentiert einen Tumor, die Quantifizierung wurde auf Bildern von kompletten Tumorschnitten durchgeführt. ns, nicht signifikant; ***p < 0,001.

Nachdem die cDC1-CD8⁺ T-Zell-Cluster als persistierendes Unterscheidungsmerkmal der *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}-Tumoren gegenüber den Kontroll-BRAF^{V600E}-Tumoren identifiziert wurden, sollte untersucht werden, ob das Phänomen der Clusterbildung auch andere Regressor-/Progressor-Tumorkomplexe voneinander unterscheiden kann. Ähnlich wie im synchronisierten BRAF^{V600E}-Modell formen *Ptgs2*^{-/-}-CT26-Darmkrebszellen aufgrund ihrer COX-Defizienz Regressortumoren, während WT-CT26-Zellen Tumoren mit progressivem Wachstum bilden¹⁸⁵. An Tag 6 nach Transplantation konnten in den peripheren Regionen von *Ptgs2*^{-/-}-CT26-Darmkrebstumoren cDC1-CD8⁺ T-Zell-Cluster identifiziert werden, während WT-CT26-Tumoren kaum Cluster aufwiesen (Abb. 13C,D). In immunogenen Pankreaskarzinomen¹⁸⁶ (PDAC-53578), die trotz ihrer Fähigkeit zur Expression von COX1/2 durch cDC1 und CD8⁺ T-Zellen abgestoßen werden¹⁷⁷, konnte ebenfalls eine hohe Anzahl an Clustern beobachtet werden, im korrelierenden progressiv wachsenden Modell (PDAC-8028) war dies nicht der Fall (Abb. 13C,D). Ein weiterer Regressor-Tumortyp, das immunogene Fibrosarkom MCA-1969¹⁸⁷, wies ebenfalls eine große Menge an cDC1-CD8⁺ T-Zell-Clustern auf (Abb. 13C,D). Abschließend wurden spontan gewachsene Tumoren aus genetisch modifizierten Mausmodellen für Hautkrebs (BRaf^{CA}) und Brustkrebs (MMTV-PyMT) auf Clusterbildung untersucht. In diesen progressiv wachsenden Tumoren fehlten cDC1-CD8⁺ T-Zell-Cluster fast gänzlich (Fig. 13C,D). Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass cDC1-CD8⁺ T-Zell-Cluster ein konserviertes Merkmal der protektiven Antitumor-Immunantwort in Regressortumoren sind.

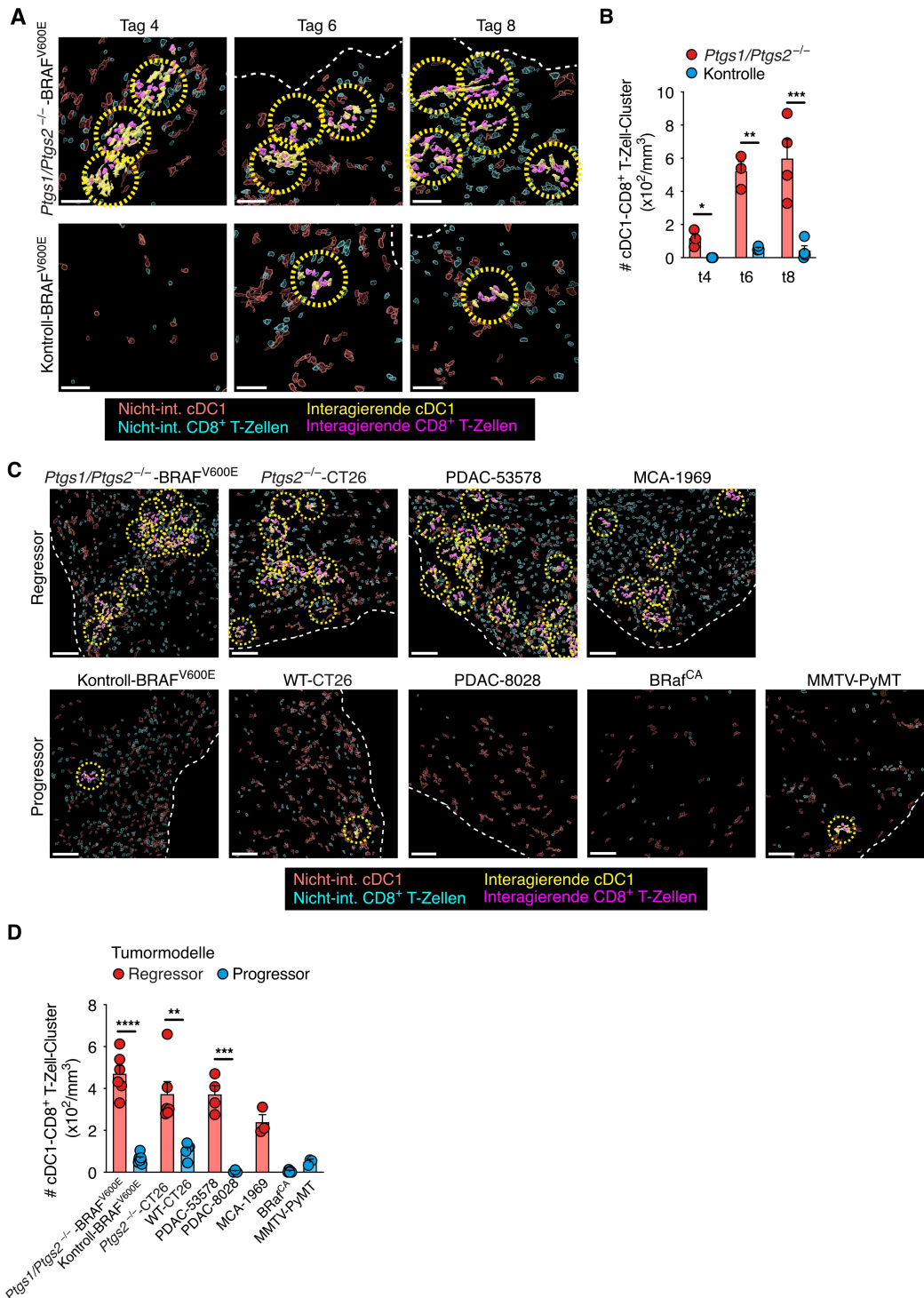


Abbildung 13: cDC1-CD8⁺ T-Zell-Cluster im Verlauf des Tumorwachstums und in unterschiedlichen Regressor- und Progressor-Tumormodellen. (A) Repräsentative Bilder von cDC1-CD8⁺ T-Zell-Clustern zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Tumorwachstums, visualisiert durch 3D-Zell-Rending. Scalebar 50 μ m. (B) Quantifizierung basierend auf Analysen aus (A). t, Tag. (C) Repräsentative Visualisierungen der intratumoralen cDC1-CD8⁺ T-Zell-Cluster in Mikroskopiebildern der angegebenen Tumormodelle. Scalebar 100 μ m. (D) Quantifizierung basierend auf den Analysen aus (C). In (A, C) zeigen gestrichelte Linien den Tumorrand, gelbe Kreise heben cDC1-CD8⁺ T-Zell-Cluster hervor. In (B, D) ist der Mittelwert \pm SEM aus einem von zwei unabhängigen Experimenten mit drei bis sechs Mäusen pro Gruppe gezeigt. Jeder Punkt repräsentiert einen Tumor, die Quantifizierung wurde auf Bildern von kompletten Tumorschnitten durchgeführt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

3.2 cDC1-CD8⁺ T-Zell-Cluster im Stroma bilden eine Nische für T-Zell-Stimulation

3.2.1 cDC1-CD8⁺ T-Zell-Cluster sind im Stroma lokalisiert

Die überwiegend periphere Lokalisierung der RKIs und der cDC1-CD8⁺ T-Zell-Cluster in *Ptgs1/Ptgs2^{-/-}*-BRAF^{V600E}-Tumoren legte die Vermutung nahe, dass sich die Cluster nicht im Tumor-Parenchym, sondern präferenziell im außen liegenden Stroma bilden. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurde die Lokalisierung der Immunzellen in *Ptgs1/Ptgs2^{-/-}*-BRAF^{V600E}-ZsG-Tumoren analysiert, in denen die Zellen des Tumorparenchyms ZsGreen (ZsG) exprimieren und so vom ZsG-negativen Stroma unterschieden werden können (Abb. 14A). Auf diese Weise wurde bestätigt, dass die cDC1-CD8⁺ T-Zell-Cluster sich ausschließlich im Stroma in der Nähe der stromal-parenchymalen Grenzfläche bilden (Abb. 14A,B). Im Gegensatz dazu sind nicht in Clustern interagierende cDC1 und CD8⁺ T-Zellen sowohl im Stroma als auch im Parenchym verteilt (Abb. 14A,B).

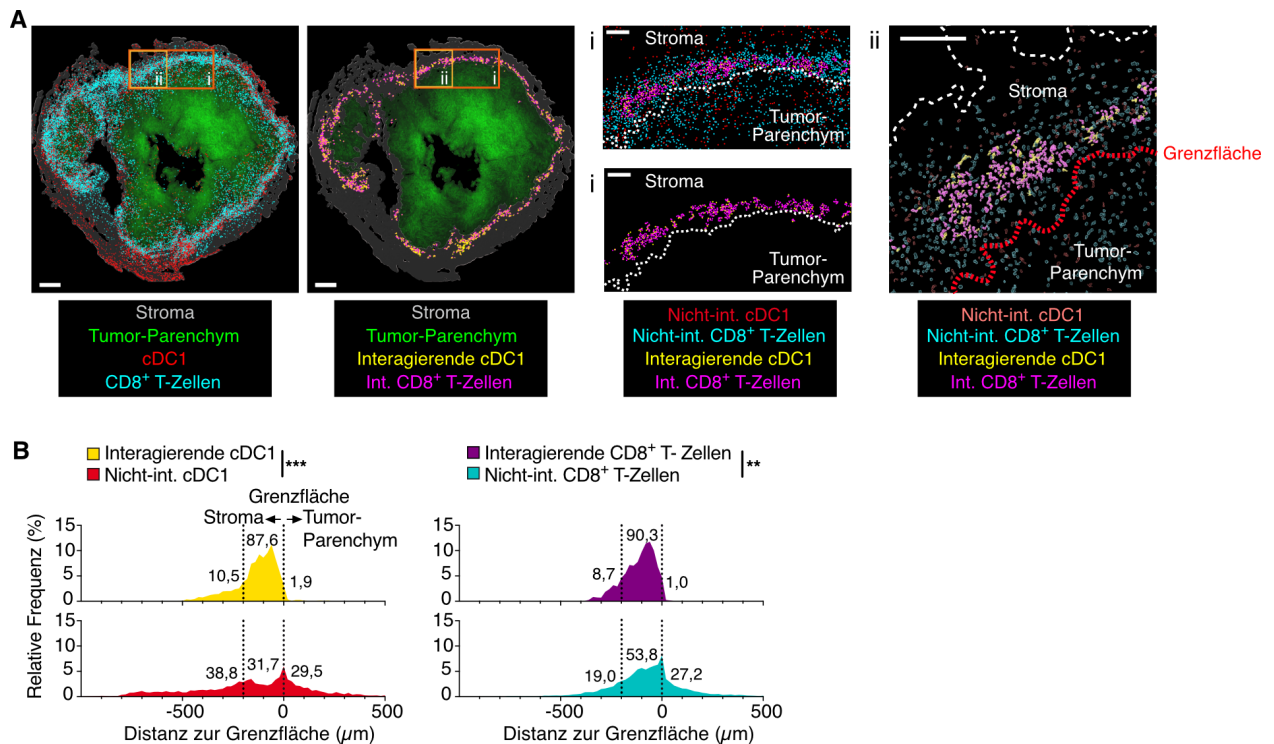


Abbildung 14: cDC1-CD8⁺ T-Zell-Cluster bilden sich im Tumorstroma. (A, B) Analyse von *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}-ZsG-Tumoren mittels volumetrischer Mikroskopie. (A) Lokalisierung von interagierenden und nicht-interagierenden cDC1 und CD8⁺ T-Zellen relativ zu Tumorparenchym und Stroma. Scalebars 100μm (Übersicht), 200μm (Zoom-Ins). Die orangenen Quadrate markieren die vergrößerten Regionen. Gestrichelte Linien zeigen den Tumorrand, rote Linie zeigt die Tumor-Stroma-Grenzfläche. (B) Distanzanalyse für interagierende und nicht-interagierende Zellpopulationen basierend auf (A). Die Daten in (A, B) zeigen ein repräsentatives Beispiel von mindestens drei Tumoren aus zwei unabhängigen Experimenten. **p < 0,01; *p < 0,001.**

3.2.2 Lokale Stimulation von CD8⁺ T-Zellen findet innerhalb der Cluster statt

Als Nächstes sollte die Frage beantwortet werden, ob die CD8⁺ T-Zell-Antworten in *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}-Tumoren von den cDC1-CD8⁺ T-Zell-Clustern ausgehen. Mittels quantitativer Histozytometrie konnte in den CD8⁺ T-Zellen, die mit cDC1 in Clustern interagieren, eine hohe Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 festgestellt werden, was für die nicht-interagierenden CD8⁺ T-Zellen nicht der Fall war (Abb. 15A). Diese Analyse wurde auf die gesamten CD8⁺ T-Zellen in Kontroll-BRAF^{V600E}-Tumoren ausgeweitet, von denen ebenfalls nur wenige eine Ki-67-Expression aufwiesen (Abb. 10B), was zu der Annahme passte, dass eine Interaktion zwischen CD8⁺ T-Zellen und cDC1 für die T-Zell-Proliferation im TMM notwendig ist.

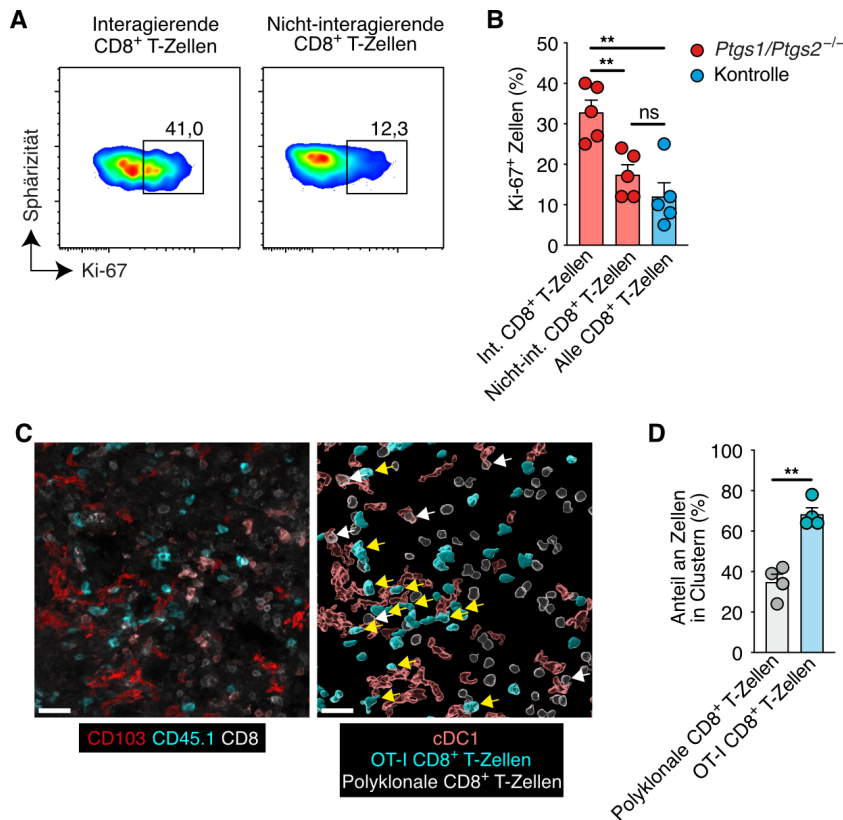


Abbildung 15: cDC1-CD8⁺ T-Zell-Cluster bilden intratumorale Nischen für die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen. (A) Analyse der Ki-67-Expression der intratumoralen CD8⁺ T-Zellen. (B) Quantifizierung basierend auf der Analyse aus (A) für Bilder von ganzen Tumorschnitten (n=5). (C, D) WT-Mäusen wurden 1x10³ naive, OVA-spezifische CD45.1⁺ OT-I-Zellen transferiert und 2x10⁶ *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}-OVA-Zellen transplantiert. Die intratumorale Lokalisierung der Immunzellen wurde an Tag 6 mittels volumetrischer Mikroskopie analysiert (n=4). (C) Mikroskopiebilder (links) und Visualisierung der gerenderten Zellen (rechts) im Tumorstroma. Pfeile weisen auf Interaktionen von cDC1 mit OT-I-Zellen (gelb) oder polyklonalen CD8⁺ T-Zellen (weiß) hin. Scalebar 30µm. (D) Quantifizierung basierend auf der Analyse aus (C). (A, C) zeigen ein repräsentatives Beispiel von mindestens drei Tumoren aus zwei unabhängigen Experimenten. (B, D) zeigen gebündelte Daten aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten. Gezeigt ist der Mittelwert ± SEM, jeder Punkt repräsentiert einen Tumor. Die Quantifizierung wurde auf Bildern von kompletten Tumorschnitten durchgeführt. ns, nicht signifikant; **p < 0,01.

Um die Beziehung zwischen cDC1-CD8⁺ T-Zell-Clustern und Antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen zu erforschen, wurden 1x10³ naive, Ovalbumin (OVA)-spezifische OT-I CD8⁺ T-Zellen adoptiv in WT-Mäuse transferiert, denen danach OVA-exprimierende *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}-Tumorzellen (*Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}-OVA) transplantiert wurden. An Tag 6 nach Transplantation waren Nachkommen der transferierten OT-I T-Zellen im TMM zu finden (Abb. 15C). Eine signifikant höhere Frequenz dieser OT-I T-Zellen war in Clustern mit cDC1 lokalisiert als bei den polyklonalen, endogenen CD8⁺ T-Zellen (Abb. 15C,D), was andeutete, dass Antigen-Präsentation und -Erkennung an innerhalb der Cluster stattfindet.

3.3 Die protektive Antitumor-Immunantwort geht von TCF1⁺ T-Zellen aus, die in cDC1-CD8⁺ T-Zell-Clustern stimuliert werden

3.3.1 Charakterisierung der intratumoralen T-Zellen

Intratumorale CD8⁺ T-Zellen sind heterogen und können in mindestens zwei Subsets unterteilt werden: „Stem-like“ TCF1⁺ Zellen, die die Fähigkeit zur Proliferation und Differenzierung besitzen, und „effector-like“ TCF1^{neg}TIM-3⁺ Zellen, die Effektorfunktionen wie Zytotoxizität aufweisen, aber weniger proliferativ sind. Aktuelle Studien deuten darauf hin, dass die TCF1⁺ T-Zellen die TCF1^{neg} T-Zellen im Tumorgewebe hervorbringen und dass dieser Prozess für die Aufrechterhaltung einer effektiven T-Zell-Antwort essenziell ist^{135-138,141}.

Um zu bestätigen, dass auch in *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}-Tumoren diese zwei T-Zell-Subsets vorliegen, wurden die intratumoralen CD8⁺ T-Zellen an Tag 8 nach Tumortransplantation durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 16A). Im Tumorgewebe konnten so eine TCF1⁺ und eine TIM-3⁺ CD8⁺ T-Zellpopulation identifiziert werden, die beide wesentliche Marker für tumorreaktive T-Zellen exprimierten, wie den Aktivierungsmarker CD44, den Transkriptionsfaktor TOX, und PD-1 (Abb. 16A). TIM-3⁺ CD8⁺ T-Zellen wiesen außerdem eine hohe Expression des Chemokinrezeptors CXCR6 und des zytotoxischen Effektormoleküls GzmB auf und produzierten nach Restimulation die Zytokine IFN γ und TNF (Abb. 16A). Im Einklang mit ihrem Effektor-Phänotyp zeigten die TIM-3⁺ CD8⁺ T-Zellen eine starke Antigen-spezifische Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen (Abb. 16B). Im Gegensatz dazu exprimierten die TCF1⁺ CD8⁺ T-Zellen kaum CXCR6 und GzmB, produzierten nur geringe Mengen an IFN γ und TNF und zeigten keine zytotoxische Funktion (Abb. 16A,B). Sie exprimierten CD62L (Abb. 16A) und zeigten verglichen mit TIM-3⁺ T-Zellen eine überlegene proliferative Kapazität nach Restimulation (Abb. 16C).

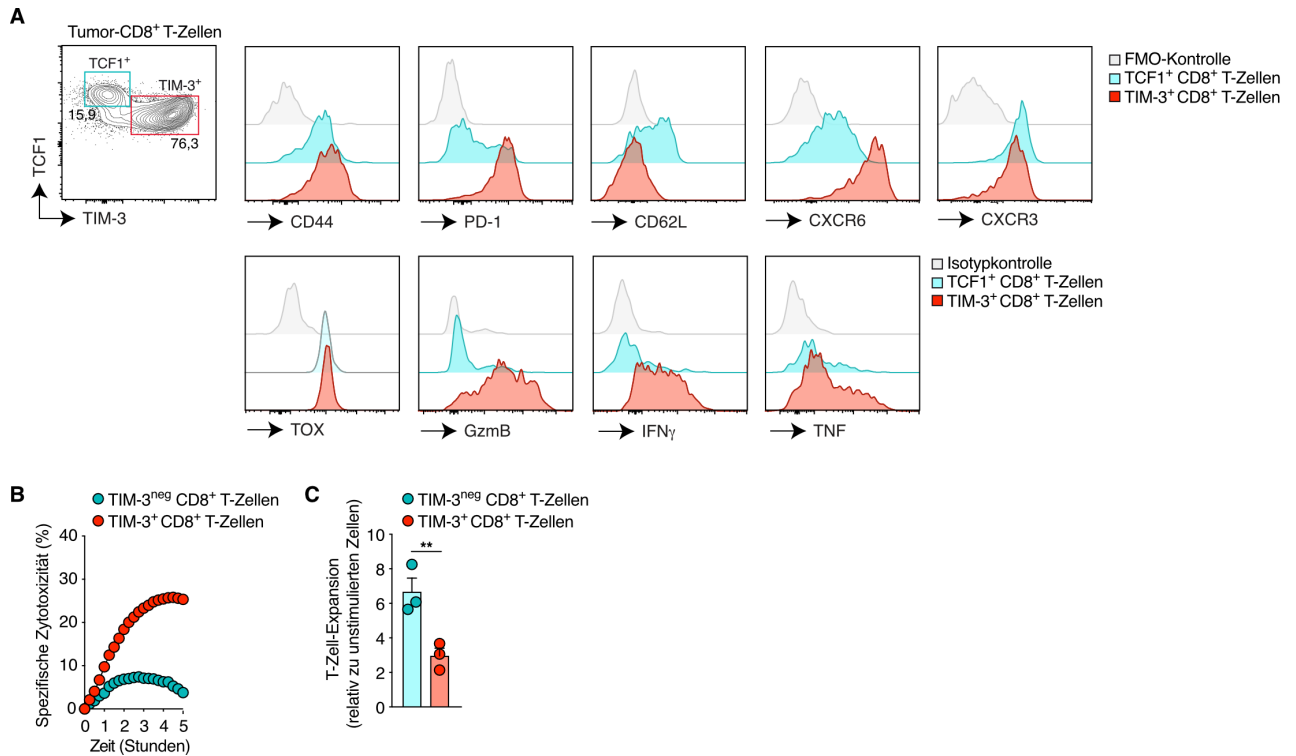


Abbildung 16: Phänotypisierung und funktionelle Analyse von intratumoralen CD8⁺ T-Zellen. (A) 2×10^6 *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAFV^{600E}-Zellen wurden in WT-Mäuse transplantiert. Acht Tage später wurden die intratumoralen stem-like TCF1⁺CD8⁺ T-Zellen und die differenzierten effector-like TIM-3⁺CD8⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Die Expression von CD44, PD-1, CD62L, CXCR6 und CXCR3 wurde durch Oberflächenfärbung gemessen, die Expression von TOX und GzmB und die Produktion von IFN γ und TNF durch eine intrazelluläre Färbung nach *ex vivo* Restimulation mit α CD3/ α CD28. FMO, Fluorescence minus one. (B, C) 1×10^3 naive OVA-spezifische CD45.1⁺ OT-I T-Zellen wurden in WT-Mäuse transferiert, denen danach 2×10^6 *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAFV^{600E}-OVA-Zellen transplantiert wurden. Acht Tage später wurden die TIM-3⁺CXCR6⁺(TCF1^{neg}) und TIM-3^{neg}CXCR6^{neg}(TCF1⁺) OT-I-Zellen aus den Tumoren gesortet und auf ihre (B) Zytotoxizität gegenüber OVA-exprimierenden BRAFV^{600E}-Tumorzellen und (C) ihre Kapazität zur Expansion nach α CD3/ α CD28-Stimulation getestet. (A, B) zeigen repräsentative Daten aus einem von mindestens zwei unabhängigen Experimenten. Daten in (C) zeigen den Mittelwert \pm SEM aus einem von zwei unabhängigen Experimenten. ** $p < 0,01$.

3.3.2 Stem-like CD8⁺ T-Zellen sind in cDC1-CD8⁺ T-Zell-Clustern lokalisiert

Um zu untersuchen, ob die für ihre Effektor-Differenzierung notwendige intratumorale Stimulation der stem-like TCF1⁺CD8⁺ T-Zellen in Clustern mit cDC1 stattfindet, wurde die Lokalisierung der verschiedenen T-Zell-Subsets relativ zu cDC1 in *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAFV^{600E}-ZsG-Tumoren analysiert. Zur Unterscheidung der beiden T-Zell-Subsets wurden hierbei TCF1 und CXCR6 genutzt (Abb. 17A).

Diese Analysen zeigten, dass stem-like TCF1⁺ T-Zellen fast ausschließlich im Stroma lokalisiert waren (Abb. 17B,C) und dort häufig in Clustern mit cDC1 interagierten (Abb. 17D,E). CXCR6⁺TCF1^{neg} effector-like T-Zellen waren dagegen hauptsächlich im Tumor-Parenchym lokalisiert und interagierten nur selten mit cDC1 (Abb. 17B-E).

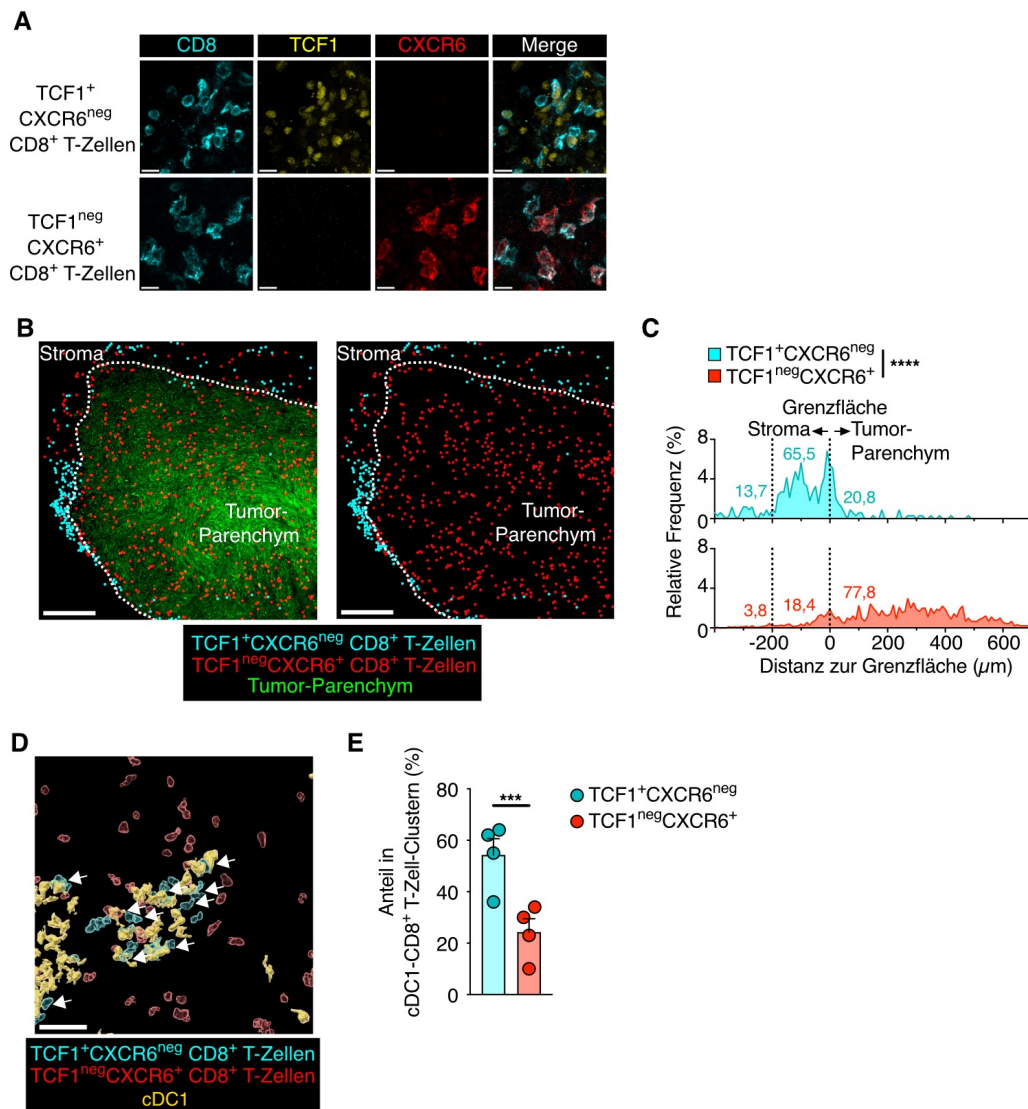


Abbildung 17: Die Amplifizierung von TCF1⁺CD8⁺ T-Zell-Antworten findet in intratumoralen cDC1-CD8⁺ T-Zell-Clustern statt. (A-E) Mikroskopische Analyse von TCF1⁺CXCR6^{neg} und TCF1^{neg}CXCR6⁺ CD8⁺ T-Zellen in *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}-ZsG-Tumoren aus WT-Mäusen an Tag 8. (A) Bilder der Färbung der beiden T-Zell-Subsets. Merge, Überlagerung aller Kanäle. Scalebar 10μm. (B) Visualisierung der Lokalisierung der T-Zell-Subsets nach 3D Zell-Rendering. Scalebar 300μm. (C) Distanzanalyse basierend auf den Analysen aus (B). (D) Visualisierung von T-Zell-Subsets und cDC1. Pfeile heben TCF1⁺CXCR6^{neg} T-Zellen hervor, die mit cDC1 interagieren. Scalebar 50μm. (E) Quantifizierung der T-Zell-Subsets in cDC1-CD8⁺ T-Zell-Clustern über vier Bilder von ganzen Tumorschnitten. Gezeigt ist der Mittelwert ± SEM. (A-D) zeigen Daten für einen repräsentativen Tumor von mindestens drei Tumoren aus zwei unabhängigen Experimenten. ***p < 0,001; ****p < 0,0001.

3.3.3 Die lokale Stimulation in intratumoralen Clustern ist notwendig für eine protektive Antitumor-Immunantwort

Als Nächstes sollte bestätigt werden, dass die TCF1⁺ CD8⁺ T-Zellen auf die Stimulation in den Clustern hin TIM-3⁺TCF1^{neg} CD8⁺ T-Zellen hervorbringen. Hier konnte der Umstand genutzt werden, dass an Tag 6 des Tumorwachstums bereits TCF1⁺ CD8⁺ T-Zellen im Tumor zu finden sind, aber noch keine TIM-3⁺ T-Zellen (Abb. 18A). WT-Mäuse mit *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}-Tumoren wurden ab Tag 6 mit dem Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptorantagonisten FTY720 behandelt, der die Einwanderung neuer aktivierter Tumor-spezifischer CD8⁺ T-Zellen aus dem drainierenden Lymphknoten in den Tumor verhindert¹⁸⁸. In diesen Mäusen konnte keine Verminderung der intratumoralen Entwicklung der TIM-3⁺ CD8⁺ T-Zellen beobachtet werden (Abb. 18A), auch wenn die Gesamtzellzahlen verglichen mit unbehandelten Mäusen reduziert waren (Abb. 18B). Im Gegensatz dazu führte eine Inhibierung der initialen Tumordinfiltration durch TCF1⁺ CD8⁺ T-Zellen durch die Gabe von FTY720 ab Tag 1 zu einem völligen Verlust der intratumoralen T-Zell-Expansion (Abb. 18B). Aus diesen und den vorangegangenen Ergebnissen konnte geschlossen werden, dass die Effektor-Differenzierung Tumor-spezifischer CD8⁺ T-Zellen lokal im Tumorgewebe stattfindet und von den intratumoralen TCF1⁺ T-Zellen ausgeht. Im Einklang mit dieser Schlussfolgerung wurde beobachtet, dass eine lokale Stimulation von stem-like TCF1⁺ CD8⁺ T-Zellen ab Tag 6 des Tumorwachstums ausreicht, um das Tumorwachstum erfolgreich zu kontrollieren, und nicht auf die Infiltration weiterer T-Zellen aus dem Lymphknoten angewiesen ist (Abb. 18C).

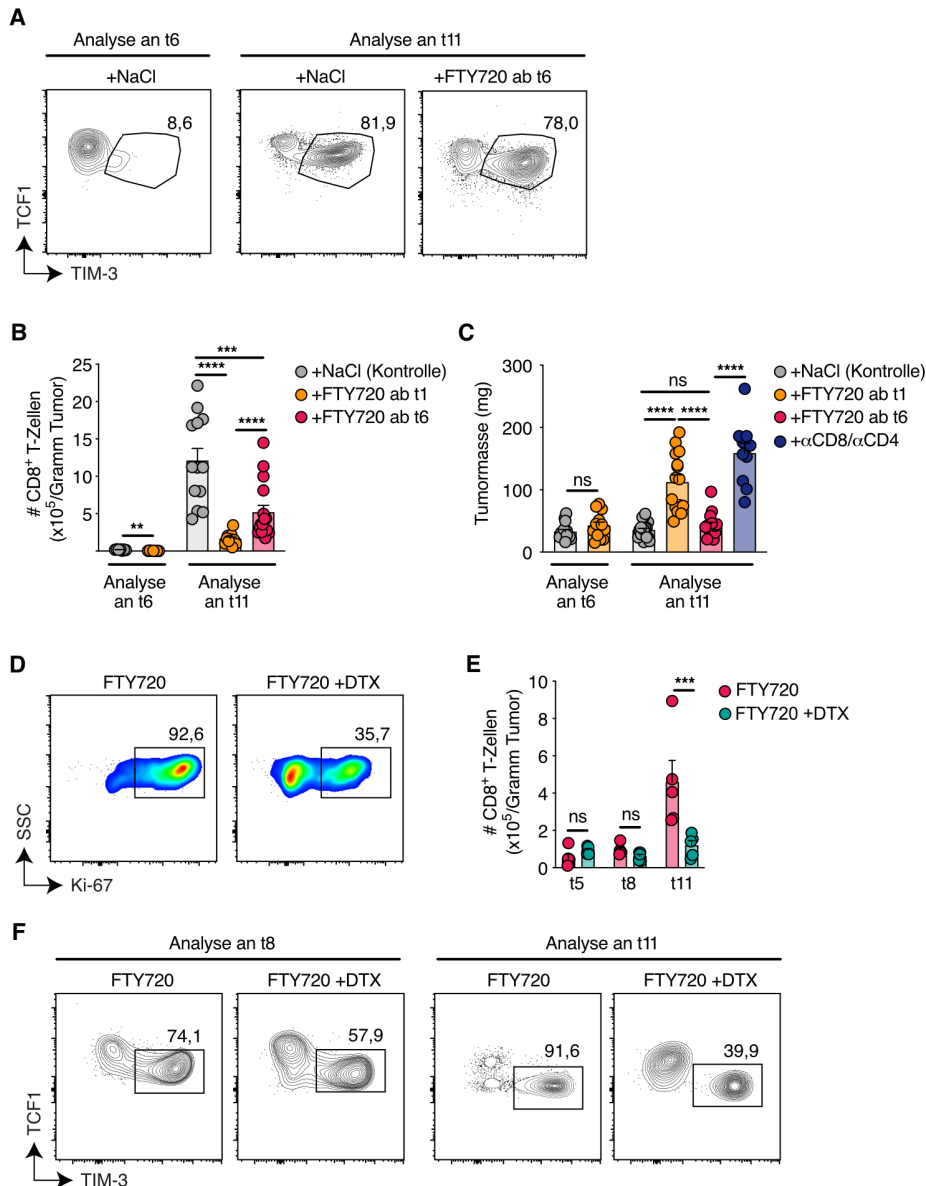


Abbildung 18: Protektive Antitumor-Immunantworten erfordern eine intratumorale Stimulation von CD8⁺ T-Zellen durch cDC1. (A-C) WT-Mäuse mit *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}-Tumoren wurden mit FTY720 oder NaCl als Kontrolle behandelt. (A) Analyse der TIM-3⁺ effektorlike CD8⁺ T-Zell-Differenzierung in den Tumoren. t, Tag. (B) Quantifizierung der intratumoralen CD8⁺ T-Zellzahlen (n=7-16 pro Gruppe). (C) Analyse der Tumormasse (n=10-19 pro Gruppe). (D-F) *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}-Tumorzellen wurden in XCR1^{DTR-Venus}-Mäuse transplantiert, die mit FTY720 (Tag 5) und DTX oder PBS (Tag 5, 7 und 9) behandelt wurden. CD8⁺ T-Zellen im Tumor wurden untersucht auf (D) Ki-67-Expression an Tag 8, (E) Gesamtzellzahlen (n=5) und (F) Effektor-Differenzierung an den angegebenen Zeitpunkten. (A, D und F) zeigen repräsentative Daten für mindestens drei Tumoren aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Daten in (B, C und E) wurden aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten gebündelt und sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. Jeder Punkt repräsentiert einen Tumor. ns, nicht signifikant; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001.

Abschließend sollte bewiesen werden, dass cDC1 für diese lokale Stimulation unerlässlich sind. Zu diesem Zweck wurden *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}-Tumoren in XCR1^{DTR-Venus}-Mäuse transplantiert, in denen durch Gabe von Diphtherietoxin (DTX) eine Depletion aller cDC1 erzielt werden kann. Um Prozesse außerhalb des Tumors auszuschließen und nur die intratumorale Stimulation zu analysieren, wurden auch diese Mäuse mit FTY720 behandelt. Eine Depletion der cDC1 ab Tag 5 des Tumorwachstums resultierte in diesem Modell in einer Verminderung der intratumoralen Proliferation der CD8⁺ T-Zellen (Abb. 18D). Dementsprechend blieben die CD8⁺-Zellzahlen in Tumoren ohne cDC1 gering (Abb. 18E), und die Effektor-Differenzierung von TCF1⁺CD8⁺ T-Zellen zu TIM-3⁺CD8⁺ T-Zellen war in Abwesenheit von cDC1 stark eingeschränkt (Abb. 18F). Insgesamt weisen die Ergebnisse auf einen sequenziellen Prozess hin, bei dem sich zunächst an der Grenze zwischen Stroma und Parenchym Cluster aus intratumoralen cDC1 und infiltrierenden stem-like TCF1⁺CD8⁺ T-Zellen bilden, in denen dann die T-Zellen durch cDC1 aktiviert werden und zu effector-like TIM-3⁺CD8⁺ T-Zellen differenzieren. Dieser im TMM stattfindende Prozess ist essenziell für eine produktive Antitumor-Immunantwort.

3.4 Die räumliche Organisation der cDC1-CD8⁺ T-Zell-Interaktionen ist in humanen Tumoren konserviert

Die Erkenntnisse zu den intratumoralen Interaktionen zwischen cDC1 und CD8⁺ T-Zellen sollten von präklinischen Modellen auf Krebspatienten übertragen werden. Dazu wurden Tumorbiopsien 18 unbehandelter Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs (HNSCC; engl. *head and neck squamous cell carcinoma*) untersucht. Ähnlich wie bei Melanomen ist auch bei HNSCC das Vorkommen von cDC1 und CD8⁺ T-Zellen in den Tumoren mit einer besseren Prognose assoziiert¹¹⁵. Die Untersuchung der räumlichen Organisation der Immunzellen im Tumor wurde analog zu den Analysen des murinen Melanommodells mittels volumetrischer Mikroskopie und 3D-Zell-Rendering durchgeführt (Abb. 19A) und ergab, dass in 15 der 18 Patientenproben cDC1-CD8⁺ T-Zell-Cluster vorlagen (Abb. 19B).

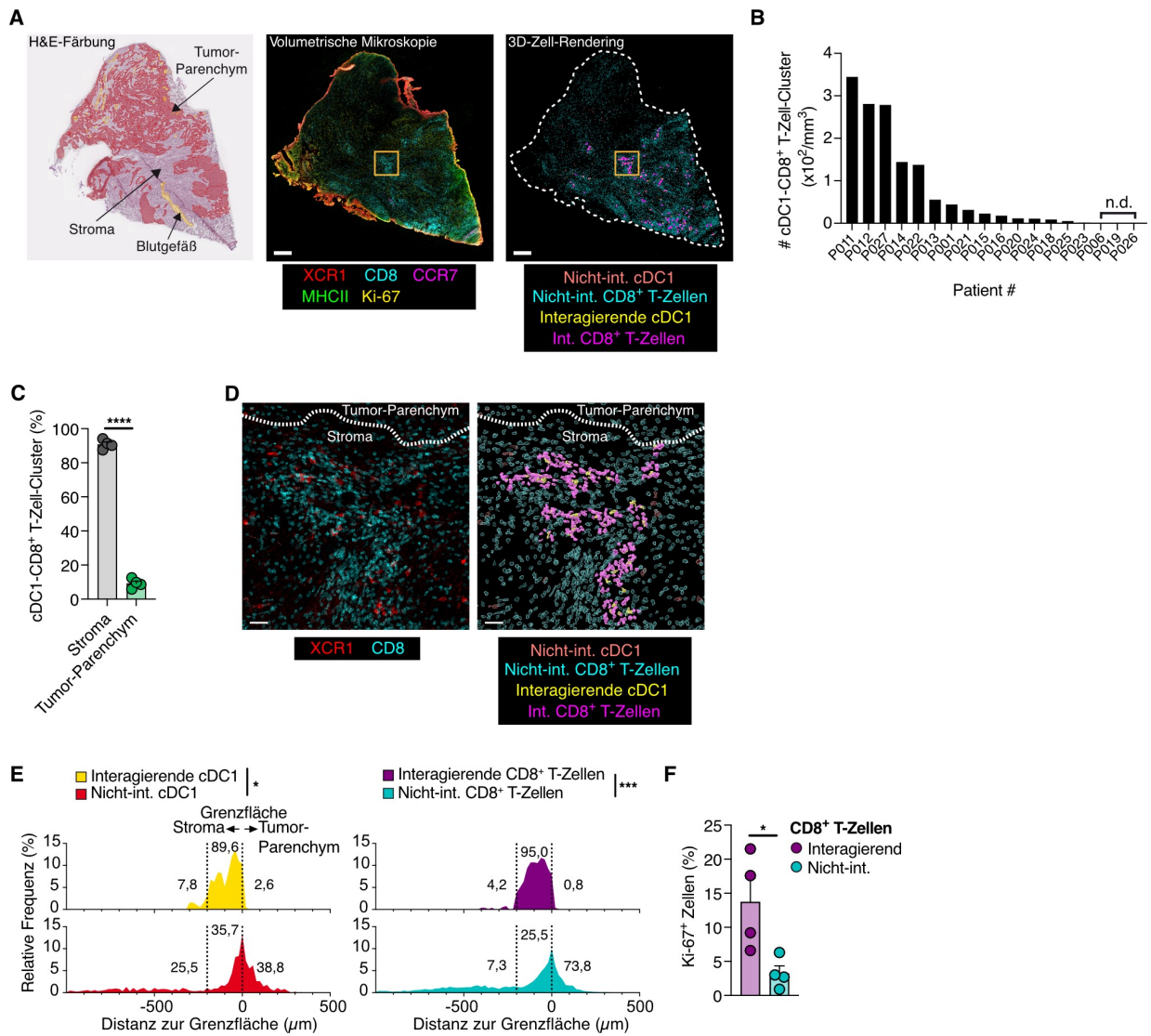


Abbildung 19: cDC1-CD8⁺ T-Zell-Cluster bilden eine Nische für T-Zell-Proliferation in humanen HNSCC-Tumoren. (A) HNSCC-Tumorbiopsie. H&E-Färbung zur Unterscheidung von Stroma und Tumor-Parenchym (links), Immunzellfärbung mittels volumetrischer Mikroskopie (Mitte) und Visualisierung der cDC1 und CD8⁺ T-Zellen per Zell-Rendering (rechts). Die orange markierte Region ist vergrößert in (D) gezeigt. Scalebar 500μm. **(B)** Quantifizierung der cDC1-CD8⁺ T-Zell-Cluster in Bildern von ganzen Tumorschnitten aus Biopsien von HNSCC-Patienten (n=18). **(C)** Analyse der Lokalisierung der cDC1-CD8⁺ T-Zell-Cluster für die vier Biopsien mit den meisten Clustern. **(D)** Beispielbild zur stromalen Lokalisierung der cDC1-CD8⁺ T-Zell-Cluster. Gestrichelte Linien zeigen die Grenzfläche zwischen Stroma und Parenchym. Scalebar 50μm. **(E)** Distanzanalyse basierend auf einem Bild einer ganzen HNSCC-Tumorbiopsie. **(F)** Analyse der Ki-67-Expression in CD8⁺ T-Zellen für die vier Biopsien mit den meisten Clustern. (A, D und E) zeigen Daten einer repräsentativen Tumorbiopsie. Die Daten in (C und F) zeigen den Mittelwert ± SEM. *p < 0,05; ***p < 0,001; ****p < 0,0001.

Entsprechend der beschriebenen intratumoralen Heterogenität humaner Tumoren¹⁸⁹ variierte die Anzahl der cDC1-CD8⁺ T-Zell-Cluster zwischen Patienten stark (Abb. 19B). Die Cluster waren bemerkenswerterweise auch in den Tumorbiopsien fast ausschließlich im Stroma nahe der Grenzfläche zwischen Stroma und Parenchym lokalisiert (Abb. 19C-E). Außerdem konnte wie in den murinen Tumoren eine starke Ki-67-Expression in den in Cluster interagierenden CD8⁺ T-Zellen beobachtet werden, nicht aber in den nicht-interagierenden CD8⁺ T-Zellen (Abb. 19F).

Es konnte keine Korrelation zwischen der Anzahl der cDC1-CD8⁺ T-Zell-Cluster und dem Combined Positive Score (CPS) gemessen werden (Abb. 20A), einem klinischen Parameter, der über die Expression von PD-L1 im Tumor die Eignung von Patienten für eine anti-PD-1 ICI-Therapie bestimmen soll¹⁷⁵. Im Gegensatz dazu korrelierte die Clusteranzahl invers mit dem Tumorstadium (Abb. 20B), was andeutete, dass progressives Tumorstadium mit einem Verlust der cDC1-CD8⁺ T-Zell-Cluster einhergeht.

Zusammengefasst konnten also in einer Subgruppe der analysierten Patienten die zentralen Merkmale einer räumlichen Organisation von cDC1 und CD8⁺ T-Zellen identifiziert werden, die in murinen Tumormodellen mit einer protektiven Antitumor-Immunantwort assoziiert sind.

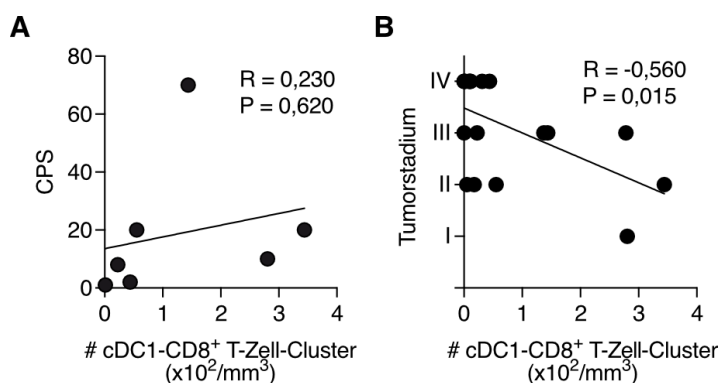


Abbildung 20: Zusammenhang der cDC1-CD8⁺ T-Zell-Cluster in humanen HNSCC mit klinischen Parametern. Korrelation zwischen der Menge an cDC1-CD8⁺ T-Zell-Clustern mit (A) der intratumoralen PD-L1-Expression, gemessen als Combined Positive Score¹⁷⁵ (CPS)(n=7) und mit (B) dem Tumorstadium (n=18).

3.5 Intratumorale cDC1-CD8⁺ T-Zell-Cluster werden von einer immunostimulatorischen cDC1-Subpopulation gebildet

3.5.1 Charakterisierung der cDCs in *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}-Tumoren

Es wurde beschrieben, dass CCR7⁺ cDC1 für die intratumorale Stimulation von effector-like TIM-3⁺CD8⁺ T-Zellen notwendig sind¹⁴². In dem hier analysierten Melanommodell floss die CCR7-Expression der intratumoralen cDC1 allerdings kaum in die Ausgangsvorhersage des Deep-Learning-Modells ein (Abb. 21A), was die Vermutung nahelegte, dass an der Clusterbildung und Aktivierung der TCF1⁺CD8⁺ T-Zellen andere cDC1 beteiligt sind als die CCR7⁺ cDC1. Zur Bestätigung dieser Hypothese wurden zunächst die cDCs aus *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}-Tumoren mittels scRNA-Seq charakterisiert. Hierbei konnten fünf cDC-Cluster identifiziert werden, von denen zwei deutlich kanonische Marker für cDC1 exprimierten (Abb. 21B,C). cDC1 in Cluster 1 exprimierten hohe Mengen an *Havcr2*, *Ccl3* und *Ccl4*, aber keinerlei Marker, die mit der Reifung von cDC1 assoziiert sind (Abb. 21D), was sie als unreife cDC1 identifizierte. cDC1 in Cluster 2 waren durch eine geringere Expression kanonischer cDC1-Marker gekennzeichnet (Abb. 21C). Aufgrund ihrer hohen Expression von costimulatorischen Molekülen (*Cd40* und *Cd86*) und Genen, die mit Antigenpräsentation assoziiert sind (*Ciita*, *Tap1* und *Tap2*), wurden diese cDC1 als reif identifiziert. Die cDC1 in Cluster 2 zeigten außerdem eine einzigartige Expression der Chemokine *Cxcl9* und *Cxcl10* (Abb. 21D,E), was auf einen immunostimulatorischen cDC1-Zustand schließen ließ. cDCs in Cluster 3 exprimierten kaum kanonische Marker für cDC1 oder cDC2 (Abb. 21C), aber zeigten eine einzigartige Expression von *CCR7*, *Fscn1* und *Il12b* sowie von co-inhibitorischen Rezeptoren (z.B. *Cd274* und *Tigit*) (Abb. 21D,E), was auf einen reifen, migratorischen cDC-Zustand hinwies. Diese reifen cDCs mit einer stark ausgeprägten migratorischen Signatur, aber kaum Expression kanonischer Marker, wurden bereits von anderen Gruppen als „mregDC“¹⁴⁴ oder „DC3“¹⁴⁷ in Tumoren beschrieben. Im Nachfolgenden werden die drei funktional unterschiedlichen cDC1-Zustände aus den Clustern 1-3 als „Subpopulationen“ bezeichnet.

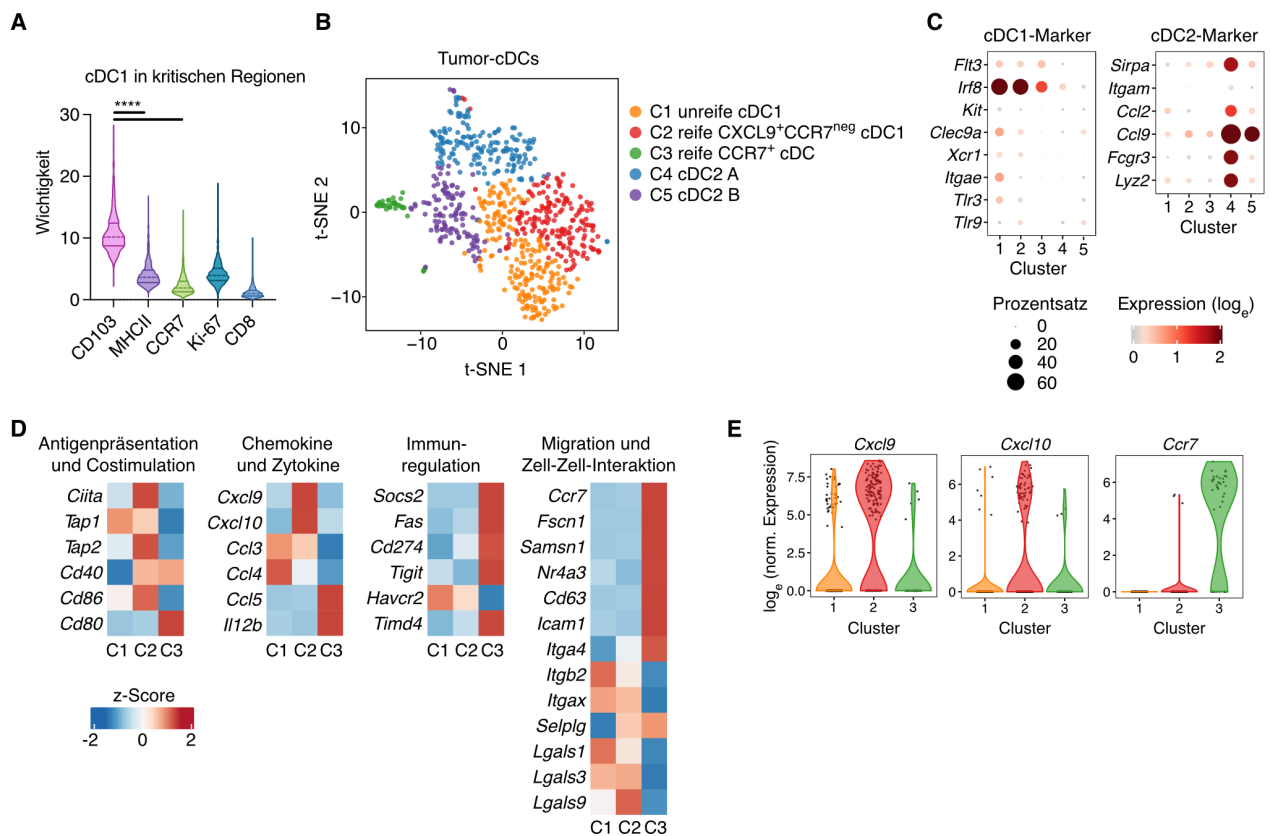


Abbildung 21: Heterogenität von cDC1 im TMM von *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}-Tumoren. (A) Beitrag der Moleküle, die von cDC1 in RKIs im Tumor exprimiert werden, zur Genauigkeit des Deep-Learning-Modells. Gezeigt ist ein repräsentativer *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}-Tumor. (B-E) Intratumorale cDCs wurden an Tag 6 aus *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}-Tumoren aus WT-Mäusen gesortet und mithilfe des BD Rhapsody Single-Cell Analysesystems für scRNA-Seq prozessiert. (B) t-SNE-Plot mit cDC-Clustern. Identifizierung der Cluster basiert auf den Einzelzell-Transkriptomen. (C) Expression kanonischer Markergene zur Unterteilung der Cluster in cDC1 und cDC2. (D) Expressionslevel ausgewählter Immungenen. (E) Geigenplots zur Darstellung der unterschiedlichen Expression ausgewählter charakteristischer Marker für Cluster 1 bis 3.

Mithilfe von CCR7^{GFP}-Reporter-mäusen zur Identifizierung der migratorischen Subpopulation und MHCII als Marker für die Reifung der cDC1 konnte die Existenz der drei cDC1-Subpopulationen durchflusszytometrisch im BRAF^{V600E}-Melanommodell bestätigt werden (Abb. 22A). Hierbei korrelieren die cDC1 mit niedriger MHCII-Expression („MHCII^{lo} cDC1“) mit den unreifen cDC1 aus Cluster 1 in der scRNA-Seq, die CCR7^{neg} cDC1 mit einer hohen MHCII-Expression („MHCII^{hi}CCR7^{neg} cDC1“) mit den immunstimulatorischen cDC1 aus Cluster 2 und die CCR7⁺ cDC1 mit den cDCs in Cluster 3. Die Erkenntnisse über die drei Subpopulationen suggerierten, dass sich in Tumoren zwei verschiedene Populationen reifer cDC1 aus unreifen cDC1 entwickeln können, nämlich die bereits beschriebene migratorische Subpopulation, die stimulatorische und inhibitorische Moleküle exprimiert¹⁴⁴⁻¹⁴⁷, und eine bislang

unbekannte nicht-migratorische Subpopulation mit einer immunostimulatorischen Signatur. In Übereinstimmung mit dieser Annahme entwickelten sich aus den unreifen cDC1 aus einer *in vitro* Knochenmarkskultur nach Stimulation mit Tumorzellen oder dem TLR3-Agonisten Poly(I:C) sowohl MHCII^{hi}CCR7^{neg} cDC1 als auch CCR7⁺ cDC1 (Abb. 22B,C).

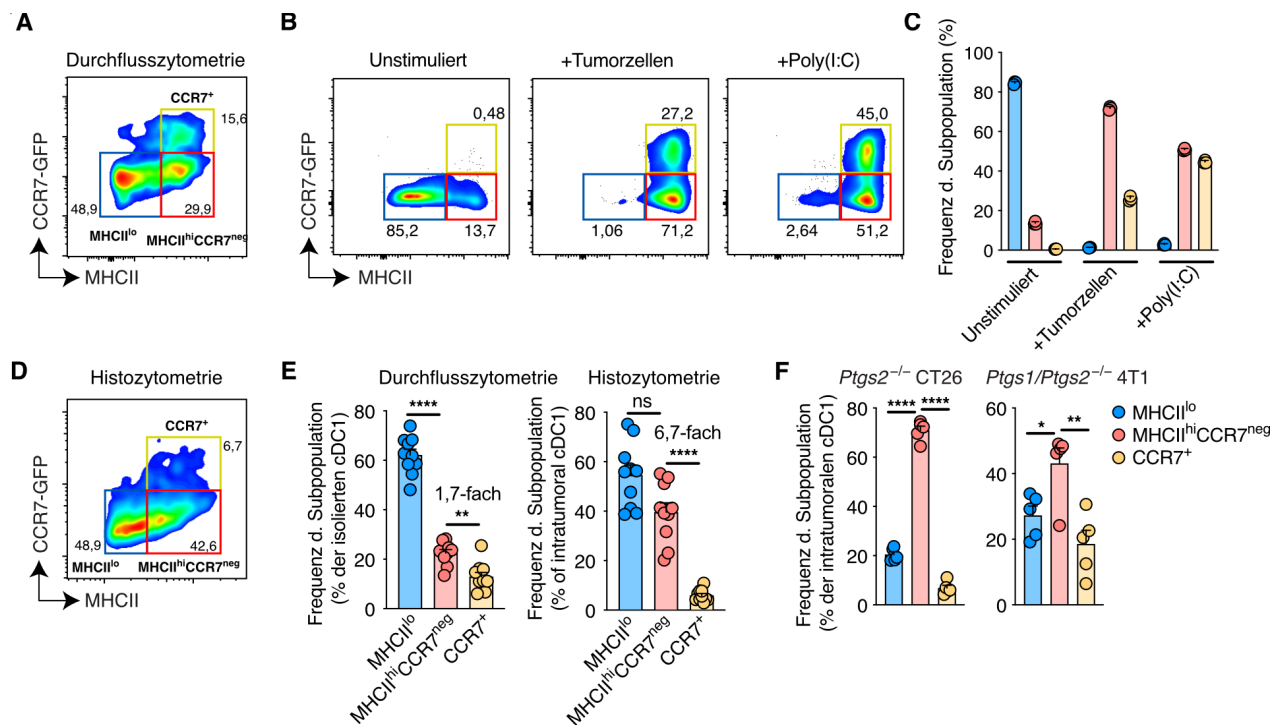


Abbildung 22: Identifizierung der drei intratumoralen cDC1-Subpopulationen *ex vivo*. (A) Durchflusszytometrische Identifizierung der cDC1-Subpopulationen in *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}-Tumoren aus CCR7^{GFP}-Mäusen. (B) Unreife MHCII^{lo} cDC1 aus einer *in vitro* DC-Kultur wurden gesortet und mit Tumorzellen oder poly(I:C) stimuliert. Die Expression der Subpopulationsmarker wurde durchflusszytometrisch analysiert. (C) Quantifizierung basierend auf den Analysen in (B)(n=3). (D) Histozytometrische Identifizierung der cDC1-Subpopulationen auf Bildern von ganzen *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}-Tumoren aus CCR7^{GFP}-Mäusen. (E) Quantifizierung der cDC1-Subpopulationen mittels Durchflusszytometrie von isolierten Zellen versus *in situ* Histozytometrie (n=10). (F) Frequenz der cDC1-Subpopulationen, bestimmt mittels Durchflusszytometrie der isolierten intratumoralen Immunzellen aus *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-} 4T1-Brustkrebstumoren (n=5) und *Ptgs2*^{-/-} CT26-Kolonkarzinomen (n=5) aus Wildtyp-BALB/c-Mäusen. (A, B und D) zeigen einen repräsentativen von mindestens drei Tumoren aus zwei unabhängigen Experimenten. (C) zeigt ein repräsentatives von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Daten in (E, F) sind gebündelt aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten. Jeder Punkt repräsentiert einen Tumor. Gezeigt ist der Mittelwert ±SEM. ns, nicht signifikant; *p < 0,05; **p < 0,01; ****p < 0,0001.

Die drei Subpopulationen konnten mithilfe von CCR7^{GFP}-Mäusen und einer MHCII-Färbung auch mikroskopisch in Tumoren identifiziert werden (Abb. 22D). Bei der Quantifizierung der Frequenzen der Subpopulationen mittels Durchflusszytometrie isolierter Zellen oder mittels Histozytometrie auf Mikroskopiebildern (Abb. 22E) wurde deutlich, dass die MHCII^{hi}CCR7^{neg} cDC1 verglichen mit den CCR7⁺ cDC1 in der Überzahl waren. Dieser Unterschied wurde vor allem in der histozytometrischen Analyse deutlich, während er in der durchflusszytometrischen Analyse geringer ausgeprägt war (Abb. 22E), was auf die Zellisolation zurückzuführen sein könnte. Abschließend konnte die Existenz der drei cDC1-Subpopulationen in zwei weiteren Regressor-Tumormodellen bestätigt werden (Abb. 22F).

3.5.2 Immunostimulatorische cDC1 formen Cluster mit CD8⁺ T-Zellen

Nach der Identifizierung der drei cDC1-Subpopulationen sollte untersucht werden, welche der drei Subpopulationen die Stimulation von CD8⁺ T-Zellen in den Clustern orchestriert. Dazu wurde die Lokalisierung der verschiedenen Subpopulationen mithilfe von volumetrischer Mikroskopie verglichen. Während die unreifen MHCII^{lo} cDC1 in zentralen (parenchymalen) Tumorregionen verteilt waren, waren die beiden reifen cDC1-Subpopulationen in peripheren (stromalen) Tumorregionen lokalisiert (Abb. 23A). Durch Analysen von ganzen Tumorbildern, aber auch von einzelnen Clustern konnte aufgedeckt werden, dass der Großteil der in Clustern interagierenden cDC1 zur Subpopulation der MHCII^{hi}CCR7^{neg} cDC1 gehört (Abb. 23B,C), was darauf hinweist, dass diese Subpopulation die Clusterbildung und Stimulation von TCF1⁺CD8⁺ T-Zellen vorantreibt. Für diese Annahme sprachen auch Distanzanalysen, die zeigten, dass MHCII^{hi}CCR7^{neg} cDC1 in engem Kontakt mit proliferierenden CD8⁺ T-Zellen sind, was für CCR7⁺ und unreife MHCII^{lo} cDC1 nicht der Fall war (Abb. 23D). Bei der Analyse der cDC1-CD8⁺ T-Zell-Cluster über die gesamte Dauer des Tumorwachstums war zu jedem Zeitpunkt hauptsächlich die MHCII^{hi}CCR7^{neg} cDC1-Subpopulation in den Clustern zu finden (Abb. 23E).

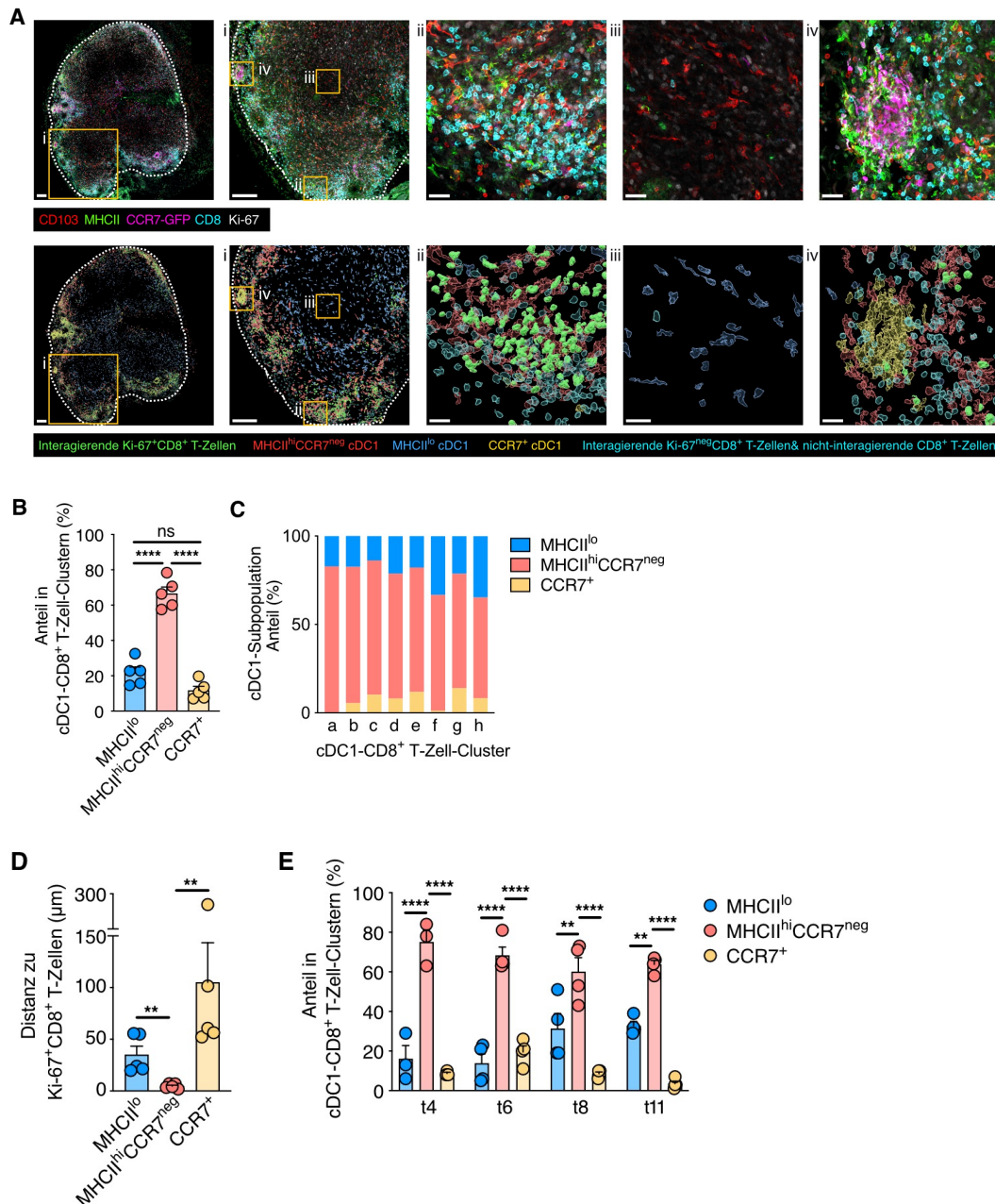


Abbildung 23: cDC1-CD8⁺ T-Zell-Cluster werden von der MHCII^{hi}CCR7^{neg} cDC1-Subpopulation gebildet. (A-E) Analyse der Lokalisierung der cDC1-Subpopulationen in *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}-Tumoren aus CCR7^{GFP}-Mäusen mittels volumetrischer Mikroskopie an Tag 6 oder zu den angegebenen Zeitpunkten. **(A)** Lokalisierung der cDC1-Subpopulationen relativ zu proliferierenden CD8⁺ T-Zellen in einem repräsentativen Tumor. Volumetrische Mikroskopie (oben) und Visualisierung der Immunzellen mittels Zell-Rendering (unten). Scalebars 200 μ m (Übersicht und Zoom-In i) und 30 μ m (ii, iii und iv). Gestrichelte Linien zeigen den Tumorrand. Orangene Quadrate markieren die vergrößerten Regionen. **(B, C)** Quantifizierung der Frequenzen der cDC1-Subpopulationen in cDC1-CD8⁺ T-Zell-Cluster für **(B)** ganze Tumorschnitte (n=5) und **(C)** acht individuelle Cluster innerhalb eines Tumors. **(D)** Distanzanalyse basierend auf den Analysen in (B). **(E)** Wie in (B), aber für unterschiedliche Zeitpunkte des Tumorwachstums (n=3-4 pro Gruppe). t, Tag. (A, C) zeigen Daten eines repräsentativen von mindestens drei Tumoren aus zwei unabhängigen Experimenten. Daten in (B, D und E) sind gebündelt aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten und als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Jeder Punkt repräsentiert einen Tumor. **p < 0,01; ****p < 0,0001.

Laut der Analysen aus der scRNA-Seq exprimierten die reifen CCR7⁺ cDC1 als einzige Subpopulation hohe Mengen an *Fscn1* (Abb. 24D), einem Gen, das wie CCR7 mit Migration assoziiert ist. Es konnte mikroskopisch bestätigt werden, dass außer den CCR7⁺ cDC1 keine andere Subpopulation eine nennenswerte Proteinexpression von FSCN1 aufwies (Abb. 24A,B), sodass die FSCN1-Expression als Ersatz für CCR7 zur Identifizierung der reifen, migratorischen cDC1-Subpopulation genutzt werden konnte. Dieser Umstand ermöglichte es, auch in murinen Tumormodellen, die nicht für CCR7^{GFP}-Reporterermäuse syngene sind, zu quantifizieren, welche cDC1-Subpopulation vornehmlich in den Clustern lokalisiert ist. Analog zur Benennung der cDC1-Subpopulationen in BRAF^{V600E}-Melanomen werden die reifen cDC1-Populationen in diesem Fall als „MHCII^{hi}FSCN1^{neg} cDC1“ und „FSCN1⁺ cDC1“ bezeichnet. In Regressor-Tumormodellen für Darm-, Brust- und Pankreaskrebs bestätigte sich, dass in den Clustern überwiegend die reife, nicht-migratorische MHCII^{hi}FSCN1^{neg} Subpopulation mit CD8⁺ T-Zellen interagiert (Abb. 24C). Auch in den wenigen Clustern, die sich in den progressiv wachsenden Melanomen von genetisch modifizierten BRaf^{CA}-Mäusen bilden, waren fast ausschließlich MHCII^{hi}FSCN1^{neg} cDC1 lokalisiert (Abb. 24D,E). Insgesamt deuteten diese Daten darauf hin, dass immunostimulatorische MHCII^{hi}CCR7^{neg} cDC1 in einer Vielzahl von Tumormodellen cDC1-CD8⁺ T-Zell-Cluster bilden und somit eine zentrale Rolle in der Orchestrierung der Antitumor-Immunantwort spielen.

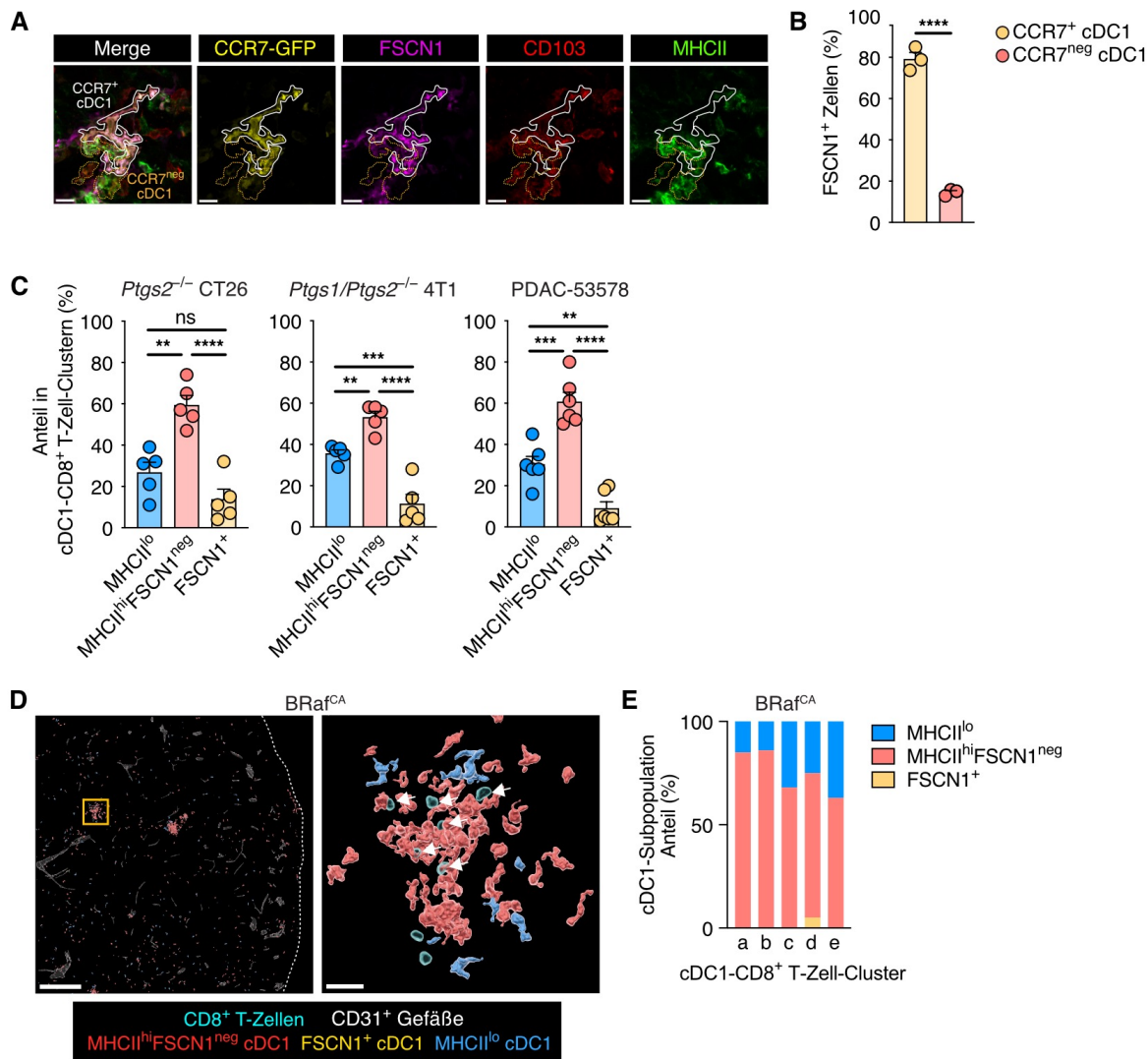


Abbildung 24: Clusterbildung durch MHCII^{hi}CCR7^{neg} cDC1 im TMM ist ein konserviertes Phänomen. (A) Analyse der FSCN1-Expression in CCR7⁺ und CCR7^{neg} cDC1 in *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAFV600E-Tumoren aus CCR7^{GFP}-Mäusen. Gestrichelte Linien zeigen einzelne cDC1. Scalebar 10µm. (B) Quantifizierung basierend auf der Analyse in (A) für n=3 Tumoren. (C) Quantifizierung der Frequenzen der cDC1-Subpopulationen in cDC1-CD8⁺ T-Zell-Clustern in Tumoren nach Transplantation von *Ptgs2*^{-/-} CT26-, *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-} 4T1- oder PDAC-53578-Tumorzellen (n=5-6 pro Gruppe). (D) Analyse der cDC1-Subpopulationen und CD8⁺ T-Zellen im Tumor einer BRAf^{CA}-Maus. Pfeile weisen auf CD8⁺ T-Zellen in Kontakt mit reifen CCR7^{neg} cDC1 (hier definiert als MHCII^{hi}FSCN1^{neg}). Das orangene Quadrat markiert die vergrößerte Region. Die gestrichelte Linie zeigt den Tumorrand. Scalebars 400µm (Übersicht) und 30µm (Zoom-In). (E) Analyse der Frequenz der cDC1-Subpopulationen in fünf repräsentativen Clustern basierend auf (D). In (C-E) wurde statt CCR7 ein FSCN1-Staining zur Unterscheidung der cDC1-Subpopulationen verwendet. (A, D) zeigen einen repräsentativen von drei Tumoren aus zwei unabhängigen Experimenten. Daten in (B, C und E) zeigen ein repräsentatives von mindestens zwei unabhängigen Experimenten. (B, C) sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. Jeder Punkt repräsentiert einen Tumor. ns, nicht signifikant; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001.

3.6 Clusterbildung und T-Zell-Stimulation durch die immunostimulatorische cDC1-Subpopulation

3.6.1 Antigenaufnahme und Kreuzpräsentation durch MHCII^{hi}CCR7^{neg} cDC1

Nachdem aufgedeckt wurde, dass die MHCII^{hi}CCR7^{neg} cDC1-Subpopulation spezifisch in den Clustern mit CD8⁺ T-Zellen lokalisiert ist, sollte untersucht werden, ob und wie diese Subpopulation die T-Zellen in den Clustern stimulieren kann. Zunächst wurde untersucht, ob die MHCII^{hi}CCR7^{neg} cDC1 in der Lage sind, Tumorantigen aufzunehmen. Dazu wurden die cDC1-Subpopulationen in *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}-ZsG-Tumoren entweder mikroskopisch oder durchflusszytometrisch auf die Aufnahme von ZsGreen untersucht (Abb. 25A,B). Diese Analysen zeigten, dass MHCII^{hi}CCR7^{neg} cDC1 in der Lage sind, Tumormaterial aufzunehmen. Auch die nicht in den Clustern lokalisierten CCR7⁺ cDC1 zeigten eine hohe Antigenaufnahme, im Gegensatz dazu nahmen die unreifen MHCII^{lo} cDC1 kaum Tumorantigen auf (Abb. 25B). Die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation der Subpopulationen wurde in cDC1 quantifiziert, die aus *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}-OVA-Tumoren isoliert und dann mit einem Antikörper spezifisch für das OVA-Peptid SIINFEKL (S8) kreuzpräsentiert auf dem MHCII-Molekül H-2Kb (S8:H2-Kb) gefärbt wurden. Die durchflusszytometrische Analyse zeigte, dass MHCII^{hi}CCR7^{neg} cDC1 Tumorantigene kreuzpräsentieren können (Abb. 25C). Auch CCR7⁺ cDC1 besitzen die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation, MHCII^{lo} cDC1 dagegen nicht (Abb. 25C).

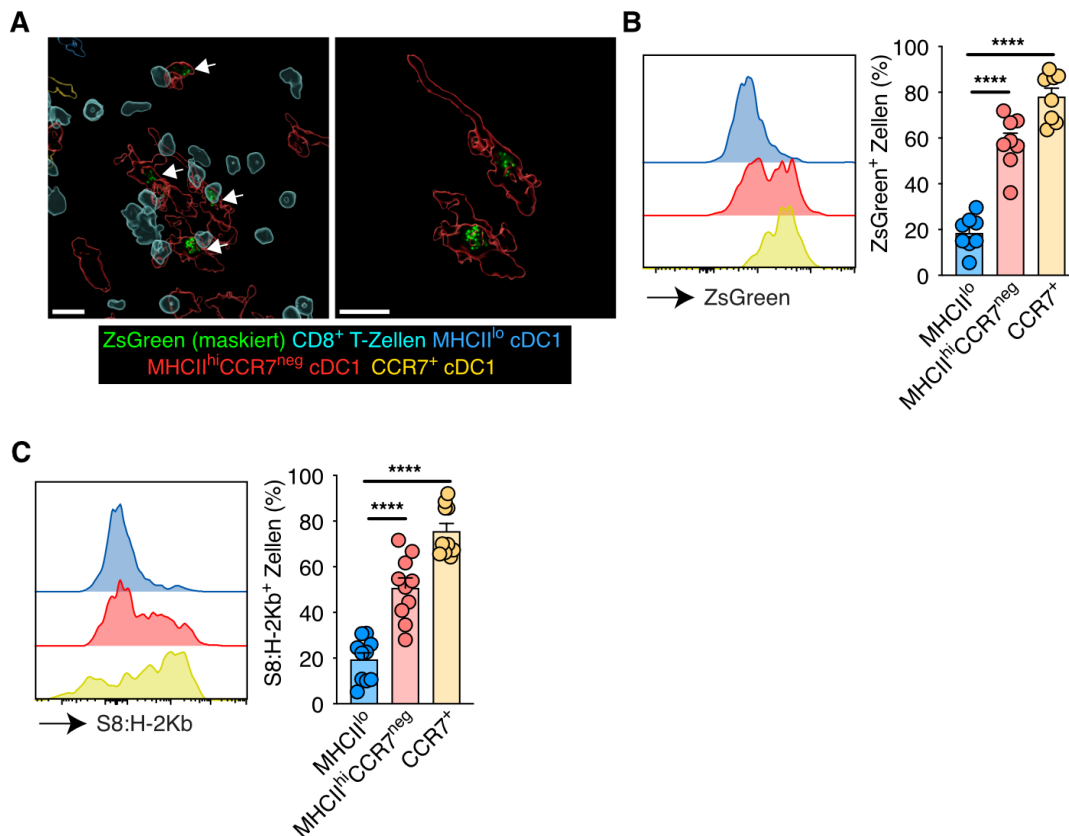
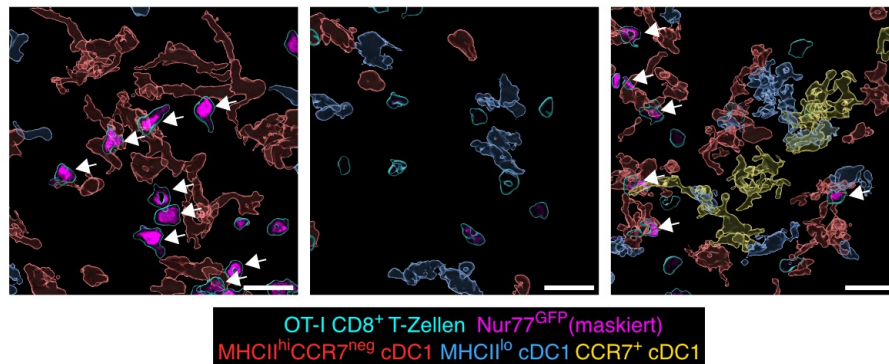


Abbildung 25: Immunostimulatorische MHCII^{hi}CCR7^{neg} cDC1 können Tumorantigene aufnehmen und kreuzpräsentieren. (A, B) Untersuchung der Tumorantigen-Aufnahme durch cDC1-Subpopulationen in *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}-ZsG-Tumoren mittels (A) Mikroskopie (Scalebar 15µm) oder (B) Durchflusszytometrie (n=8). (C) Quantifizierung der Kreuzpräsentation des OVA-Peptids SIINFEKL (S8) auf MHC I (H-2Kb) durch cDC1-Subpopulationen in *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}-OVA-Tumoren (n=10). Bilder in (A) und Histogramme in (B, C) zeigen einen repräsentativen von mindestens drei Tumoren aus zwei unabhängigen Experimenten. Balkendiagramme in (B, C) zeigen gebündelte Daten aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten und sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. Jeder Punkt repräsentiert einen Tumor. ****p < 0,0001.

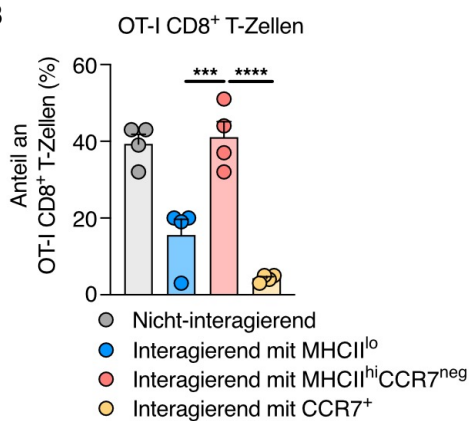
Aufgrund dieser Ergebnisse sollte die Fähigkeit der einzelnen cDC1-Subpopulationen zur Stimulation Tumorantigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen im Tumorgewebe verglichen werden. Zu diesem Zweck wurden naive OVA-spezifische Nur77^{GFP} OT-I T-Zellen adoptiv in CCR7^{GFP}-Mäuse transferiert, denen danach *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}-OVA-Zellen transplantiert wurden. An Tag 6 nach Transplantation zeigte sich eine klare Präferenz der OT-I T-Zellen zur Interaktion mit der MHCII^{hi}CCR7^{neg} cDC1-Subpopulation (Abb. 26A,B). Nur diese Interaktion mit MHCII^{hi}CCR7^{neg} cDC1 führte zu einer Antigen-spezifischen Aktivierung der OT-I T-Zellen, die anhand der Nur77-GFP-Expression quantifiziert werden konnte¹⁹⁰ (Abb. 26C).

Die geringe Anzahl an OT-I T-Zellen, die mit MHCII^{lo} oder CCR7⁺ cDC1 interagiert, zeigte eine signifikant niedrigere Expression von Nur77-GFP (Abb. 26B,C). MHCII^{hi}CCR7^{neg} cDC1 können also Tumorantigene aufnehmen, diese in den Clustern an Tumorantigen-spezifische CD8⁺ T-Zellen kreuzpräsentieren und so die T-Zell-Antwort gegen den Tumor orchestrieren.

A



B



C

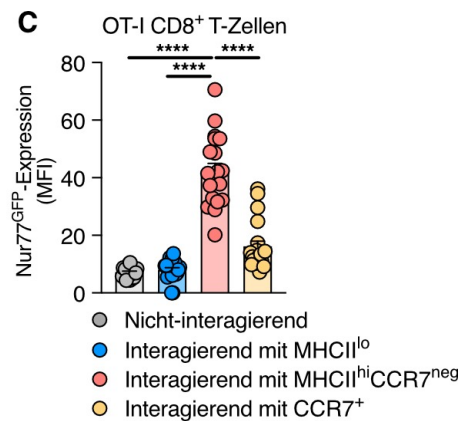


Abbildung 26: Tumorantigen-spezifische CD8⁺ T-Zellen interagieren präferenziell mit MHCII^{hi}CCR7^{neg} cDC1. (A-C) CCR7^{GFP}-Mäusen wurden 1x10³ naive, OVA-spezifische CD45.1⁺ Nur77^{GFP} OT-I-Zellen transferriert und 2x10⁶ *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}-OVA-Zellen transplantiert. Die intratumorale Lokalisierung der Immunzellen wurde an Tag 6 mittels volumetrischer Mikroskopie analysiert. (A) Expression von Nur77^{GFP} (als Indikator für eine antigen-spezifische Stimulation des T-Zell-Rezeptors) in intratumoralen OT-I-Zellen. Pfeile weisen auf Nur77^{GFP}⁺ Zellen in Kontakt mit MHCII^{hi}CCR7^{neg} cDC1 hin. Scalebar 25µm. (B) Quantifizierung der Interaktionspartner der OT-I-Zellen. Ein Punkt repräsentiert einen Tumor (n=4). (C) Quantifizierung basierend auf den Analysen in (A). Ein Punkt repräsentiert eine OT-I-Zelle (n=14-18). MFI, mittlere Fluoreszenz-Intensität. (B, C) zeigen repräsentative Daten aus einem von mindestens zwei unabhängigen Experimenten. Daten sind dargestellt als Mittelwert ± SEM. (A) zeigt einen repräsentativen von drei Tumoren aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten. ***p < 0,001; ****p < 0,0001.

3.6.2 MHCII^{hi}CCR7^{neg} cDC1 koordinieren die Clusterbildung über die CXCL9/CXCR3-Achse

In der scRNA-Seq wurde die Expression von *Cxcl9* und *Cxcl10* als einzigartiges Merkmal der immunostimulatorischen CCR7^{neg} cDC1-Subpopulation aufgedeckt (Abb. 21D,E). Die Expression von CXCL9 durch MHCII^{hi}CCR7^{neg} cDC1, aber nicht durch CCR7⁺ cDC1, wurde *ex vivo* auf Proteinebene bestätigt (Abb. 27A). Da bereits beschrieben wurde, dass die Achse aus cDC1-produziertem CXCL9/CXCL10 und dem korrelierenden Rezeptor CXCR3 auf CD8⁺ T-Zellen wichtig für eine produktive Antitumor-Immunantwort ist¹³²⁻¹³⁴ und nur die CXCL9-produzierenden cDC1 in den Clustern lokalisiert sind, wurde vermutet, dass diese Achse der Clusterbildung zugrunde liegt. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurden CCR7^{GFP}-Mäuse mit *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}-Tumoren mit einem antagonistisch wirkenden CXCR3-Antikörper behandelt, der die Bindung der Liganden verhindert. In Tumoren, in denen die CXCL9/CXCL10-CXCR3-Achse durch den Antikörper blockiert wurde, bildeten sich nahezu keine cDC1-CD8⁺ T-Zell-Cluster (Abb. 27B,C). Dies ging mit einer reduzierten Ki-67-Expression und Expansion der intratumoralen CD8⁺ T-Zellen sowie einem Verlust der Kontrolle über das Tumorstadium einher (Abb. 27D-F). Die CXCL9/CXCL10-CXCR3-Achse ist an der von den Clustern ausgehenden produktiven Antitumor-Immunantwort also maßgeblich beteiligt.

Die Produktion von CXCL9/CXCL10 wird in cDC1 durch IFN γ ausgelöst^{118,191,192}. Die einzigartige Fähigkeit der MHCII^{hi}CCR7^{neg} cDC1-Subpopulation, CXCL9 und CXCL10 im Tumor zu produzieren, könnte also auf eine erhöhte Sensibilität für IFN γ zurückzuführen sein. Diese Vermutung konnte in einer *in vitro* Knochenmarkskultur für cDC1 bestätigt werden, in der einzig die MHCII^{hi}CCR7^{neg} cDC1 auf einen IFN γ -Stimulus mit CXCL9-Produktion reagierten (Abb. 27G). Die MHCII^{lo} cDC1 und die CCR7⁺ cDC1 produzierten auf diesen Stimulus hin kein CXCL9 (Abb. 27G).

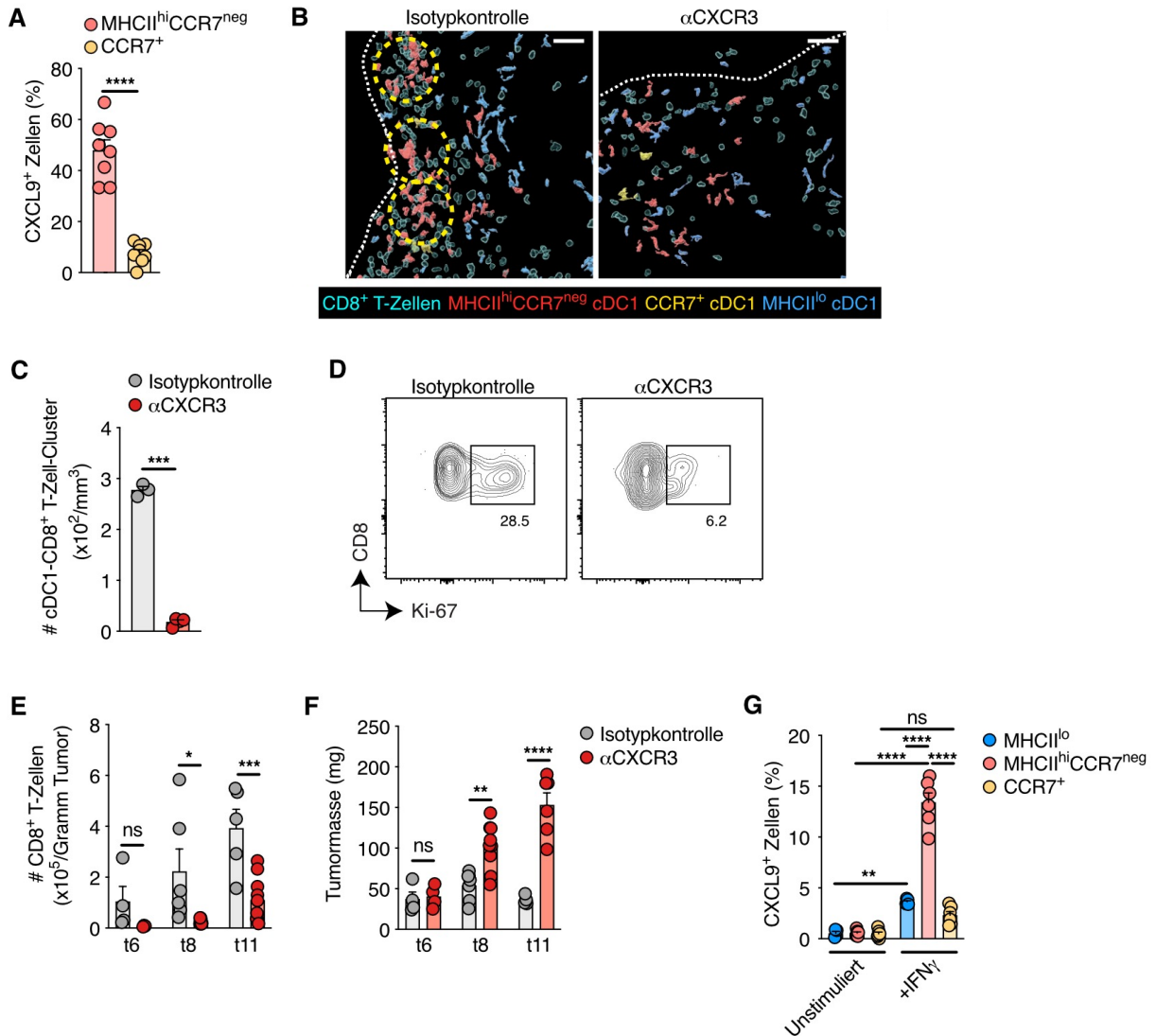


Abbildung 27: MHCII^{hi}CCR7^{neg} cDC1 orchestrieren das CD8⁺ T-Zell-Clustering über die CXCL9/CXCR3-Achse. (A) CXCL9-Produktion von MHCII^{hi}CCR7^{neg} und CCR7⁺ cDC1 in Tumoren, gemessen über intrazelluläre Durchflusszytometrie (n=9). **(B-F)** Auswirkung einer CXCR3-Blockade auf die intratumorale CD8⁺ T-Zell-Antwort in *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}-Tumoren. **(B)** Bildung von cDC1-CD8⁺ T-Zell-Clustern an Tag 6. Visualisierung der Immunzellen durch 3D-Zell-Rendering in Mikroskopiebildern. Scalebar 50 μ m, gestrichelte Linien zeigen den Tumorrand, gelbe Kreise heben Cluster hervor. **(C)** Quantifizierung basierend auf den Analysen aus (B) auf Bildern von ganzen Tumorschnitten (n=3). **(D)** Ki-67-Expression in intratumoralen CD8⁺ T-Zellen an Tag 6. **(E)** CD8⁺ T-Zell-Expansion im Tumor (n=3-10 pro Gruppe). t, Tag. **(F)** Untersuchung des Tumorwachstums zu den angegebenen Zeitpunkten (n=4-9 pro Gruppe). **(G)** Messung der CXCL9-Produktion in einer *in vitro* DC-Kultur. Gesortete cDC1 wurden für 16 Stunden mit *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}-Zellen kultiviert und danach für 5 Stunden mit IFN γ stimuliert (n=6 pro Gruppe). (A, E, F and G) zeigen gebündelte Daten aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten. (C) zeigt ein repräsentatives von mindestens zwei unabhängigen Experimenten. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM, jeder Punkt repräsentiert einen Tumor. Daten in (B, D) zeigen einen repräsentativen von mindestens drei Tumoren aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten. ns, nicht signifikant; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001.

Um abschließend zu bestätigen, dass die verminderte Clusterbildung und der Verlust der produktiven Antitumor-Immunantwort nach Behandlung mit dem CXCR3-Antikörper nicht nur auf eine verminderte initiale Rekrutierung von CD8⁺ T-Zellen ins TMM zurückzuführen war, wurde die Behandlung in Anwesenheit von FTY720 wiederholt, sodass auch in den mit der Isotypkontrolle behandelten Tumoren eine Infiltration von neuen CD8⁺ T-Zellen aus dem drainierenden Lymphknoten unterbunden war. Es konnte beobachtet werden, dass nur bei CXCR3-Blockade wie im vorangegangenen Experiment die Clusterbildung, CD8⁺ T-Zell-Expansion und Tumorkontrolle ausbleiben (Abb. 28A-D). Diese Prozesse fanden in den Kontrollmäusen trotz der Inhibierung der T-Zell-Infiltration durch FTY720 statt (Abb. 28A-D). Es kann daher geschlossen werden, dass die Rolle der CXCL9/CXCL10-CXCR3-Achse in der Antitumor-Immunantwort über eine ledigliche Rekrutierung von CD8⁺ T-Zellen ins Tumorgewebe hinausgeht und auch die Koordination von Interaktionen zwischen cDC1 und CD8⁺ T-Zellen im Tumorgewebe beinhaltet.

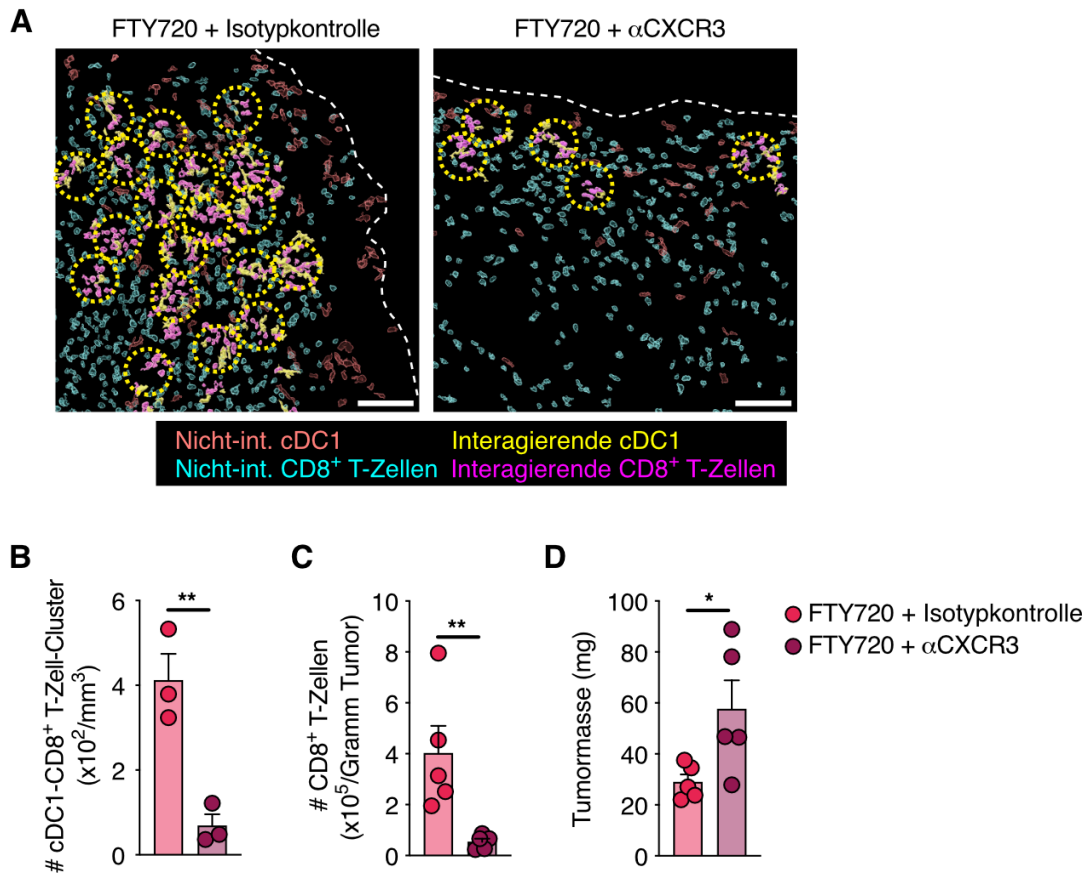


Abbildung 28: Die CXCL9/CXCL10-CXCR3-Achse vermittelt die Clusterbildung unabhängig von der Rekrutierung von CD8⁺ T-Zellen. (A-D) *Ptgs1/Ptgs2*^{-/-}-BRAF^{V600E}-Zellen wurden in WT-Mäuse transplantiert, die an Tag 6 des Tumorstwachstums mit FTY720 und an Tag 6 und Tag 8 mit α CXCR3 oder einer Isotypkontrolle behandelt wurden. Tumoren wurden an Tag 9 (A, B; n=3) oder an Tag 11 (C, D; n=5) analysiert. **(A)** Analyse der intratumoralen cDC1-CD8⁺ T-Zell-Cluster mittels Zell-Rendering. Gestrichelte Linien zeigen den Tumorrand, gelbe Kreise heben Cluster hervor. Scalebar 100 μ m. **(B)** Quantifizierung basierend auf den Analysen in (A) auf Bildern von ganzen Tumorschnitten. **(C)** Durchflusszytometrische Analyse der intratumoralen CD8⁺ T-Zell-Expansion. **(D)** Quantifizierung der Tumormasse. (A) zeigt einen repräsentativen von mindestens drei Tumoren aus zwei unabhängigen Experimenten. Daten in (B-D) zeigen ein repräsentatives von zwei unabhängigen Experimenten, dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM. Jeder Punkt repräsentiert einen Tumor. *p < 0,05; **p < 0,01.

3.7 cDC1-CD8⁺ T-Zell-Cluster und die CXCL9⁺ cDC1-Gensignatur korrelieren mit dem Überleben von Krebspatienten

3.7.1 cDC1-CD8⁺ T-Zell-Cluster korrelieren mit progressionsfreiem Überleben von Patienten

Die Tumorbiopsien aus der Kohorte der 18 HNSCC-Patienten wurden genutzt, um zu untersuchen, ob die drei cDC1-Subpopulationen auch in humanen Tumoren identifiziert werden können. Über ihre Expression von CCR7 und MHCII konnten auch in den humanen Tumorproben MHCII^{lo}, MHCII^{hi}CCR7^{neg} und CCR7⁺ cDC1 gefunden werden, wobei die MHCII^{hi}CCR7^{neg} cDC1 mengenmäßig erneut den CCR7⁺ cDC1 überlegen waren (Abb. 29A). Ähnlich zu den murinen Tumoren interagierten auch in den HNSCC-Biopsien hauptsächlich die MHCII^{hi}CCR7^{neg} cDC1 in Clustern mit CD8⁺ T-Zellen (Abb. 29B). Um zu evaluieren, ob diese Beobachtungen mit der Prognose der Patienten zusammenhängen, wurde die Kohorte in Patienten mit einer hohen oder einer niedrigen cDC1-CD8⁺ T-Zell-Clusteranzahl aufgeteilt (Abb. 29C). Beim Vergleich der Krankheitsverläufe in beiden Gruppen wurde eine positive Assoziation der cDC1-CD8⁺ T-Zell-Cluster mit einem progressionsfreien Überleben der Patienten festgestellt (Abb. 29D), was darauf hinwies, dass auch in humanen Patienten Interaktionen zwischen cDC1 und CD8⁺ T-Zellen im Tumorgewebe die Antitumor-Immunantwort begünstigen können.

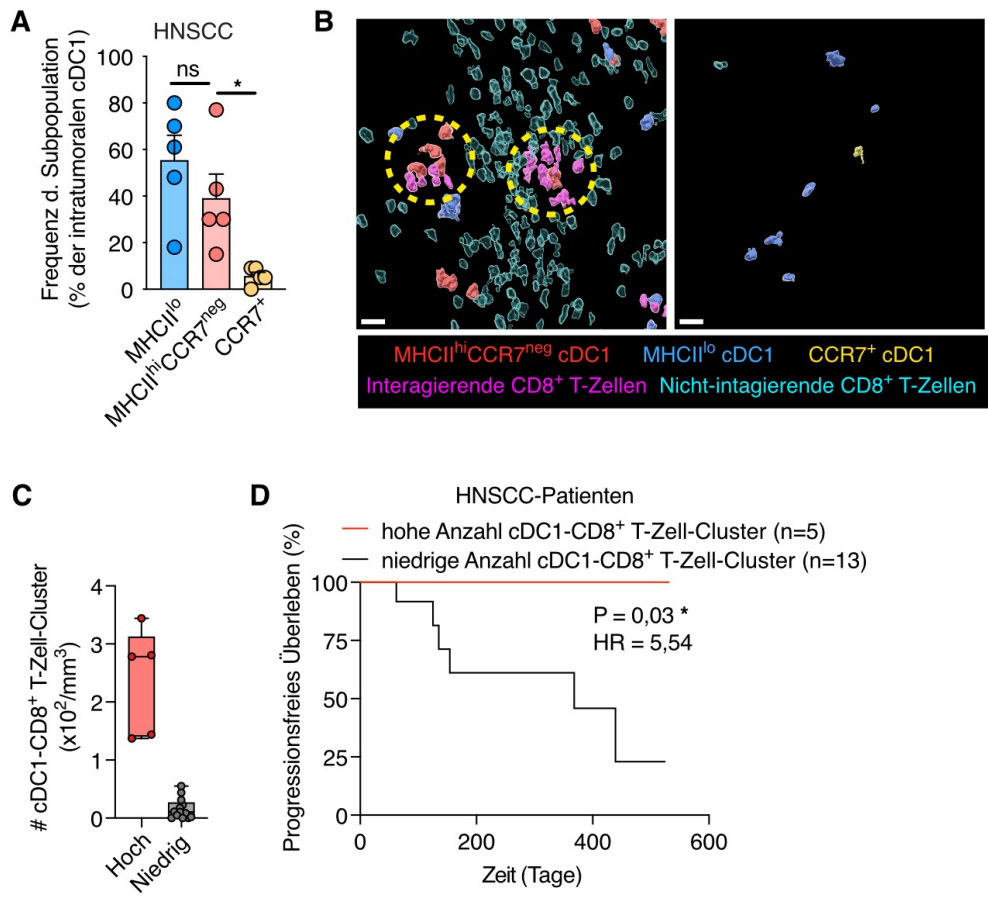


Abbildung 29: cDC1-CD8⁺ T-Zell-Cluster mit MHCII^{hi}CCR7^{neg} cDC1 korrelieren mit progressionsfreiem Überleben der HNSCC-Patienten. (A) Mikroskopie-basierte Quantifizierung der cDC1-Subpopulationen in HNSCC-Biopsien (n=5). Gezeigt sind Mittelwert ± SEM. (B) Lokalisierung der MHCII^{hi}CCR7^{neg} cDC1-Subpopulation in Clustern mit CD8⁺ T-Zellen in einem repräsentativen der fünf Tumoren aus (A). Scalebar 20µm, gelbe Kreise heben Cluster hervor. (C, D) Prognostische Aussagekraft von intratumoralen cDC1-CD8⁺ T-Zell-Clustern über Krankheitsprogression in der HNSCC-Patientenkohorte, stratifiziert nach hoher (n=5) und niedriger (n=13) Clusteranzahl. (C) Quantifizierung der cDC1-CD8⁺ T-Zell-Cluster in der hohen und niedrigen Subgruppe. Gezeigt sind Median, oberes und unteres Quartil. Die Whiskers zeigen Minimum und Maximum an. (D) Analyse des progressionsfreien Überlebens der zwei Subgruppen. ns, nicht signifikant; *p < 0,05.

3.7.2 Reife cDC1-Subpopulationen existieren in humanen Tumoren

Zur Ausweitung unserer Analysen auf andere humane Tumortypen als HNSCC wurde ein öffentlich zugängliches scRNA-Seq-Datenset¹⁴⁶ re-analysiert. Die im Datenset enthaltenen Informationen zu intratumoralen cDCs stammten aus Proben von humanen Patienten mit 15 verschiedenen Tumortypen.

Die Gensignaturen der reifen CXCL9⁺ cDC1 und CCR7⁺ cDC1 aus den murinen BRAF^{V600E}-Melanomen wurden ebenfalls von den intratumoralen cDCs aus dem humanen Datenset exprimiert, auch hier von cDC-Populationen aus unterschiedlichen Clustern (Abb. 30A). Humane cDCs mit einer hohen Expression der CXCL9⁺ cDC1-Gensignatur konnten vor allem in Cluster 1 identifiziert werden, während die CCR7⁺ cDC1-Gensignatur von den humanen cDCs in Cluster 3 exprimiert wurden (Abb. 30B). Die zwei funktional unterschiedlichen Populationen reifer cDC1 scheinen also auch in humanen Tumoren konserviert zu sein.

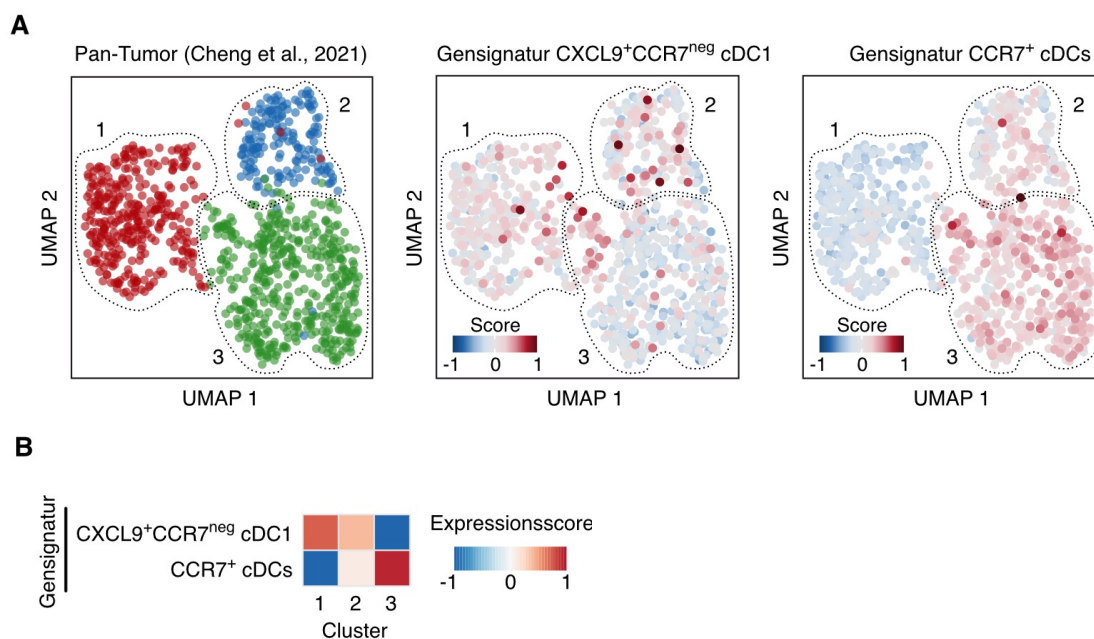


Abbildung 30: Identifizierung von CXCL9+CCR7^{neg} cDC1 und CCR7⁺ cDCs in humanen Tumoren. (A, B) Re-Analyse eines scRNA-Seq-Datensets der intratumoralen cDCs aus 210 humanen Patienten mit 15 verschiedenen Tumortypen¹⁴⁶. **(A)** UMAP-Plots zur Dimensionalitätsreduzierung. Leiden-Clustering (links) und Expression der Gensignaturen von CXCL9+CCR7^{neg} cDC1 (Mitte) oder CCR7⁺ cDCs (rechts) innerhalb der Cluster. **(B)** Heatmap zur Expression der Gensignaturen in den scRNA-Seq-Clustern aus (A).

3.7.3 Die CXCL9⁺ cDC1-Gensignatur korreliert mit dem Überleben humaner Patienten

Abschließend sollte in möglichst großen Kohorten ermittelt werden, ob die Anwesenheit reifer CXCL9⁺CCR7^{neg} cDC1 den Verlauf von humanen Tumorerkrankungen beeinflusst. Daher wurden Daten zur Genexpression in verschiedenen Tumoren aus der Datenbank The Cancer Genome Atlas (TCGA) ausgewertet. Es konnte festgestellt werden, dass eine höhere Expression der Gensignatur der reifen CXCL9⁺CCR7^{neg} cDC1 in den humanen Tumoren positiv mit dem Überleben der Patienten mit verschiedenen Tumortypen korreliert (Abb. 31A). Die hier analysierten Tumortypen umfassten Melanome (SKCM; engl. *skin cutaneous melanoma*), Sarkome (SARC; engl. *sarcoma*), Kopf-Hals-Karzinome (HNSC; engl. *head and neck squamous cell carcinoma*), Lungenkarzinome (LUAD; engl. *lung adenocarcinoma*) und Brustkarzinome (BRCA; engl. *breast cancer*). Die Gensignaturen von unreifen cDC1 und CCR7⁺ cDCs hatten dagegen weniger Einfluss auf das Überleben der Patienten oder zeigten überhaupt keine Assoziation mit dem Überleben (Abb. 31B). Auf die gleiche Weise wurde ein weiteres Datenset aus einer Kohorte mit Melanompatienten analysiert, die mit einer anti-PD-1 ICI therapiert wurden¹⁹³. Hier zeigte sich eine positive Korrelation einer hohen Expression der CXCL9⁺CCR7^{neg} cDC1-Gensignatur in den Tumoren mit einer guten Empfänglichkeit der Patienten für die ICI-Therapie (Abb. 31C) und mit dem Überleben der Patienten (Abb. 31D). Insgesamt weisen die Daten also darauf hin, dass in Menschen genau wie in den Mausmodellen eine immunostimulatorische Subpopulation von reifen CCR7^{neg} cDC1 eine intratumorale Phase der Antitumor-Immunantwort orchestriert und bei verschiedenen Krebserkrankungen mit verbessertem Überleben der Patienten assoziiert ist.

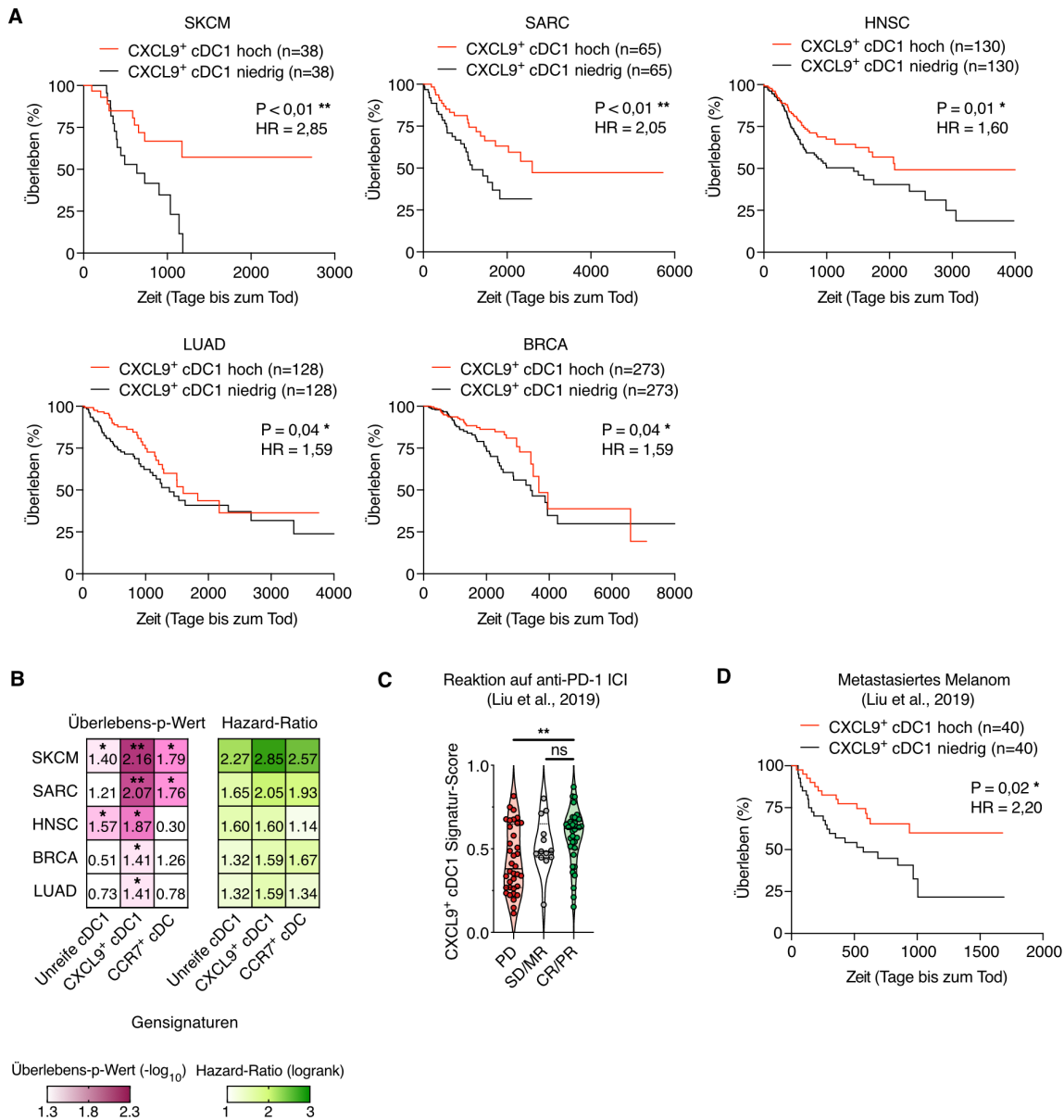


Abbildung 31: Die Gensignatur der CXCL9+CCR7^{neg} cDC1 korreliert mit dem Überleben humaner Krebspatienten. (A) Prognostische Aussagekraft der Gensignatur der CXCL9+CCR7^{neg} cDC1 über das Überleben humaner Krebspatienten. Verglichen werden die oberen und unteren Quartile der angegebenen TCGA-Datensets. HR, Hazard-Ratio. **(B)** Heatmap zu Überlebens-p-Wert und Hazard-Ratio in den angegebenen Datensets für die Gensignaturen der drei Subpopulationen. **(C)** Korrelation der Gensignatur der CXCL9+CCR7^{neg} cDC1 mit der Reaktion humaner Patienten mit metastasierendem Melanom auf ICI-Therapie mit anti-PD-1¹⁹³. PD, progressive disease; SD/MR, stable disease/mixed response; CR/PR, complete response/partial response. **(D)** Prognostische Aussagekraft der Gensignatur der CXCL9+CCR7^{neg} cDC1 über das Überleben von Patienten mit metastasiertem Melanom¹⁹³. ns, nicht signifikant; **p < 0,01.

4 Diskussion

Diese Arbeit konnte aufdecken, dass für eine produktive Antitumor-Immunantwort spezifische Interaktionen zwischen CD8⁺ T-Zellen und cDC1 im Tumorgewebe stattfinden müssen: Eine vorher nicht beschriebene immunstimulatorische CXCL9⁺CCR7^{neg} cDC1-Subpopulation organisiert die infiltrierenden stem-like CD8⁺ T-Zellen in stromalen Clustern, in denen die cDC1 die T-Zellen stimulieren und ihnen Tumorantigene kreuzpräsentieren, um ihre Effektordifferenzierung zu initiieren (Abb. 32). Somit konnte neben der Aktivierung naiver Tumor-spezifischer CD8⁺ T-Zellen durch CCR7⁺ cDC1 im drainierenden Lymphknoten eine weitere essenzielle Funktion von cDC1 während der Antitumor-Immunantwort identifiziert werden, die auch auf humane Tumoren übertragen werden konnte.

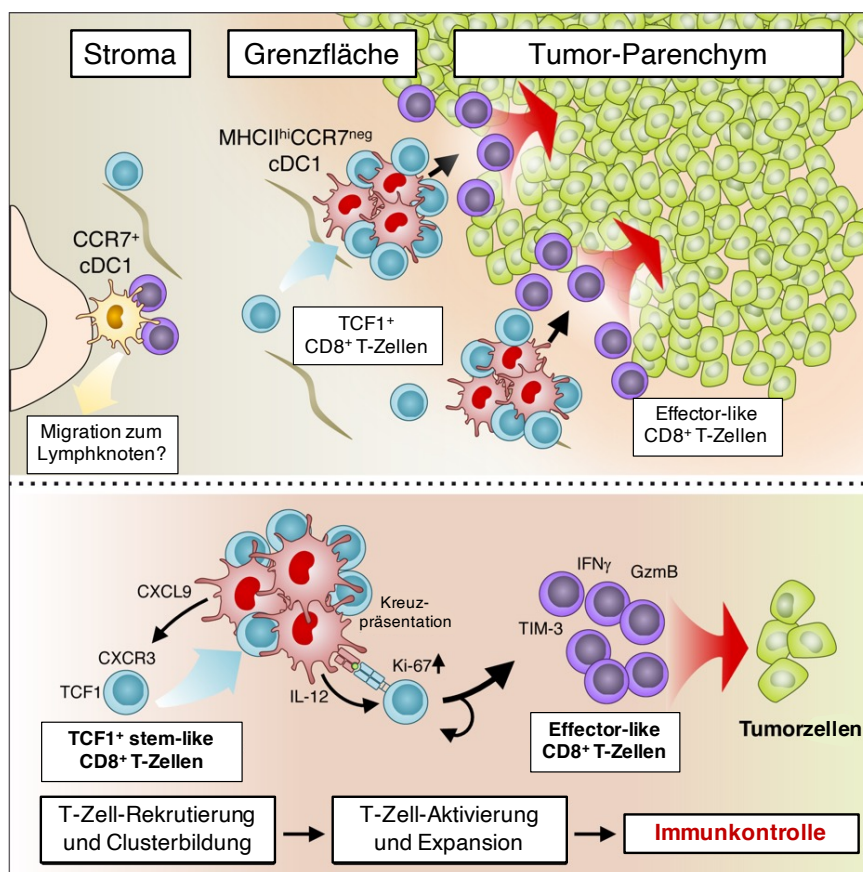


Abbildung 32: Grafische Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit. Oben: Bildung von Clustern zwischen MHCII^{hi}CCR7^{neg} cDC1 und TCF1⁺CD8⁺ T-Zellen an der stromal-parenchymalen Grenzfläche. Unten: Bildung der cDC1-CD8⁺ T-Zell-Cluster mittels CXCL9 und Induktion der Effektordifferenzierung der stem-like CD8⁺ T Zellen durch Kreuzpräsentation in den Clustern.

4.1 Räumliche Interaktionen von Immunzellen als Parameter für die Tumorklassifizierung

Zur Identifizierung der cDC1-CD8⁺ T-Zell-Cluster als Merkmal einer produktiven Antitumor-Immunantwort wurde ein Deep-Learning-Ansatz gewählt, um eine möglichst unvoreingenommene Analyse der Bilddaten zu gewährleisten. Die hohe Genauigkeit bei der Klassifizierung der Tumortypen durch das Deep-Learning-Modell beruhte zumindest teilweise auf den Informationen zur räumlichen Verteilung von cDC1 und CD8⁺ T-Zellen im Tumorgewebe. Eine Klassifizierung basierend auf der Anzahl an cDC1 und CD8⁺ T-Zellen erzielte eine wesentlich niedrigere Genauigkeit. Bereits im Jahr 2006 wurde erkannt, dass die Klassifizierung von Tumoren humaner Krebspatienten anhand einer Quantifizierung des T-Zell-Infiltrats im TMM eine genauere Prognose liefert als klassische, vom Tumor ausgehende Parameter wie das Tumorstadium¹⁹⁴. Daraufhin wurde der sogenannte Immunscore erstellt, der aus der Menge an T-Zellen im Tumorzentrum und im invasiven Rand berechnet wird¹⁹⁵. Krebspatienten mit einem hohen Immunscore, also einer hohen T-Zell-Infiltration in Tumorzentrum und invasivem Rand, zeigen ein signifikant längeres progressionsfreies Überleben als Patienten mit einem niedrigen Immunscore, bei denen kaum oder gar keine T-Zellen den Tumor infiltriert haben^{196,197}. Basierend auf dem Immunscore wurde das Konzept von „heißen“ Tumoren (hoher Immunscore) und „kalten“ Tumoren (niedriger Immunscore) entwickelt. Ob ein Tumor als „heiß“ oder „kalt“ klassifiziert wird, beeinflusst auch, welche Therapiemethoden für Krebspatienten gewählt werden¹⁹⁸. Diese Art der Klassifizierung vernachlässigt jedoch, dass die T-Zellen auch bei einer ungehinderten Infiltration in den Tumor den immunsuppressiven Signalen im TMM ausgesetzt sind und dass auch die Anwesenheit anderer Immunzellen wie cDC1 eine wichtige Rolle spielt. Neben immunsuppressiven Immunzellen, die in den Tumor rekrutiert werden, inhibieren auch die Tumorzellen selbst die T-Zellen. Dies kann über die Produktion inhibitorischer Zytokine wie TGFβ, die Expression inhibitorischer Moleküle wie PD-L1 oder die Expression Zelltod-induzierender Proteine wie FasL erfolgen¹⁹⁹. Auch wenn die reine T-Zell-Infiltration also bereits eine gute Möglichkeit bietet, die Immunantwort der Patienten zu prognostizieren, sollten weitere Parameter, beispielsweise zur T-Zell-Funktionalität, für die Klassifizierung beachtet werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen dafür, für eine Klassifizierung von Tumoren auch

räumliche Charakteristika der T-Zellen zu untersuchen. Die hier untersuchten Tumortypen konnten nur unter Einbezug von T-Zell-Clustering und Interaktionen mit cDC1 mit einer sehr hohen Genauigkeit voneinander unterschieden werden. Diese wichtigen Aspekte, die auf die Funktionalität der T-Zellen im TMM hindeuten, könnten dabei helfen, die Klassifizierung in „heiße“ und „kalte“ Tumoren noch aussagekräftiger zu machen. Natürlich muss dabei berücksichtigt werden, dass die Antitumor-Immunantwort nicht grundsätzlich in jeder Tumorart durch cDC1 orchestriert wird²⁰⁰⁻²⁰², aber in jedem Fall einem komplexen Zusammenspiel unterschiedlicher Immunzellen unterliegt. Die Analyse räumlicher Informationen zu verschiedenen Immunzelltypen (zusätzlich zu deren Anzahl) könnte daher zu einer genaueren Klassifizierung und Prognose für Krebspatienten führen.

4.2 Nutzung von künstlicher Intelligenz zur Interpretation medizinischer Daten

Machine Learning-Anwendungen wie das hier genutzte Deep-Learning-Modell, die auf künstlicher Intelligenz (KI) basieren, werden immer öfter auch im medizinischen Bereich eingesetzt. Wie im Fall dieser Arbeit geht es dabei häufig darum, anhand bestimmter Daten schnell und zuverlässig Patienten zu klassifizieren oder diagnostische Fragestellungen zu beantworten. So wurden beispielsweise KI-gestützte Modelle entwickelt, die klassifizieren können, ob Krankenhauspatienten erste Anzeichen einer Sepsis zeigen²⁰³ oder ob computertomografische Aufnahmen von Lungen Anzeichen für Lungenkrebs aufweisen²⁰⁴. Während die Anwendung solcher Modelle auf den initialen Datensets, mit denen sie auch trainiert wurden, oft eine sehr hohe Genauigkeit verspricht, können diese Ergebnisse bei der Anwendung der Modelle auf andere Datensets häufig noch nicht reproduziert werden²⁰³⁻²⁰⁵. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nicht untersucht, ob auch unser Deep-Learning-Modell bei der Übertragung auf andere Datensets an Genauigkeit verliert. Um zu evaluieren, ob das Modell auch für eine bildbasierte Klassifizierung von anderen Tumortypen als dem BRAF^{V600E}-Melanommodell eingesetzt werden kann, sollte also zunächst die Reproduzierbarkeit des Modells sichergestellt werden. Trotz des Problems der Reproduzierbarkeit von KI-basierten Klassifizierungsverfahren sollte ihr Wert für

Medizin und Forschung nicht unterschätzt werden. Gerade bei der Analyse und Beurteilung von Bildmaterial kann KI Merkmale detektieren, die dem menschlichen Auge unter Umständen nicht auffallen²⁰⁶. So konnte das Deep-Learning-Modell in dieser Arbeit maßgeblich zur Identifizierung der cDC1-CD8⁺ T-Zell-Cluster als Merkmal einer protektiven Antitumor-Immunantwort beitragen.

4.3 Die stromale Lokalisierung der cDC1-CD8⁺ T-Zell-Cluster

Die cDC1-CD8⁺ T-Zell-Cluster bilden sich sowohl in den untersuchten humanen Tumoren als auch in verschiedenen murinen Regressortumoren ausschließlich in stromalen Regionen. Das Tumorstroma gilt allgemein als immunsuppressiv, unter anderem durch die Rekrutierung protumorigener Immunzellen wie Makrophagen und die Produktion inhibitorischer Chemokine durch die dort ansässigen Fibroblasten²⁰⁷. Trotzdem könnten spezifische stromale Nischen existieren, die die Bildung von cDC1-CD8⁺ T-Zell-Clustern begünstigen. Im Gegensatz zum Tumor-Parenchym, in dem hauptsächlich die Tumorzellen die ohnehin schon spärlichen Nährstoffe wie Glukose und Sauerstoff verbrauchen²⁰⁸, könnten den CD8⁺ T-Zellen in den stromalen Nischen die Metabolite bereitstehen, die sie während ihrer Aktivierung benötigen²⁰⁹. In einer hier nicht gezeigten Analyse im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch festgestellt werden, dass die Cluster sich nicht präferenziell in unmittelbarer Nähe zu Blutgefäßen bilden¹⁷⁷. Es ist ebenfalls vorstellbar, dass sich die cDC1-CD8⁺ T-Zell-Cluster in Regionen formen, in denen die Aktivierung von Immunzellen und die Präsentation von Tumorantigenen erleichtert sind. An der stromal-parenchymalen Grenzfläche könnte beispielsweise ein besonders hohes Maß an Tumorzelltod auftreten, wodurch vermehrt DAMPs zur Aktivierung der cDC1 und Antigene zur Kreuzpräsentation an die CD8⁺ T-Zellen freigesetzt werden würden. Die stromalen Nischen, die die lokale Aktivierung und Expansion von CD8⁺ T-Zellen erlauben, sollten in zukünftigen Studien genauer charakterisiert werden, da sie von therapeutischem Nutzen sein könnten.

4.3.1 Vergleich der cDC1-CD8⁺ T-Zell-Cluster mit tertiären lymphatischen Strukturen

In unterschiedlichen humanen Tumortypen wurden bereits sogenannte tertiäre lymphatische Strukturen (TLS; engl. *tertiary lymphoid structures*) als eine Nische für Immunzellen im TMM beschrieben²¹⁰⁻²¹². TLS, die sich auch während chronischer Erkrankungen in lymphatischen Organen bilden können, sind Immunzellaggregate, die vor allem aus B-Zellen und T-Zellen bestehen und sich ähnlich zu den hier beschriebenen cDC1-CD8⁺ T-Zell-Clustern häufig im Stroma befinden²¹³. Welche CD8⁺ T-Zell-Subsets in TLS vorkommen und wie genau diese dort stimuliert werden, ist noch nicht ausreichend erforscht. Auch DCs können Teil der TLS sein, hierbei handelt es sich überwiegend um folliculäre DCs, die normalerweise in Lymphknoten vorkommen. In humanen Lungenkarzinomen konnte gezeigt werden, dass in TLS reife LAMP3⁺ DCs mit CD8⁺ T-Zellen interagieren²¹⁴. Die Gensignatur von intratumoralen LAMP3⁺ DCs^{145,146} ist der Gensignatur der reifen CCR7⁺ cDC-Subpopulation aus dieser Arbeit sehr ähnlich. Die reife CCR7⁺ Subpopulation war weder in den hier untersuchten murinen Modellen noch in den humanen Tumorbiopsien an der Bildung der cDC1-CD8⁺ T-Zell-Cluster beteiligt. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass diese Subpopulation in bestimmten humanen Tumortypen in TLS lokalisiert ist und dort CD8⁺ T-Zellen stimuliert. Eine unterschiedliche Beteiligung der verschiedenen cDC1-Subpopulationen spricht dafür, dass es sich bei TLS und den von reifen CXCL9⁺ cDC1 gebildeten Clustern um zwei unterschiedliche Strukturen handelt. In dieser Arbeit wurde allerdings nicht untersucht, ob auch B-Zellen in cDC1-CD8⁺ T-Zell-Clustern lokalisiert sind, oder ob in den hier untersuchten Tumormodellen zusätzlich zu den Clustern auch TLS vorliegen. Um diese zwei für die Immunantwort wichtigen Strukturen besser voneinander abgrenzen zu können, sind also weitere Experimente nötig.

Die cDC1-CD8⁺ T-Zell-Cluster sind durch die Interaktion zwischen stem-like CD8⁺ T-Zellen und der CXCL9⁺ cDC1-Subpopulation charakterisiert. Eine neue Studie konnte zeigen, dass in humanen Lungenkarzinomen stem-like CD8⁺ T-Zellen mit B-Zellen in stromalen Regionen in Strukturen organisiert sind, die TLS sehr ähnlich sind²¹⁵. Da die Aktivierung und Effektordifferenzierung von stem-like CD8⁺ T-Zellen im TMM ein äußerst wichtiger Prozess für eine erfolgreiche Antitumor-Immunantwort ist, ist es

vorstellbar, dass es im TMM redundante Nischen gibt, in denen dieser Prozess induziert werden kann. Es könnte also neben den Stromalen Clustern mit immunostimulatorischen cDC1 auch TLS-ähnliche Regionen geben, in denen andere APCs mit stem-like T-Zellen interagieren. Die Art und Weise der intratumoralen Stimulation von stem-like CD8⁺ T-Zellen könnte aber auch je nach Tumortyp und inflammatorischem Kontext variieren.

4.4 Heterogenität und Arbeitsteilung intratumoraler cDC1

Durch die detaillierte Charakterisierung der Zellen in den cDC1-CD8⁺ T-Zell-Clustern konnte diese Arbeit eine bisher nicht beschriebene reife, CXCL9⁺CCR7^{neg} cDC1-Subpopulation identifizieren, die die Clusterbildung orchestriert und in Krebspatienten mit einer verbesserten Prognose assoziiert ist. Bei der scRNA-Seq-Analyse war auffällig, dass diese cDC1-Subpopulation zwar Reifungsmarker exprimiert, aber keine Transkripte, die mit Zellmigration assoziiert sind, wie beispielsweise *Ccr7*, *Fscn1* und *Smsn1*. Die Expression dieser Migrationssignatur war auf eine weitere reife cDC-Subpopulation beschränkt. Auch *ex vivo* und in einem *in vitro*-Modell konnte bestätigt werden, dass sich im TMM sowohl MHCII^{hi}CCR7⁺ als auch MHCII^{hi}CCR7^{neg} cDC1 entwickeln. Gemeinhin wird angenommen, dass die Reifung und Antigenaufnahme von cDC1 immer auch mit einer erhöhten Mobilität durch die Hochregulierung der CCR7-Expression einhergeht²¹⁶. Diese Arbeit zeigt dagegen, dass es im Tumorkontext zwei unterschiedliche funktionelle Zustände von reifen cDC1 gibt, die sich in ihrer CCR7-Expression und migratorischen Kapazität unterscheiden, aber beide in der Lage sind, T-Zellen zu aktivieren. Basierend auf den Erkenntnissen aus dieser Arbeit sind beide Subpopulationen für eine erfolgreiche Antitumor-Immunantwort unverzichtbar: Die CCR7⁺ cDCs werden benötigt, um in der initialen Phase der Antwort Tumorantigene zum drainierenden Lymphknoten zu transportieren und dort naive tumorspezifische CD8⁺ T-Zellen zu aktivieren. Die MHCII^{hi}CCR7^{neg} cDC1 positionieren in einer späteren Phase diese rekrutierten stem-like CD8⁺ T-Zellen im Tumorgewebe in Clustern und stimulieren dort ihre Differenzierung zu Effektorzellen, die Tumorzellen töten können. Eine dritte Phase könnte durch die intratumorale Stimulation der effector-like CD8⁺ T-Zellen durch CCR7⁺ cDCs im Tumorgewebe gebildet werden, die perivaskulär stattfindet und bei

der die CCR7⁺ cDCs IL-15 *trans*-präsentieren, um das Überleben der effector-like T-Zellen zu fördern¹⁴².

Ob es sich bei den beiden reifen cDC1-Subpopulationen im TMM um funktionelle Zustände handelt, die durch anhaltende Stimulation sequenziell ineinander übergehen oder sich durch unterschiedliche Stimuli unabhängig voneinander aus unreifen cDC1 entwickeln (Abb. 33), konnte in den hier durchgeführten Experimenten nicht bestimmt werden. Es gibt bereits Hinweise darauf, dass sich in Tumoren unreife cDC1 über einen reife CCR7^{neg} Zustand in CCR7⁺ cDC1 entwickeln¹³¹. Sollte tatsächlich eine solche sequenzielle Entwicklung stattfinden, ist es durchaus vorstellbar, dass die Induktion des migratorischen Programms und der CCR7-Expression in den reifen CCR7^{neg} cDC1 durch Zell-Zell-Interaktionen innerhalb der cDC1-CD8⁺ T-Zell-Cluster vermittelt wird. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass sich je nach Art und Umfang der initialen Stimulation der unreifen cDC1 entweder reife CXCL9⁺ oder reife CCR7⁺ cDC1 entwickeln, die voneinander unabhängig sind (Abb. 33). Ein besseres Verständnis der Entwicklung der beiden reifen cDC1-Subpopulationen könnte dabei helfen, in Patienten gezielt die unterschiedlichen Phasen der T-Zell-Aktivierung zu fördern und so die Immunantwort effizienter zu unterstützen.

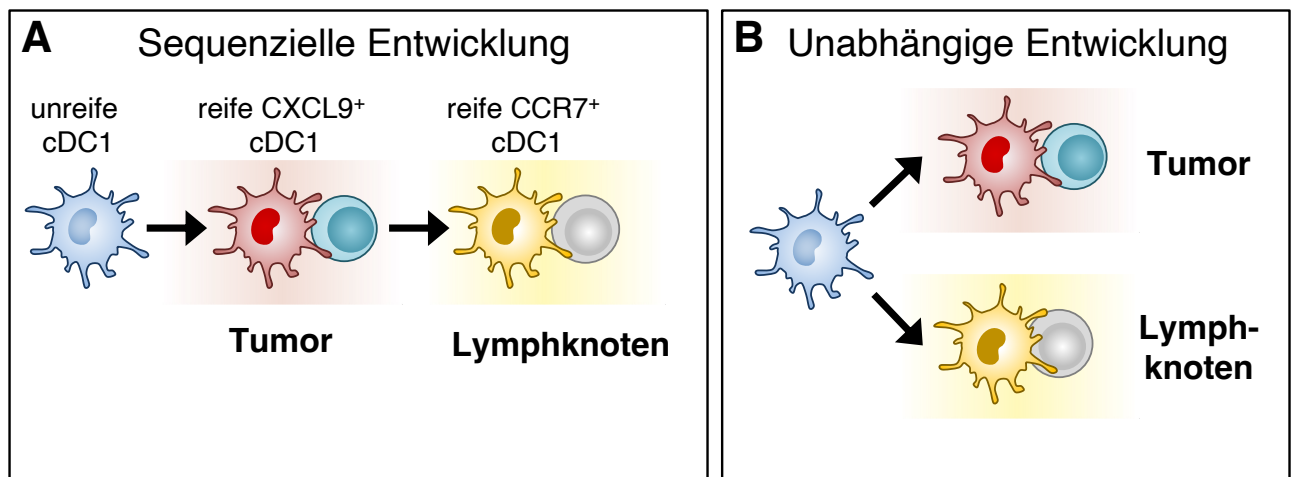


Abbildung 33: Modelle für die Entwicklung der reifen cDC1-Subpopulationen. (A) Unreife cDC1 entwickeln sich im TMM zunächst in reife CXCL9⁺ cDC1, die dann durch eine weitere Stimulation zu CCR7⁺ cDC1 differenzieren. **(B)** Durch unterschiedliche Stimuli entwickeln sich aus unreifen cDC1 entweder reife CXCL9⁺ cDC1 oder reife CCR7⁺ cDC1.

Anstelle einer migratorischen Signatur exprimieren die reifen CXCL9⁺CCR7^{neg} cDC1 vermehrt Gene für Integrine (*Itgb2*, *Itgax*) und Galektine (*Lgals1*, *Lgals3*, *Lgals9*). Die

Expression von Galektin-3 (codiert durch *Lgals3*) ist ebenfalls in geweberesidenten T-Zellen erhöht^{217,218}. Des Weiteren werden geweberesidente Populationen von NK-Zellen häufig durch ihre Integrinexpression definiert²¹⁹. Diese Parallelen könnten darauf hinweisen, dass es sich bei der MHCII^{hi}CCR7^{neg} cDC1-Subpopulation um „tumorresidente“ cDC1 handelt. Für diese Hypothese würde auch der Umstand sprechen, dass durch eine mechanisch-enzymatische Isolation aller cDC1 aus dem Tumor verglichen mit mikroskopischen *in situ* Analysen nur eine sehr geringe Zahl an MHCII^{hi}CCR7^{neg} cDC1 gewonnen werden kann. Betrachtet man nur die durchflusszytometrische Quantifizierung nach Isolation, wird die Zahl der MHCII^{hi}CCR7^{neg} cDC1 also deutlich unterschätzt. Dieses Phänomen könnte auf die Expression von Adhäsionsmolekülen zurückzuführen sein, die einen Verbleib im Tumorgewebe vermitteln und so die Isolation der cDC1 aus dem Tumorgewebe erschweren. Eine solche Ineffizienz bei der Isolierung aus verschiedenen Organen wurde auch für residente T-Zellen beschrieben^{220,221}.

Ob die MHCII^{hi}CCR7^{neg} cDC1 wirklich tumorresident sind, lange im Tumorgewebe verweilen und nicht auswandern, sollte in weiteren Experimenten festgestellt werden, beispielsweise durch Nachverfolgung der cDC1 im Tumor mittels Fotokonversion.

4.5 Unterstützung der protektiven Antitumor-Immunantwort durch die CXCL9/CXCL10-CXCR3-Achse

Diese Arbeit konnte zeigen, dass die Bildung der cDC1-CD8⁺ T-Zell-Cluster von der CXCL9/CXCL10-CXCR3-Achse abhängig ist. Die Achse war nicht nur wichtig für die Rekrutierung der CD8⁺ T-Zellen in das TMM, sondern auch für das Zusammenfinden der MHCII^{hi}CCR7^{neg} cDC1 und der stem-like CD8⁺ T-Zellen in den Clustern. Diese Erkenntnis stimmt mit den Resultaten einer anderen Studie überein, die ebenfalls zeigt, dass CXCL9/CXCL10-CXCR3-Signale neben der Rekrutierung noch weitere Funktionen im TMM erfüllen und so die Antitumor-Immunantwort unterstützen¹³³. Es ist wichtig zu erwähnen, dass im in dieser Arbeit untersuchten Modell die CXCL9-Produktion von cDC1 besondere Relevanz hat, aber grundsätzlich auch andere Immunzellpopulationen im Tumor, wie zum Beispiel Makrophagen, CXCL9 und CXCL10 produzieren können¹⁹¹.

In den PGE2-produzierenden BRAF^{V600E}-Progressortumoren blieb die Bildung von cDC1-CD8⁺ T-Zell-Clustern aus und die Antitumor-Immunantwort war ineffektiv. Eine Studie, die ebenfalls das BRAF^{V600E}-Melanommodell untersucht, konnte zeigen, dass das von den Tumorzellen produzierte PGE2 die CXCL9-Produktion von cDC1 im TMM hemmt¹⁵⁸. In den BRAF^{V600E}-Tumoren tritt also eine Inhibierung der spezifischen Funktion der MHCII^{hi}CCR7^{neg} cDC1-Subpopulation auf, die zur Folge hat, dass die Tumoren nicht abgestoßen werden. Dieser Zusammenhang unterstreicht noch einmal die Wichtigkeit der MHCII^{hi}CCR7^{neg} CXCL9-produzierenden cDC1-Subpopulation. In dieser Arbeit wurde die Bildung von cDC1-CD8⁺ T-Zell-Clustern in Tumorbiopsien humaner HNSCC-Patienten untersucht. Interessanterweise wurden auch im TMM von Darmkrebspatienten Cluster aus aktivierten CD8⁺ T-Zellen und CXCL9/CXCL10-produzierenden myeloischen Zellen beobachtet²²². Der Mechanismus der CXCL9/CXCL10-vermittelten Clusterbildung könnte also auch in humanen Tumoren konserviert sein. Ob es sich bei den CXCL9/CXCL10-produzierenden Immunzellen in den Clustern grundsätzlich um reife CCR7^{neg} cDC1 handelt, muss in weiteren Studien bestätigt werden.

4.6 Abhängigkeit der Funktion der MHCII^{hi}CCR7^{neg} cDC1 von IFN γ

Die Produktion von CXCL9 und CXCL10 durch cDC1 und andere Immunzellen wird als Antwort auf eine Stimulation mit IFN γ induziert¹⁹². Tatsächlich sind neben *Cxcl9* und *Cxcl10* viele weitere der differenziell exprimierten Gene der reifen CCR7^{neg} cDC1-Subpopulation mit einer IFN γ -Antwort assoziiert (Daten in dieser Arbeit nicht gezeigt, siehe Referenz¹⁷⁷). So findet man in der Gensignatur der reifen CCR7^{neg} cDC1 auch die durch IFN γ induzierten Gene *Irf7* (engl. *Interferon regulatory factor 7*) und *Ifitm3* (engl. *Interferon-induced transmembrane protein 3*), aber auch *Jak2* (Januskinase 2), welches wichtig für die Signalübertragung durch den IFN γ -Rezeptor ist²²³. Zusätzlich zu dieser IFN γ -geprägten Gensignatur konnte diese Arbeit in einem *in vitro*-Modell zeigen, dass die MHCII^{hi}CCR7^{neg} cDC1-Subpopulation verglichen mit den anderen zwei Subpopulationen besonders empfänglich für eine IFN γ -Stimulation ist. Es ist also davon auszugehen, dass die Funktion von MHCII^{hi}CCR7^{neg} cDC1 vom Vorhandensein von IFN γ abhängig ist. Im TMM produzieren T_H1-Zellen, effector-like CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen IFN γ ^{224,225}. NK-Zellen infiltrieren schon zu einem frühen

Zeitpunkt des Tumorwachstums das TMM und rekrutieren dort cDC1, die daraufhin die Infiltration von T-Zellen in den Tumor orchestrieren¹¹⁵. Dieser zeitliche Ablauf legt die Vermutung nahe, dass das von NK-Zellen produzierte IFN γ die CXCL9/CXCL10-Produktion in den MHCII^{hi}CCR7^{neg} cDC1 induziert, die daraufhin die infiltrierenden stem-like CD8⁺ T-Zellen in Clustern positionieren. Durch die T-Zell-Stimulation der stem-like CD8⁺ T-Zellen innerhalb der Cluster entstehen dann effector-like CD8⁺ T-Zellen, die ihrerseits IFN γ produzieren und so die CXCL9/CXCL10-Produktion und die Clusterbildung durch die MHCII^{hi}CCR7^{neg} cDC1 weiter unterstützen könnten. Zur Bestätigung dieser Hypothese sind weitere Experimente nötig, die zeigen, welche Zellen zu welchem Zeitpunkt die Quelle für IFN γ bilden.

Es wurden auch in anderen Modellen cDCs beschrieben, deren Gensignatur von einer IFN-Antwort geprägt ist. In Modellen für Fibrosarkome und Kolonkarzinome, die unabhängig von cDC1 vom Immunsystem abgestoßen werden, wurden cDC2-ähnliche cDCs beobachtet, die durch eine Typ I IFN-induzierte Gensignatur charakterisiert sind²⁰⁰. In einem murinen Infektionsmodell der Lunge spielen ebenfalls cDCs eine Rolle, die eine IFN-abhängige Gensignatur zeigen²²⁶. Eine weitere Untersuchung von IFN-induzierten funktionellen Zuständen von cDCs in Tumoren und Infektionen könnte also wertvolle Erkenntnisse zur Heterogenität dieser Zellen während einer Immunantwort und zu neuen Therapieansätzen liefern. Hierbei sollte beachtet werden, dass eine Erhöhung der intratumoralen IFN γ -Konzentration, die eventuell die Bildung von cDC1-CD8⁺ T-Zell-Clustern fördern könnte, auch gegenteilig wirken und das Tumorwachstum unterstützen kann^{227,228}.

4.7 Mögliche Wirkungen von Immuntherapien auf cDC1-CD8⁺ T-Zell-Cluster

Das Vorhandensein der CXCL9⁺CCR7^{neg} cDC1-Gensignatur im TMM korrelierte in den Analysen aus dieser Arbeit mit dem Erfolg einer ICI-Therapie in Melanompatienten. Zukünftige Experimente könnten untersuchen, welcher Zusammenhang zwischen ICI-Therapie und intratumoralen cDC1-CD8⁺ T-Zell-Clustern besteht und ob eine solche Therapie in Progressortumoren die Bildung von Clustern induzieren kann. In

den Clustern waren hauptsächlich stem-like CD8⁺ T-Zellen lokalisiert, die – wenn auch in einem geringeren Maße als die effector-like CD8⁺ T-Zellen – PD-1 exprimierten. In einigen murinen Tumormodellen konnte gezeigt werden, dass eine ICI-Therapie mit anti-PD-1-Antikörpern vor allem auf diese stem-like T-Zell-Population wirkt, während die effector-like T-Zell-Population weniger stark auf die Therapie reagiert^{136,141}. Eine verstärkte Expansion und Effektordifferenzierung der stem-like CD8⁺ T-Zellen nach Behandlung mit anti-PD-1-Antikörpern könnte also auch Auswirkungen auf die cDC1-CD8⁺ T-Zell-Cluster haben. Es ist vorstellbar, dass die Cluster durch die gesteigerte Expansion mehr T-Zellen beherbergen und deshalb größer werden. Auch die Ki-67-Expression der T-Zellen im Cluster könnte erhöht sein. Es könnte allerdings auch sein, dass eine ICI-Therapie mit anti-PD-1-Antikörpern sich nicht in den cDC1-CD8⁺ T-Zell-Clustern manifestiert, sondern nach der Behandlung auch CD8⁺ T-Zellen außerhalb der Cluster besser proliferieren können und mehr Ki-67 exprimieren. Außerdem könnte durch die Unterstützung der Effektordifferenzierung der stem-like CD8⁺ T-Zellen durch anti-PD-1 die Anzahl an effector-like CD8⁺ T-Zellen im Tumorgewebe steigen. Da sich in unserem Modell die effector-like CD8⁺ T-Zellen gegensätzlich zu den stem-like T-Zellen präferenziell im Tumor-Parenchym aufhielten, sollten also bei der Beurteilung der Wirkung einer anti-PD-1-Behandlung nicht nur die stromalen Regionen mit den Clustern analysiert werden.

In humanen Patienten ist noch nicht abschließend geklärt, ob eine Behandlung mit anti-PD-1-Antikörpern eher stem-like oder effector-like CD8⁺ T-Zellen beeinflusst^{137,181,229,230}. Außerdem gibt es einige Studien, die zeigen, dass ein Effekt von anti-PD-1-Antikörpern auf die stem-like CD8⁺ T-Zellen in Tumor-drainierenden Lymphknoten eine wichtige Rolle spielt, da diese ein Reservoir für Tumor-spezifische stem-like CD8⁺ T-Zellen bilden^{231,232}. Die Untersuchung der Wirkung einer ICI-Therapie auf die cDC1-CD8⁺ T-Zell-Cluster als Nische für die intratumorale Stimulation von stem-like CD8⁺ T-Zellen, könnte daher weitere Erkenntnisse über die Wirkweise dieser Therapieform liefern. In diesem Zuge könnte zukünftig auch untersucht werden, inwiefern das Vorhandensein von cDC1-CD8⁺ T-Zell-Clustern ein Ansprechen auf eine anti-PD-1 ICI-Therapie begünstigt und auf welche Weise die Clusterbildung in humanen Tumoren gefördert werden kann.

5 Appendix

5.1 Ergänzende Daten

5.1.1 Liste der 88 ausgewählten immunrelevanten Gene zur Primergenerierung für die Einzelzell-RNA-Sequenzierung

Adcy6
Adora2a
Akt1
Ankrd33b
Anxa3
Arhgap28
Bmp2k
Cacnb3
Ccrl2
Ccser2
Cd276
Cd70
Cd80
Cdkn2b
Ciita
Clec9a
Clnk
Clu
Creb1
Crem
Dap
E130311K13Rik
Eno2
Etv3
Extl1
Fah
Gal3st2

Gpr52
Gyg
H2-D1
H2-K2
Hivep1
Icosl
Ifna4
Ifnb1
Ifnl3
Insm1
Itgb8
Lilrb4a
Mycl
Net1
Nfatc1
Nr4a1
Nr4a2
Nr4a3
Nudt17
Ogfrl1
Pcgf5
Pfkfb3
Phf24
Pias3
Pik3ca
Poglut1
Ptger1
Ptger2
Ptger3
Ptger4
Pvr
Rabgap1l
Rnf115
Samsn1
Sbno2
Serinc5

Sirpa
Slc16a1
Slc16a3
Slc16a7
Slc16a8
Slc22a23
Slc2a1
Slco5a1
Socs2
Spred1
Spsb1
Stap2
Tap1
Tap2
Timd4
Tmem123
Tnfaip3
Tnfsf18
Tnfsf4
Vsig10
Vtcn1
Xcr1
Zbtb46
Zc2hc1a
Zfand6

5.2 Glossar

3D	dreidimensional
ACK-Puffer	Ammonium-Chlorid-Kalium-Puffer
APC	Antigen-präsentierende Zelle (<i>antigen-presenting cell</i>)
BATF3	<i>Basic Leucine Zipper ATF-Like Transcription Factor 3</i>
BRCA	Brustkrebs (<i>breast cancer</i>)
BSA	Bovines Serumalbumin
CAF	Tumor-assoziiertes Fibroblast (<i>cancer-associated fibroblast</i>)
CCL	<i>C-C motif chemokine ligand</i>
CCR	<i>C-C motif chemokine receptor</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDC	Konventionelle dendritische Zelle (<i>conventional dendritic cell</i>)
CDP	Allgemeine DC-Vorläuferzelle (<i>common dendritic cell progenitor</i>)
CLEC9A	<i>C-type lectin domain-containing 9A</i>
CLR	C-Typ-Lektin-Rezeptor (<i>C-type lectin receptor</i>)
CMoP	Allgemeine Monozyten-Vorläuferzelle (<i>common monocyte progenitor</i>)
CMP	Myeloische Stammzelle (<i>common myeloid progenitor</i>)
COX	Zyklooxygenase (<i>cyclooxygenase</i>)
CpG	5'-Cytosin-Phosphat-Guanin-3'
CPS	<i>Combined Positive Score</i>
CXCL	<i>C-X-C motif chemokine ligand</i>
CXCR	<i>C-X-C motif chemokine receptor</i>
DC	Dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle-Medium
DTX	Diphtherietoxin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (<i>fluorescence-activated cell sorting</i>)
FasL	<i>Fas Cell Surface Death Receptor Ligand</i>
FCS	Fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
Flt3(L)	<i>Fms-like tyrosine kinase 3 (ligand)</i>
FMO	<i>Fluorescence minus one</i> , Negativkontrolle für eine Antikörperfärbung bei der Durchflusszytometrie

FSCN1	<i>Fascin actin-bundling protein 1</i>
FTY720	Fingolimod; Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptorantagonist
GFP	Grün fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
H&E	Hämatoxylin und Eosin
H2-Kb	Haplotyp für die schwere Kette (<i>heavy chain</i>) im MHC I-Komplex in C57BL/6-Mäusen
HNSCC	Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs (<i>head and neck squamous cell carcinoma</i>)
HSC	Hämatopoietische Stammzelle (<i>hematopoietic stem cell</i>)
HR	Hazard-Ratio, Maß für das Risikoverhältnis zwischen zwei Patientengruppen
ID2	<i>Inhibitor of DNA binding 2</i>
Ifitm	<i>Interferon-induced transmembrane protein</i>
IFN	Interferon
IL	Interleukin
i.p.	Intraperitoneal
IRF	<i>Interferon regulatory factor</i>
Itg	Integrin
Jak2	Januskinase 2
KI	Künstliche Intelligenz
KLF4	<i>Krüppel-like factor 4</i>
KO	Knockout
LAMP3	<i>Lysosomal Associated Membrane Protein 3</i>
LUAD	Lungenkarzinom (<i>lung adenocarcinoma</i>)
MDP	Vorläuferzelle für Makrophagen und dendritische Zellen (<i>macrophage-dendritic cell progenitor</i>)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
MHCI	MHC Klasse I (<i>MHC class I</i>)
MHCII	MHC Klasse II (<i>MHC class II</i>)
moDC	DC monozytischen Ursprungs (<i>monocyte-derived dendritic cell</i>)
MPP	Multipotente Vorläuferzelle (<i>multipotent progenitor</i>)
NFIL3	<i>Nuclear Factor, Interleukin-3 regulated</i>
NLR	NOD-ähnlicher Rezeptor (<i>NOD-like receptor</i>)
NOD	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i>

NOTCH2	<i>Neurogenic locus notch homolog protein 2</i>
ns	Nicht signifikant
OT-I T cells	Transgene CD8 ⁺ T-Zellen, deren T-Zell-Rezeptor ausschließlich für das Ovalbumin-Peptid SIINFEKL spezifisch ist (<i>MHC class I-restricted, ovalbumin-specific, CD8⁺ T cells</i>)
OVA	Ovalbumin
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PD-1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
PD-L1/2	<i>Programmed cell death ligand 1/2</i>
PDAC	Duktales Pankreas-Adenokarzinom (<i>pancreatic ductal adenocarcinoma</i>)
pDC	Plasmazytoide dendritische Zelle (<i>plasmacytoid dendritic cell</i>)
PGE2	Prostaglandin E ₂
Poly(I:C)	Polyinosinsäure:Polycytidylsäure
RIG-I	<i>Retinoic acid inducible gene 1</i>
RKIs	Regionen mit kritischen Informationen
RLR	RIG-I-ähnlicher Rezeptor (<i>RIG-I-like receptor</i>)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute-Medium
s.c.	Subkutan (<i>subcutaneous</i>)
SARC	Sarkom (<i>sarcoma</i>)
scRNA-Seq	Einzelzell-RNA-Sequenzierung (<i>single cell RNA sequencing</i>)
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (<i>standard error of the mean</i>)
SIINFEKL (S8)	Ovalbumin-Peptid (Aminosäure 257-264), das auf H2-Kb (MHCI) präsentiert wird
SIRPα	<i>Signal regulatory protein α</i>
SKCM	Hautkrebs (<i>skin cutaneous melanoma</i>)
t	Tag
TCF1	<i>T cell factor 1</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor (<i>T cell receptor</i>)
TGFβ	<i>Transforming growth factor beta</i>
TIM-3	<i>T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3</i>
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor (<i>toll-like receptor</i>)
TLS	Tertiäre lymphatische Strukturen (<i>tertiary lymphoid structures</i>)
TMM	Tumormikromilieu
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>

tSNE	<i>t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding</i> , statistische Methode zur Visualisierung hochdimensionaler Daten
UMAP	<i>Uniform Manifold Approximation and Projection</i> , statistische Methode zur Visualisierung hochdimensionaler Daten
XCL1	<i>X-C motif chemokine ligand 1</i>
XCR1	<i>X-C motif chemokine receptor 1</i>
ZsG	<i>ZsGreen</i>

5.3 Literaturverzeichnis

1. Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., and Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 71, 209-249. 10.3322/caac.21660.
2. Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D.M., Pineros, M., Znaor, A., and Bray, F. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J Cancer*. 10.1002/ijc.33588.
3. Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70. 10.1016/s0092-8674(00)81683-9.
4. Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674. 10.1016/j.cell.2011.02.013.
5. Miller, K.D., Nogueira, L., Devasia, T., Mariotto, A.B., Yabroff, K.R., Jemal, A., Kramer, J., and Siegel, R.L. (2022). Cancer treatment and survivorship statistics, 2022. *CA Cancer J Clin* 72, 409-436. 10.3322/caac.21731.
6. Raskov, H., Orhan, A., Christensen, J.P., and Gogenur, I. (2021). Cytotoxic CD8(+) T cells in cancer and cancer immunotherapy. *Br J Cancer* 124, 359-367. 10.1038/s41416-020-01048-4.
7. Jhunjunwala, S., Hammer, C., and Delamarre, L. (2021). Antigen presentation in cancer: insights into tumour immunogenicity and immune evasion. *Nat Rev Cancer* 21, 298-312. 10.1038/s41568-021-00339-z.
8. 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.
9. Kvedaraitė, E., and Ginhoux, F. (2022). Human dendritic cells in cancer. *Sci Immunol* 7, eabm9409. 10.1126/sciimmunol.abm9409.
10. Murphy, T.L., and Murphy, K.M. (2022). Dendritic cells in cancer immunology. *Cell Mol Immunol* 19, 3-13. 10.1038/s41423-021-00741-5.
11. Steinman, R.M., and Cohn, Z.A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 137, 1142-1162. 10.1084/jem.137.5.1142.
12. Steinman, R.M., and Witmer, M.D. (1978). Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 5132-5136. 10.1073/pnas.75.10.5132.
13. Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., and Weissman, I.L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404, 193-197. 10.1038/35004599.
14. Laurenti, E., and Gottgens, B. (2018). From haematopoietic stem cells to complex differentiation landscapes. *Nature* 553, 418-426. 10.1038/nature25022.
15. 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.
16. Onai, N., Obata-Onai, A., Schmid, M.A., Ohteki, T., Jarrossay, D., and Manz, M.G. (2007). Identification of clonogenic common Flt3+M-CSFR+ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. *Nat Immunol* 8, 1207-1216. 10.1038/ni1518.
17. Schlitzer, A., Sivakamasundari, V., Chen, J., Sumatoh, H.R., Schreuder, J., Lum, J., Malleret, B., Zhang, S., Larbi, A., Zolezzi, F., et al. (2015). Identification of cDC1- and cDC2-committed DC progenitors reveals early lineage priming at the common DC progenitor stage in the bone marrow. *Nat Immunol* 16, 718-728. 10.1038/ni.3200.

18. Grajales-Reyes, G.E., Iwata, A., Albring, J., Wu, X., Tussiwand, R., Kc, W., Kretzer, N.M., Briseno, C.G., Durai, V., Bagadia, P., et al. (2015). *Batf3* maintains autoactivation of *Irf8* for commitment of a CD8 α (+) conventional DC clonogenic progenitor. *Nat Immunol* *16*, 708-717. 10.1038/ni.3197.
19. Liu, K., Victora, G.D., Schwickert, T.A., Guermontprez, 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.
20. 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.
21. Villani, A.C., Satija, R., Reynolds, G., Sarkizova, S., Shekhar, K., Fletcher, J., Griesbeck, M., Butler, A., Zheng, S., Lazo, S., et al. (2017). Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science* *356*. 10.1126/science.aah4573.
22. Bourdely, P., Anselmi, G., Vaivode, K., Ramos, R.N., Missolo-Koussou, Y., Hidalgo, S., Tosselo, J., Nunez, 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.
23. McKenna, H.J., Stocking, K.L., Miller, R.E., Brasel, K., De Smedt, T., Maraskovsky, E., Maliszewski, C.R., Lynch, D.H., Smith, J., Pulendran, B., et al. (2000). Mice lacking *flt3* ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* *95*, 3489-3497. 10.1182/blood.V95.11.3489.
24. Waskow, C., Liu, K., Darrasse-Jeze, G., Guermontprez, P., Ginhoux, F., Merad, M., Shengelia, T., Yao, K., and Nussenzweig, M. (2008). The receptor tyrosine kinase *Flt3* is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues. *Nat Immunol* *9*, 676-683. 10.1038/ni.1615.
25. Rodrigues, P.F., Alberti-Servera, L., Eremin, A., Grajales-Reyes, G.E., Ivanek, R., and Tussiwand, R. (2018). Distinct progenitor lineages contribute to the heterogeneity of plasmacytoid dendritic cells. *Nat Immunol* *19*, 711-722. 10.1038/s41590-018-0136-9.
26. Dress, R.J., Dutertre, C.A., Giladi, A., Schlitzer, A., Low, I., Shadan, N.B., Tay, A., Lum, J., Kairi, M., Hwang, Y.Y., et al. (2019). Plasmacytoid dendritic cells develop from Ly6D(+) lymphoid progenitors distinct from the myeloid lineage. *Nat Immunol* *20*, 852-864. 10.1038/s41590-019-0420-3.
27. Hettinger, J., Richards, D.M., Hansson, J., Barra, M.M., Joschko, A.C., Krijgsveld, J., and Feuerer, M. (2013). Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. *Nat Immunol* *14*, 821-830. 10.1038/ni.2638.
28. Leon, B., Lopez-Bravo, M., and Ardavin, C. (2007). Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*. *Immunity* *26*, 519-531. 10.1016/j.immuni.2007.01.017.
29. 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.
30. Theisen, D.J., Ferris, S.T., Briseno, C.G., Kretzer, N., Iwata, A., Murphy, K.M., and Murphy, T.L. (2019). *Batf3*-Dependent Genes Control Tumor Rejection Induced by Dendritic Cells Independently of Cross-Presentation. *Cancer Immunol Res* *7*, 29-39. 10.1158/2326-6066.CIR-18-0138.
31. 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 CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science* 322, 1097-1100. 10.1126/science.1164206.
32. Bagadia, P., Huang, X., Liu, T.T., Durai, V., Grajales-Reyes, G.E., Nitschke, M., Modrusan, Z., Granja, J.M., Satpathy, A.T., Briseno, C.G., et al. (2019). An Nfil3-Zeb2-Id2 pathway imposes Irf8 enhancer switching during cDC1 development. *Nat Immunol* 20, 1174-1185. 10.1038/s41590-019-0449-3.
 33. Durai, V., Bagadia, P., Granja, J.M., Satpathy, A.T., Kulkarni, D.H., Davidson, J.T.t., Wu, R., Patel, S.J., Iwata, A., Liu, T.T., et al. (2019). Cryptic activation of an Irf8 enhancer governs cDC1 fate specification. *Nat Immunol* 20, 1161-1173. 10.1038/s41590-019-0450-x.
 34. Lewis, K.L., Caton, M.L., Bogunovic, M., Greter, M., Grajkowska, L.T., Ng, D., Klinakis, A., Charo, I.F., Jung, S., Gommerman, J.L., et al. (2011). Notch2 receptor signaling controls functional differentiation of dendritic cells in the spleen and intestine. *Immunity* 35, 780-791. 10.1016/j.immuni.2011.08.013.
 35. Schlitzer, A., McGovern, N., Teo, P., Zelante, T., Atarashi, K., Low, D., Ho, A.W., See, P., Shin, A., Wasan, P.S., 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.
 36. Tussiwand, R., Everts, B., Grajales-Reyes, G.E., Kretzer, N.M., Iwata, A., Bagaitkar, J., Wu, X., Wong, R., Anderson, D.A., Murphy, T.L., et al. (2015). Klf4 expression in conventional dendritic cells is required for T helper 2 cell responses. *Immunity* 42, 916-928. 10.1016/j.immuni.2015.04.017.
 37. Ginhoux, F., Liu, K., Helft, J., Bogunovic, M., Greter, M., Hashimoto, D., Price, J., Yin, N., Bromberg, J., Lira, S.A., et al. (2009). The origin and development of nonlymphoid tissue CD103+ DCs. *J Exp Med* 206, 3115-3130. 10.1084/jem.20091756.
 38. Nakano, H., Lyons-Cohen, M.R., Whitehead, G.S., Nakano, K., and Cook, D.N. (2017). Distinct functions of CXCR4, CCR2, and CX3CR1 direct dendritic cell precursors from the bone marrow to the lung. *J Leukoc Biol* 101, 1143-1153. 10.1189/jlb.1A0616-285R.
 39. Cosway, E.J., Ohigashi, I., Schauble, K., Parnell, S.M., Jenkinson, W.E., Luther, S., Takahama, Y., and Anderson, G. (2018). Formation of the Intrathymic Dendritic Cell Pool Requires CCL21-Mediated Recruitment of CCR7(+) Progenitors to the Thymus. *J Immunol* 201, 516-523. 10.4049/jimmunol.1800348.
 40. Gallizioli, M., Miro-Mur, F., Otxoa-de-Amezaga, A., Cugota, R., Salas-Perdomo, A., Justicia, C., Brait, V.H., Ruiz-Jaen, F., Arbaizar-Roviro, M., Pedragosa, J., et al. (2020). Dendritic Cells and Microglia Have Non-redundant Functions in the Inflamed Brain with Protective Effects of Type 1 cDCs. *Cell Rep* 33, 108291. 10.1016/j.celrep.2020.108291.
 41. Miller, J.C., Brown, B.D., Shay, T., Gautier, E.L., Jojic, V., Cohain, A., Pandey, G., Leboeuf, M., Elpek, K.G., Helft, J., et al. (2012). Deciphering the transcriptional network of the dendritic cell lineage. *Nat Immunol* 13, 888-899. 10.1038/ni.2370.
 42. MacDonald, K.P., Munster, D.J., Clark, G.J., Dzionek, A., Schmitz, J., and Hart, D.N. (2002). Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood* 100, 4512-4520. 10.1182/blood-2001-11-0097.
 43. Vremec, D., Zorbas, M., Scollay, R., Saunders, D.J., Ardavin, C.F., Wu, L., and Shortman, K. (1992). The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells. *J Exp Med* 176, 47-58. 10.1084/jem.176.1.47.
 44. Anjuère, F., Martín, P., Ferrero, I., Fraga, M.L.p., del Hoyo, G.M.n., Wright, N., and Ardavin, C. (1999). Definition of Dendritic Cell Subpopulations Present in the Spleen, Peyer's Patches, Lymph Nodes, and Skin of the Mouse. *Blood* 93, 590-598. 10.1182/blood.V93.2.590.
 45. Edelson, B.T., Kc, W., Juang, R., Kohyama, M., Benoit, L.A., Klekotka, P.A., Moon, C., Albring, J.C., Ise, W., Michael, D.G., et al. (2010). Peripheral CD103+ dendritic cells

- form a unified subset developmentally related to CD8alpha+ conventional dendritic cells. *J Exp Med* 207, 823-836. 10.1084/jem.20091627.
46. del Rio, M.L., Rodriguez-Barbosa, J.I., Kremmer, E., and Forster, R. (2007). CD103- and CD103+ bronchial lymph node dendritic cells are specialized in presenting and cross-presenting innocuous antigen to CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol* 178, 6861-6866. 10.4049/jimmunol.178.11.6861.
 47. Bedoui, S., Whitney, P.G., Waithman, J., Eidsmo, L., Wakim, L., Caminschi, I., Allan, R.S., Wojtasiak, M., Shortman, K., Carbone, F.R., et al. (2009). Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103+ dendritic cells. *Nat Immunol* 10, 488-495. 10.1038/ni.1724.
 48. Jaensson, E., Uronen-Hansson, H., Pabst, O., Eksteen, B., Tian, J., Coombes, J.L., Berg, P.L., Davidsson, T., Powrie, F., Johansson-Lindbom, B., and Agace, W.W. (2008). Small intestinal CD103+ dendritic cells display unique functional properties that are conserved between mice and humans. *J Exp Med* 205, 2139-2149. 10.1084/jem.20080414.
 49. Jongbloed, S.L., Kassianos, A.J., McDonald, K.J., Clark, G.J., Ju, X., Angel, C.E., Chen, C.J., Dunbar, P.R., Wadley, R.B., Jeet, V., et al. (2010). Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *J Exp Med* 207, 1247-1260. 10.1084/jem.20092140.
 50. Dzionek, A., Fuchs, A., Schmidt, P., Cremer, S., Zysk, M., Miltenyi, S., Buck, D.W., and Schmitz, J. (2000). BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol* 165, 6037-6046. 10.4049/jimmunol.165.11.6037.
 51. Haniffa, M., Shin, A., Bigley, V., McGovern, N., Teo, P., See, P., Wasan, P.S., Wang, X.N., Malinarich, F., Malleret, B., et al. (2012). Human tissues contain CD141hi cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103+ nonlymphoid dendritic cells. *Immunity* 37, 60-73. 10.1016/j.immuni.2012.04.012.
 52. Crozat, K., Tamoutounour, S., Vu Manh, T.P., Fossum, E., Luche, H., Ardouin, L., Williams, M., Azukizawa, H., Bogen, B., Malissen, B., et al. (2011). Cutting edge: expression of XCR1 defines mouse lymphoid-tissue resident and migratory dendritic cells of the CD8alpha+ type. *J Immunol* 187, 4411-4415. 10.4049/jimmunol.1101717.
 53. Dorner, B.G., Dorner, M.B., Zhou, X., Opitz, C., Mora, A., Guttler, S., Hutloff, A., Mages, H.W., Ranke, K., Schaefer, M., et al. (2009). Selective expression of the chemokine receptor XCR1 on cross-presenting dendritic cells determines cooperation with CD8+ T cells. *Immunity* 31, 823-833. 10.1016/j.immuni.2009.08.027.
 54. Bachem, A., Guttler, 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. *J Exp Med* 207, 1273-1281. 10.1084/jem.20100348.
 55. Poulin, L.F., Rey, Y., Uronen-Hansson, H., Schraml, B.U., Sancho, D., Murphy, K.M., Hakansson, U.K., Moita, L.F., Agace, W.W., Bonnet, D., and Reis e Sousa, C. (2012). DNGR-1 is a specific and universal marker of mouse and human Batf3-dependent dendritic cells in lymphoid and nonlymphoid tissues. *Blood* 119, 6052-6062. 10.1182/blood-2012-01-406967.
 56. Poulin, L.F., Salio, M., Griessinger, E., Anjos-Afonso, F., Craciun, L., Chen, J.L., Keller, A.M., Joffre, O., Zelenay, S., Nye, E., et al. (2010). Characterization of human DNGR-1+ BDCA3+ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8alpha+ dendritic cells. *J Exp Med* 207, 1261-1271. 10.1084/jem.20092618.
 57. Huysamen, C., Willment, J.A., Dennehy, K.M., and Brown, G.D. (2008). CLEC9A is a novel activation C-type lectin-like receptor expressed on BDCA3+ dendritic cells and a subset of monocytes. *J Biol Chem* 283, 16693-16701. 10.1074/jbc.M709923200.
 58. Plantinga, M., Williams, M., Vanheerswynghels, M., Deswarte, K., Branco-Madeira, F., Toussaint, W., Vanhoutte, L., Neyt, K., Killeen, N., Malissen, B., et al. (2013).

- Conventional and monocyte-derived CD11b(+) 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.
59. Bogunovic, M., Ginhoux, F., Helft, J., Shang, L., Hashimoto, D., Greter, M., Liu, K., Jakubzick, C., Ingersoll, M.A., Leboeuf, M., et al. (2009). Origin of the lamina propria dendritic cell network. *Immunity* **31**, 513-525. 10.1016/j.immuni.2009.08.010.
 60. Watchmaker, P.B., Lahl, K., Lee, M., Baumjohann, D., Morton, J., Kim, S.J., Zeng, R., Dent, A., Ansel, K.M., Diamond, B., et al. (2014). Comparative transcriptional and functional profiling defines conserved programs of intestinal DC differentiation in humans and mice. *Nat Immunol* **15**, 98-108. 10.1038/ni.2768.
 61. Vremec, D., Pooley, J., Hochrein, H., Wu, L., and Shortman, K. (2000). CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J Immunol* **164**, 2978-2986. 10.4049/jimmunol.164.6.2978.
 62. Guillemins, M., Lambrecht, B.N., and Hammad, H. (2013). Division of labor between lung dendritic cells and macrophages in the defense against pulmonary infections. *Mucosal Immunol* **6**, 464-473. 10.1038/mi.2013.14.
 63. Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J.P., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* **2**, 361-367. 10.1038/86373.
 64. Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783-801. 10.1016/j.cell.2006.02.015.
 65. Takeuchi, O., and Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **140**, 805-820. 10.1016/j.cell.2010.01.022.
 66. Li, D., and Wu, M. (2021). Pattern recognition receptors in health and diseases. *Signal Transduct Target Ther* **6**, 291. 10.1038/s41392-021-00687-0.
 67. Lubber, C.A., Cox, J., Lauterbach, H., Fancke, B., Selbach, M., Tschopp, J., Akira, S., Wiegand, M., Hochrein, H., O'Keeffe, M., and Mann, M. (2010). Quantitative proteomics reveals subset-specific viral recognition in dendritic cells. *Immunity* **32**, 279-289. 10.1016/j.immuni.2010.01.013.
 68. Edwards, A.D., Diebold, S.S., Slack, E.M., Tomizawa, H., Hemmi, H., Kaisho, T., Akira, S., and Reis e Sousa, C. (2003). Toll-like receptor expression in murine DC subsets: lack of TLR7 expression by CD8 alpha+ DC correlates with unresponsiveness to imidazoquinolines. *Eur J Immunol* **33**, 827-833. 10.1002/eji.200323797.
 69. Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., and Akira, S. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**, 740-745. 10.1038/35047123.
 70. Fujimoto, K., Karuppuchamy, T., Takemura, N., Shimohigoshi, M., Machida, T., Haseda, Y., Aoshi, T., Ishii, K.J., Akira, S., and Uematsu, S. (2011). A new subset of CD103+CD8alpha+ dendritic cells in the small intestine expresses TLR3, TLR7, and TLR9 and induces Th1 response and CTL activity. *J Immunol* **186**, 6287-6295. 10.4049/jimmunol.1004036.
 71. Sancho, D., Joffre, O.P., Keller, A.M., Rogers, N.C., Martinez, D., Hernanz-Falcon, P., Rosewell, I., and Reis e Sousa, C. (2009). Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity. *Nature* **458**, 899-903. 10.1038/nature07750.
 72. Zelenay, S., Keller, A.M., Whitney, P.G., Schraml, B.U., Deddouche, S., Rogers, N.C., Schulz, O., Sancho, D., and Reis e Sousa, C. (2012). The dendritic cell receptor DNGR-1 controls endocytic handling of necrotic cell antigens to favor cross-priming of CTLs in virus-infected mice. *J Clin Invest* **122**, 1615-1627. 10.1172/JCI60644.
 73. Kato, H., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Uematsu, S., Matsui, K., Tsujimura, T., Takeda, K., Fujita, T., Takeuchi, O., and Akira, S. (2005). Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* **23**, 19-28. 10.1016/j.immuni.2005.04.010.

74. Sultan, H., Wu, J., Kumai, T., Salazar, A.M., and Celis, E. (2018). Role of MDA5 and interferon-I in dendritic cells for T cell expansion by anti-tumor peptide vaccines in mice. *Cancer Immunol Immunother* *67*, 1091-1103. 10.1007/s00262-018-2164-6.
75. Biswas, A., Petnicki-Ocwieja, T., and Kobayashi, K.S. (2012). Nod2: a key regulator linking microbiota to intestinal mucosal immunity. *J Mol Med (Berl)* *90*, 15-24. 10.1007/s00109-011-0802-y.
76. Cella, M., Engering, A., Pinet, V., Pieters, J., and Lanzavecchia, A. (1997). Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* *388*, 782-787. 10.1038/42030.
77. Larsen, C.P., Ritchie, S.C., Pearson, T.C., Linsley, P.S., and Lowry, R.P. (1992). Functional expression of the costimulatory molecule, B7/BB1, on murine dendritic cell populations. *J Exp Med* *176*, 1215-1220. 10.1084/jem.176.4.1215.
78. Inaba, K., Witmer-Pack, M., Inaba, M., Hathcock, K.S., Sakuta, H., Azuma, M., Yagita, H., Okumura, K., Linsley, P.S., Ikehara, S., et al. (1994). The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro. *J Exp Med* *180*, 1849-1860. 10.1084/jem.180.5.1849.
79. Romani, N., Lenz, A., Glassel, H., Stossel, H., Stanzl, U., Majdic, O., Fritsch, P., and Schuler, G. (1989). Cultured human Langerhans cells resemble lymphoid dendritic cells in phenotype and function. *J Invest Dermatol* *93*, 600-609. 10.1111/1523-1747.ep12319727.
80. Van Voorhis, W.C., Valinsky, J., Hoffman, E., Luban, J., Hair, L.S., and Steinman, R.M. (1983). Relative efficacy of human monocytes and dendritic cells as accessory cells for T cell replication. *J Exp Med* *158*, 174-191. 10.1084/jem.158.1.174.
81. Förster, R., Schubel, A., Breitfeld, D., Kremmer, E., Renner-Muller, I., Wolf, E., and Lipp, M. (1999). CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* *99*, 23-33. 10.1016/s0092-8674(00)80059-8.
82. Ohl, L., Mohaupt, M., Czeloth, N., Hintzen, G., Kiafard, Z., Zwirner, J., Blankenstein, T., Henning, G., and Forster, R. (2004). CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity* *21*, 279-288. 10.1016/j.immuni.2004.06.014.
83. Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C., and Amigorena, S. (2002). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* *20*, 621-667. 10.1146/annurev.immunol.20.100301.064828.
84. Kotsias, F., Cebrian, I., and Alloatti, A. (2019). Antigen processing and presentation. *Int Rev Cell Mol Biol* *348*, 69-121. 10.1016/bs.ircmb.2019.07.005.
85. Jurewicz, M.M., and Stern, L.J. (2019). Class II MHC antigen processing in immune tolerance and inflammation. *Immunogenetics* *71*, 171-187. 10.1007/s00251-018-1095-x.
86. Embgenbroich, M., and Burgdorf, S. (2018). Current Concepts of Antigen Cross-Presentation. *Front Immunol* *9*, 1643. 10.3389/fimmu.2018.01643.
87. Carbone, F.R., and Heath, W.R. (2010). Cross-priming: its beginnings. *J Immunol* *185*, 1353-1354. 10.4049/jimmunol.1090065.
88. Chen, L., and Flies, D.B. (2013). Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol* *13*, 227-242. 10.1038/nri3405.
89. Saravia, J., Chapman, N.M., and Chi, H. (2019). Helper T cell differentiation. *Cell Mol Immunol* *16*, 634-643. 10.1038/s41423-019-0220-6.
90. Hilligan, K.L., and Ronchese, F. (2020). Antigen presentation by dendritic cells and their instruction of CD4+ T helper cell responses. *Cell Mol Immunol* *17*, 587-599. 10.1038/s41423-020-0465-0.
91. Yin, X., Chen, S., and Eisenbarth, S.C. (2021). Dendritic Cell Regulation of T Helper Cells. *Annu Rev Immunol* *39*, 759-790. 10.1146/annurev-immunol-101819-025146.
92. Dudziak, D., Kamphorst, A.O., Heidkamp, G.F., Buchholz, V.R., Trumpfheller, C., Yamazaki, S., Cheong, C., Liu, K., Lee, H.W., Park, C.G., et al. (2007). Differential

- antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science* *315*, 107-111. 10.1126/science.1136080.
93. Schulz, O., Diebold, S.S., Chen, M., Naslund, T.I., Nolte, M.A., Alexopoulou, L., Azuma, Y.T., Flavell, R.A., Liljestrom, P., and Reis e Sousa, C. (2005). Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature* *433*, 887-892. 10.1038/nature03326.
 94. Torti, N., Walton, S.M., Murphy, K.M., and Oxenius, A. (2011). Batf3 transcription factor-dependent DC subsets in murine CMV infection: differential impact on T-cell priming and memory inflation. *Eur J Immunol* *41*, 2612-2618. 10.1002/eji.201041075.
 95. Yamazaki, C., Sugiyama, M., Ohta, T., Hemmi, H., Hamada, E., Sasaki, I., Fukuda, Y., Yano, T., Nobuoka, M., Hirashima, T., et al. (2013). Critical roles of a dendritic cell subset expressing a chemokine receptor, XCR1. *J Immunol* *190*, 6071-6082. 10.4049/jimmunol.1202798.
 96. den Haan, J.M., Lehar, S.M., and Bevan, M.J. (2000). CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *J Exp Med* *192*, 1685-1696. 10.1084/jem.192.12.1685.
 97. Mashayekhi, M., Sandau, M.M., Dunay, I.R., Frickel, E.M., Khan, A., Goldszmid, R.S., Sher, A., Ploegh, H.L., Murphy, T.L., Sibley, L.D., and Murphy, K.M. (2011). CD8alpha(+) dendritic cells are the critical source of interleukin-12 that controls acute infection by *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Immunity* *35*, 249-259. 10.1016/j.immuni.2011.08.008.
 98. Curtsinger, J.M., and Mescher, M.F. (2010). Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. *Curr Opin Immunol* *22*, 333-340. 10.1016/j.coi.2010.02.013.
 99. Kaech, S.M., and Cui, W. (2012). Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nat Rev Immunol* *12*, 749-761. 10.1038/nri3307.
 100. Maldonado-Lopez, R., De Smedt, T., Michel, P., Godfroid, J., Pajak, B., Heirman, C., Thielemans, K., Leo, O., Urbain, J., and Moser, M. (1999). CD8alpha+ and CD8alpha- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J Exp Med* *189*, 587-592. 10.1084/jem.189.3.587.
 101. Pulendran, B., Smith, J.L., Caspary, G., Brasel, K., Pettit, D., Maraskovsky, E., and Maliszewski, C.R. (1999). Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 1036-1041. 10.1073/pnas.96.3.1036.
 102. Askenase, M.H., Han, S.J., Byrd, A.L., Morais da Fonseca, D., Bouladoux, N., Wilhelm, C., Konkel, J.E., Hand, T.W., Lacerda-Queiroz, N., Su, X.Z., et al. (2015). Bone-Marrow-Resident NK Cells Prime Monocytes for Regulatory Function during Infection. *Immunity* *42*, 1130-1142. 10.1016/j.immuni.2015.05.011.
 103. Ma, X., Chow, J.M., Gri, G., Carra, G., Gerosa, F., Wolf, S.F., Dzialo, R., and Trinchieri, G. (1996). The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells. *J Exp Med* *183*, 147-157. 10.1084/jem.183.1.147.
 104. Sarhan, D., Palma, M., Mao, Y., Adamson, L., Kiessling, R., Mellstedt, H., Osterborg, A., and Lundqvist, A. (2015). Dendritic cell regulation of NK-cell responses involves lymphotoxin-alpha, IL-12, and TGF-beta. *Eur J Immunol* *45*, 1783-1793. 10.1002/eji.201444885.
 105. Alexandre, Y.O., Ghilas, S., Sanchez, C., Le Bon, A., Crozat, K., and Dalod, M. (2016). XCR1+ dendritic cells promote memory CD8+ T cell recall upon secondary infections with *Listeria monocytogenes* or certain viruses. *J Exp Med* *213*, 75-92. 10.1084/jem.20142350.
 106. Durand, M., Walter, T., Pirnay, T., Naessens, T., Gueguen, P., Goudot, C., Lameiras, S., Chang, Q., Talaei, N., Ornatsky, O., et al. (2019). Human lymphoid organ cDC2 and macrophages play complementary roles in T follicular helper responses. *J Exp Med* *216*, 1561-1581. 10.1084/jem.20181994.
 107. Mittag, D., Proietto, A.I., Loudovaris, T., Mannering, S.I., Vremec, D., Shortman, K., Wu, L., and Harrison, L.C. (2011). Human dendritic cell subsets from spleen and blood

- are similar in phenotype and function but modified by donor health status. *J Immunol* **186**, 6207-6217. 10.4049/jimmunol.1002632.
108. Gao, Y., Nish, S.A., Jiang, R., Hou, L., Licona-Limon, P., Weinstein, J.S., Zhao, H., and Medzhitov, R. (2013). Control of T helper 2 responses by transcription factor IRF4-dependent dendritic cells. *Immunity* **39**, 722-732. 10.1016/j.immuni.2013.08.028.
 109. Williams, J.W., Tjota, M.Y., Clay, B.S., Vander Lugt, B., Bandukwala, H.S., Hrusch, C.L., Decker, D.C., Blaine, K.M., Fixsen, B.R., Singh, H., et al. (2013). Transcription factor IRF4 drives dendritic cells to promote Th2 differentiation. *Nat Commun* **4**, 2990. 10.1038/ncomms3990.
 110. Izumi, G., Nakano, H., Nakano, K., Whitehead, G.S., Grimm, S.A., Fessler, M.B., Karmaus, P.W., and Cook, D.N. (2021). CD11b(+) lung dendritic cells at different stages of maturation induce Th17 or Th2 differentiation. *Nat Commun* **12**, 5029. 10.1038/s41467-021-25307-x.
 111. Persson, E.K., Uronen-Hansson, H., Semmrich, M., Rivollier, A., Hagerbrand, K., Marsal, J., Gudjonsson, S., Hakansson, U., Reizis, B., Kotarsky, K., and Agace, W.W. (2013). IRF4 transcription-factor-dependent CD103(+)CD11b(+) dendritic cells drive mucosal T helper 17 cell differentiation. *Immunity* **38**, 958-969. 10.1016/j.immuni.2013.03.009.
 112. Satpathy, A.T., Briseno, C.G., Lee, J.S., Ng, D., Manieri, N.A., Kc, W., Wu, X., Thomas, S.R., Lee, W.L., Turkoz, M., et al. (2013). Notch2-dependent classical dendritic cells orchestrate intestinal immunity to attaching-and-effacing bacterial pathogens. *Nat Immunol* **14**, 937-948. 10.1038/ni.2679.
 113. Lavin, Y., Kobayashi, S., Leader, A., Amir, E.D., Elefant, N., Bigenwald, C., Remark, R., Sweeney, R., Becker, C.D., Levine, J.H., et al. (2017). Innate Immune Landscape in Early Lung Adenocarcinoma by Paired Single-Cell Analyses. *Cell* **169**, 750-765 e717. 10.1016/j.cell.2017.04.014.
 114. Michea, P., Noel, F., Zakine, E., Czerwinska, U., Sirven, P., Abouzid, O., Goudot, C., Scholer-Dahirel, A., Vincent-Salomon, A., Rey, F., et al. (2018). Adjustment of dendritic cells to the breast-cancer microenvironment is subset specific. *Nat Immunol* **19**, 885-897. 10.1038/s41590-018-0145-8.
 115. Böttcher, J.P., Bonavita, E., Chakravarty, P., Bles, 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.
 116. 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.
 117. Hubert, M., Gobbi, E., Couillault, C., Manh, T.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. *Sci Immunol* **5**. 10.1126/sciimmunol.aav3942.
 118. 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.
 119. Nagarsheth, N., Wicha, M.S., and Zou, W. (2017). Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol* **17**, 559-572. 10.1038/nri.2017.49.
 120. Li, J., Byrne, K.T., Yan, F., Yamazoe, T., Chen, Z., Baslan, T., Richman, L.P., Lin, J.H., Sun, Y.H., Rech, A.J., et al. (2018). Tumor Cell-Intrinsic Factors Underlie Heterogeneity of Immune Cell Infiltration and Response to Immunotherapy. *Immunity* **49**, 178-193 e177. 10.1016/j.immuni.2018.06.006.

121. Spranger, S., Bao, R., and Gajewski, T.F. (2015). Melanoma-intrinsic beta-catenin signalling prevents anti-tumour immunity. *Nature* 523, 231-235. 10.1038/nature14404.
122. Canton, J., Bles, 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. *Nat Immunol* 22, 140-153. 10.1038/s41590-020-00824-x.
123. Henry, C.M., Castellanos, C.A., and Reis e Sousa, C. (2023). DNGR-1-mediated cross-presentation of dead cell-associated antigens. *Semin Immunol* 66, 101726. 10.1016/j.smim.2023.101726.
124. Pittet, M.J., Di Pilato, M., Garris, C., and Mempel, T.R. (2023). Dendritic cells as shepherds of T cell immunity in cancer. *Immunity*. 10.1016/j.immuni.2023.08.014.
125. Böttcher, J.P., and Reis e Sousa, C. (2018). The Role of Type 1 Conventional Dendritic Cells in Cancer Immunity. *Trends Cancer* 4, 784-792. 10.1016/j.trecan.2018.09.001.
126. 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.
127. 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(+) 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.
128. Laoui, D., Keirsse, J., Morias, Y., Van Overmeire, E., Geeraerts, X., Elkrim, Y., Kiss, M., Bolli, E., Lahmar, Q., Sichien, D., et al. (2016). The tumour microenvironment harbours ontogenically distinct dendritic cell populations with opposing effects on tumour immunity. *Nat Commun* 7, 13720. 10.1038/ncomms13720.
129. Ferris, S.T., Durai, V., Wu, R., Theisen, D.J., Ward, J.P., Bern, M.D., Davidson, J.T.t., Bagadia, P., Liu, T., Briseno, 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.
130. 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.
131. 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- κ B-dependent IRF1 activation programs cDC1 dendritic cells to drive antitumor immunity. *Sci Immunol* 6. 10.1126/sciimmunol.abg3570.
132. 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.
133. 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.
134. 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., et al. (2015). Non-redundant requirement for CXCR3 signalling during tumoricidal T-cell trafficking across tumour vascular checkpoints. *Nat Commun* 6, 7458. 10.1038/ncomms8458.
135. 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.
136. Siddiqui, I., Schaeuble, K., Chennupati, V., Fuertes Marraco, S.A., Calderon-Copete, S., Pais Ferreira, D., Carmona, S.J., Scarpellino, L., Gfeller, D., Pradervand, S., et al. (2019). Intratumoral Tcf1(+)PD-1(+)CD8(+) T Cells with Stem-like Properties Promote Tumor Control in Response to Vaccination and Checkpoint Blockade Immunotherapy. *Immunity* 50, 195-211 e110. 10.1016/j.immuni.2018.12.021.
 137. Sade-Feldman, M., Yizhak, K., Bjorgaard, S.L., Ray, J.P., de Boer, C.G., Jenkins, R.W., Lieb, D.J., Chen, J.H., Frederick, D.T., Barzily-Rokni, M., et al. (2018). Defining T Cell States Associated with Response to Checkpoint Immunotherapy in Melanoma. *Cell* 175, 998-1013 e1020. 10.1016/j.cell.2018.10.038.
 138. Kurtulus, S., Madi, A., Escobar, G., Klapholz, M., Nyman, J., Christian, E., Pawlak, M., Dionne, D., Xia, J., Rozenblatt-Rosen, O., et al. (2019). Checkpoint Blockade Immunotherapy Induces Dynamic Changes in PD-1(-)CD8(+) Tumor-Infiltrating T Cells. *Immunity* 50, 181-194 e186. 10.1016/j.immuni.2018.11.014.
 139. Zehn, D., Thimme, R., Lugli, E., de Almeida, G.P., and Oxenius, A. (2022). 'Stem-like' precursors are the fount to sustain persistent CD8(+) T cell responses. *Nat Immunol* 23, 836-847. 10.1038/s41590-022-01219-w.
 140. Jansen, C.S., Prokhnevskaya, N., Master, V.A., Sanda, M.G., Carlisle, J.W., Bilen, M.A., Cardenas, M., Wilkinson, S., Lake, R., Sowalsky, A.G., et al. (2019). An intra-tumoral niche maintains and differentiates stem-like CD8 T cells. *Nature* 576, 465-470. 10.1038/s41586-019-1836-5.
 141. Miller, B.C., Sen, D.R., Al Aboosy, R., Bi, K., Virkud, Y.V., LaFleur, M.W., Yates, K.B., Lako, A., Felt, K., Naik, G.S., et al. (2019). Subsets of exhausted CD8(+) T cells differentially mediate tumor control and respond to checkpoint blockade. *Nat Immunol* 20, 326-336. 10.1038/s41590-019-0312-6.
 142. Di Pilato, M., Kfuri-Rubens, R., Pruessmann, J.N., Ozga, A.J., Messemaker, M., Cadilha, B.L., Sivakumar, R., Cianciaruso, C., Warner, R.D., Marangoni, F., et al. (2021). CXCR6 positions cytotoxic T cells to receive critical survival signals in the tumor microenvironment. *Cell* 184, 4512-4530 e4522. 10.1016/j.cell.2021.07.015.
 143. Schenkel, J.M., Herbst, R.H., Canner, D., Li, A., Hillman, M., Shanahan, S.L., Gibbons, G., Smith, O.C., Kim, J.Y., Westcott, P., et al. (2021). Conventional type I dendritic cells maintain a reservoir of proliferative tumor-antigen specific TCF-1(+) CD8(+) T cells in tumor-draining lymph nodes. *Immunity* 54, 2338-2353 e2336. 10.1016/j.immuni.2021.08.026.
 144. Maier, B., Leader, A.M., Chen, S.T., Tung, N., Chang, C., LeBerichel, J., Chudnovskiy, A., Maskey, S., Walker, L., Finnigan, J.P., et al. (2020). A conserved dendritic-cell regulatory program limits antitumour immunity. *Nature* 580, 257-262. 10.1038/s41586-020-2134-y.
 145. Zhang, Q., He, Y., Luo, N., Patel, S.J., Han, Y., Gao, R., Modak, M., Carotta, S., Haslinger, C., Kind, D., et al. (2019). Landscape and Dynamics of Single Immune Cells in Hepatocellular Carcinoma. *Cell* 179, 829-845 e820. 10.1016/j.cell.2019.10.003.
 146. Cheng, S., Li, Z., Gao, R., Xing, B., Gao, Y., Yang, Y., Qin, S., Zhang, L., Ouyang, H., Du, P., et al. (2021). A pan-cancer single-cell transcriptional atlas of tumor infiltrating myeloid cells. *Cell* 184, 792-809 e723. 10.1016/j.cell.2021.01.010.
 147. 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.
 148. Denton, A.E., Roberts, E.W., and Fearon, D.T. (2018). Stromal Cells in the Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol* 1060, 99-114. 10.1007/978-3-319-78127-3_6.

149. Turley, S.J., Cremasco, V., and Astarita, J.L. (2015). Immunological hallmarks of stromal cells in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* *15*, 669-682. 10.1038/nri3902.
150. Davidson, S., Coles, M., Thomas, T., Kollias, G., Ludewig, B., Turley, S., Brenner, M., and Buckley, C.D. (2021). Fibroblasts as immune regulators in infection, inflammation and cancer. *Nat Rev Immunol* *21*, 704-717. 10.1038/s41577-021-00540-z.
151. Tauriello, D.V.F., Sancho, E., and Batlle, E. (2022). Overcoming TGFbeta-mediated immune evasion in cancer. *Nat Rev Cancer* *22*, 25-44. 10.1038/s41568-021-00413-6.
152. Gabrilovich, D.I., Chen, H.L., Girgis, K.R., Cunningham, H.T., Meny, G.M., Nadaf, S., Kavanaugh, D., and Carbone, D.P. (1996). Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med* *2*, 1096-1103. 10.1038/nm1096-1096.
153. Rigas, B., Goldman, I.S., and Levine, L. (1993). Altered eicosanoid levels in human colon cancer. *J Lab Clin Med* *122*, 518-523.
154. Wang, D., and Dubois, R.N. (2010). Eicosanoids and cancer. *Nat Rev Cancer* *10*, 181-193. 10.1038/nrc2809.
155. 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.
156. 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.
157. 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.
158. 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.
159. Dong, H., Zhu, G., Tamada, K., and Chen, L. (1999). B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med* *5*, 1365-1369. 10.1038/70932.
160. Sheppard, K.A., Fitz, L.J., Lee, J.M., Benander, C., George, J.A., Wooters, J., Qiu, Y., Jussif, J.M., Carter, L.L., Wood, C.R., and Chaudhary, D. (2004). PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKCtheta. *FEBS Lett* *574*, 37-41. 10.1016/j.febslet.2004.07.083.
161. Butte, M.J., Keir, M.E., Phamduy, T.B., Sharpe, A.H., and Freeman, G.J. (2007). Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity* *27*, 111-122. 10.1016/j.immuni.2007.05.016.
162. Sun, C., Mezzadra, R., and Schumacher, T.N. (2018). Regulation and Function of the PD-L1 Checkpoint. *Immunity* *48*, 434-452. 10.1016/j.immuni.2018.03.014.
163. Sharma, P., Siddiqui, B.A., Anandhan, S., Yadav, S.S., Subudhi, S.K., Gao, J., Goswami, S., and Allison, J.P. (2021). The Next Decade of Immune Checkpoint Therapy. *Cancer Discov* *11*, 838-857. 10.1158/2159-8290.CD-20-1680.
164. Wherry, E.J. (2011). T cell exhaustion. *Nat Immunol* *12*, 492-499. 10.1038/ni.2035.
165. Wherry, E.J., and Kurachi, M. (2015). Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol* *15*, 486-499. 10.1038/nri3862.
166. Blackburn, S.D., Shin, H., Haining, W.N., Zou, T., Workman, C.J., Polley, A., Betts, M.R., Freeman, G.J., Vignali, D.A., and Wherry, E.J. (2009). Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol* *10*, 29-37. 10.1038/ni.1679.

167. Fourcade, J., Sun, Z., Pagliano, O., Guillaume, P., Luescher, I.F., Sander, C., Kirkwood, J.M., Olive, D., Kuchroo, V., and Zarour, H.M. (2012). CD8(+) T cells specific for tumor antigens can be rendered dysfunctional by the tumor microenvironment through upregulation of the inhibitory receptors BTLA and PD-1. *Cancer Res* 72, 887-896. 10.1158/0008-5472.CAN-11-2637.
168. 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.
169. Katayama, H., Yamamoto, A., Mizushima, N., Yoshimori, T., and Miyawaki, A. (2008). GFP-like proteins stably accumulate in lysosomes. *Cell Struct Funct* 33, 1-12. 10.1247/csf.07011.
170. Nakamura, Y., Ishii, J., and Kondo, A. (2013). Bright fluorescence monitoring system utilizing *Zoanthus* sp. green fluorescent protein (ZsGreen) for human G-protein-coupled receptor signaling in microbial yeast cells. *PLoS One* 8, e82237. 10.1371/journal.pone.0082237.
171. Wübbenhorst, D., Dumler, K., Wagner, B., Wexel, G., Imhoff, A., Gansbacher, B., Vogt, S., and Anton, M. (2010). Tetracycline-regulated bone morphogenetic protein 2 gene expression in lentivirally transduced primary rabbit chondrocytes for treatment of cartilage defects. *Arthritis Rheum* 62, 2037-2046. 10.1002/art.27461.
172. Mayer, C.T., Ghorbani, P., Nandan, A., Dudek, M., Arnold-Schrauf, C., Hesse, C., Berod, L., Stuve, P., Puttur, F., Merad, M., and Sparwasser, T. (2014). Selective and efficient generation of functional Batf3-dependent CD103+ dendritic cells from mouse bone marrow. *Blood* 124, 3081-3091. 10.1182/blood-2013-12-545772.
173. 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. *Eur J Immunol*, e2249923. 10.1002/eji.202249923.
174. Bankhead, P., Loughrey, M.B., Fernandez, J.A., Dombrowski, Y., McArt, D.G., Dunne, P.D., McQuaid, S., Gray, R.T., Murray, L.J., Coleman, H.G., et al. (2017). QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep* 7, 16878. 10.1038/s41598-017-17204-5.
175. Fuchs, C.S., Doi, T., Jang, R.W., Muro, K., Satoh, T., Machado, M., Sun, W., Jalal, S.I., Shah, M.A., Metges, J.P., et al. (2018). Safety and Efficacy of Pembrolizumab Monotherapy in Patients With Previously Treated Advanced Gastric and Gastroesophageal Junction Cancer: Phase 2 Clinical KEYNOTE-059 Trial. *JAMA Oncol* 4, e180013. 10.1001/jamaoncol.2018.0013.
176. Stuart, T., Butler, A., Hoffman, P., Hafemeister, C., Papalexi, E., Mauck, W.M., 3rd, Hao, Y., Stoekius, M., Smibert, P., and Satija, R. (2019). Comprehensive Integration of Single-Cell Data. *Cell* 177, 1888-1902 e1821. 10.1016/j.cell.2019.05.031.
177. Meiser, P., Knolle, M.A., Hirschberger, A., de Almeida, G.P., Bayerl, F., Lacher, S., Pedde, A.M., Flommersfeld, S., Honninger, 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. 10.1016/j.ccell.2023.06.008.
178. Wickham, H. (2016). *ggplot2 - Elegant Graphics for Data Analysis*, 2 Edition (Springer Cham). 10.1007/978-3-319-24277-4.
179. Gu, Z., Eils, R., and Schlesner, M. (2016). Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics* 32, 2847-2849. 10.1093/bioinformatics/btw313.
180. Hao, Y., Hao, S., Andersen-Nissen, E., Mauck, W.M., 3rd, Zheng, S., Butler, A., Lee, M.J., Wilk, A.J., Darby, C., Zager, M., et al. (2021). Integrated analysis of multimodal single-cell data. *Cell* 184, 3573-3587 e3529. 10.1016/j.cell.2021.04.048.
181. Liu, B., Hu, X., Feng, K., Gao, R., Xue, Z., Zhang, S., Zhang, Y., Corse, E., Hu, Y., Han, W., and Zhang, Z. (2022). Temporal single-cell tracing reveals clonal revival and

- expansion of precursor exhausted T cells during anti-PD-1 therapy in lung cancer. *Nat Cancer* 3, 108-121. 10.1038/s43018-021-00292-8.
182. Zeiler, M.D., and Fergus, R. (2014). *Visualizing and Understanding Convolutional Networks*. European Conference on Computer Vision. Springer.
 183. Smilkov, D., Thorat, N., Kim, B., Viegas, F., and Wattenberg, M. (2017). SmoothGrad: removing noise by adding noise. arXiv. 10.48550/arXiv.1706.03825.
 184. Breiman, L. (2001). Random Forests. *Machine Learning* 45, 5-32. 10.1023/a:1010933404324.
 185. Zelenay, S., van der Veen, A.G., Bottcher, J.P., Snelgrove, K.J., Rogers, N., Acton, S.E., Chakravarty, P., Girotti, M.R., Marais, R., Quezada, S.A., et al. (2015). Cyclooxygenase-Dependent Tumor Growth through Evasion of Immunity. *Cell* 162, 1257-1270. 10.1016/j.cell.2015.08.015.
 186. Falcomata, C., Barthel, S., Widholz, S.A., Schneeweis, C., Montero, J.J., Toska, A., Mir, J., Kaltenbacher, T., Heetmeyer, J., Swietlik, J.J., et al. (2022). Selective multi-kinase inhibition sensitizes mesenchymal pancreatic cancer to immune checkpoint blockade by remodeling the tumor microenvironment. *Nat Cancer* 3, 318-336. 10.1038/s43018-021-00326-1.
 187. Diamond, M.S., Kinder, M., Matsushita, H., Mashayekhi, M., Dunn, G.P., Archambault, J.M., Lee, H., Arthur, C.D., White, J.M., Kalinke, U., et al. (2011). Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors. *J Exp Med* 208, 1989-2003. 10.1084/jem.20101158.
 188. 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.
 189. Gerlinger, M., Rowan, A.J., Horswell, S., Math, M., Larkin, J., Endesfelder, D., Gronroos, E., Martinez, P., Matthews, N., Stewart, A., et al. (2012). Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 366, 883-892. 10.1056/NEJMoa1113205.
 190. Moran, A.E., Holzapfel, K.L., Xing, Y., Cunningham, N.R., Maltzman, J.S., Punt, J., and Hogquist, K.A. (2011). T cell receptor signal strength in Treg and iNKT cell development demonstrated by a novel fluorescent reporter mouse. *J Exp Med* 208, 1279-1289. 10.1084/jem.20110308.
 191. Reschke, R., and Gajewski, T.F. (2022). CXCL9 and CXCL10 bring the heat to tumors. *Sci Immunol* 7, eabq6509. 10.1126/sciimmunol.abq6509.
 192. Tokunaga, R., Zhang, W., Naseem, M., Puccini, A., Berger, M.D., Soni, S., McSkane, M., Baba, H., and Lenz, H.J. (2018). CXCL9, CXCL10, CXCL11/CXCR3 axis for immune activation - A target for novel cancer therapy. *Cancer Treat Rev* 63, 40-47. 10.1016/j.ctrv.2017.11.007.
 193. 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.
 194. Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pages, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., et al. (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313, 1960-1964. 10.1126/science.1129139.
 195. Pages, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Asslaber, M., Tosolini, M., Bindea, G., Lagorce, C., Wind, P., Marliot, F., Bruneval, P., et al. (2009). In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J Clin Oncol* 27, 5944-5951. 10.1200/JCO.2008.19.6147.
 196. Camus, M., Tosolini, M., Mlecnik, B., Pages, F., Kirilovsky, A., Berger, A., Costes, A., Bindea, G., Charoentong, P., Bruneval, P., et al. (2009). Coordination of intratumoral

- immune reaction and human colorectal cancer recurrence. *Cancer Res* *69*, 2685-2693. 10.1158/0008-5472.CAN-08-2654.
197. Pages, F., Mlecnik, B., Marliot, F., Bindea, G., Ou, F.S., Bifulco, C., Lugli, A., Zlobec, I., Rau, T.T., Berger, M.D., et al. (2018). International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *Lancet* *391*, 2128-2139. 10.1016/S0140-6736(18)30789-X.
 198. Galon, J., and Bruni, D. (2019). Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies. *Nat Rev Drug Discov* *18*, 197-218. 10.1038/s41573-018-0007-y.
 199. Motz, G.T., and Coukos, G. (2013). Deciphering and reversing tumor immune suppression. *Immunity* *39*, 61-73. 10.1016/j.immuni.2013.07.005.
 200. 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.
 201. 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.
 202. 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.
 203. Sohn, E. (2023). The reproducibility issues that haunt health-care AI. *Nature* *613*, 402-403. 10.1038/d41586-023-00023-2.
 204. Yu, K.H., Lee, T.M., Yen, M.H., Kou, S.C., Rosen, B., Chiang, J.H., and Kohane, I.S. (2020). Reproducible Machine Learning Methods for Lung Cancer Detection Using Computed Tomography Images: Algorithm Development and Validation. *J Med Internet Res* *22*, e16709. 10.2196/16709.
 205. Gibney, E. (2022). Could machine learning fuel a reproducibility crisis in science? *Nature* *608*, 250-251. 10.1038/d41586-022-02035-w.
 206. Davenport, T., and Kalakota, R. (2019). The potential for artificial intelligence in healthcare. *Future Healthc J* *6*, 94-98. 10.7861/futurehosp.6-2-94.
 207. Hanahan, D., and Coussens, L.M. (2012). Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* *21*, 309-322. 10.1016/j.ccr.2012.02.022.
 208. Lim, A.R., Rathmell, W.K., and Rathmell, J.C. (2020). The tumor microenvironment as a metabolic barrier to effector T cells and immunotherapy. *Elife* *9*. 10.7554/eLife.55185.
 209. Chang, C.H., Qiu, J., O'Sullivan, D., Buck, M.D., Noguchi, T., Curtis, J.D., Chen, Q., Gindin, M., Gubin, M.M., van der Windt, G.J., et al. (2015). Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression. *Cell* *162*, 1229-1241. 10.1016/j.cell.2015.08.016.
 210. Bergomas, F., Grizzi, F., Doni, A., Pesce, S., Laghi, L., Allavena, P., Mantovani, A., and Marchesi, F. (2011). Tertiary intratumor lymphoid tissue in colo-rectal cancer. *Cancers (Basel)* *4*, 1-10. 10.3390/cancers4010001.
 211. de Chaisemartin, L., Goc, J., Damotte, D., Validire, P., Magdeleinat, P., Alifano, M., Cremer, I., Fridman, W.H., Sautes-Fridman, C., and Dieu-Nosjean, M.C. (2011). Characterization of chemokines and adhesion molecules associated with T cell presence in tertiary lymphoid structures in human lung cancer. *Cancer Res* *71*, 6391-6399. 10.1158/0008-5472.CAN-11-0952.
 212. Dieu-Nosjean, M.C., Antoine, M., Danel, C., Heudes, D., Wislez, M., Poulot, V., Rabbe, N., Laurans, L., Tartour, E., de Chaisemartin, L., et al. (2008). Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. *J Clin Oncol* *26*, 4410-4417. 10.1200/JCO.2007.15.0284.

213. Schumacher, T.N., and Thommen, D.S. (2022). Tertiary lymphoid structures in cancer. *Science* *375*, eabf9419. 10.1126/science.abf9419.
214. Goc, J., Germain, C., Vo-Bourgais, T.K., Lupo, A., Klein, C., Knockaert, S., de Chaisemartin, L., Ouakrim, H., Becht, E., Alifano, M., et al. (2014). Dendritic cells in tumor-associated tertiary lymphoid structures signal a Th1 cytotoxic immune contexture and license the positive prognostic value of infiltrating CD8+ T cells. *Cancer Res* *74*, 705-715. 10.1158/0008-5472.CAN-13-1342.
215. Im, S.J., Obeng, R.C., Nasti, T.H., McManus, D., Kamphorst, A.O., Gunisetty, S., Prokhnenska, N., Carlisle, J.W., Yu, K., Sica, G.L., et al. (2023). Characteristics and anatomic location of PD-1(+)/TCF1(+) stem-like CD8 T cells in chronic viral infection and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* *120*, e2221985120. 10.1073/pnas.2221985120.
216. Worbs, T., Hammerschmidt, S.I., and Forster, R. (2017). Dendritic cell migration in health and disease. *Nat Rev Immunol* *17*, 30-48. 10.1038/nri.2016.116.
217. Strobl, J., Pandey, R.V., Krausgruber, T., Bayer, N., Kleissl, L., Reininger, B., Vieyra-Garcia, P., Wolf, P., Jentus, M.M., Mitterbauer, M., et al. (2020). Long-term skin-resident memory T cells proliferate in situ and are involved in human graft-versus-host disease. *Sci Transl Med* *12*. 10.1126/scitranslmed.abb7028.
218. de Almeida, G.P., Lichtner, P., Eckstein, G., Brinkschmidt, T., Chu, C.F., Sun, S., Reinhard, J., Madler, S.C., Kloeppel, M., Verbeek, M., and Zielinski, C.E. (2022). Human skin-resident host T cells can persist long term after allogeneic stem cell transplantation and maintain recirculation potential. *Sci Immunol* *7*, eabe2634. 10.1126/sciimmunol.abe2634.
219. Shannon, M.J., and Mace, E.M. (2021). Natural Killer Cell Integrins and Their Functions in Tissue Residency. *Front Immunol* *12*, 647358. 10.3389/fimmu.2021.647358.
220. Clark, R.A., Chong, B., Mirchandani, N., Brinster, N.K., Yamanaka, K., Dowgiert, R.K., and Kupper, T.S. (2006). The vast majority of CLA+ T cells are resident in normal skin. *J Immunol* *176*, 4431-4439. 10.4049/jimmunol.176.7.4431.
221. Steinert, E.M., Schenkel, J.M., Fraser, K.A., Beura, L.K., Manlove, L.S., Igyarto, B.Z., Southern, P.J., and Masopust, D. (2015). Quantifying Memory CD8 T Cells Reveals Regionalization of Immunosurveillance. *Cell* *161*, 737-749. 10.1016/j.cell.2015.03.031.
222. Pelka, K., Hofree, M., Chen, J.H., Sarkizova, S., Pirl, J.D., Jorgji, V., Bejnood, A., Dionne, D., Ge, W.H., Xu, K.H., et al. (2021). Spatially organized multicellular immune hubs in human colorectal cancer. *Cell* *184*, 4734-4752 e4720. 10.1016/j.cell.2021.08.003.
223. Szente, B.E., Subramaniam, P.S., and Johnson, H.M. (1995). Identification of IFN-gamma receptor binding sites for JAK2 and enhancement of binding by IFN-gamma and its C-terminal peptide IFN-gamma(95-133). *J Immunol* *155*, 5617-5622.
224. Castro, F., Cardoso, A.P., Goncalves, R.M., Serre, K., and Oliveira, M.J. (2018). Interferon-Gamma at the Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion. *Front Immunol* *9*, 847. 10.3389/fimmu.2018.00847.
225. Bald, T., Pedde, A.M., Corvino, D., and Bottcher, J.P. (2020). The role of NK cell as central communicators in cancer immunity. *Adv Immunol* *147*, 61-88. 10.1016/bs.ai.2020.06.002.
226. Bosteels, C., Neyt, K., Vanheerswynghe, M., van Helden, M.J., Sichien, D., Debeuf, N., De Prijck, S., Bosteels, V., Vandamme, N., Martens, L., et al. (2020). Inflammatory Type 2 cDCs Acquire Features of cDC1s and Macrophages to Orchestrate Immunity to Respiratory Virus Infection. *Immunity* *52*, 1039-1056 e1039. 10.1016/j.immuni.2020.04.005.
227. Mazet, J.M., Mahale, J.N., Tong, O., Watson, R.A., Lechuga-Vieco, A.V., Pirogova, G., Lau, V.W.C., Attar, M., Koneva, L.A., Sansom, S.N., et al. (2023). IFN-gamma signaling in cytotoxic T cells restricts anti-tumor responses by inhibiting the maintenance and diversity of intra-tumoral stem-like T cells. *Nat Commun* *14*, 321. 10.1038/s41467-023-35948-9.

228. Mojic, M., Takeda, K., and Hayakawa, Y. (2017). The Dark Side of IFN-gamma: Its Role in Promoting Cancer Immuno-evasion. *Int J Mol Sci* 19. 10.3390/ijms19010089.
229. Thommen, D.S., Koelzer, V.H., Herzig, P., Roller, A., Trefny, M., Dimeloe, S., Kiialainen, A., Hanhart, J., Schill, C., Hess, C., et al. (2018). A transcriptionally and functionally distinct PD-1(+) CD8(+) T cell pool with predictive potential in non-small-cell lung cancer treated with PD-1 blockade. *Nat Med* 24, 994-1004. 10.1038/s41591-018-0057-z.
230. Zhang, Y., Chen, H., Mo, H., Hu, X., Gao, R., Zhao, Y., Liu, B., Niu, L., Sun, X., Yu, X., et al. (2021). Single-cell analyses reveal key immune cell subsets associated with response to PD-L1 blockade in triple-negative breast cancer. *Cancer Cell* 39, 1578-1593 e1578. 10.1016/j.ccell.2021.09.010.
231. Dammeijer, F., van Gulijk, M., Mulder, E.E., Lukkes, M., Klaase, L., van den Bosch, T., van Nimwegen, M., Lau, S.P., Latupeirissa, K., Schetterers, S., et al. (2020). The PD-1/PD-L1-Checkpoint Restrains T cell Immunity in Tumor-Draining Lymph Nodes. *Cancer Cell* 38, 685-700 e688. 10.1016/j.ccell.2020.09.001.
232. Francis, D.M., Manspeaker, M.P., Schudel, A., Sestito, L.F., O'Melia, M.J., Kissick, H.T., Pollack, B.P., Waller, E.K., and Thomas, S.N. (2020). Blockade of immune checkpoints in lymph nodes through locoregional delivery augments cancer immunotherapy. *Sci Transl Med* 12. 10.1126/scitranslmed.aay3575.

5.4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ontogenese dendritischer Zellen	14
Abbildung 2: Die Reifung von cDCs	17
Abbildung 3: Exemplarische Antigenpräsentation einer cDC1 an eine CD8 ⁺ T-Zelle	19
Abbildung 4: Orchestrierung der Antitumor-Immunantwort durch cDC1	22
Abbildung 5: Arbeitsablauf zur Probenherstellung für die volumetrische Immunofluoreszenz-Mikroskopie.	39
Abbildung 6: 3D-Zell-Rendering für cDC1 und CD8 ⁺ T-Zellen in volumetrischen Mikroskopiebildern	40
Abbildung 7: Synchronisiertes BRAF ^{V600E} -Melanommodell	48
Abbildung 8: Vorhersage des Ausgangs der Antitumor-Immunantwort basierend auf räumlichen Informationen zu cDC1 und CD8 ⁺ T-Zellen durch ein Deep-Learning-Modell.....	50
Abbildung 9: Relevanz räumlicher Informationen für die Tumorklassifizierung durch das Deep-Learning-Modell.....	51
Abbildung 10: Die Quantifizierung intratumoraler Immunzellen ist für die Unterscheidung zwischen Progressor- und Regressortumoren nicht ausreichend ...	53
Abbildung 11: Randregionen des Tumors sind wichtig für die Genauigkeit des Deep-Learning-Modells.....	55
Abbildung 12: Die Bildung von cDC1-CD8 ⁺ T Zell-Clustern unterscheidet Regressor- von Progressortumoren.....	57
Abbildung 13: cDC1-CD8 ⁺ T-Zell-Cluster im Verlauf des Tumorwachstums und in unterschiedlichen Regressor- und Progressor-Tumormodellen.....	59
Abbildung 14: cDC1-CD8 ⁺ T-Zell-Cluster bilden sich im Tumorstroma	61
Abbildung 15: cDC1-CD8 ⁺ T-Zell-Cluster bilden intratumorale Nischen für die Aktivierung von CD8 ⁺ T-Zellen.....	62
Abbildung 16: Phänotypisierung und funktionelle Analyse von intratumoralen CD8 ⁺ T-Zellen	64
Abbildung 17: Die Amplifizierung von TCF1 ⁺ CD8 ⁺ T-Zell-Antworten findet in intratumoralen cDC1-CD8 ⁺ T-Zell-Clustern statt.....	65

Abbildung 18: Protektive Antitumor-Immunantworten erfordern eine intratumorale Stimulation von CD8 ⁺ T-Zellen durch cDC1	67
Abbildung 19: cDC1-CD8 ⁺ T-Zell-Cluster bilden eine Nische für T-Zell-Proliferation in humanen HNSCC-Tumoren	69
Abbildung 20: Zusammenhang der cDC1-CD8 ⁺ T-Zell-Cluster in humanen HNSCC mit klinischen Parametern.	70
Abbildung 21: Heterogenität von cDC1 im TMM von <i>Ptgs1/Ptgs2</i> ^{-/-} -BRAF ^{V600E} -Tumoren	72
Abbildung 22: Identifizierung der drei intratumoralen cDC1-Subpopulationen <i>ex vivo</i>	73
Abbildung 23: cDC1-CD8 ⁺ T-Zell-Cluster werden von der MHCII ^{hi} CCR7 ^{neg} cDC1-Subpopulation gebildet	75
Abbildung 24: Clusterbildung durch MHCII ^{hi} CCR7 ^{neg} cDC1 im TMM ist ein konserviertes Phänomen	77
Abbildung 25: Immunostimulatorische MHCII ^{hi} CCR7 ^{neg} cDC1 können Tumorantigene aufnehmen und kreuzpräsentieren	79
Abbildung 26: Tumorantigen-spezifische CD8 ⁺ T-Zellen interagieren präferenziell mit MHCII ^{hi} CCR7 ^{neg} cDC1	80
Abbildung 27: MHCII ^{hi} CCR7 ^{neg} cDC1 orchestrieren das CD8 ⁺ T-Zell-Clustering über die CXCL9/CXCR3-Achse	82
Abbildung 28: Die CXCL9/CXCL10-CXCR3-Achse vermittelt die Clusterbildung unabhängig von der Rekrutierung von CD8 ⁺ T-Zellen.	84
Abbildung 29: cDC1-CD8 ⁺ T-Zell-Cluster mit MHCII ^{hi} CCR7 ^{neg} cDC1 korrelieren mit progressionsfreiem Überleben der HNSCC-Patienten.....	86
Abbildung 30: Identifizierung von CXCL9 ⁺ CCR7 ^{neg} cDC1 und CCR7 ⁺ cDCs in humanen Tumoren.....	87
Abbildung 31: Die Gensignatur der CXCL9 ⁺ CCR7 ^{neg} cDC1 korreliert mit dem Überleben humaner Krebspatienten	89
Abbildung 32: Grafische Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit	90
Abbildung 33: Modelle für die Entwicklung der reifen cDC1-Subpopulationen	96

5.5 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien und Reagenzien	27
Tabelle 2: Medien und Puffer	27
Tabelle 3: Antikörper	28
Tabelle 4: Assay-Kits	29
Tabelle 5: Tumorzelllinien	30
Tabelle 6: Rekombinante DNA.....	30
Tabelle 7: Datensets und Code.....	30
Tabelle 8: Software und Algorithmen	30
Tabelle 9: Mausstämme	31

6 Danksagung

Während meiner Promotion haben mich viele Menschen begleitet, ohne die die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre. An dieser Stelle möchte ich mich bei ihnen bedanken.

Als Erstes danke ich meinem Betreuer Dr. Jan Böttcher für seine Anleitung und Unterstützung. Während unserer Zusammenarbeit habe ich sehr viel gelernt, konnte an spannenden Projekten arbeiten und dabei immer auf seinen Rat und seine Hilfe zählen. Eine bessere Betreuung meiner Promotion hätte ich mir nicht vorstellen können.

Bei meinem Mentor Prof. Dr. Percy Knolle bedanke ich mich für die tolle Zeit an seinem Institut und die hilfreichen Diskussionen zu meiner Arbeit.

Ich danke außerdem Prof. Dr. Angelika Schnieke, die sich die Zeit genommen hat, ein Teil meines Prüfungskomitees zu sein und meine Promotion zu begleiten.

Während meiner Promotion habe ich mit wunderbaren Kolleginnen und Kollegen gearbeitet, die zu Freundinnen und Freunden geworden sind. Mein Dank gilt vor allem Anna-Marie Pedde, Anna Hirschberger, Felix Bayerl, Sebastian Lacher, Lukas Ramsauer und Thomas Rudolph für die Zusammenarbeit und Unterstützung im Labor, aber auch für unsere gemeinsamen Erlebnisse außerhalb der Arbeit. Ich werde unsere Arbeitsgruppe vermissen.

Auch bei allen weiteren Mitgliedern des Instituts für molekulare Immunologie bedanke ich mich an dieser Stelle für ihre Unterstützung, besonders bei Silke Hegenbarth, Savvoula Michailidou, Josef Straßmair und Irina Rodionova.

Herzlich danke ich auch allen Co-Autoren der Publikation in Cancer Cell, die während meiner Promotion entstanden ist, für die Zusammenarbeit, insbesondere Dr. Gustavo de Almeida, Moritz Knolle und Dr. Georgios Kaissis.

Besonderer Dank gebührt meiner Familie: meinen Eltern Andrea Meiser und Jürgen Frische, die nicht nur während der Promotion, sondern auch auf meinem Weg dorthin, immer für mich da waren und mich unterstützt haben, wo sie nur konnten. Das gilt auch für meine Großeltern Werner und Agnes Meiser.

Petra Frank danke ich für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Abschließend danke ich meinem Partner Philipp Frank für seinen Optimismus und sein Vertrauen, die mir durch die schwierigen Phasen der Promotion geholfen haben, und dafür, dass er immer sofort zur Stelle war, wenn ich ihn brauchte.

7 Eidesstattliche Erklärung

Ich, Philippa Paulina Meiser, erkläre an Eides statt, dass ich die bei der promotionsführenden Einrichtung Graduate Center of Medicine and Health (School of Medicine and Health) der Technischen Universität München zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel:

Die Orchestrierung der CD8⁺ T-Zell-vermittelten Antitumor-Immunantwort durch eine immunostimulatorische cDC1-Subpopulation

unter der Anleitung und Betreuung durch Dr. Jan P. Böttcher ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 7 Abs. 6 und 7 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuer*innen für die Anfertigung von Dissertationen sucht, oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.

Ich habe die Dissertation in dieser oder ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt.

Teile der Dissertation wurden in Cancer Cell, Volume 41, Issue 8, August 2023 (DOI: 10.1016/j.ccell.2023.06.008) veröffentlicht.

Ich habe den angestrebten Doktorgrad noch nicht erworben und bin nicht in einem früheren Promotionsverfahren für den angestrebten Doktorgrad endgültig gescheitert.

Ich habe bereits am _____ bei der promotionsführenden Einrichtung _____ der Hochschule _____ unter Vorlage einer Dissertation mit dem Thema _____ die Zulassung zur Promotion beantragt mit dem Ergebnis:

Ich habe keine Kenntnis über ein strafrechtliches Ermittlungsverfahren in Bezug auf wissenschaftsbezogene Straftaten gegen mich oder eine rechtskräftige strafrechtliche Verurteilung mit Wissenschaftsbezug.

Die öffentlich zugängliche Promotionsordnung sowie die Richtlinien zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und für den Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten der TUM sind mir bekannt, insbesondere habe ich die Bedeutung von § 27 PromO (Nichtigkeit der Promotion) und § 28 PromO (Entzug des Doktorgrades) zur Kenntnis genommen. Ich bin mir der Konsequenzen einer falschen Eidesstattlichen Erklärung bewusst.

Mit der Aufnahme meiner personenbezogenen Daten in die Alumni-Datei bei der TUM bin ich

einverstanden, nicht einverstanden.

München, 05.01.2024



Ort, Datum, Unterschrift