

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut der Pathologie mit den Sektionen Molekularpathologie und Zytopathologie

Direktor: Prof. Dr. med. Guido Sauter

**Expressionsunterschiede des Immuncheckpoint-Rezeptors CD112R in
humanen Karzinomen im Vergleich zu Normalgeweben**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Hannah Lea Jansen
aus Hamburg

Hamburg 2020

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 27.07.2021**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Walter Fiedler

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. Guido Sauter

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Historische Entwicklung von Immuncheckpoint-Therapien	1
1.2 Immuncheckpoint Inhibitoren in den untersuchten Tumorentitäten	4
1.3 Nebenwirkungen und Limitationen der aktuellen Immuncheckpoint-Therapien	5
1.4 CD112R	8
1.4.1 Struktureller Aufbau und Funktion von CD112R.....	8
1.4.2 Liganden und Interaktions-Netzwerk von CD112R.....	9
1.4.3 CD112R Expressionsmuster in Geweben	10
1.4.4 Diagnostische Relevanz (CD112R als prädiktiver Marker).....	11
1.4.5 Klinische Studien	11
1.5 Multiplex-Fluoreszenz-Immunhistochemie (mIHC).....	12
2. Material und Methoden	15
2.1 Gewebekollektiv.....	15
2.2 Tissue MicroArray (TMA).....	15
2.3 Multiplex-Fluoreszenz-Immunhistochemie	15
2.4 Quantifizierung der Immunzellen	17
2.4.1 Digitalisierung und Analyse von Großschnitten und TMAs.....	17
2.4.2 Deep Learning basierte Zellsegmentierung.....	17
2.4.3 Schwellenwertbestimmung für die Definition positiver Zell-Phänotypen.....	17
2.5 Referenz-Zelllinie.....	19
2.5.1 Zellkultur und Transfektion.....	19
2.5.2 Zelllysat Vorbereitung für den Referenz-Zelllinien-TMA	20
2.6 Statistik	21
3. Ergebnisse	23
3.1 CD112R Expression im Normalgewebe	23
3.2 Hochregulation von CD112R in malignen Tumoren	30
4. Diskussion	43
5. Zusammenfassung	55
6. Abkürzungsverzeichnis	57
7. Abbildungsverzeichnis	59
8. Tabellenverzeichnis	61
9. Literaturverzeichnis	62
10. Danksagung	73
11. Lebenslauf	74
12. Eidesstattliche Versicherung	75

1. Einleitung

1.1 Historische Entwicklung von Immuncheckpoint-Therapien

Die moderne Behandlung von Krebserkrankungen wurde lange Zeit durch operative Eingriffe, Chemotherapie und Strahlentherapie dominiert. Die zielgerichteten Therapien („*targeted therapies*“) haben seit der Entwicklung von Tamoxifen für Brustkrebspatientinnen in der 1970er Jahren einen weiteren Behandlungsweg geebnet (Cole et al., 1971). Diese etablierten Therapien werden nun durch Immuntherapien immer mehr erweitert und spielen insbesondere bei der Behandlung von fortgeschrittenen Krebserkrankungen eine zunehmende Rolle.

Die Aktivierung des Immunsystems als therapeutische Option zu nutzen um Krebspatienten im palliativen Stadium zu helfen, ist seit über 150 Jahren Teil der Medizingeschichte. Bereits im Jahr 1868 wurde der Rückgang von Geschwülsten bei gleichzeitigem Auftreten von Erysipelen beobachtet (Busch, 1868, Fehleisen, 1882). Um diese Kausalität zu untersuchen wurde bei einer Patientin mit einer rasant wachsenden Wucherung vorsätzlich die Entwicklung eines Erysipels hervorgerufen. Die Masse der Geschwulst nahm im Verlauf der Entzündung deutlich ab und bestätigte damit den vermuteten Zusammenhang. Nach Abklingen der Infektion kam es jedoch zu einem raschen Progress des Tumors (Busch, 1868).

Die Injektion von Streptokokken in einen fortgeschrittenen Tumor durch William B. Coley im Jahr 1891 gilt als die erste erfolgreiche Immuntherapie einer Krebserkrankung (Coley, 1893). Dieses als „Coley's Toxin“ bekannt gewordene und mit Risiken behaftete Therapeutikum geriet jedoch durch die Entwicklung der Strahlen- und Chemotherapie zunächst in Vergessenheit.

Der diesem beobachteten Effekt zugrunde liegende Mechanismus setzt sich aus mehreren immunologischen und tumorbiologischen Eigenschaften zusammen. Dazu gehört, dass sich potentiell maligne Zellen durch eine hohe Mutationsrate auszeichnen, was unter anderem die Expression einer Vielzahl von Neoantigenen zur Folge hat. Diese körperfremden Antigene erlauben es dem Immunsystem entartete Zellen von benignen Zellen zu unterscheiden. Diese Theorie der sogenannten „*immune surveillance*“, zu deutsch Immunüberwachung, wurde um das Jahr 1950 von Macfarlane Burnet und Lewis Thomas geprägt und später mit dem Nobelpreis gewürdigt (Burnet, 1970, Thomas, 1982). Unterstützt wurde diese Theorie durch die Beobachtung von primär immundefizienten und therapeutisch immunsupprimierten Patienten, welche ein signifikant höheres relatives

Risiko für die Entstehung maligner Tumoren zeigten (Gatti und Good, 1971, Penn und Starzl, 1972).

Aus der Theorie der „*immune surveillance*“ und dem Vorhandensein und Fortschreiten von Tumorerkrankungen lässt sich ableiten, dass die Antitumoraktivität des Immunsystems über verschiedene Mechanismen von den Tumorzellen gehemmt werden muss.

Die Phasen des Immunoediting wurden von Dunn et al. (2002) als die „drei E's“ beschrieben: „*Elimination*“, „*Equilibrium*“ und „*Escape*“. Die „*Elimination*“ entspricht dabei der „*immune surveillance*“ und ist eine Interferon- γ (IFN- γ) getriggerte Reaktion, welche durch die Produktion von Chemokinen und die Rekrutierung von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), dendritischen Zellen und Makrophagen zum Untergang von malignen Zellen führt. Dieser durch Antigenpräsentierende Zellen getriebene Tumorzelluntergang geht mit der Bildung von tumorspezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen einher. Das „*Equilibrium*“ (Gleichgewicht) ist die zweite Phase, beschreibt die Beseitigung von einzelnen Tumorzellvarianten und trägt nach dem darwinschen „*survival of the fittest*“ Prinzip zur Selektion der am besten angepassten Zellklone bei. In der letzten Phase „*Escape*“ finden sich Tumorzellvarianten, welche sich durch genetische Mutationen oder epigenetische Veränderungen der immunologischen Kontrolle und Zerstörung entziehen und schließlich durch unkontrollierte Teilung zu klinisch relevanten Tumoren heranwachsen können (Dunn et al., 2002).

Gegenwärtig sind einige der sogenannten „*Escape*“-Mechanismen von Tumorzellen bekannt: Der mutationsbedingte Verlust der „*major histocompatibility complex*“- (MHC)-Proteine und damit die fehlende Präsentation von tumoreigenen Neoantigenen sowie die von Tumorzellen produzierten Enzyme, wie der Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO), stören die T-Zell-vermittelte Immunantwort (Beatty und Gladney, 2015). Nicht zuletzt kann die Sekretion von verschiedenen Zytokinen durch tumorinfiltrierende Immunzellen die Expression von inhibitorischen Oberflächenproteinen, wie PD-L1, auf Makrophagen und Tumorzellen induzieren (Taube et al., 2012, Zong et al., 2019).

Die gegenwärtige Entwicklung von individualisierten Krebstherapien zielt auf die Reaktivierung des durch die Tumorzellen inhibierten Immunsystems ab. Eine der ersten effektiven Immuntherapien ist heute noch Teil der leitliniengerechten Therapie des nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020): Die intravesikale Applikation von „*Bacille Calmette-Guérin*“ (BCG) bei superfizialen Blasenkrebs wurde 1976 in einer Studie untersucht, nachdem eine Behandlung mit BCG bereits zuvor bei soliden Tumoren, wie beispielsweise dem malignen Melanom, zu einem Tumorregress geführt hatte (Morales et al., 1976, Grant et al., 1974). BCG wird von Tumorzellen aufgenommen, führt dort zu einer verstärkten Expression von

Oberflächenantigenen wie MHC Klasse II und einer Sekretion von diversen Interleukinen. Dies stellt einen Mechanismus dar, der sonst nur von professionell Antigen-präsentierenden Zellen bekannt ist und vermutlich die tumorzellspezifische Wirkung der BCG-Therapie erklärt (Ikeda et al., 2002, Redelman-Sidi et al., 2014).

Eine weitere vielversprechende Entwicklung brachte in den 1980er Jahren der Einsatz von rekombinant hergestelltem α -2-Interferon, welches bei Patienten mit Haarzelleukämie vielversprechende Ergebnisse zeigte (Golomb et al., 1986, Quesada et al., 1984). Die Behandlung war jedoch mit vielen Nebenwirkungen verbunden, wie beispielsweise anhaltenden grippeähnlichen Symptomen, psychopathologischen Veränderungen oder autoimmunen Begleiterscheinungen (Sleijfer et al., 2005). Zeitgleich konnte in klinischen Studien ein Nutzen bei der Behandlung von fortgeschrittenen Tumorerkrankungen mit Interleukin-2 nachgewiesen werden (Rosenberg et al., 1985, Rosenberg et al., 1994). Interleukin-2 wird physiologischerweise von T-Lymphozyten produziert und hat eine aktivierende und proliferationsfördernde Wirkung auf Lymphozyten und NK-Zellen (Smith, 1988). Als Medikament wurde es 1992 von der „*United States Food and Drug Administration*“ (FDA) für die Behandlung des Nierenzellkarzinoms und 1998 für die Therapie des malignen Melanoms zugelassen.

Nachdem diese Behandlungsansätze wegweisende Fortschritte gezeigt hatten und antikörperbasierte Therapien an anderen Stellen zum Einsatz kamen, wurden die inhibitorischen Immuncheckpoints in der Immuntherapie von Krebserkrankungen als mögliche Zielstruktur ausgemacht. Die Aufgabe von Immuncheckpoints im menschlichen Körper ist die Balance zwischen Immunreaktion und Immuntoleranz aufrecht zu erhalten und somit die Dauer und das Ausmaß der physiologischen Immunantwort auf Reize zu modellieren (Pardoll, 2012). Jede Immunreaktion geht daher mit der Aktivierung von potentiell inhibitorischen Pfaden einher, doch dieser Mechanismus wird ebenfalls von Tumorzellen genutzt, um sich der Zerstörung durch Immunzellen zu entziehen (Pardoll, 2012). Viele dieser inhibitorischen Signale werden durch eine Ligand-Rezeptor-Beziehung gesteuert, welche sich durch eine lokale Blockade dieser Interaktion unterbrechen lässt (Pardoll, 2012).

Die erste von der FDA im Jahr 2011 zugelassene Immuncheckpoint-Therapie ist ein blockierender Antikörper namens Ipilimumab, welcher gegen das „*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*“ (CTLA-4) gerichtet ist (Mansh, 2011). Ipilimumab hatte zuvor im Rahmen einer Studie bei der Behandlung von Patienten mit fortgeschrittenem malignem Melanom zu einem verbesserten mittleren Gesamtüberleben von über 10 Monaten geführt (Hodi et al., 2010). CTLA-4 war der erste identifizierte inhibitorische Rezeptor, welcher während der

frühen Aktivierungsphase von T-Zellen hochreguliert wurde und bei Bindung seines Liganden eine proliferationshemmende Wirkung zeigte (Walunas et al., 1994).

Die zweite Generation von Immuncheckpoint-Inhibitoren haben als Ziel die Blockade des „*programmed cell death protein 1*“ (PD-1). Die negative immunregulatorische Wirkung von PD-1 konnte durch das erhöhte Auftreten von autoimmunen Reaktionen in PD-1 Knockout-Mäusen gezeigt werden (Nishimura et al., 1999). Die Expression des PD-1 Liganden „*programmed cell death-ligand 1*“ (PD-L1) durch Tumorzellen zeigte sich als möglicher „*Escape*“-Mechanismus von Tumoren, der durch die Interaktion mit PD-1 einen signifikanten inhibitorischen Einfluss auf T-Lymphozyten in der Tumorumgebung ausübte (Iwai et al., 2002). Die Zulassung des ersten PD-1-blockierenden Antikörpers Nivolumab im Jahr 2014 durch die FDA beruhte auf dem Ausgang der „CheckMate 037“ Studie, in der sich Nivolumab im Vergleich zu einer Chemotherapie bei Patienten mit fortgeschrittenem malignen Melanom überlegen zeigte, welche zuvor einen Tumorprogress unter Ipilimumab +/- einer BRAF-Inhibitor Therapie dargeboten hatten (Weber et al., 2015). Pembrolizumab, ein weiterer Antikörper gegen PD-1, erhielt kurze Zeit später von der FDA die Zulassung und darauf folgend die Einstufung als Erstlinientherapie des fortgeschrittenen Melanoms, da es Ipilimumab im direkten Vergleich überlegen war (Ribas et al., 2015, Robert et al., 2015, Schachter et al., 2017). Cemiplimab, der dritte PD-1-Inhibitor, wurde für die Behandlung des fortgeschrittenen Plattenkarzinoms der Haut zugelassen und stellt aktuell in diesem Stadium dieser Tumorentität die einzige vielversprechende Therapie dar (Migden et al., 2018).

Seit diesen ersten Erfolgen ist die Anzahl der Zulassungen von der FDA für Immuncheckpoint-Therapien von Tumoren kontinuierlich gestiegen, mittlerweile auf über 15 verschiedene Entitäten (Vaddepally et al., 2020). Dieser enorme Fortschritt in der Krebstherapie wurde 2018 mit der Vergabe des Nobel-Preises für Medizin an James Allison und Tasuku Honjo für ihren maßgeblichen Anteil an der Entwicklung der CTLA-4- und PD-1/ PD-L1-Blockade gewürdigt.

1.2 Immuncheckpoint Inhibitoren in den untersuchten Tumorentitäten

Aktuell sind sieben Immuncheckpoint-Inhibitoren von der FDA zugelassen, die therapeutisch an PD-L1, PD-1 oder CTLA-4 ansetzen (Vaddepally et al., 2020). Für die Behandlung des Blasenkarzinoms sind drei PD-L1 Inhibitoren (Atezolizumab, Avelumab, Durvalumab) sowie zwei PD-1 Inhibitoren (Nivolumab, Pembrolizumab) genehmigt, die in Studien bei bereits metastasierten Befunden Ansprechraten zwischen 23 und 29% erreichen konnten (Kim und Seo, 2018, Ghatalia und Plimack, 2019). Der in der „Checkmate-017“ Studie nachgewiesene Überlebensvorteil einer Immuncheckpoint-

Therapie bei nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen hat 2015 zur Zulassung von Nivolumab geführt, welche bis heute um Pembrolizumab, Durvalumab und Atezolizumab erweitert wurde (Brahmer et al., 2015). Die Möglichkeit einer Kombinationstherapie mit Ipilimumab und Nivolumab beim metastasierten Kolonkarzinom kann in Abhängigkeit von einer vorliegenden hochfrequenten Mikrosatelliteninstabilität (MSI-H) erfolgen (Vaddepally et al., 2020). Beim Pankreaskarzinom zeigte sich das größte Potential für den erfolgreichen Einsatz der Immuncheckpoint-Therapie in der prozentual sehr gering repräsentierten Mikrosatelliten-instabilen Kohorte (Ma et al., 2020). Die Ansprechraten des epithelialen Ovarialkarzinoms auf eine Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren fielen in Monotherapiestudien niedrig aus, konnten jedoch in einer Vergleichsstudie durch eine Kombinationstherapie von 12% (Nivolumab) auf 31% (Nivolumab + Ipilimumab) erhöht werden (Kandalaft et al., 2020, Zamarin et al., 2020).

1.3 Nebenwirkungen und Limitationen der aktuellen Immuncheckpoint-Therapien

Das Nebenwirkungsprofil dieser neuen Therapien lässt sich aus der immunsuppressiven Wirkung einiger Immuncheckpoints ableiten. Die auftretenden lokalen und systemischen autoimmunen Nebenwirkungen unterscheiden sich in Schwere und Art je nach verabreichtem Immuncheckpoint-Inhibitor und behandelter Tumorerkrankung (Michot et al., 2016).

Zu den häufigsten gehören Fatigue, autoimmune Reaktionen der Haut (u.a. Vitiligo), der Schleimhäute (u.a. trockener Mund), des Gastrointestinaltraktes (u.a. Diarrhoe, Colitis), der endokrinen Organe (u.a. Hypothyreose) und der Leber (Hepatitis) (Postow et al., 2018). Die Lunge, das Herz sowie das zentrale Nervensystem sind seltener betroffen, können aber wie die meisten anderen auch lebensbedrohlich sein (Martins et al., 2019). Bei Auftreten dieser „*immune-related adverse events*“ (irAEs) wird die nächste geplante Gabe des Immuncheckpoint-Inhibitors zunächst verzögert beziehungsweise ausgesetzt oder eine orale Glukokortikoidtherapie begonnen. Wenn es zu schwereren Reaktionen kommt, kann auf andere Immunsuppressiva, wie beispielsweise Infliximab, ein Antikörper, der sich gegen den Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) richtet, zurückgegriffen werden (Postow et al., 2018). Eine autoimmune Nebenwirkung zu entwickeln ist jedoch in bestimmten Konstellationen mit einem besseren Überleben assoziiert und kann somit auch ein Hinweis auf die Wirksamkeit des Immuncheckpoint-Inhibitors sein (Zhou et al., 2020).

Im Hinblick auf diese partiell gravierenden Nebenwirkungen und durchschnittlich niedrigen Ansprechraten der Immuncheckpoint-Therapien ist das Ziel prädiktive Biomarker zu identifizieren, welche den Behandlungserfolg einzelner Patienten prognostizieren können (Mahoney et al., 2015, Arora et al., 2019). Dabei gilt es, das Patientenkollektiv, welches von

einer Monotherapie profitieren würde, von demjenigen zu unterscheiden, das mindestens eine Kombination aus zwei verschiedenen Immuncheckpoint-Inhibitoren benötigt sowie die Responder von den Non-Respondern und damit die Steuerung dieser kostenintensiven Therapie sinnvoll zu verbessern (Mahoney et al., 2015). Die bisher einzigen etablierten prädiktiven Biomarker stellen die PD-L1 Expression von Tumorzellen und Immunzellen sowie das Vorhandensein einer Mikrosatelliteninstabilität (MSI) dar (Arora et al., 2019).

Tumor-Immunphänotypen als prädiktive Biomarker

Ein weiterer prognostisch relevanter Biomarker ist die Beschaffenheit der Tumormikroumgebung („*tumor microenvironment*“), zu welcher unter anderem die Distribution der tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs) gehört (Arora et al., 2019). In malignen Tumoren lassen sich unterschiedliche Immunphänotypen unterscheiden, welche sich anhand der Dichte und Lokalisation der TILs charakterisieren lassen: der „*immune-desert*“- , „*immune-excluded*“- und „*inflamed*“-Phänotyp (Chen und Mellman, 2017). Der als „*immune-desert*“ beschriebene Typ zeichnet sich durch die geringe Infiltrationsdichte von Immunzellen aus und bleibt weitestgehend unentdeckt vom Immunsystem. Die möglichen Ursachen hierfür sind eine immunologische Toleranz, ein fehlendes Priming der T-Zellen oder eine immunologische Ignoranz, bspw. durch das Fehlen von Neoantigenen oder einer verringerten Antigen-Präsentation über MHC-Moleküle. Tumore, die dem „*immune-excluded*“ Phänotypen zugeordnet werden, sind an ihrem invasiven Randwall von Immunzellen gesäumt, im Zentrum des Tumors jedoch vergleichbar mit dem „*immune desert*“-Phänotyp, durch eine geringe Dichte von Immunzellen charakterisiert. Kennzeichnend für den „*inflamed*“-Immunphänotyp ist eine hohe Dichte von verschiedenen Immunzellen in allen Kompartimenten des Tumors. Studien konnten zeigen, dass der „*inflamed*“-Immunphänotyp sowohl mit einem längeren Überleben als auch einem besseren Ansprechen auf Immuncheckpoint-Inhibitoren assoziiert ist (Herbst et al., 2014, Tume et al., 2014, Pfannstiel et al., 2019, Schulze et al., 2020). Neben diesen immunhistochemisch sichtbar unterschiedlichen Lymphozyteninfiltrationen zeigt die Tumormikroumgebung zudem eine abweichende Zusammensetzung von Zytokinen und Expressionsmustern von Oberflächenmolekülen wie PD-L1 (Mellman et al., 2011). Die tumorinfiltrierenden CD8⁺ Lymphozyten scheinen sich in einem dysfunktionalen Zustand der Erschöpfung („*exhaustion*“) zu befinden (ebd.).

Neben der Suche nach prädiktiven Biomarkern ist aktueller Gegenstand der Forschung die Ansprechraten durch Kombinationstherapien mit weiteren Immuncheckpoint-Inhibitoren weiter zu steigern. Die Kombination von zwei Immuncheckpoint-Inhibitoren wurde für verschiedene Tumorentitäten in Studien geprüft und konnte dort eine Erhöhung der Ansprechrate bewirken, zum Beispiel durch die duale Therapie mit Nivolumab und

Ipilimumab bei Patienten mit einem malignen Melanom (Larkin et al., 2015, Hodi et al., 2016, Postow et al., 2015, Larkin et al., 2019). Daher ist es wünschenswert weitere Immuncheckpoint-Rezeptoren zu identifizieren, um Kombinationstherapien zu ermöglichen. In den vergangenen Jahren wurden zahlreiche neue Immuncheckpoints wie „*T-cell immunoglobulin 3*“ (TIM-3), „*lymphocyte activation gene 3*“ (LAG-3), „*T-cell immunoglobulin and ITIM domain*“ (TIGIT) und CD112R beschrieben, die nun als neue Angriffspunkte die Therapieoptionen erweitern sollen (Cogdill et al., 2017).

1.4 CD112R

1.4.1 Struktureller Aufbau und Funktion von CD112R

Das CD112R-Gen codiert ein Transmembranprotein mit einer einzelnen extrazellulären Immunglobulin-V-Domäne sowie einer intrazellulären Domäne. Die intrazelluläre Domäne besitzt zwei Tyrosin-Moleküle, welche durch Phosphorylierung eine Signaltransduktion ermöglichen (Zhu et al., 2016). Diese entspricht somit dem Aufbau von „*immunoreceptor tyrosin-based inhibitory motifs*“ (ITIM) und ist auch in anderen inhibitorischen Rezeptoren, wie beispielsweise TIGIT, zu finden (Billadeau und Leibson, 2002, Anderson et al., 2016). Bei fehlender Stimulierung des T-Zell-Rezeptors wird CD112R zügig internalisiert, ein Mechanismus, der bei anderen inhibitorischen Immuncheckpoint-Rezeptoren, wie CTLA-4, vermutlich zur Regulation der Aktivität beiträgt (Whelan et al., 2019, Valk et al., 2008).

CD112R wurde zunächst als „*Poliovirus receptor related immunoglobulin domain containing*“ (PVRIG) benannt, um den Aufbau des Proteins widerzuspiegeln. Zhu et al. (2016) haben PVRIG, nachdem sie das Protein als Immuncheckpoint identifiziert hatten, mit „*CD112-receptor*“ (CD112R) einen weiteren Namen gegeben, welcher die starke Interaktion von PVRIG mit CD112 hervorheben sollte. Zhu et al. (2016) zeigten, dass CD112R die T-Zell-Rezeptor vermittelte NFAT-Aktivierung inhibiert, was ihre Vermutung - einen neuen inhibitorischen Immuncheckpoint entdeckt zu haben - unterstützte, da die „*nuclear factor of activated T-cells*“ (NFAT) Proteine eine wichtige Rolle bei der Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen spielen (Macian, 2005). Bestätigung fand diese Theorie in der Untersuchung von Murter et al. (2019), die zeigen konnten, dass der induzierte Mangel von CD112R in Mäusen zu einer gesteigerten T-Zell-Antwort von CD8⁺ Zellen und einem geringeren Tumorwachstum in vivo führte, eine Beobachtung, welche sich durch die supprimierende Wirkung von CD112R auf die Zytokinproduktion und die zytotoxische Aktivität von T-Zellen erklären lässt (Murter et al., 2019, Whelan et al., 2019). Der Beweis, dass diese Effekte tatsächlich mit dem CD112R – CD112-Signalweg in Zusammenhang stehen, konnte in Versuchen durch die Blockade dieser Verbindung mit humanisierten Antikörpern erbracht werden: Die Effektorfunktion zytotoxischer T-Zellen wurde signifikant gesteigert (Whelan et al., 2019, Zhu et al., 2016).

Auch 56⁺ NK-Zellen betreffend konnte CD112R eine supprimierende Funktion nachgewiesen werden, unabhängig von der durch CD16 möglichen Subtypisierung (Xu et al., 2017).

Die CD112R Expression auf CD8⁺ T-Lymphozyten scheint signifikant mit einem erschöpften Phänotyp (Eomes⁺T-bet⁻) assoziiert zu sein (Whelan et al., 2019).

1.4.2 Liganden und Interaktions-Netzwerk von CD112R

CD112R gehört zu der Gruppe der Poliovirus-Rezeptor-Nectin/ Nectin-like Familie und ist damit Teil eines größeren Interaktionsnetzwerks (Sanchez-Correa et al., 2019). CD112 (auch PVRL2/ Nectin-2) gilt derzeit als einziger Ligand für CD112R und die Stärke der wechselseitigen Bindungsaffinität hebt ihre Verbindung von anderen CD112-Interaktionen ab (Zhu et al., 2016). CD112 wird auf Monozyten, dendritischen Zellen und Krebszellen exprimiert, wobei die Expression auf adhärennten Tumorzellen sehr hoch ist und bei Zellen hämatopoetischen Ursprungs in der Mehrheit negativ (Zhu et al., 2016). Weitere Bindungspartner von CD112 sind TIGIT und „*DNAX Accessory Molecule-1*“ (DNAM-1, CD226), welche wiederum einen weiteren Liganden namens CD155 (PVR) haben (Sanchez-Correa et al., 2019). TIGIT ist ein Immuncheckpoint, der ausschließlich auf Lymphozyten exprimiert wird und nach der Bindung von CD155 inhibitorisch auf diese wirkt (Stamm et al., 2018, Blessin et al., 2019).

Die Signalwege von TIGIT und CD112R scheinen in Verbindung zu stehen, da die Blockade von CD112R die Expression von TIGIT in Versuchen unabhängig von einer T-Zell-Aktivierung steigerte, umgekehrt war dies jedoch nicht zu beobachten (Whelan et al., 2019). Dieser Effekt ließ sich auch bei PD-1 messen, hier war er jedoch weniger stark ausgeprägt (ebd.) Weitere Untersuchungen ergaben, dass die kombinierte Blockade von CD112R und TIGIT zu einem signifikanten Anstieg der Zytokinproduktion führte, unter anderem von IL-2, IL-5, IL-10, IL-13 und IFN- γ sowie zu einer erhöhten T-Zell Proliferation und einer gesteigerten Effektorfunktion von CD8⁺ Lymphozyten (Zhu et al., 2016, Whelan et al., 2019). Der Anstieg der IFN- γ Produktion konnte durch die Hinzunahme eines PD-1 blockierenden Antikörpers noch einmal gesteigert werden, war jedoch im Vergleich der dualen Blockaden der Kombination von TIGIT und CD112R unterlegen (Whelan et al., 2019).

Ein Modellversuch mit humanen NK-Zellen und Brustkrebszelllinien zeigte, dass die Kombination von blockierenden Antikörpern gegen TIGIT und CD112R gemeinsam nicht nur zu einem signifikant erhöhten Prozentsatz von IFN- γ produzierenden NK-Zellen führte, als die einzelnen Inhibierungen in der Lage waren, sondern ebenfalls eine erhöhte zytotoxische Aktivität und eine Zerstörung von Krebszellen zur Folge hatte (Xu et al., 2017). Dies zeigte sich zusätzlich in einer erhöhten Bereitschaft bei synergistischem Zusammenspiel von TIGIT- und CD112R-Antikörpern Tumorzellen zu vernichten, welche zuvor mit Trastuzumab behandelt worden waren. Diese Ergebnisse bekräftigen, dass es sich bei der CD112R – CD112 Interaktion um einen, von zuvor entdeckten inhibitorischen Pfaden, unabhängigen Signalweg handelt (Xu et al., 2017, Whelan et al., 2019). Die Aktivierung von DNAM-1 durch Bindung von CD155 oder CD112 wirkt immunstimulatorisch und steigert die NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität (Sanchez-Correa et al., 2019). Ein weiterer

Teil des Netzwerks ist CD96 („*T cell-activated increased late expression*“, TACTILE), dessen Einfluss bislang nicht endgültig geklärt werden konnte (Martinet und Smyth, 2015).

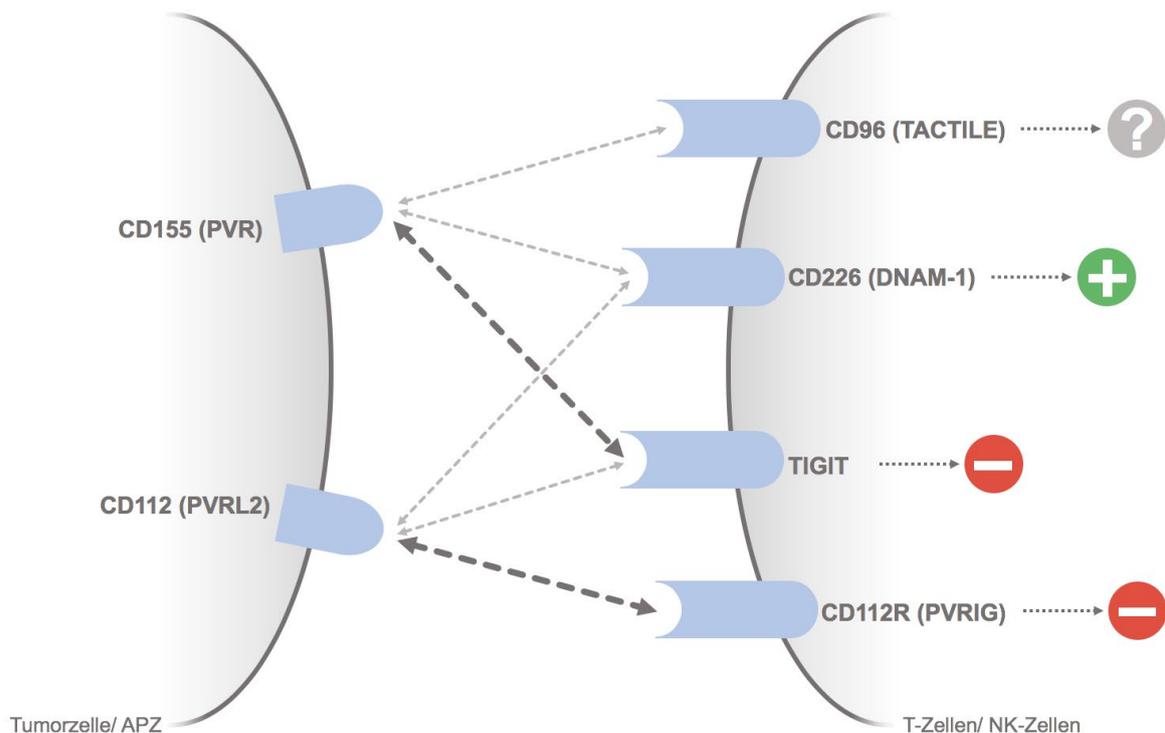


Abbildung 1: Vereinfachtes Interaktionsnetzwerk von CD112R, rotes Minuszeichen indiziert einen inhibitorischen Effekt, ein grünes Plus einen stimulierenden Effekt, die gestrichelten Linien demonstrieren die bekannten Interaktionen (APZ = Antigenpräsentierende Zelle).

1.4.3 CD112R Expressionsmuster in Geweben

Studien des „messenger“ Ribonucleinsäure (mRNA) Expressionsprofils zeigten eine bevorzugte Expression in Lymphozyten und dabei in T-Lymphozyten und NK-Zellen (Zhu et al., 2016). Die Expression wird durch Aktivierung in T-Zellen gesteigert (ebd.). Dendritische Zellen, die von Monozyten abstammen, zeigten keine CD112R-Expression (ebd.).

In humanen malignen Gewebeproben war CD112R auf CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen und NK-Zellen zu finden (Whelan et al., 2019). Dabei zeigte sich die höchste Expression in Ovarial-, Nieren-, Lungen-, Endometrium- und Brustkrebs auf CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen und auf NK-Zellen im Prostatakarzinom (ebd.). Im Vergleich weniger Proben des an Lungentumoren grenzenden Normalgewebes und den Tumor infiltrierenden Lymphozyten, zeigte sich die CD112R Expression auf intratumoralen CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen signifikant erhöht (ebd.).

1.4.4 Diagnostische Relevanz (CD112R als prädiktiver Marker)

Eine Analyse von Patienten mit hepatozellulärem Karzinom (HCC) zeigte einen signifikanten Zusammenhang zwischen der höheren Expression von CD112R und dem Überleben (Gesamtüberleben und rezidivfreies Überleben) (Tang et al., 2019).

In einer weiteren Untersuchung wurden HCC-Genexpressionsprofile hinsichtlich eines Überlebensvorteils analysiert. CD112R wurde dabei den protektiven Faktoren zugerechnet und war in Patienten der niedrigen Risikogruppe hochreguliert (Qiao et al., 2019).

Das CD112R-Gen wurde zudem als Teil eines Profils von 10 herunterregulierten Genen identifiziert, welche als Marker Blutproben zuverlässig in eine Sepsis und eine nicht-Sepsis Gruppe einteilen konnten (Lu et al., 2020).

1.4.5 Klinische Studien

Eine laufende Phase-1-Studie untersucht die Wirkung von COM701, einem humanisierten monoklonalen IgG4 PVRIG Antikörper. Der neue Antikörper wird dabei als Monotherapie oder in Kombination mit Nivolumab bei erwachsenen Patienten mit fortgeschrittenen oder metastasierten soliden Tumorerkrankungen eingesetzt, bei denen die Standardtherapiemethoden bereits ausgeschöpft waren. Erste Ergebnisse dieser Studie zeigten einen klinischen Nutzen bei 69% in der Kohorte mit COM701-Monotherapie und 75% in der Kombinationskohorte (Sullivan et al., 2020b). Zudem war bei zwei Patienten eine Teilremission zu beobachten (ebd.). Ein primäres peritoneales Karzinom zeigte dies unter der Monotherapie und ein Mikrosatelliten-stabiles Kolonkarzinom unter der Kombinationstherapie (Sullivan et al., 2020b). Die beobachteten Nebenwirkungen waren weitestgehend tolerabel und überwiegend in Form von Fatigue und Übelkeit angegeben worden (ebd.). Es ist geplant, den CD112R Antikörper in einer dreifachen Kombinationstherapiestudie mit Nivolumab und BMS-98620, einem ebenfalls in der Testung befindlichen TIGIT Antikörper, zu untersuchen. Dabei soll unter anderem die Möglichkeit der Dosisescalation von COM701 evaluiert werden. Das Patientenkollektiv soll erneut aus Menschen mit verschiedenen fortgeschrittenen soliden Tumoren bestehen (Compugen).

1.5 Multiplex-Fluoreszenz-Immunhistochemie (mflHC)

Während die Hellfeld-Immunhistochemie einen großen Stellenwert in der Tumordiagnostik hat und hauptsächlich zur Analyse von einzelnen Markern eingesetzt wird (z.B. Tumormarker zur Identifizierung von Tumoren und Analyse möglicher Zielstrukturen für eine Therapie), ermöglicht die Multiplex-Fluoreszenz-Immunhistochemie mehrere Marker auf einer Zelle sichtbar zu machen. Für die Darstellung verschiedener Marker müssen in der Hellfeld-Immunhistochemie mehrere konsekutive Schnitte angefertigt und gefärbt werden. In jedem gefärbten Schnitt sind andere Zellen zu sehen, da sich selbst mit der minimalen Schnittdicke die Zellzusammensetzung ändert. Wohingegen mit Hilfe der mflHC eine Vielzahl von verschiedenen Markern „in-situ“ auf derselben Zelle detektiert werden können.

Bei der Fluoreszenzmikroskopie werden Fluoreszenzfarbstoffe zum Detektieren von mit Antikörpern markierten Proteinen verwendet, sogenannte Fluorochromierung. Fluoreszenzfarbstoffe, auch Fluorochrome genannt, werden durch Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt und emittieren einen Teil dieses Lichts mit einer anderen, längeren Wellenlänge (Stokes-Verschiebung). Diese emittierten Photonen lassen sich mittels eines Fluoreszenzmikroskops detektieren und können als monochromatisches Bild für jedes Fluorochrom dargestellt werden. Die mflHC ermöglicht durch die parallele Färbung verschiedener Zielproteine mittels verschiedener Fluorophore die Detektion dieser Zielstrukturen in einem Gewebeschnitt. Dies ermöglicht weitere Informationen aus einem einzigen Gewebeschnitt zu gewinnen, die bei konsekutiven Studien verloren gehen würden. Aussagen über die Intensität (Expressionslevel) und Ko-Expression von Biomarkern auf der Ebene einzelner Zellen sind damit möglich. Darüber hinaus können diese Informationen Aufschluss über räumliche Beziehungen, sogar zwischen einzelnen Zellen, geben. Um den Inhalt dieser komplexen Daten angemessen analysieren zu können, ist es sinnvoll, sich visueller Analysemethoden zu bedienen. Zu diesen gehören t-SNE, Cluster-Heatmap-Diagramme und Heatmap-Korrelationsmatrizen.

t-SNE

Die Visualisierung von komplexen Daten mittels „*T-distributed Stochastic Neighbor Embedding*“ (t-SNE) wurde von Laurens Van der Maaten und Geoffrey Hinton entwickelt (van der Maaten und Hinton, 2008). Die komplexe Struktur der eingegebenen Daten wird hierbei auf eine niedrigere Dimension projiziert ohne die Gruppierung (Clustering) der Ausgangsdaten zu verlieren. Anders ausgedrückt: Benachbarte Datenpunkte bleiben auch in einer vereinfachten Dimension in enger Lagebeziehung zueinander. Somit geht die zugrunde liegende Struktur nicht verloren. Die Vereinfachung soll helfen, diese ansonsten schwer zu abstrahierenden Zugehörigkeiten, sichtbar zu machen. Dabei ist es möglich, eine

bestimmte Eigenschaft, wie die Zugehörigkeit zu einer Subgruppe oder die Darstellung eines gemessenen Wertes auf den dargestellten Punkten zu zeigen. Damit kann die Verteilung, auch in Hinblick der Intensitäten von Messwerten oder anderen Informationen jedes einzelnen Datenpunktes, visualisiert werden.

Cluster-Heatmap & Korrelationsmatrix

In einem Cluster-Heatmap-Diagramm werden die analysierten Informationen, ihrem Wert entsprechend, in einem Farbspektrum dargestellt. Dabei können die Ausgangswerte Rohdaten oder normalisierte Daten sein. Diese Werte werden dann mittels einer Clustering-Methode, ihrer Ähnlichkeit entsprechend, hierarchisch angeordnet. Innerhalb dieser Anordnung ist es möglich, bestimmte Gruppen von Werten voneinander abzugrenzen – die verschiedenen Cluster. Diese Cluster werden durch das angrenzende Dendrogramm noch verdeutlicht.

Eine weitere farbcodierte Darstellung ist mit einer Korrelationsmatrix möglich. Dabei zeigt jedes Kästchen der Tabelle die Korrelation von zwei Variablen. Hinter diesen auf der X- und Y-Achse aufgetragenen Variablen verbergen sich Gruppen von Messwerten. Zwischen diesen wird dann die Korrelation berechnet, vereinfacht gesagt ihre Ähnlichkeit. Bei einer totalen Übereinstimmung der Variablen beträgt der Wert der Korrelation 1. Je unähnlicher die verglichenen Variablen sind, desto mehr nähert sich der Wert -1. Diese Skala von 1 bis -1 kann zur Vereinfachung der Lesbarkeit farbkodiert werden. In einem weiteren Analyseschritt können die Variablen anhand des Korrelationskoeffizienten durch „*hierarchical clustering*“ neu sortiert werden, um mögliche Zusammenhänge erkennbar zu machen.

Interaktionen

Um Zellen nicht nur als Individuen, sondern als interagierendes Netzwerk zu verstehen, muss man sich vor Augen führen, dass die Multiplex-Fluoreszenz-Immunhistochemie eine Aussage über die Lagebeziehung der analysierten Zellen ermöglicht. So ist es möglich, durch die „in situ“ Mehrfachmarkierung von Zellen ihre räumlichen Verhältnisse („*spatial relationships*“) in ihrem Ursprungsgewebe darzustellen. Diese räumlichen Verhältnisse können nicht nur Aufschluss über die proportionale Verteilung von beispielsweise Lymphozyten in der Tumormikroumgebung geben, sondern es ist machbar, den exakten Abstand zwischen einzelnen Zellen zu berechnen. Solche Erkenntnisse lassen sich nicht durch Methoden wie beispielsweise der Durchflusszytometrie gewinnen.

Die Betrachtung der räumlichen Verhältnisse von Zellen, unter Verwendung von Algorithmen, die eine „*nearest neighbor*“ Berechnung nutzen, ermöglichen spezifische Analysen von Zellverteilungen in einem Gewebe. Dies wurde zum Beispiel für die Analyse

des Zusammenhangs zwischen der Distanz von Lymphozyten und „*tumor buds*“, Tumoreinzelzellen oder kleine Tumorzellgruppen am invasiven Rand des kolorektalen Karzinoms verwendet. Hier konnte gezeigt werden, dass die Einbeziehung dieser neuen Variable die Prognosegenauigkeit für Patienten im Stadium II verbessert und als „*tumor bud-immuno spatial index*“ (TBIS) einen neuen prognostischen Marker darstellt (Nearchou et al., 2019, Nearchou et al., 2020).

Wenn man diesen Abstand von Zellen zueinander nicht auf eine mögliche Anwesenheit von Immunzellen beschränkt, sondern den Radius der Interaktion stark begrenzt, lässt sich berechnen, welche Zellen aufgrund ihrer Größe direkten Kontakt miteinander haben müssen. Ein solcher Kontakt stellt vermutlich eine Rezeptor-Liganden oder chemotaktische Verbindung zweier Zellen dar. Diese Interaktionen analysieren zu können, ermöglicht ein tieferes Verständnis der Tumormikroumgebung.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Verteilung des inhibitorischen Immuncheckpoint-Rezeptors CD112R auf verschiedenen Leukozyten-Subtypen in-situ zu charakterisieren. Das aktuelle Wissen über die Expression von CD112R auf Immunzellen basiert zum größten Teil auf wenigen Ergebnissen aus Durchflusszytometrie-Studien an kleinen Blutprobenkollektiven, welche keine Aussage über Lokalisationsbeziehungen der Zellen im Gewebe ermöglichen. Daher wurde in dieser Studie die mFHC genutzt, um die räumlichen Expressionsunterschiede der Leukozyten in malignen Geweben, im Vergleich zum Normalgewebe, zu ermitteln. Die gemessene CD112R Expression auf Lymphozyten und natürlichen Killerzellen in verschiedenen Neoplasien identifizierte einzelne Patienten, in allen untersuchten Tumorentitäten, mit besonders hoher CD112R Expression auf T-Lymphozyten, welche wahrscheinlich besser auf eine CD112R Immuncheckpoint-Inhibitoren ansprechen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Gewebekollektiv

Für diese Studie wurden archivierte Gewebe des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) aus den Jahren 2009 bis 2018 verwendet, welche die folgenden Entitäten umfassten: 40 maligne Blasen-tumore, 21 Plattenepithelkarzinome und 21 Adenokarzinome der Lunge, 21 Adenokarzinome des Pankreas, 21 seröse Ovarialkarzinome, zwei Lymphknotenmetastasen sowie ein MSI-positives Kolonkarzinom. Des Weiteren wurden die folgenden Normalgewebe eingeschlossen: 7 Tonsillen-, 2 Lymphknoten-, 2 Milz-, 2 Ileum-, 2 Colon- und 2 Appendix-Gewebeproben. Klinisch-pathologische Parameter und Follow-Up-Daten wurden nicht in der statistischen Analyse berücksichtigt. Die Nutzung von archivierten, zu diagnostischen Zwecken entnommenen Gewebeproben für die Herstellung von TMAs (Tissue MicroArrays) und deren Analyse für wissenschaftliche Zwecke, ist laut dem Gesetz (HmbKHG, §12,1) und der Ethikkommission (Hamburg, WF-049/09) zulässig. Alle Arbeiten wurden unter Berücksichtigung der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Die malignen Gewebe wurden, mit Ausnahme des MSI-positiven Kolonkarzinoms, welches als Großschnitt gefärbt wurde, als TMAs aufbereitet. Die Normalgewebe wurden ebenfalls als Großschnitte analysiert.

2.2 Tissue MicroArray (TMA)

Die verwendeten Tissue MicroArrays (TMAs) haben einen größeren Durchmesser als die standardmäßig verwendeten TMAs und werden als „*microenvironment*“ ME-TMAs bezeichnet. Für deren Herstellung wurde aus jedem Gewebeblock eine 4 mm durchmessende Stanze entnommen und in bekannter Art in den TMA eingefügt (Kononen et al., 1998, Sauter et al., 2003). Hieraus wurden, verteilt auf sechs Paraffinblöcke, fünf ME-TMAs angefertigt.

2.3 Multiplex-Fluoreszenz-Immunhistochemie

Für die multiplex-fluoreszenz-immunhistochemischen Färbungen wurden frische Konsekutivschnitte mit einer Dicke von 4 µm angefertigt. Die verwendeten Antikörper der simultanen Untersuchung von CD3, CD8, CD4, FoxP3, CD20, CD56, CD11c, CD68 und CD112R sind der Tabelle 1 zu entnehmen. Die Spezifität des Anti-CD112R Antikörper Klons DIA-R12 (Dianova, Hamburg, Deutschland) wurde mittels Western-Blot, „*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*“ (ELISA) und Präabsorption des primären Antikörpers mit

CD112R Protein validiert. Für die mFIHC wurde das „OPAL Dye Kit“ (Cat. #OP7DS1001KT, Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA) verwendet und nach dem experimentellen Protokoll von AKOYA durchgeführt (AKOYA Biosciences, 2018): Die Objektträger mit den Gewebeschnitten wurden für die Epitop-Demaskierung zunächst in einem Autoklav für 30 Minuten bei 100 – 120°C in einem Puffer (pH=9) gekocht. In den folgenden Färbeprozessen wurden vier verschiedene primäre Antikörper kombiniert und im letzten Schritt durch die Gegenfärbung der Zellkerne mit Diamidin-2-phenylindol (DAPI) komplementiert. Ein Färbezyklus mit einem Antikörper beinhaltet verschiedene Schritte:

1. Blockierung der endogenen Peroxidase-Aktivität und damit unspezifischer Proteinbindungen mit Wasserstoffperoxid, um eine Hintergrundfärbung zu vermeiden
2. Die Applikation des ersten Antikörpers (siehe Tabelle 1)
3. Die Detektion des ersten Antikörpers mittels eines sekundären mit Horseradish Peroxidase (HPO) konjugierten Antikörper
4. Die Fluoreszenzfärbung mit den verschiedenen Opalen
5. Die Entfernung der gebundenen Antikörper durch Erhitzung in der Mikrowelle für 5 Minuten bei 100°C und für weitere 5 Minuten bei 93°C

Die Schritte 1-5 wurden dreimal für die verbliebenen Antikörper wiederholt und durch den folgenden Schritt vervollständigt:

6. Die Gegenfärbung mit DAPI und Konservierung mit einer Antifade-Lösung

Antikörper und zugehörige Opal-Fluorochrome

Zielstruktur	Antikörper	Epitop-Demaskierung (pH-Wert)	Verdünnung	Position in der Färbereihenfolge	Opal-Fluorochrom
CD3	DAKO #IR503	9,0	unverdünnt	1 - 4*	520 - 780*
CD8	DAKO #IR623	9,0	unverdünnt	1 - 4*	520 - 780*
CD4	DAKO #IR649	9,0	unverdünnt	1 - 4*	520 - 780*
FoxP3	Dianova #BF0630-005	7,8	1:450	1 - 4*	520 - 780*
CD20	DAKO #IR604	9,0	1:10	1 - 4*	520 - 780*
CD56	DAKO #IR628	9,0	unverdünnt	1 - 4*	520 - 780*
CD11c	Abcam #ab52632	9,0	1:450	1 - 4*	520 - 780*
CD68	DAKO #IR613	7,8	1:3	1 - 4*	520 - 780*
CD112R	Dianova DIA-R12	7,8	1:500	1 - 4*	520 - 780*

Tabelle 1: Die benutzten Antikörper, der pH-Wert der Epitop-Demaskierungen und die zugehörigen Opal-Fluorochrome (*Die Antikörper wurden in abwechselnden Reihenfolgen und Kombinationen mit unterschiedlichen Opalen gefärbt, da für die Interaktionsanalyse jede mögliche Markerkombination einmal zusammen auf einem Schnitt gefärbt werden musste).

2.4 Quantifizierung der Immunzellen

2.4.1 Digitalisierung und Analyse von Großschnitten und TMAs

Die fluoreszenz-gefärbten Schnitte wurden mit Hilfe des Leica Aperio VERSA 8 Epifluoreszenz-Mikroskop digitalisiert. Die anschließende Bildanalyse wurde mit dem Visopharm Softwarepaket (Hørsholm, Dänemark) durchgeführt. Um Schwellenwerte – Intensitätswerte der gemessenen Fluoreszenz, welche zur Identifikation von „positiven“ Zellen benötigt werden – definieren zu können, wurden zudem Analysen in R (Version 3.6.1, The R Foundation for Statistical Computing) und RStudio (Version 1.1.463, RStudio Inc.) durchgeführt.

2.4.2 Deep Learning basierte Zellsegmentierung

Für die Analyse der digitalen Bilder wurde ein „U-Net“ Deep Learning Algorithmus des Visopharm Softwarepaketes (Hørsholm, Dänemark) verwendet, welcher zuvor auf die automatische Zellerkennung, -segmentierung und die Bestimmung der Intensitätswerte der Fluorophore trainiert wurde (Ronneberger et al., 2015). Die Spannweite der Fluorophor-Intensität wird dabei zwischen 0 und 255 auf einer kontinuierlichen, einheitslosen Skala angegeben, welche die Signalstärke der Fluoreszenz widerspiegelt und an die hexadezimale Farbdefinition und damit das RGB-Farbsystems angelehnt ist, einem gängigen System, um computerbasiert additive Farbmischungen zu erstellen (RGB = Rot, Grün und Blau, wobei 0-255 den RGB-Anteil einer Farbe angibt). Die Photonen, welche für jedes Pixel detektiert wurden, werden in den Intensitätswert konvertiert, welcher somit mit der Anzahl der Photonen pro Pixel korreliert, ihr somit nicht gleicht, jedoch einen Rückschluss auf die lokale Konzentration von Fluorophoren ermöglicht (Waters, 2009). Die Intensität jedes Fluorochroms wurde dabei in der Analyse als mittlere rohe Intensität jeder einzelnen Zelle bestimmt.

2.4.3 Schwellenwertbestimmung für die Definition positiver Zell-Phänotypen

Nur detektierte Färbeintensitäten, welche über einer zuvor definierten Schwelle lagen, wurden als „positiv“ für den einzelnen Marker gewertet. Diese Schwelle wurde in einem mehrere Schritte umfassenden Prozess individuell für jeden Marker (CD3, CD4, CD8, FOXP3, CD20, CD56, CD11c, CD68, CD112R) anhand des folgenden Ablaufes bestimmt: Die Intensität des Markers wurde für 50 bis 200 einzelne Zellen gemessen, welche keine spezifische Färbung des Markers zeigten und der Wert der Zellen, welche den höchsten

„falsch positiven“ Wert zeigten, als vorläufiger unterer Grenzwert für die „positive“ Expression genutzt.

Dieser vorläufige Grenzwert wurde anschließend durch die graphische Darstellung der Intensitätswerte der gemessenen Marker in Streudiagrammen mit logarithmischer Skala in R geprüft, um einen zusätzlichen Validierungsschritt durchzuführen (d.h. Identifizierung homogener Zellpopulationen, die eine bestimmte Funktion teilen, eine bekannte Methode der Durchflusszytometrie). Die ermittelten Schwellenwerte dieser beiden Validierungsschritte wurden von einem erfahrenen Pathologen überprüft bevor diese zur Analyse dieses Gewebeschnittes verwendet wurden. Um eine Vergleichbarkeit des CD112R Expressionslevels verschiedener Schnitte zu ermöglichen, wurde die relative Expression durch die Normalisierung der rohen CD112R Intensität zu einer Referenz-Zelllinie berechnet. Als Referenz-Zelllinien wurden HeLa-Zellen benutzt, die das CD112R Protein überexprimieren (siehe Abschnitt 2.5). Diese Zelllinie wurde in einem 2 mm Spot in die Gewebeschnitte eingefügt und ihre mittlere rohe Intensität als Maß für 100% gesetzt. Die relative Expression wurde berechnet als der Prozentsatz der mittleren rohen Intensität der Testzellen in Relation zu den 100% mittleren rohen Intensität der Referenz-Zelllinien. Basierend auf der kombinierten Betrachtung der CD112R Expression und der Histomorphologie konnten die zwei Populationen, CD112R^{low} und CD112R^{high}, identifiziert werden. Entsprechend der zwei Expressionsniveaus von CD112R auf verschiedenen Leukozyten wurden die verschiedenen Subgruppen definiert.

Um die TMAs analysieren zu können, wurden die Gewebespots mithilfe des Visiopharm Softwarepaketes (Hørsholm, Dänemark) segmentiert. Für jeden TMA-Spot und jedes Gewebekompartiment wurden im Folgenden zwei Werte bestimmt:

1. Die Dichte von Immunzellen einer bestimmten Subgruppe pro mm² wurde durch die Division der gemessenen Immunzellen pro Kompartiment durch die Fläche dieses Gewebes berechnet. Die Fläche eines segmentierten Kompartiments wurde durch einen Deep Learning Algorithmus bestimmt, welcher zuvor im Visiopharm Softwarepaket (Hørsholm, Dänemark) zu diesem Zweck entwickelt worden ist.
2. Die Prozentzahl von CD112R^{high} Immunzellen jeder Leukozyten-Subgruppe wurde durch Division der CD112R^{high} Zellen eines bestimmten Phänotyps durch die Gesamtzahl aller Zellen (CD112R^{high}, CD112R^{low} und CD112R^{negative}) dieser Leukozyten-Subgruppe berechnet. Die gleiche Berechnung wurde für die CD112R^{low} und CD112R^{negativen} Immunzellen vorgenommen.

2.5 Referenz-Zelllinie

2.5.1 Zellkultur und Transfektion

Für die Zellkultur und Transfektion der CD112R überexprimierenden Zellen wurden immortalisierte humane epitheliale Zervixkarzinomzellen (HeLa-Zellen) in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) mit 10% FBS (*fetal bovine serum*) und 1% antibiotischer Lösung aus Penicillin und Streptomycin kultiviert. Die HeLa Zellen befanden sich dabei in Multilayer-Zellkulturflaschen bei einer konstanten Temperatur von 37°C und 5% CO₂. Das für CD112R codierende Plasmid mit CMV-Promotor wurde bei der Sino Biological Inc. (Beijing, China) erworben. Für die Transformation und Plasmid-Vermehrung wurden kompetente *Escherichia coli* Zellen (One Shot™ TOP10, ThermoFisher Scientific, Deutschland) verwendet. Nach der Amplifizierung der Plasmide wurden diese mithilfe des „Plasmid Purification Kit“ von Macherey-Nagel nach deren Vorgaben isoliert. Die Plasmid-DNA wurde in destilliertem, sterilem Wasser verdünnt und die finale Konzentration mit einem NanoDrop-1000 Spektralphotometer (PegLab) bestimmt. 3×10^6 HeLa-Zellen wurden in sterilen Petrischalen ausgesät und mit 20 ml DMEM, 10% FBS und 1% antibiotischer Lösung aus Penicillin und Streptomycin kultiviert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C, um eine 50 – 60%ige Konfluenz zu erzielen. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit PBS (*phosphate buffered saline*) gewaschen und 8 ml frisches Medium hinzugefügt. Anschließend wurde die Transfektion der Zellen mit der CD112R Plasmid-DNA, unter Verwendung des „JetPEI DNA Transfection Reagent“ (Polyplus-transfection SA, BIOPARC, Illkirch Frankreich), den Herstellerangaben folgend durchgeführt. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen mit 4 ml Accutase geerntet und anschließend mit 1000 x g bei Raumtemperatur für 5 min zentrifugiert. Die Zellen wurden dann in Agarose eingebettet und Formalin-fixiert.

Diese neu konstruierte HeLa-Zelllinie wurde, mit einer unveränderten HeLa-Zelllinie (ohne Transfektion), welche als Negativkontrolle fungierte, in die für diese Studie angefertigten TMA-Paraffinblöcke eingefügt. In Abbildung 2 ist die signifikant unterschiedliche Intensität der HeLa- und HeLa-PVRIG-Zelllinie in der Multiplex-Fluoreszenz-Immunhistochemie dargestellt. Das gemessene CD112R Expressionslevel der Referenz Zelllinie war 850% höher als das der nicht transfizierten HeLa-Zellen.

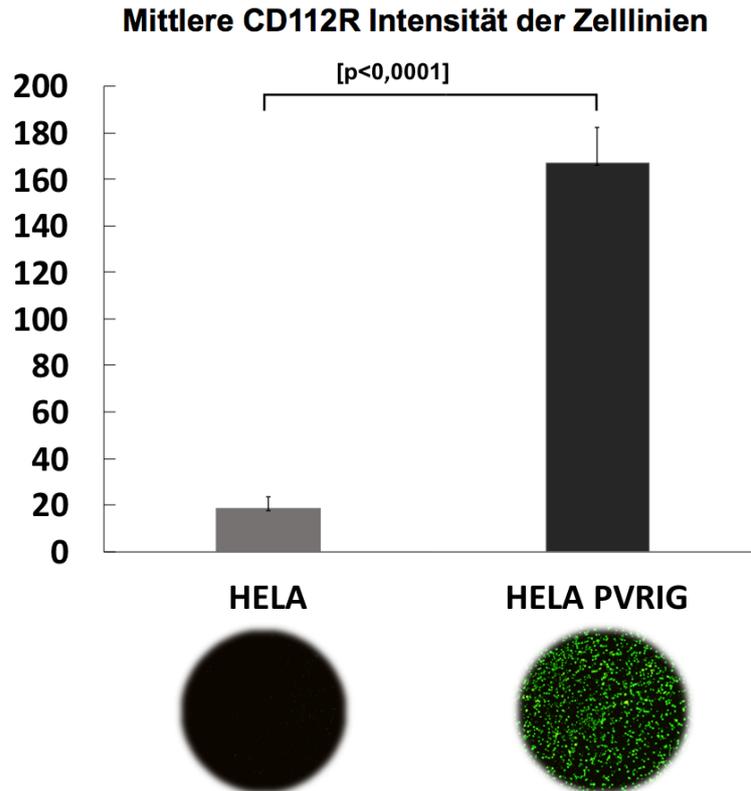


Abbildung 2: Das Balkendiagramm zeigt den signifikanten Intensitätsunterschied zwischen den Zelllinien HELA und HELA-PVRIG. Korrespondierend darunter sind repräsentative Multiplex-Fluoreszenz-Immunhistochemie-Bilder der CD112R Expression der jeweiligen Zelllinien gezeigt.

2.5.2 Zelllysat Vorbereitung für den Referenz-Zelllinien-TMA

Die transfizierten Zellen wurden mit PBS gewaschen, in 100 µl „*radioimmunoprecipitation assay*“ (RIPA) Puffer (50 mM Tris Base pH=8, 150 mM Natriumchlorid, 1% NP-40, 0,5% Natriumdesoxycholat und 0,1% Natriumlaurylsulfat) lysiert und mit einem Proteaseinhibitor versetzt (Merck, Deutschland). Die Zellen wurden anschließend in ein gekühltes 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt und 10 Minuten auf Eis gelagert. Nachfolgend wurde die Suspension mit 12000 x g für 5 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein autoklaviertes Mikroreaktionsgefäß überführt. Das Protein wurde, den Herstellerangaben folgend, mit einem „Qubit Proteinassay-Kit“ gemessen. Um das Protein mit dem korrespondierenden Antikörper zu detektieren, wurde das Zelllysat für den Western Blot auf eine „*sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis*“ (SDS-PAGE)-Trägermatrix aufgetragen, gel-elektrophoretisch getrennt, anschließend mittels Blotting auf eine Membran übertragen und mit dem spezifischen korrespondierenden Antikörper detektiert.

2.6 Statistik

Die graphischen Auswertungen und die statistische Analyse wurden mit der JMP Pro 14 Software (SAS Institute Inc., NC, USA), R Version 3.6.1 (The R Foundation for Statistical Computing) und RStudio Version 1.1.463 (RStudio Inc.) durchgeführt. Alle Ergebnisse mit einem p-Wert kleiner als 0,05 wurden als signifikant angenommen.

In der t-SNE-Analyse wurde der Wert für die „*Perplexity*“ so gewählt, dass sich die verschiedenen Zell-Subpopulationen möglichst voneinander trennen und die gruppenweise Betrachtung der relativen CD112R Expression ermöglichen. Um eine graphische Differenzierung der CD112R Expression in der t-SNE-Analyse gewährleisten zu können, wurden die Zellen mit den 0,1% höchsten Expressionswerten identifiziert, ausgeschlossen und die restlichen Zellen anhand der neuen maximalen Expression normalisiert.

Um die Clusteranalyse unabhängig von den verschiedenen Einheiten der eingehenden Messwerte durchführen zu können, wurden die Dichten zunächst zu ihrem Maximum normalisiert. Damit konnten in der Clusterbildung sowohl die Fraktionen (%) der Subgruppen als auch die Dichten (Zellen/mm²) in einen Kontext gebracht werden.

Die Korrelationskoeffizienten der Korrelationsmatrix wurden mit der Spearman-Korrelation (Rangkorrelation) bestimmt und einer Signifikanz Prüfung unterzogen. Das Signifikanzniveau wurde hier mit $p < 0,001$ festgelegt und Korrelationen, deren p-Werte über diesem lagen, wurden in der Darstellung der Korrelationsmatrix entsprechend kenntlich gemacht.

Für die Analyse der Interaktionen (Abbildung 8 und Abbildung 20) wurden zunächst Zellphänotypen definiert, die sich durch eine bestimmte Marker Kombination auszeichneten: CD68⁺ sowie jeweils CD112R^{high}, CD112R^{low} und CD112R^{negative} der Subgruppen CD20⁺, CD8⁺, CD4⁺ und CD56⁺. Nach der Identifizierung dieser Zellen wurde mittels einer „*nearest neighbor*“ Berechnung für jede dieser Zellen ihre benachbarten Zellen in einem zuvor definierten Umkreis von 8 µm ausfindig gemacht. Anschließend wurden die Anzahl der absoluten Kontakte zwischen diesen Zellphänotypen addiert und graphisch dargestellt. Die Beschränkung des Abstands auf maximal 8 µm spiegelt die räumliche Nähe wider, die nötig ist, damit die Zellemembranen der Immunzellen in Kontakt stehen (Abbildung 3).

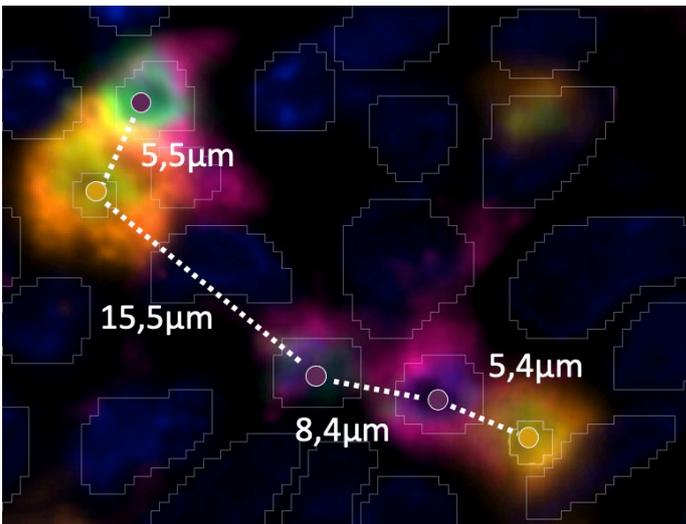
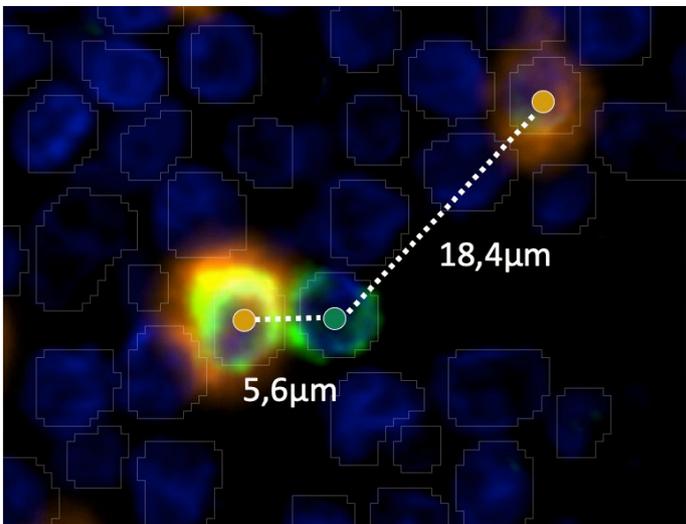
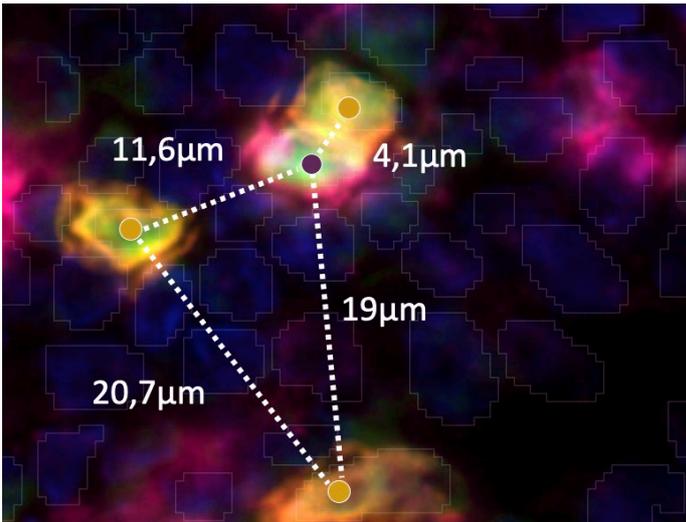


Abbildung 3: Repräsentative Veranschaulichung der räumlichen Nähe verschiedener fluoreszenzgefärbter Immunzellen: Der Abstand von dem berechneten Mittelpunkt ihres Zellkerns (farbiger Punkt) zu dem Zellkern einer anderen Zelle ist als eine weißgestrichelte Linie eingezeichnet. Die weißen Umrisse markieren die durch Deep Learning erkannten Zellkerne. (Vergrößerung 242x, CD112R = grün, CD8 = orange, CD4 = pink, DAPI = blau)

3. Ergebnisse

3.1 CD112R Expression im Normalgewebe

Als Normalgewebe für diese Studie wurden histologische Großschnitte von 7 Tonsillen-, 2 Lymphknoten-, 2 Milz-, 2 Ileum-, 2 Colon- und 2 Appendix-Gewebeproben untersucht. Davon konnten alle in die Auswertung eingeschlossen werden.

Identifizierung von CD112R positiven und negativen Immunzelltypen

Zur Identifizierung der verschiedenen Leukozyten wurden die Marker CD4 für T-Helferzellen, CD8 für zytotoxische und FoxP3 für regulatorische T-Lymphozyten gefärbt. Der Marker CD20 diente zur Detektion von B-Lymphozyten und mit Hilfe von CD56 konnten natürliche Killerzellen detektiert werden. Die Färbungen von CD68 markierten Makrophagen und CD11c wurden zur Identifizierung von dendritischen Zellen genutzt. Die Zusammenstellung der Multiplex-Färbungen ist in Tabelle 1 aufgelistet.

Es zeigte sich, dass CD112R auf CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen, CD4⁺ T-Helferzellen, CD20⁺ B-Zellen und CD56⁺ natürlichen Killerzellen stark exprimiert wurde (Abbildung 4). Auch die Subgruppe der FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen zeigt in der Fluoreszenzfärbung eine Doppelfärbung mit CD112R. Wohingegen auf den untersuchten Zellen des monozytären Phagozytensystems, wie den CD68⁺ Makrophagen oder den CD11c⁺ dendritischen Zellen, keine CD112R Expression zu finden war.

Die multiplex-fluoreszenz-immunhistochemischen Färbung von CD112R zeigte ein deutlich membranöses Färbemuster auf allen oben genannten Zellen (Abbildung 4). Dieses ließ sich bei den CD68⁺ Zellen und CD11c⁺ Zellen nicht ausmachen, auch wenn deren Zellausläufer in enger räumlicher Beziehung zu deutlich CD112R positiven Zellen standen.

Repräsentative Bilder, der in dieser Studie untersuchten Subtypen von Leukozyten und der durchgeführten Doppelmarkierungen, sind in Abbildung 4 zu sehen.

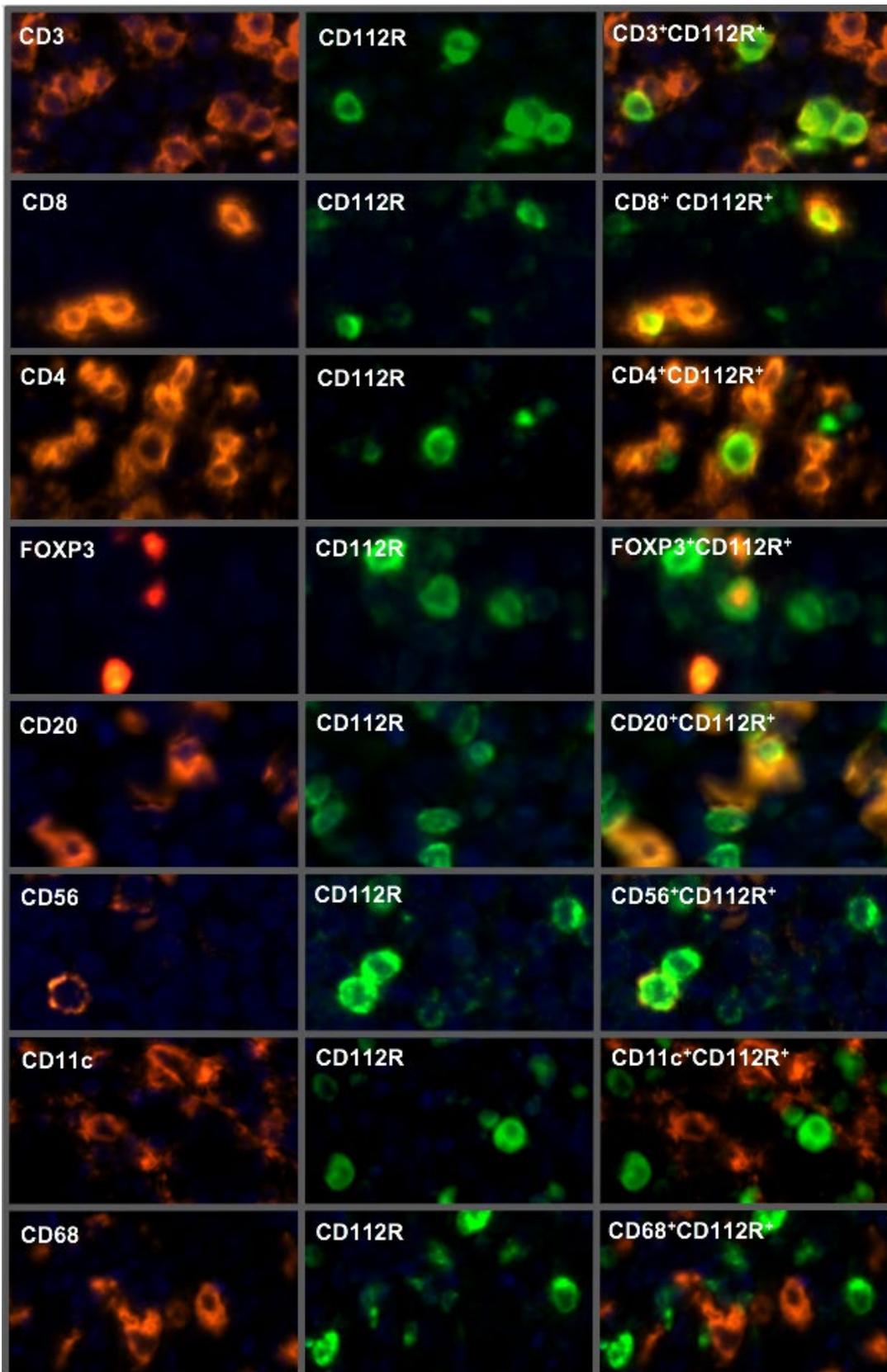


Abbildung 4: Repräsentative Multiplex-Fluoreszenz-Immunhistochemie-Bilder der Ko-Expression von CD112R mit verschiedenen Leukozytenmarkern in gesundem Tonsillengewebe. Hierbei ist jeweils links die Färbung des charakterisierenden Markers gezeigt, in der Mitte die Färbung von CD112R und auf der rechten Seite die beiden Marker übereinandergelegt. (Vergrößerung 350x)

Quantitative Unterschiede der CD112R Expression auf positiven Immunzellen

Um zu klären, ob CD112R auf allen positiven Zelltypen gleichmäßig exprimiert wurde oder Zelltyp-spezifische Expressionsunterschiede vorliegen, wurde die Verteilung der relativen Expression von CD112R auf den verschiedenen Leukozyten-Subtypen mithilfe des t-SNE Algorithmus dargestellt (Abbildung 5). Dabei entspricht jeder Datenpunkt in der Abbildung einer analysierten Zelle. Diese wurden entsprechend ihrer Ähnlichkeit näher beziehungsweise durch Unterschiede entfernter voneinander angeordnet. In dem linken Graphen wird durch eine farbige Codierung die Zugehörigkeit zu den Leukozyten-Subtypen dargestellt. Der rechte Graph zeigt die unterschiedliche relative Expression von CD112R auf diesen Zellen. Rot repräsentiert dabei eine sehr hohe relative Expression, blau eine niedrige.

Es ließ sich beobachten, dass alle in Abbildung 4 gezeigten Zelltypen grundsätzlich eine geringe basale relative Expression von CD112R zeigten. Darüber hinaus veranschaulicht die t-SNE Analyse, dass eine besonders starke relative Expression vor allem auf den CD8⁺ zytotoxischen und CD4⁺ T-Helferzellen als auch auf den CD56⁺ natürlichen Killerzellen zu finden war (Abbildung 5). Einen kleineren Anteil an Zellen höherer relativer CD112R-Expression zeigten die CD20⁺ B-Zellen. CD11c⁺ dendritische Zellen, regulatorische T-Zellen (FoxP3⁺) und CD68⁺ Makrophagen zeigten überwiegend eine geringere, überwiegend dem Hintergrund entsprechende, relative Expression von CD112R.

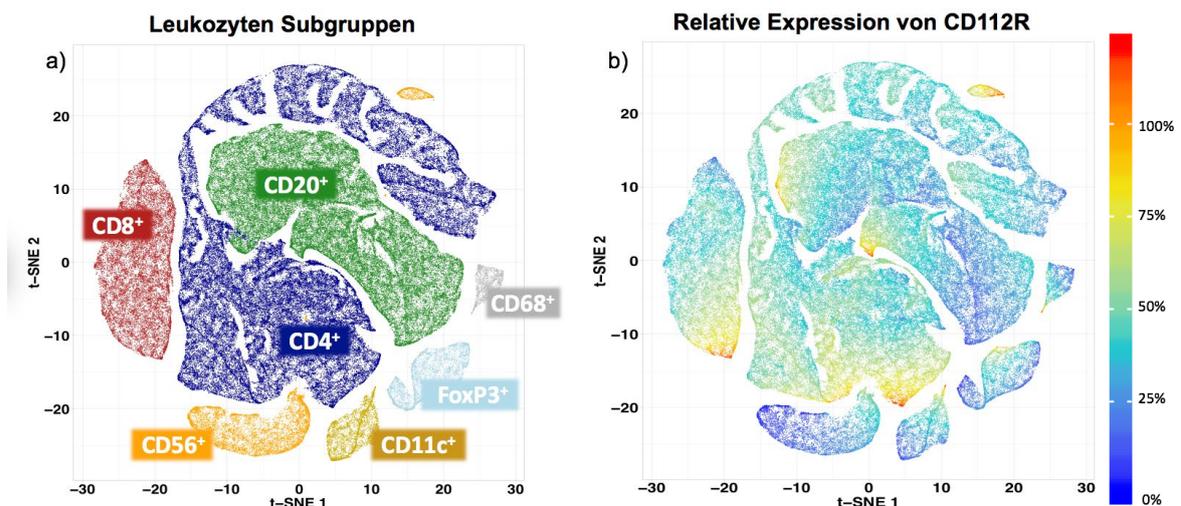


Abbildung 5: t-SNE der Subtypen von Leukozyten (a) in Tonsillengewebe und ihrer relativen CD112R-Expression (b). Die Achseinteilung wird in der t-SNE-Analyse willkürlich gesetzt und dient ausschließlich der Darstellung dieser reduzierten Dimension der Daten.

Anhand der Expressionsmuster in der Multiplex-Fluoreszenz-Immunhistochemie und den t-SNE Abbildungen ließen sich die drei folgenden Expressionsniveaus in den einzelnen Immunzellsubtypen charakterisieren: CD112R^{high}, CD112R^{low} und CD112R^{negative} (Abbildung 6). Hierbei zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Geweben und Leukozyten-Subtypen im Normalgewebe bei der Auswertung von CD112R exprimierenden Lymphozyten und natürlichen Killerzellen.

Prozentuale Unterschiede der Expressionsniveaus von CD112R in Abhängigkeit der Leukozyten-Subtypen

Um die Differenzierungskraft der definierten Expressionsniveaus von CD112R (CD112R^{high}, CD112R^{low} und CD112R^{negative}) in verschiedenen Normalgeweben sichtbar zu machen, sind diese als prozentuale Verteilungen dargestellt (Abbildung 6). Die Kreisdiagramme heben – in schwarz – den prozentualen Anteil von CD112R^{high} Zellen hervor. Der Anteil CD112R⁺ Zellen im Normalgewebe betrug durchschnittlich bei den CD8⁺ Zellen 59% (Range: 10-99%), bei den CD4⁺ Zellen 63% (Range: 13-99%), bei den FoxP3⁺ Zellen 36% (Range: 1-95%), bei den CD20⁺ Zellen 53% (Range: 0-98%) und bei den CD56⁺ Zellen 23% (Range: 2-76%). Der Anteil der CD112R^{high} Zellen war jedoch deutlich geringer mit 9,9% (Range: 0-52%) der CD8⁺ Zellen, 3,5% (Range: 0-30%) der CD4⁺ Zellen, 1,4% (Range: 0-14%) der FoxP3⁺ Zellen, 2,3% (Range: 0-22%) der CD20⁺ Zellen und 2% (Range: 0-16%) der CD56⁺ Zellen. Die Peyer-Plaques des Ileums zeigten in allen Leukozyten-Subtypen übergreifend den höchsten Anteil an CD112R^{high} Zellen und den geringsten Anteil CD112R^{negative} Leukozyten. CD8⁺ Lymphozyten besaßen in den meisten Geweben den größten Anteil an CD112R^{high} Zellen. Dieser war, in der weißen Pulpa der Milz, bei den untersuchten CD8⁺ Zellen mit über 50 % am größten.

CD8⁺ Zellen, CD4⁺ Zellen und CD20⁺ Zellen zeigten in verschiedenen Geweben tendenziell größere prozentuale Anteile von CD112R⁺ Zellen (CD112R^{high} & CD112R^{low}) als die FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen und die CD56⁺ natürlichen Killerzellen. Die Normalgewebe besaßen im Mittel einen Anteil von < 3,9 % CD112R^{high} Immunzellen, wobei dieser Anteil ohne das Einschließen der deutlich erhöhten Normalgewebekompartimente Peyer-Plaques und der weißen Pulpa der Milz < 1,2 % betrug.

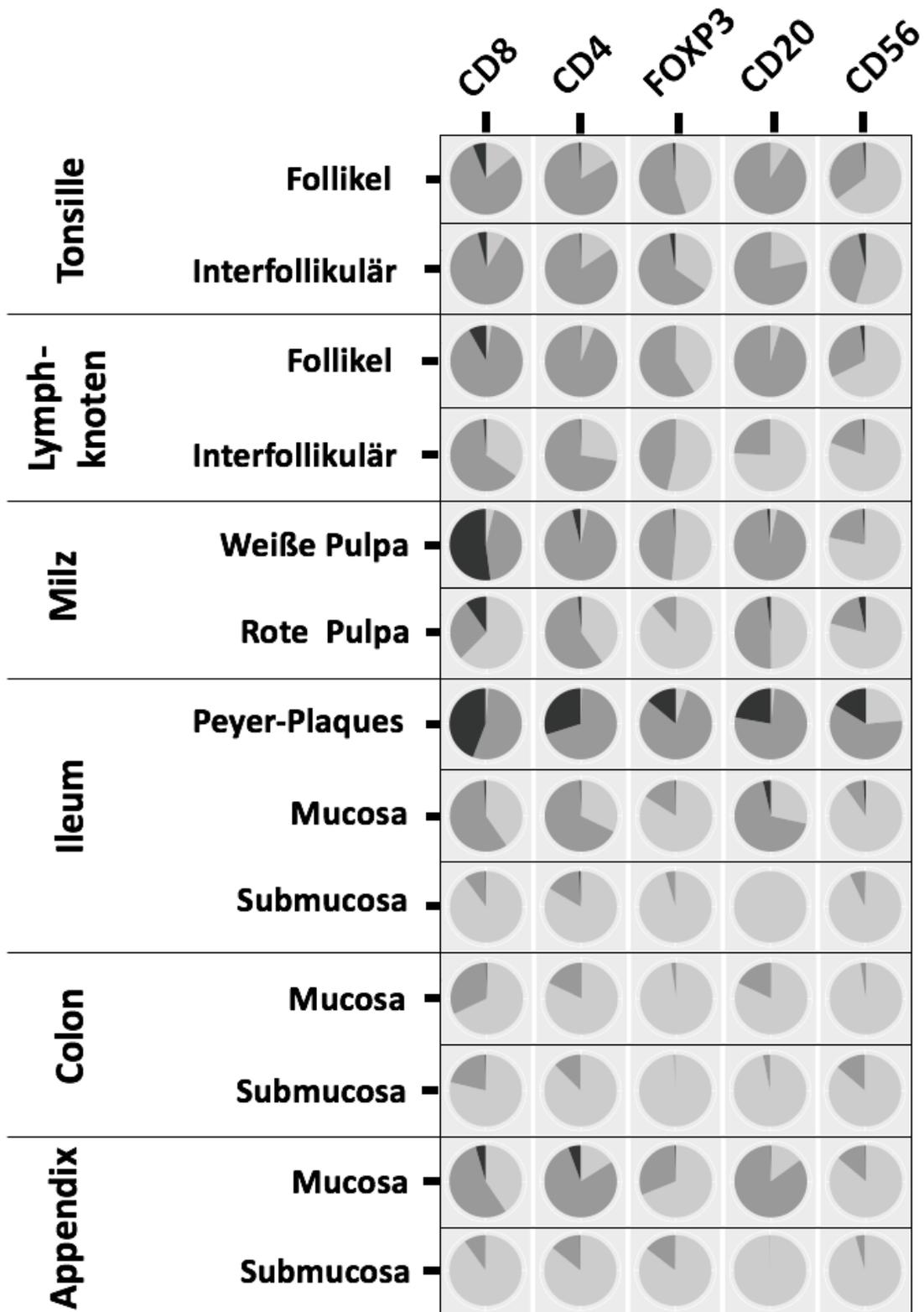


Abbildung 6: Verteilung der CD112R-Expressionsgruppen CD112R^{high} (schwarz), CD112R^{low} (dunkelgrau) und CD112R^{negativ} (hellgrau) auf Immunzellen in den untersuchten Normalgeweben.

Vergleich der relativen Expression von CD112R der relevanten Immunzellsubtypen in Normalgeweben

Um die CD112R Expression in den Normalgeweben unabhängig von den zuvor definierten Expressionsniveaus vergleichen zu können, wurden hierfür einzelne t-SNEs erstellt. Es sind die Leukozyten-Subtypen dargestellt, welche wir zuvor als stärker exprimierend identifizieren konnten, Lymphozyten und natürlichen Killerzellen. Hierbei zeigte sich, dass die CD8⁺ und CD4⁺ Zellen erneut das Bild dominierten (Abbildung 7). Dies unterstützt die in den Kreisdiagrammen gezeigte Verteilung. Zusätzlich zur vereinfachten Information in den Kreisdiagrammen ermöglichte die t-SNE Analyse der einzelnen Normalgewebe die CD112R-Intensität, unabhängig von festgesetzten Grenzwerten, zu interpretieren. Die hohe Expression auf CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen ließ sich weiterhin besonders gut in Milz und Ileum beobachten.

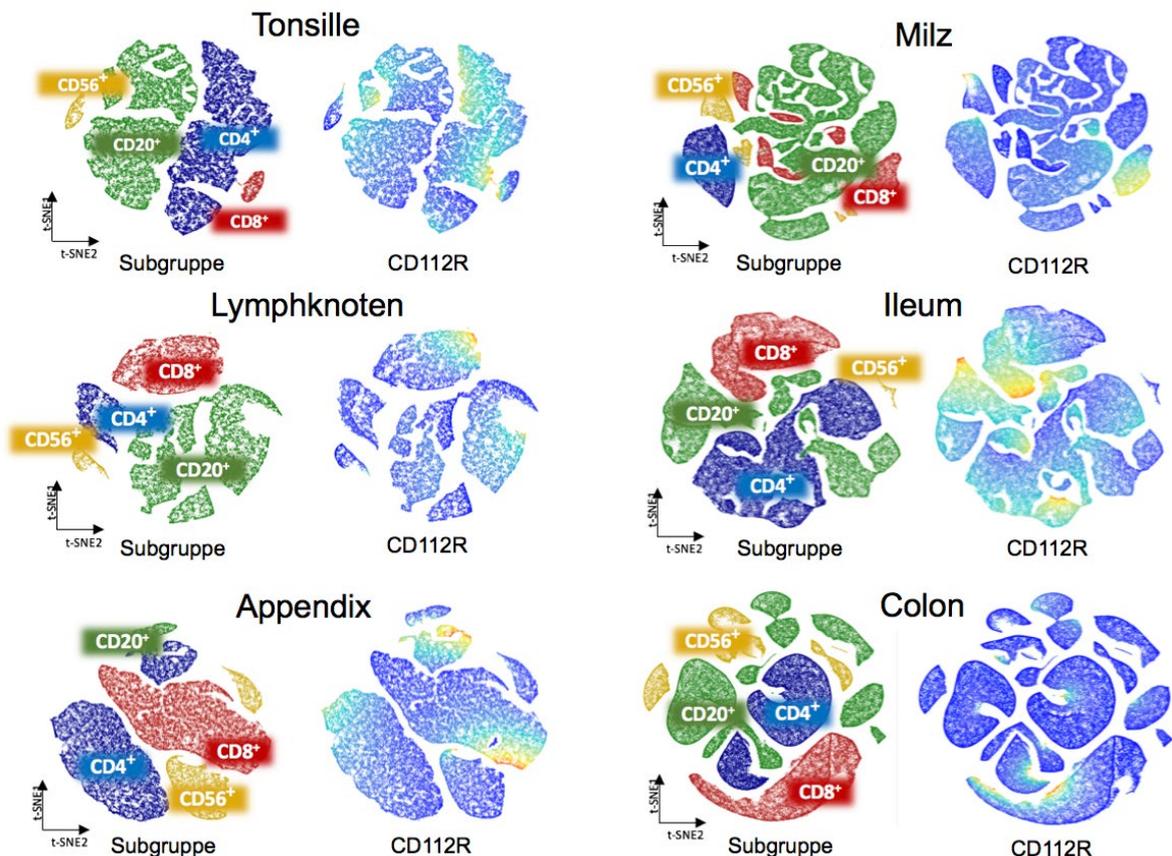


Abbildung 7: t-SNE der Subtypen von Leukozyten (jeweils links) und der relativen CD112R-Expression (jeweils rechts) in verschiedenen Normalgeweben.

Interaktionen von Leukozyten-Subpopulationen im Tonsillengewebe

Die weiterführende Analyse der Anzahl von interagierenden Zellen zeigte, dass die meisten Zellkontakte im Tonsillengewebe zwischen den Subpopulationen der $CD8^+CD112R^{low}$ und $CD4^+CD112R^{low}$ Lymphozyten vorliegen. Mit einigem Abstand folgten die detektierten Kontakte zwischen $CD8^+CD112R^{low}$ und $CD20^+CD112R^{low}$, $CD8^+CD112R^{low}$ und $CD8^+CD112R^-$ sowie $CD4^+CD112R^{low}$ und $CD4^+CD112R^{high}$. Die Anzahl der gemessenen Zellkontakte zwischen Immunzell-Subpopulationen ist in Abbildung 8 dargestellt.

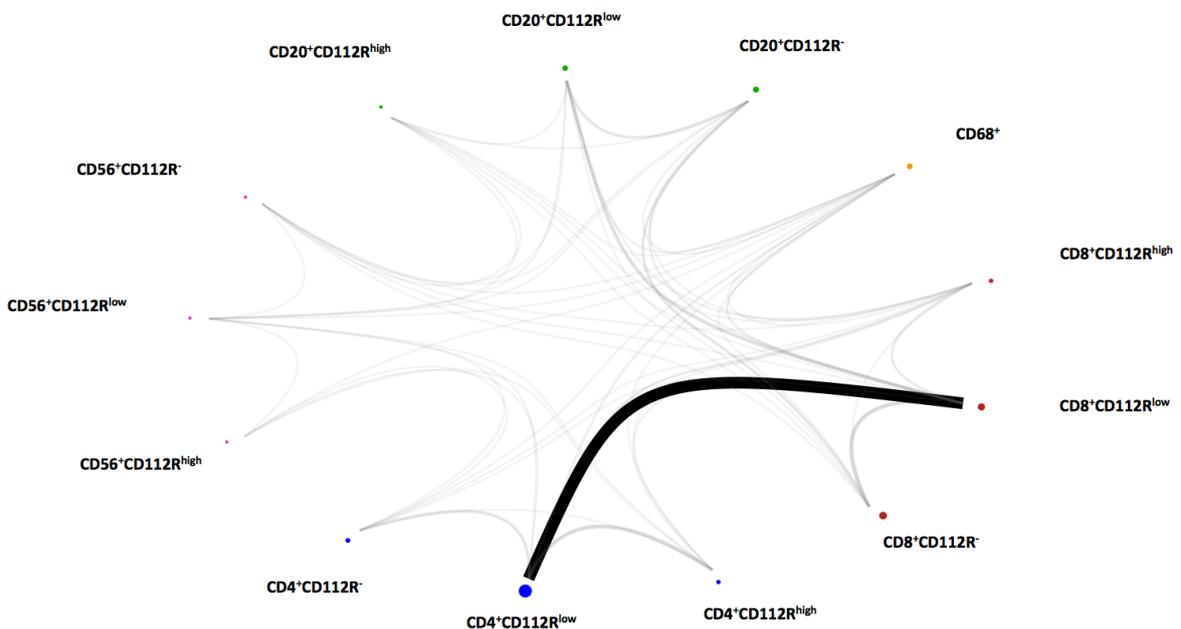


Abbildung 8: Absolute Anzahl der Zellkontakte als Maß für den Grad der Zellinteraktion zwischen verschiedenen Immunzell-Subpopulationen im Tonsillengewebe. Die Anzahl der Interaktionen wird durch die Transparenz und den Durchmesser der verbindenden Linien indiziert, der farbige Punkt zeigt die Anzahl der Zellen der Immunzellsubgruppe.

3.2 Hochregulation von CD112R in malignen Tumoren

Die Analyse von neoplastischem Gewebe umschloss 127 Patienten, von denen 122 erfolgreich analysiert werden konnten. Hierzu zählten 42 Patienten mit einem nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom („*non-small cell lung cancer*“, NSCLC), davon 21 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom und 21 mit einem Adenokarzinom. Des Weiteren kamen 21 Patienten mit serösen Ovarialkarzinomen und 21 mit Pankreaskarzinomen hinzu. Diese konnten alle analysiert werden. Darüber hinaus wurden 42 Patienten mit Blasenkrebs, von denen 37 analysiert werden konnten, in die Studie eingeschlossen. Der Grund für die nicht auswertbaren Blasentumore war das vollkommene Fehlen von Gewebe im Gewebespot des TMAs. Ergänzend wurde zudem ein repräsentativer Großschnitt eines mikrosatelliten-instabilen Kolonkarzinoms analysiert.

Quantitative Unterschiede der CD112R Expression auf positiven Immunzellen im Kolonkarzinom

Um zu klären, ob die CD112R Expression in malignen Geweben Unterschiede zu der in der Tonsille aufweist, haben wir eine exemplarische t-SNE Analyse eines mikrosatelliten-instabilen Kolonkarzinoms angefertigt. Die CD112R exprimierenden Immunzell-Subtypen im t-SNE waren im Kolonkarzinom dieselben wie im Tonsillengewebe. Die relative Expression von CD112R auf Immunzellen im kolorektalem Karzinom war auf CD8⁺ zytotoxischen Lymphozyten am höchsten, gefolgt von den CD4⁺ T-Helferzellen (Abbildung 9). Im Vergleich zu der relativen Expression im Tonsillengewebe (Abbildung 5), gab es weniger Immunzellen mit schwacher oder fehlender relativer Expression von CD112R.

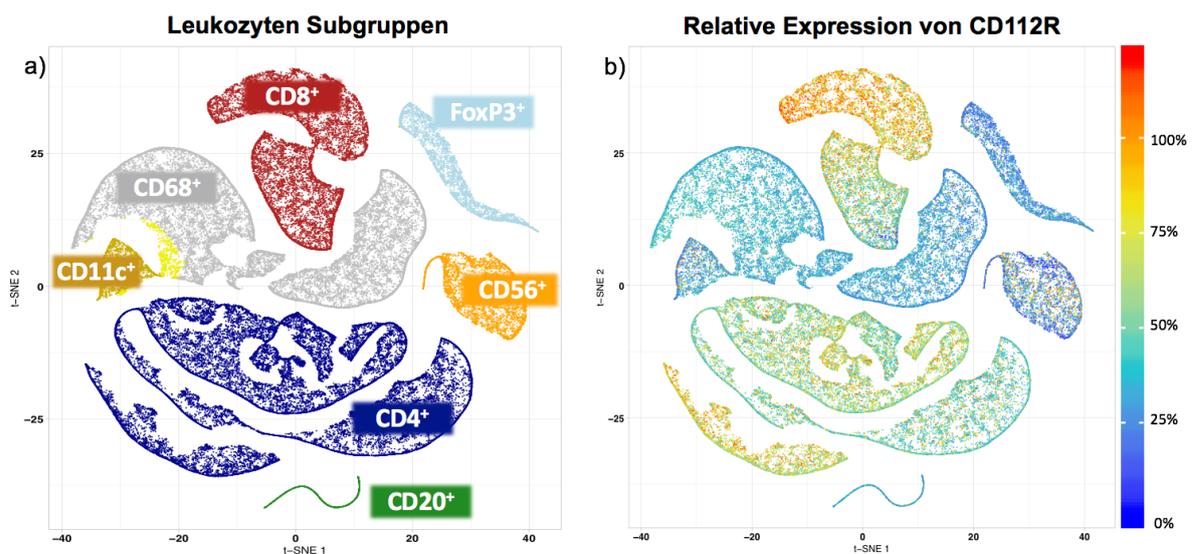


Abbildung 9: t-SNE der Subtypen von verschiedenen Leukozyten-Subtypen (a) in kolorektalem Karzinom („*invasive margin*“ und „*central tumor*“) und ihrer relativen CD112R-Expression (b)

Prozentuale Unterschiede des CD112R Expressionsniveaus von Leukozyten-Subtypen in malignen Tumoren

Der Anteil der CD112R⁺ Zellen in malignen Tumoren betrug durchschnittlich bei den CD8⁺ Zellen 83% (Range: 69-97%), bei den CD4⁺ Zellen 91% (Range: 77-100%), bei den FoxP3⁺ Zellen 69% (Range: 35-90%), bei den CD20⁺ Zellen 82% (71-96%) und bei den CD56⁺ Zellen 63% (38-84%). Deutlich geringer zeigte sich der Anteil der CD112R^{high} Immunzellen mit 20% (Range: 5-37%) der CD8⁺ Zellen, 11,8% (Range: 4-20%) der CD4⁺ Zellen, 2,3% (Range: 1-5%) der FoxP3⁺ Zellen, 5,7% (Range: 0-12%) der CD20⁺ Zellen und 1,4% (Range: 0-3%) der CD56⁺ Zellen. Insgesamt zeigte das Ovarialkarzinom (37%) und das Plattenepithelkarzinom der Lunge (29%) von allen analysierten Tumorentitäten den höchsten Anteil an CD112R⁺ und CD112R^{high} Zellen (Abbildung 10). Den größten Anteil CD112R^{high} Zellen hatten die CD8⁺ zytotoxischen Zellen in allen Tumorentitäten. Den kleinsten prozentuale Anteil von CD112R^{high} Zellen zeigten die FoxP3⁺ Zellen und die CD56⁺ Zellen konstant in allen analysierten Tumorentitäten.

Die untersuchten Lymphknotenmetastasen zeigten in allen Leukozyten-Subtypen kaum CD112R⁺ Zellen. Im Vergleich zu den prozentualen Verteilungen im Normalgewebe (Abbildung 6), waren die Anteile von CD112R⁺ und CD112R^{high} Leukozyten in den untersuchten Tumoren erhöht.

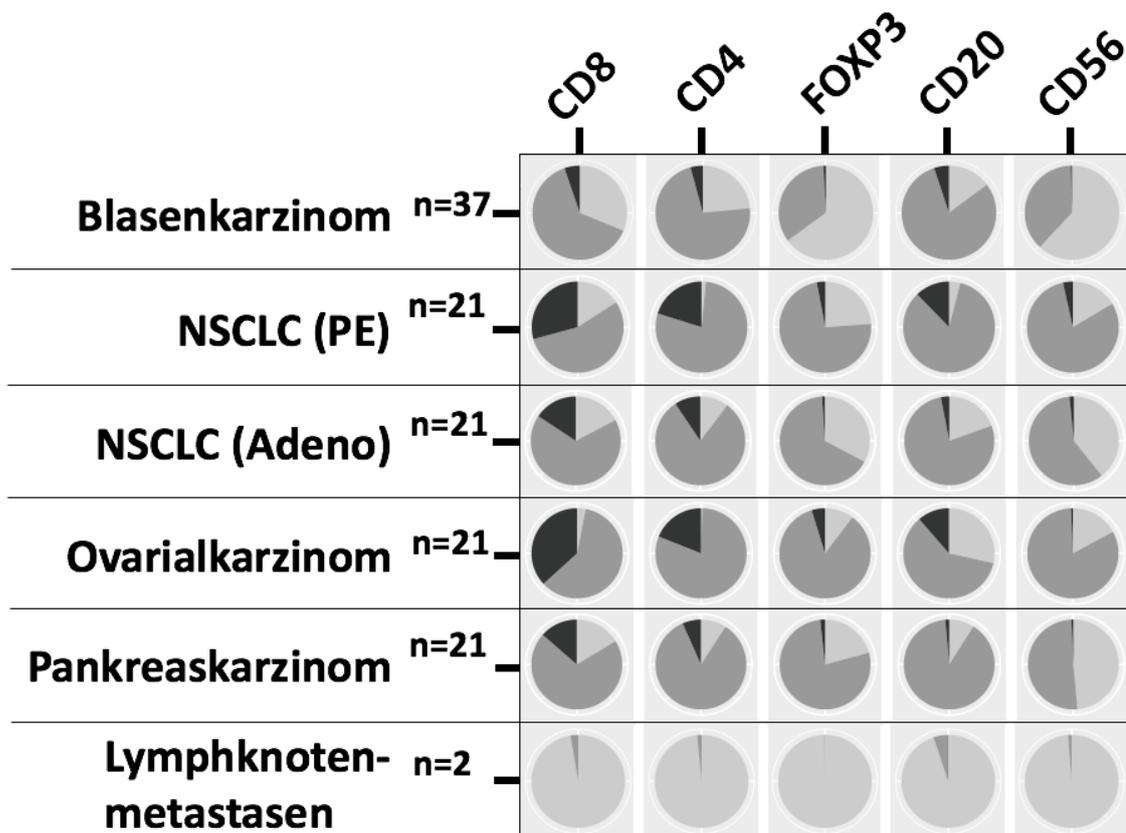


Abbildung 10: Verteilung der CD112R-Expressionsgruppen CD112R^{high} (schwarz), CD112R^{low} (dunkelgrau) und CD112R^{negativ} (hellgrau) auf Immunzellen in den untersuchten malignen Tumoren (NSCLC= „non-small cell lung cancer“, PE= Plattenepithel).

Signifikante Unterschiede der CD112R Expression von Tonsillengewebe und malignen Tumoren

Im direkten Vergleich der verschiedenen malignen Gewebeproben mit gesundem Tonsillengewebe zeigte sich ein größerer Anteil von CD112R^{high} Zellen (Tabelle 2). Insbesondere die Fraktion der CD8⁺ Leukozyten wies im Tumorgewebe einen signifikant höheren Anteil von CD112R^{high} Zellen auf ($p < 0,0001$, Abbildung 11, Tabelle 2). Dieser signifikante Unterschied war ebenfalls bei den CD4⁺CD112R^{high} Zellen zu finden ($p = 0,0001$). Auch bei den CD20⁺ Zellen zeigte sich eine signifikant höhere Fraktion von CD20⁺CD112R^{high} Zellen im malignen Gewebe ($p = 0,0258$).

In den Populationen der FoxP3⁺ Zellen sowie der CD56⁺ Zellen war der Unterschied nicht signifikant ($p = 0,1366$, bzw. $p = 0,3761$). Der Anteil der Leukozyten, die als CD112R^{low} charakterisiert wurden, war in den Subgruppen der CD8⁺, CD4⁺, FoxP3⁺ und CD20⁺ Zellen im Tonsillengewebe höher als im malignen Gewebe. Dabei war der Unterschied bei CD8⁺, CD4⁺ und CD20⁺ Leukozyten signifikant ($p \leq 0,0484$). Bei den CD56⁺CD112R^{low} Zellen gab es keinen signifikanten Unterschied der Fraktionen (Tabelle 2). Eine detaillierte Übersicht der unterschiedlichen Fraktionen ist Tabelle 2 zu entnehmen.

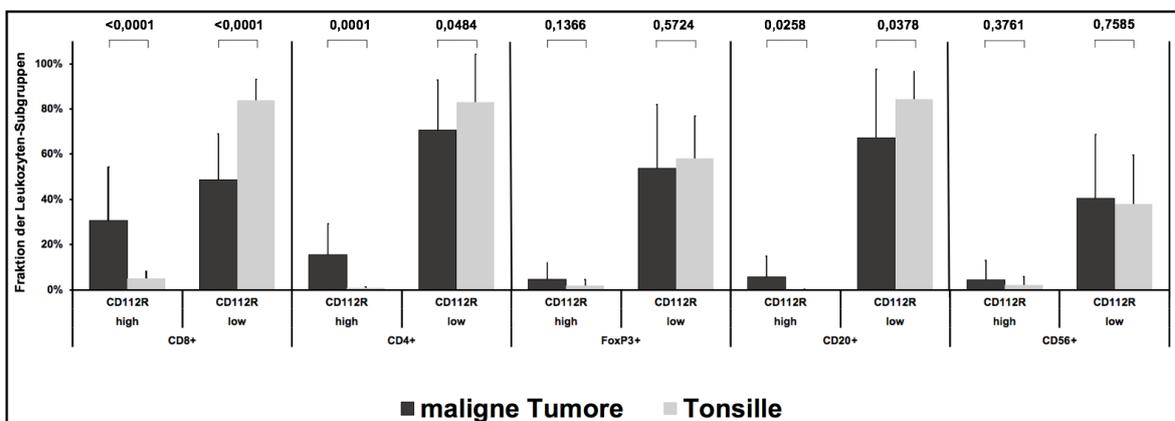


Abbildung 11: Säulendiagramme der Fraktionen der CD112^{high+} und CD112^{low+} positiven Immunzellen in malignen Geweben (schwarz) gegenüber gesunden Tonsillen (grau).

Vergleich von malignen Tumoren und gesunden Tonsillen

Phänotyp	maligne Tumore (n=121)		Tonsille (n=7)		p-Wert
	Mittelwert in %	± SD	Mittelwert in %	± SD	
CD8 ⁺ CD112R ^{high}	30,6	23,75	5,0	3,33	<0,0001
CD8 ⁺ CD112R ^{low}	48,7	20,29	83,8	9,39	<0,0001
CD4 ⁺ CD112R ^{high}	15,4	13,67	0,8	0,49	0,0001
CD4 ⁺ CD112R ^{low}	70,7	22,32	83,2	21,0	0,0484
FoxP3 ⁺ CD112R ^{high}	4,7	7,21	1,8	2,67	0,1366
FoxP3 ⁺ CD112R ^{low}	53,8	28,15	58,2	18,74	0,5724
CD20 ⁺ CD112R ^{high}	5,7	9,16	0,1	0,15	0,0258
CD20 ⁺ CD112R ^{low}	67,3	30,34	84,5	12,07	0,0378
CD56 ⁺ CD112R ^{high}	4,3	8,76	2,2	3,53	0,3761
CD56 ⁺ CD112R ^{low}	40,5	28,36	38,1	21,62	0,7585

Tabelle 2: Vergleich Fraktionen der CD112^{high} und CD112R^{low} positiven Immunzellen in malignen Geweben gegenüber gesunden Tonsillen.

Unüberwachte Clusteranalysen maligner Tumore

Die unüberwachte Clusteranalyse der Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Lunge zeigte eine Gruppierung in immunzellreiche und -arme Gewebe. Dabei verhielt sich die Dichte von CD112R gleichsinnig zu den Leukozytendichten (Abbildung 12).

Bei der Überprüfung dieser Ergebnisse anhand von Bildern lässt sich die Einteilung der Patienten in „*inflamed*“ und „*non-inflamed*“ visuell nachvollziehen (Abbildung 13). Dabei wurde standardisiert jeweils pro Patient die gleiche Region mit dem Signal eines einzelnen Leukozytenmarkers abgebildet. Um die Expressionsunterschiede konstant vergleichen zu können, zeigen die ersten oberen beiden Bilder links Gewebe von zwei gesunden Tonsillen. In den Bildern 3-8 zeigte sich in keiner der verschiedenen Subgruppen eine deutliche Leukozyteninfiltration oder eine klare CD112R Expression, so dass diese Ergebnisse mit der Gruppierung in das „*non-inflamed*“ Cluster übereinstimmten. Dennoch konnten bei zunehmender Vergrößerung einzelne Immunzellen ausgemacht werden. Somit kann nicht von einer insuffizienten Immunhistochemie ausgegangen werden.

Die Bilder 9-16 zeigten entsprechend ihrer Gruppierung in das „*inflamed*“ Cluster eine höhere Leukozytendichte und CD112R Expression. Der Immunphänotyp ist hierbei für alle untersuchten Leukozyten-Subtypen übergreifend gültig. Der Anteil der CD8⁺CD112R^{high} Zellen zeigt sich in der Übersicht der Patienten mit einem Plattenepithel-NSCLC als stärkste Fraktion (Abbildung 12).

Bei dem Vergleich der Leukozytendichten zeigte sich deutlich, dass die Komposition der Immuninfiltration von Patient zu Patient unterschiedlich war. So konnten Immuninfiltrate mit deutlich erhöhtem CD8⁺ oder CD4⁺ T-Lymphozyten-Anteil sowie deutlich erhöhtem Anteil von CD56⁺ natürlichen Killerzellen identifiziert werden.

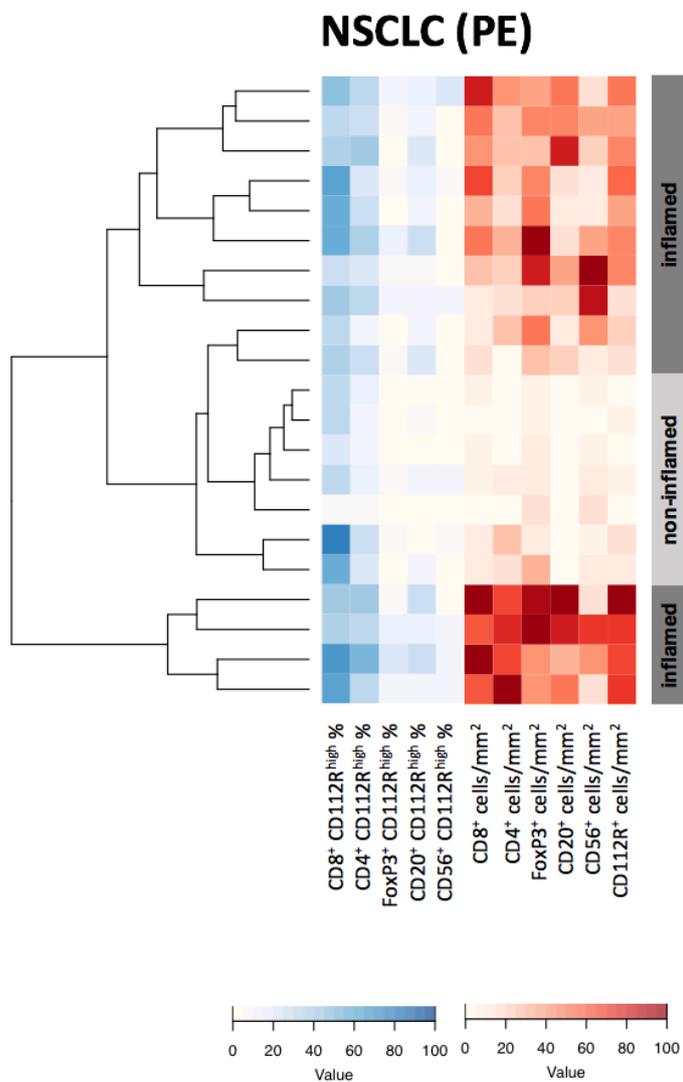


Abbildung 12: Unüberwachte Clusteranalyse des relativen Anteils der CD112R^{high} positiven Immunzellen (blau) und ihrer Dichte (rot) im Plattenepithelkarzinom der Lunge. Der Balken (rechts) verdeutlicht die Dendrogramm basierte Differenzierung des Patientenkollektivs in den „*inflamed*“ (dunkelgrau) und „*non-inflamed*“ (hellgrau) Immunphänotyp.

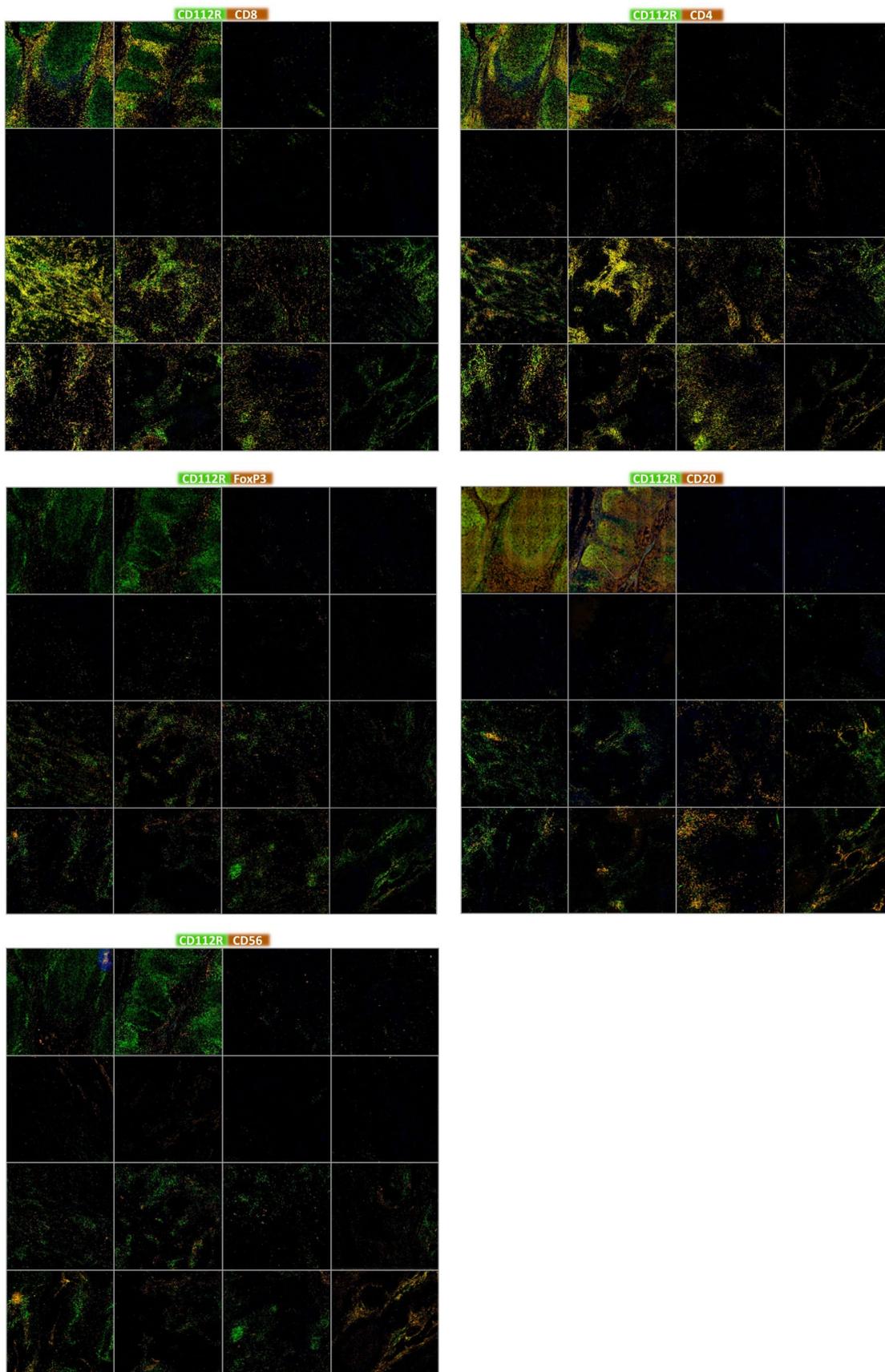


Abbildung 13: Repräsentative Darstellung der CD112R-Expression in der Multiplex-Fluoreszenz-Immunhistochemie von Plattenepithelkarzinomen der Lunge mit jeweils einem weiteren Immunzellmarker. Das erste und zweite Bild links oben zeigen Tonsillengewebe als Vergleich (Vergrößerung 10x).

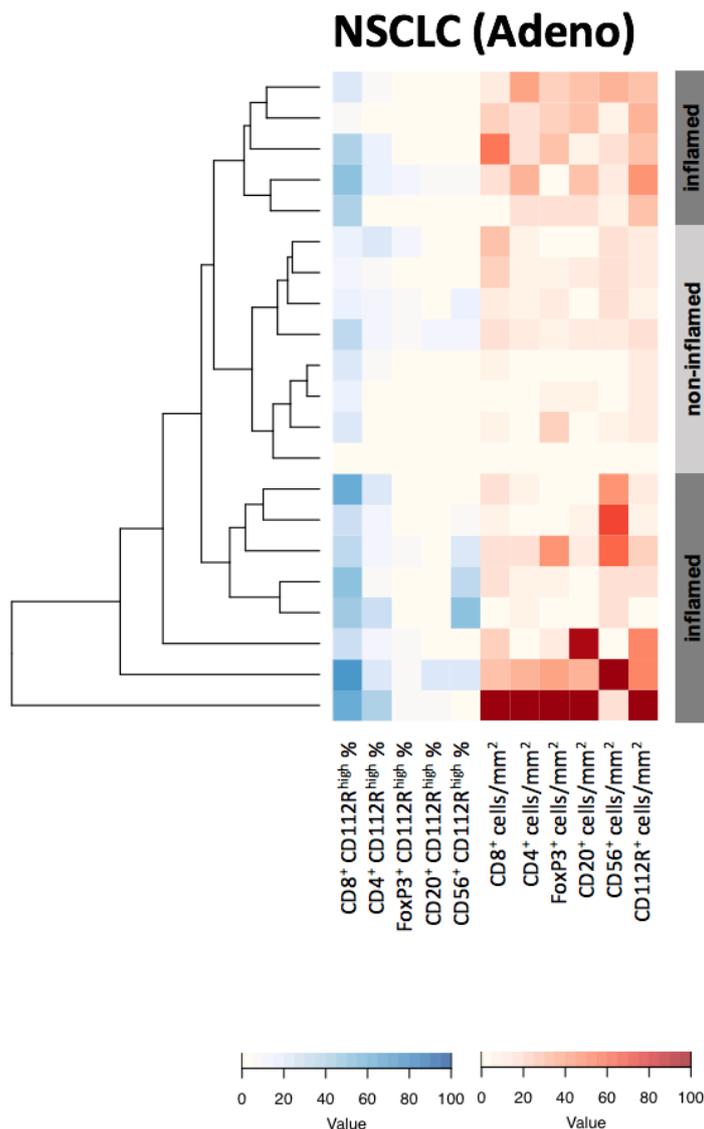


Abbildung 14: Unüberwachte Clusteranalyse des relativen Anteils der CD112R^{high} positiven Immunzellen (blau) und ihrer Dichte (rot) in NSCLC (Adeno). Der Balken (rechts) verdeutlicht die Dendrogramm basierte Differenzierung des Patientenkollektivs in den „*inflamed*“ (dunkelgrau) und „*non-inflamed*“ (hellgrau) Immunphänotyp.

Die Clusteranalyse der Adenokarzinom-Proben der Lunge zeigte ebenfalls eine Gruppierung in immunzellreiche und -arme Gewebe. Die Fraktion der CD8⁺CD112R^{high} Zellen war auch hier meist die Höchste (Abbildung 14).

Nachfolgend sind die Clusteranalysen von Pankreaskarzinom, Blasenkarzinom und Ovarialkarzinom zu sehen (Abbildung 15 - 18).

In allen Analysen ließen sich zwei unterschiedliche Cluster voneinander abgrenzen, „*immune inflamed*“ und „*non-inflamed*“. Diese Aufteilung war hauptsächlich auf die Dichte der Leukozyten zurückzuführen. Dabei verhielt sich die Dichte der FoxP3⁺ Zellen

gleichsinnig zu der Dichte der anderen Leukozyten-Subtypen. Aus den Fraktionen der CD112R^{high} charakterisierten Zellen zeigte sich die CD8⁺CD112R^{high} Fraktion in allen untersuchten malignen Tumoren als die Höchste. Ihre Höhe ließ sich optisch jedoch nicht eindeutig mit den durch das Dendrogramm verdeutlichten Gruppen in Einklang bringen, so dass von einer konstant hohen CD112R Expression auf CD8⁺ zytotoxischen T Lymphozyten in malignem Gewebe auszugehen ist (Abbildung 18).

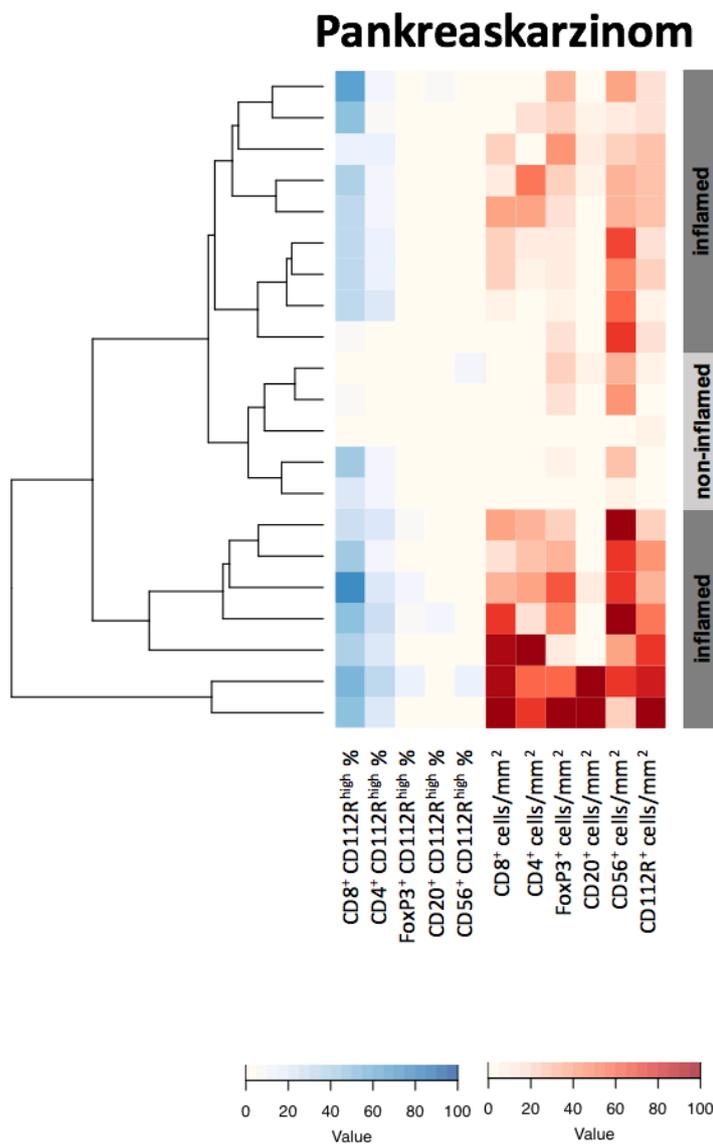


Abbildung 15: Unüberwachte Clusteranalyse des relativen Anteils der CD112R^{high} positiven Immunzellen (blau) und ihrer Dichte (rot) in Pankreaskarzinomen. Der Balken (rechts) verdeutlicht die Dendrogramm basierte Differenzierung des Patientenkollektivs in den „*inflamed*“ (dunkelgrau) und „*non-inflamed*“ (hellgrau) Immunphänotyp.

Blasenkarzinom

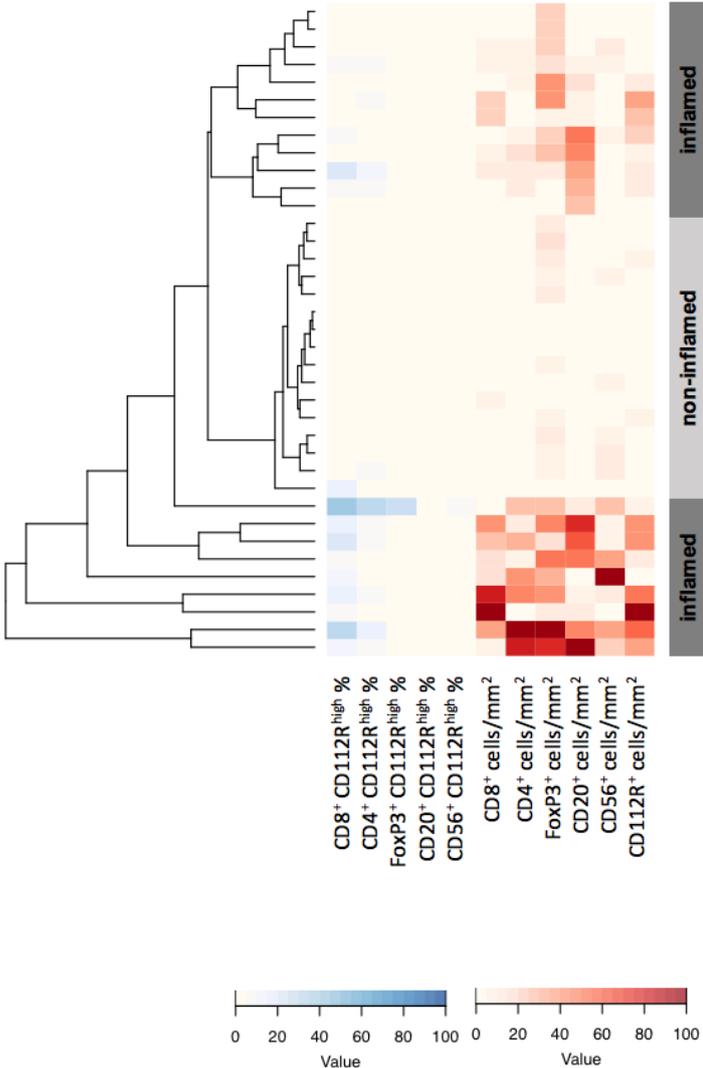


Abbildung 16: Unüberwachte Clusteranalyse des relativen Anteils der CD112R^{high} positiven Immunzellen (blau) und ihrer Dichte (rot) in Blasenkarzinomen. Der Balken (rechts) verdeutlicht die Dendrogramm basierte Differenzierung des Patientenkollektivs in den „*inflamed*“ (dunkelgrau) und „*non-inflamed*“ (hellgrau) Immunphänotyp.

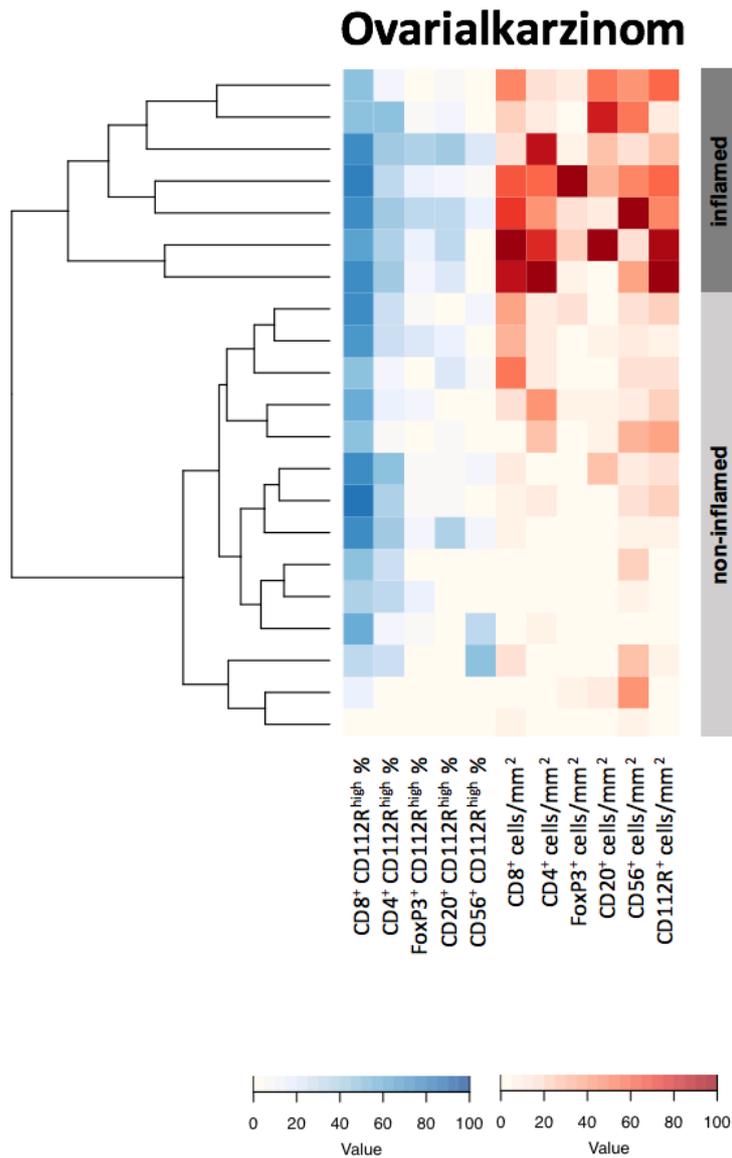


Abbildung 17: Unüberwachte Clusteranalyse des relativen Anteils der CD112R^{high} positiven Immunzellen (blau) und ihrer Dichte (rot) in Ovarialkarzinomen. Der Balken (rechts) verdeutlicht die Dendrogramm basierte Differenzierung des Patientenkollektivs in den „*inflamed*“ (dunkelgrau) und „*non-inflamed*“ (hellgrau) Immunphänotyp.

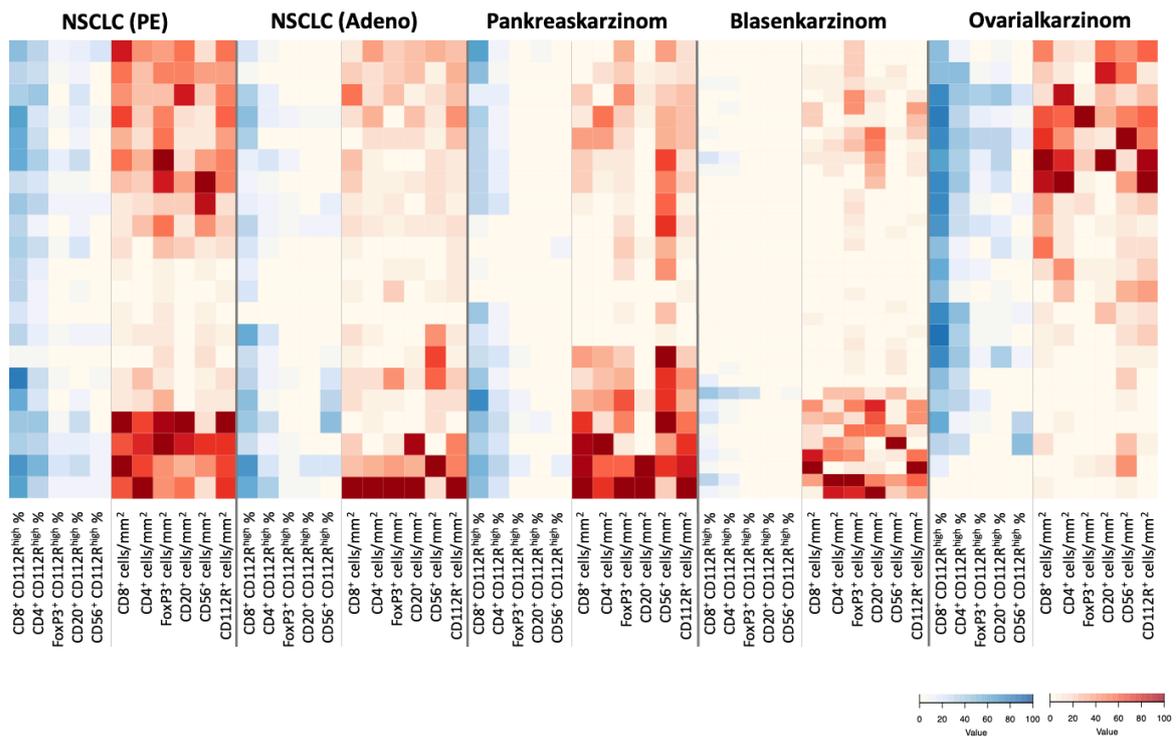


Abbildung 18: Gegenüberstellung der unüberwachten Clusteranalysen der untersuchten malignen Tumoren (Abb. 12, 14-17).

Entitätsübergreifende Korrelationsanalyse der Immunzellichten

In der entitätsübergreifenden Korrelationsanalyse konnte eine sehr hohe Assoziation zwischen den Zelldichten [Zellen/mm²] von CD8⁺CD112R^{high}, CD4⁺CD112R^{high} und CD4⁺CD112R^{low} sowie der Dichte der Gesamtheit von CD112R^{high} Zellen gezeigt werden mit einem Spearman-Korrelationskoeffizienten zwischen 0,88 und 0,75 (Abbildung 19). Die CD56⁺ natürlichen Killerzellen zeigten die höchste Assoziation zwischen den CD56⁺CD112R^{high} und CD56⁺CD112R^{low} Zellen.

PAN-Cancer Dichte [Zellen/mm²] Korrelation

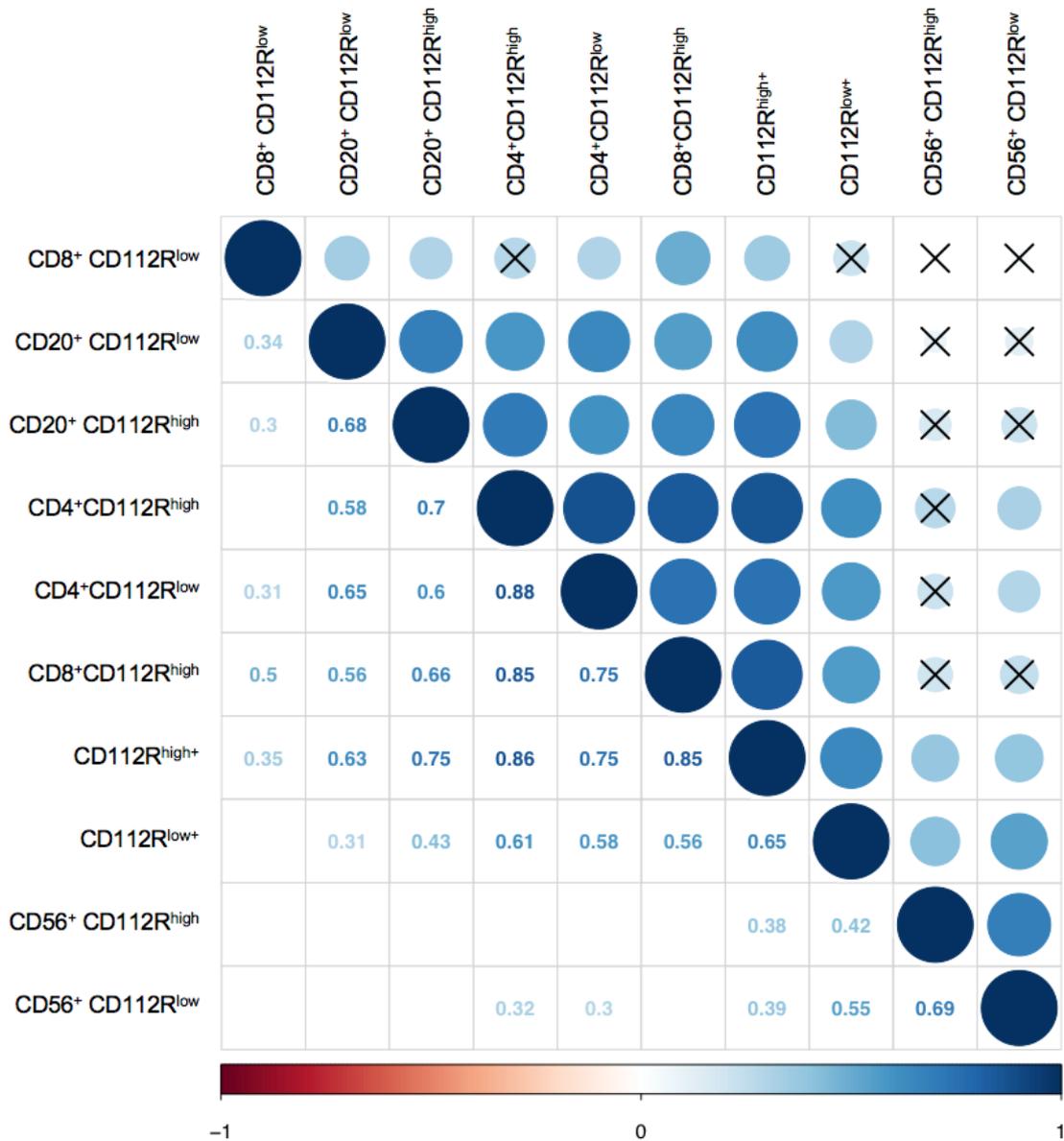


Abbildung 19: Korrelations-Clusteranalyse der Zelldichte-[Zellen/mm²] verschiedener CD112R exprimierender Immunzellen der analysierter ME-TMA-Tumorentitäten („PAN-Cancer“, n = 121). Die Kolorierung und die Größe der Kreise repräsentieren das Maß der Korrelation anhand des Spearman-Korrelationskoeffizienten ρ (ρ , dunkelrot $\rho = -1$, weiß $\rho = 0$, dunkelblau $\rho = 1$) welcher im unteren Dreieck abzulesen ist. Korrelationen, welche einen p-Wert $> 0,001$ zeigten, sind mit einem X markiert, bzw. nicht angegeben.

Interaktionen von Leukozyten-Subpopulationen im Kolonkarzinom

Die Anzahl der gemessenen Zellkontakte von Leukozyten im Kolonkarzinomgewebe waren am höchsten innerhalb der CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen und CD4⁺ T-Helferzellen. Hierbei wurden die CD4⁺CD112R⁻ Zellen und die CD4⁺CD112R^{low} Zellen als die absolut am häufigsten interagierenden Zelltypen identifiziert (Abbildung 20). Die im Tonsillengewebe dominierende Zellkontaktanzahl zwischen CD4⁺CD112R^{low} und CD8⁺CD112R^{low} war hier die zweitstärkste Interaktion. Weitere überdurchschnittlich häufige Kontakte wurde innerhalb der verschiedenen CD112R exprimierenden CD8⁺ und CD4⁺ T-Lymphozyten gefunden. Die Zellkontakte zwischen CD8⁺CD112R^{low} und CD68⁺ Zellen zeigten einen weiteren Unterschied zur korrespondierenden Analyse im Tonsillengewebe.

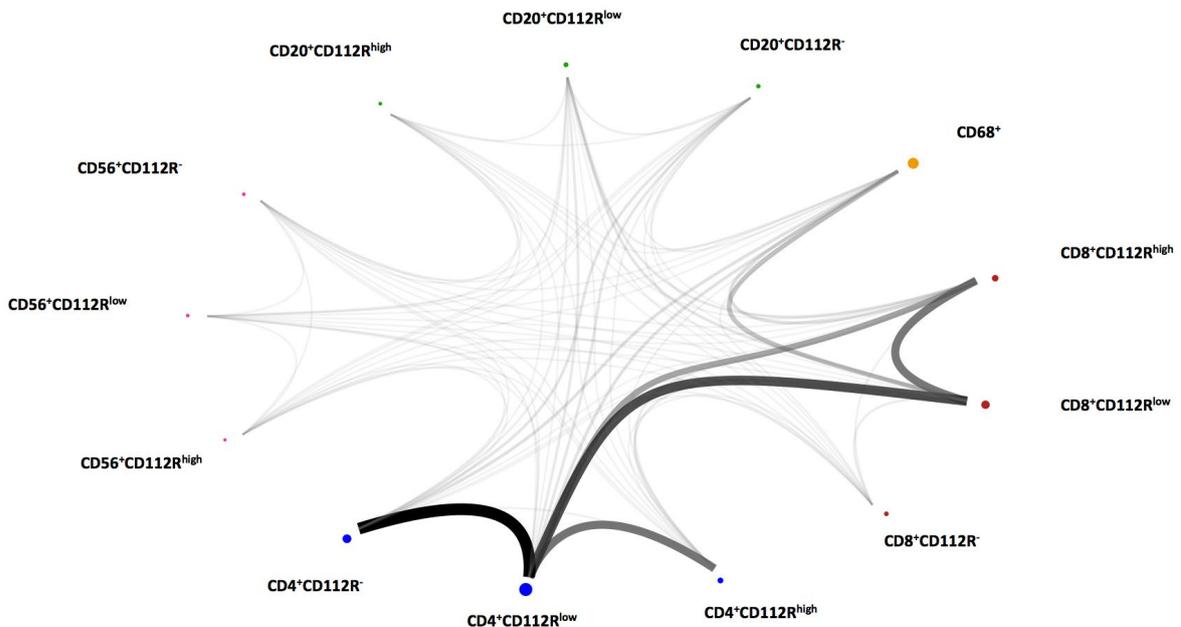


Abbildung 20: Absolute Anzahl der Zellkontakte als Maß für den Grad der Zellinteraktion zwischen verschiedenen Immunzell-Subpopulationen in Kolonkarzinomgewebe. Die Dicke, Intensität und Transparenz der Grautöne repräsentieren die Anzahl der Zellkontakte. Die Größe des farbigen Punktes visualisiert die Anzahl der gemessenen Zellen der jeweiligen Immunzell-Subpopulation.

4. Diskussion

Das Ziel dieser Studie war es, die Expressionsunterschiede des Immuncheckpoint-Rezeptors CD112R in verschiedenen Immunzell-Subpopulationen sowie zwischen normalen und malignen humanen Geweben – in situ – zu charakterisieren. Es gibt einen großen Bedarf die Behandlungsoptionen für Tumorerkrankungen, welche sich nach Behandlung mit Immuncheckpoint-Inhibitoren refraktär zeigen oder rezidivieren, zu erweitern. Es zeigt sich in immer mehr Studien, dass die Kombinationstherapie mit mehreren Immuncheckpoint-Inhibitoren der Monotherapie mit einem Immuncheckpoint-Inhibitor überlegen ist (Postow et al., 2015, Larkin et al., 2015, Hodi et al., 2016, Larkin et al., 2019). Dementsprechend stehen unter anderem neu entdeckte Immuncheckpoints, wie CD112R, im Fokus des Interesses. Um den sicheren Einsatz von CD112R-Inhibitoren in frühen klinischen Studien gewährleisten zu können, ist es von großer Bedeutung die CD112R Expression in humanen Karzinomen im Vergleich zum Normalgewebe zu kennen und Patientenkohorten/ Tumorentitäten zu identifizieren, die besonders von einer solchen Therapie profitieren würden.

CD112R Expression im Normalgewebe

Diese Studie der multiplex-fluoreszenz-immunhistochemischen Färbungen ergab, dass die CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen, CD4⁺ T-Helferzellen, CD20⁺ B-Zellen und CD56⁺ NK-Zellen sowie die Subgruppe der FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen ein Spektrum von niedriger bis hoher CD112R Expression aufwiesen. Auf CD68⁺ Makrophagen und CD11c⁺ dendritischen Zellen war hingegen keine CD112R Expressionen zu finden, was gut zu bestehenden Studien passt: Alle bisherigen Erkenntnisse zu der Expression von CD112R entstammen Studien an humanen Blutproben. Hier zeigte sich in reversen Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)-Analysen, dass T-Zellen CD112R Transkripte exprimierten, deren Menge durch eine gezielte Aktivierung erhöht werden konnte (Zhu et al., 2016). Durchflusszytometrische Analysen von CD3⁺ Zellen wiesen diese Expression auch auf ihrer Oberfläche nach. Bei der Mehrheit der CD112R⁺ T-Zellen aus humanem Blut handelte es sich um CD8⁺ T-Zellen (Zhu et al., 2016). Die Stimulation von CD8⁺ T-Zellen mit viralem Antigen-Peptid (pp65) führte ebenfalls zu einem Anstieg der CD112R Expression (Whelan et al., 2019). Die Untersuchung der Subgruppe der CD112R⁺CD8⁺ Zellen des Bluts zeigte vornehmlich Gedächtnis-/ Effektorzellen und nur sehr wenige naive (CD45RA⁺CCR7⁺) T-Zellen (Zhu et al., 2016). In einer weiteren Analyse von Immunzellen aus peripheren Blutproben wurde im Vergleich von CD8⁺ naiven T-Zellen (T_N), zentralen Gedächtnis- (T_{CM}), Effektor-Gedächtnis- (T_{EM}) und Effektor-Gedächtnis-RA-Zellen (T_{EMRA}) die höchste Expression von CD112R auf Gedächtniszellen, genauer gesagt auf T_{EMRA} CD8⁺

Lymphozyten gefunden (Whelan et al., 2019). Auf CD4⁺ T-Helferzellen aus humanem Blut konnte zunächst keine CD112R Expression detektiert werden, jedoch auf bis zu 41% der Zellen nach der Stimulation durch anti-CD3/CD28 Dynabeads (magnetischen Polymerpartikel, mit auf der Oberfläche kovalent gebundenen Antikörpern) (Zhu et al., 2016). Die beschriebene Hochregulation von CD112R sowohl auf CD8⁺ als auch CD4⁺ T-Lymphozyten, nach forcierter Aktivierung, entspricht höchstwahrscheinlich dem physiologischen, gegenregulatorischen Prozess, welcher eine überschießende und damit gewebeschädigende Immunreaktion verhindert. Sowohl die RT-PCR als auch die Durchflusszytometrie zeigten für CD56⁺ NK-Zellen eine geringe CD112R Expression, welche auf beiden Subgruppen – den CD16⁺ und CD16⁻ Zellen – gleichmäßig verteilt war (Zhu et al., 2016, Xu et al., 2017). Das Level der CD112R Expression wurde im Versuch nicht durch eine artifizielle Aktivierung beeinflusst (Xu et al., 2017). Die RT-PCR zeigte keine Expression von CD112R in dendritischen Zellen und aus den Blutanalysen von Zhu et al. (2016) ging hervor, dass die Populationen der CD19⁺ B-Zellen, CD14⁺ Monozyten und CD66b⁺ Neutrophilen kein CD112R exprimierten (Zhu et al., 2016).

Die durch Durchflusszytometrie in Blutproben bestätigte Expression von CD112R auf CD8⁺ T-Zellen, stimulierten CD4⁺ T-Zellen und NK-Zellen, jedoch nicht auf dendritischen Zellen, stimmt mit den Ergebnissen dieser gewebebasierten Studie überein und kann somit als indirekte Validierung unserer Methode gesehen werden. Da nur circa 2,2% aller Lymphozyten im Blut zirkulieren und diese generell ein niedrigeres Aktivitätsniveau als die gewebeständigen Lymphozyten zeigten, ist es zu erwarten, dass sich auch die Höhe der CD112R Expression dieser Populationen unterscheidet (Trepel, 1974, Sathaliyawala et al., 2013).

Im Normalgewebe zeigte sich ein Anteil von < 1,2% CD112R^{high} positiven Immunzellen, sprich eine generell geringe Expression in allen untersuchten gesunden Kompartimenten bis auf die Peyer-Plaques des Ileums und die weiße Pulpa der Milz. Dies lässt sich gut erklären mit der Tatsache, dass inhibitorische Immuncheckpoints wie PD-1, TIGIT und auch CD112R bisher mehrfach auf Effektor und Gedächtnis T-Zellen nachgewiesen wurden, jedoch keine oder nur eine geringe Expression auf naiven T-Lymphozyten gefunden werden konnte, welche charakteristisch für die sekundär lymphatischen Organe sind (Sauce et al., 2007, Yu et al., 2009, Zhu et al., 2016, Sada-Ovalle et al., 2012, Sathaliyawala et al., 2013). Das geringe Aktivitätsniveau der CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten im sekundär lymphatischen Gewebe wird darüber hinaus durch eine geringe – 3% nicht übersteigende – Proliferationsrate dieser Lymphozyten unterstrichen (Blessin et al., 2020). Auch passt ein geringes CD112R Expressionsniveau zu dem Konzept, dass inhibitorische Immuncheckpoint-Rezeptoren im Zuge der Aktivierung – in der Tumormikroumgebung –

hochreguliert werden, um überschießende autoimmune Reaktion abzuwenden (Pardoll, 2012, Pardoll und Drake, 2012). Ein generell geringes CD112R Expressionsniveau im Normalgewebe lässt sich somit gut durch das geringe Aktivitätsniveau in gesunden sekundär lymphatischen Organen erklären.

In unserer Analyse wurde deutlich, dass die CD8⁺ und nachfolgend die CD4⁺ Lymphozyten in den meisten Normalgeweben den größten Anteil an CD112R^{high} und CD112R⁺ Zellen besaßen. Dies wurde durch die grenzwertunabhängige t-SNE Analyse bestätigt. Deshalb lässt sich vermuten, dass die CD8⁺ und die CD4⁺ T-Lymphozyten in der Regulation durch CD112R eine Schlüsselfunktion einnehmen. CD112R^{high} Zellen machten in den Normalgeweben stets einen unterschiedlich kleinen Teil aus und zeigten trotz standardisierter Grenzwertfindung stark unterschiedliche Proportionen zwischen den verschiedenen Geweben. Die Peyer-Plaques des Ileums fielen in unserer Analyse durch ihren Leukozyten-Subtypen übergreifenden, herausstechenden Anteil von CD112R^{high} Zellen und im Vergleich der Normalgewebe geringsten Teil an CD112R^{negative} Leukozyten auf. Diese hohe Expression der Peyer-Plaques kann im Zusammenhang mit ihrer immunologischen Funktion betrachtet werden: Der permanente Antigenkontakt, unter anderem mit Nahrungsbestandteilen und dem schützenden Mikrobiom des Darms, setzt eine hohe Eigentoleranz gegenüber diesen Bestandteilen voraus (orale Toleranz), die jedoch gleichzeitig Pathogene zuverlässig erkennt (Mowat, 2003, Faria und Weiner, 2005). Untersuchungen haben gezeigt, dass der inhibitorische Immuncheckpoint PD-1 über die Steuerung von T-Helferzellen maßgeblich auf die balancierte Immunglobulin A-Produktion durch B-Zellen in den Peyer-Plaques einwirkt (Maruya et al., 2013). Bei Verlust dieser regulierenden Einheit wurde im Darm ein dysreguliertes Mikrobiom vorgefunden und es konnte zur Bildung von autoreaktiven Antikörpern kommen (ebd.). Eine inflammatorische Reaktion auf Nahrungsbestandteile oder mikrobiotische Antigene kann darüber hinaus die Entwicklung von Allergien und chronischen Entzündungen begünstigen, wie Zöliakie und chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und steht zudem im Verdacht andere Autoimmunerkrankungen wie rheumatoide Arthritis und systemischen Lupus erythematoses zu triggern (Joosse et al., 2019). Diese Ergebnisse unterstreichen die Notwendigkeit der Regulation durch die Immuncheckpoints im Darm, um die orale Toleranz aufrechterhalten zu können und die Entstehung von Krankheiten zu verhindern und passen gut zu der von uns entdeckten hohen Expression von CD112R in den Peyer-Plaques.

Hochregulation von CD112R in malignen Tumoren

Unsere Analyse von CD112R in humanen Neoplasien zeigte eine signifikante Hochregulation der Expression auf CD8⁺, CD4⁺ und CD20⁺ Zellen mit einem signifikant erhöhten Anteil von CD112R^{high} Leukozyten im Vergleich zu den Normalgeweben. Dieser Unterschied des Expressionslevel von CD112R lässt sich gut durch die erhöhte Aktivierung spezifischer Immunzellen im malignen Gewebe erklären, welche physiologisch durch eine kompensatorisch erhöhte Expression von inhibitorischen Immuncheckpoints begleitet wird (Pardoll, 2012). Wenn es jedoch nicht nur akut, sondern wie bei einer chronischen Infektion oder einem malignen Tumor zum persistierenden Antigenkontakt kommt, werden die T-Zellen in einen Zustand der Erschöpfung gedrängt, die sogenannte „*exhaustion*“ (Sen et al., 2016, Xia et al., 2019). In diesem dysfunktionalen Zustand sind die T-Zellen trotz vorhandenem Stimulus nicht mehr in der Lage ihre Effektorfunktionen auszuführen (Wherry, 2011). Die inhibitorischen Immuncheckpoints spielen hierbei eine große Rolle. So konnte gezeigt werden, dass die Ko-Expression und das Expressionslevel verschiedener inhibitorischer Immuncheckpoints auf derselben CD8⁺ T-Zelle die Schwere ihrer Dysfunktion beeinflusst (Blackburn et al., 2009). Auch für CD112R konnte eine Ko-Expression mit zwei dieser inhibitorischen Immuncheckpoints (TIGIT und PD-1) auf CD8⁺ und CD4⁺ Zellen nachgewiesen werden (Whelan et al., 2019). Es gibt jedoch auch Zellen, die nur einen oder zwei dieser Immuncheckpoints exprimieren und bei denen vermutet wird, dass ihre Inaktivität maßgeblich auf diesen hochregulierten Immuncheckpoint zurückgeht (Blessin et al., 2019, Whelan et al., 2019). Hierzu passt, dass die Expression von CD112R auf CD8⁺ TIL signifikant mit einem Eomes⁺T-bet Phänotyp assoziiert war, einem Transkriptionsprofil, welches zur Unterscheidung von Effektor- oder Gedächtnis-T-Zellen und funktionsuntüchtigen „*exhausted*“ T-Zellen verwendet wird (Whelan et al., 2019, Buggert et al., 2014, Li et al., 2018). Wenn wir davon ausgehen, dass die Hochregulation von Immuncheckpoints zunächst im Rahmen ihrer Aktivierung stattfindet und es unter anhaltendem Antigenkontakt zu einer dysfunktionalen Entwicklung mit ansteigendem Expressionslevel von CD112R kommt, kann vermutet werden, dass die von uns als CD112R^{high} beschriebenen Zellen den erschöpften Zustand der Lymphozyten abbilden. Von diesen erschöpften Zellen, welche durch die Dominanz des inhibitorischen CD112R-Pfades dysfunktional geworden sind, wird jedoch erwartet, dass sie therapeutisch durch die Blockade des hochregulierten Immuncheckpoints reaktiviert werden können und somit eine Anti-Tumor-Reaktion ermöglichen. So konnte nach einer CD112R-Blockade in Zellversuchen eine gesteigerte T- und NK-Zellfunktion anhand ihrer IFN- γ Produktion nachgewiesen werden (Xu et al., 2017, Whelan et al., 2019). Um der Frage nachzugehen, ob die Fraktion der CD112R^{high} Zellen tatsächlich die Immunzellen abbildet, welche sich im

Zustand der „*exhaustion*“ befinden, könnten kombinierte Untersuchungen mit den Transkriptionsfaktoren T-bet und Eomesdermin weiteren Aufschluss bringen.

Die von uns gefundene Hochregulation von CD112R auf Lymphozyten in malignen Geweben steht im Einklang mit dem Ergebnis von Whelan et al. (2019), welches eine im Vergleich zum Normalgewebe erhöhte Expression von CD112R auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in humanem Lungenkrebsgewebe beschrieben hatte (Whelan et al., 2019). Das Normalgewebe dieser Untersuchungen stammte jedoch aus dem benachbarten Umfeld des Tumors, sogenanntes „*normal adjacent tissue*“ (NAT), welches außerhalb des histologisch sichtbaren invasiven Randwalls des Tumors beginnt (ebd.). Die Verwendung von NAT als Vergleichsgewebe ist in Krebsstudien üblich und hat Vorteile wie beispielsweise den relativ einfachen Zugang zu diesem Gewebe und der direkten Vergleichbarkeit, da sowohl Kontroll- als auch Krebsgewebe von den individuellen Patienten stammen (Aran et al., 2017). Dabei wird angenommen, dass das histologisch unauffällige NAT auch biologisch normal sei, eine Annahme, welche in Untersuchungen jedoch widerlegt wurde (Aran et al., 2017, Seo et al., 2018). Dieses Vorgehen kann dazu führen, bei vergleichenden Untersuchungen Schlüsse über die Expression von Biomarkern zu ziehen, welche nicht den realen Unterschied zwischen Krebs- und Normalgewebe widerspiegeln (Aran et al., 2017). Das NAT stellte vielmehr eine Zwischenstufe dar, die sich in der Entwicklung zwischen dem Tumor und gesundem Gewebe einordnen lässt (ebd.). Vor diesem Hintergrund wurde in dieser Arbeit die CD112R Expression von Immunzellen in mehreren gesunden Tonsillen als Vergleich bestimmt und es konnte anhand dieses unabhängigen Normalgewebes eine Hochregulation von CD112R in malignen Geweben gezeigt werden.

Um einen optimalen Vergleich von Tumor- und Normalgewebe durchzuführen zu können, liegt es nah das gesunde Gewebe der Ursprungsorgane der Tumoren zu verwenden und damit eine sichere Aussage über einen tatsächlichen Unterschied in der Expression von CD112R im Krebsgewebe machen zu können. Eine erste Limitation stellt hierbei die Materialgewinnung dieser Vergleichsproben dar, die bei gesundem Gewebe keine chirurgische Indikation darstellt. Ein zweiter limitierender Faktor ist die benötigte hohe Anzahl von Immunzellen auf einer kleinen Fläche, welche sich histologisch aufarbeiten lässt. Dies ist im gesunden Normalgewebe nicht gegeben. Insbesondere gesundes Tonsillengewebe eignet sich aufgrund seiner hohen Lymphozytendichte sehr gut, um aus einer großen Summe von Immunzellen einen durchschnittlichen Expressionswert für einen Marker bestimmen zu können. Da die meisten Präparate von Patienten stammen, die häufige Tonsillitiden durchgemacht haben, könnte vermutet werden, dass dieses Gewebe eventuell durch die wiederkehrende Inflammation verändert sei. Die Funktion der Lymphozyten solcher Präparate zeigte sich jedoch im Versuch, gemessen an ihrer

Fähigkeit auf Stimulation zu reagieren, aktiviert zu werden und zu differenzieren, unverändert (Sada-Ovalle et al., 2012).

Im Vergleich der Interaktionsanalysen zeigten sich im gesunden Tonsillengewebe die meisten Zellkontakte zwischen den CD4⁺CD112^{low} und CD8⁺CD112R^{low} Zellen. Diese stellte im Kolonkarzinom die zweithäufigste Interaktion dar. Interessanterweise zeigte sich im Kolonkarzinom dafür eine neue dominierende Interaktion zwischen den CD8⁺CD112R^{low} zytotoxischen T-Zellen und den CD68⁺ Makrophagen. Makrophagen können in der Tumormikroumgebung je nach ihrer Polarisierung (M1 oder M2/ M2-like) das Tumormikroumwachstum oder die Zerstörung von Tumorzellen fördern (Biswas und Mantovani, 2010). Diese gegensätzlichen Wirkungsweisen spiegeln sich auch in der prognostischen Bedeutung der „*tumor associated macrophages*“ (TAM) wider. Eine hohe Dichte von TAM scheint in Magen-, Urogenitalkarzinomen und Tumoren des Kopf- und Halsbereichs mit einer schlechteren Prognose assoziiert zu sein, in Kolonkarzinomen jedoch mit einem besseren Gesamtüberleben (Zhang et al., 2012).

Den Zelltypen der CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen und CD4⁺ T-Helferzellen, welchen bei unserer Analyse der Normalgewebe eine Schlüsselrolle zugeschrieben werden konnte, waren auch im malignen Gewebe dominierend. Sie zeigten hier ebenfalls den höchsten Anteil an CD112R^{high} Zellen. Die Verbindung zwischen den CD8⁺ und CD4⁺ Zellen wird zusätzlich durch das Ergebnis der entitätsübergreifenden Korrelationsanalyse bestätigt. Es konnte eine signifikante und hohe Assoziation zwischen den Zelldichten von CD8⁺CD112R^{high}, CD4⁺CD112R^{high}, CD4⁺CD112R^{low} gezeigt werden. Die Wichtigkeit der tumor-spezifischen CD4⁺ T-Zellen für die antitumorale Immunantwort und ihre Assoziation mit den zytotoxischen T-Zellen ergibt sich aus ihrer anregenden Wirkung auf die Rekrutierung, Proliferation von CD8⁺ T-Zellen sowie die Steigerung ihrer Effektorfunktion (Bos und Sherman, 2010). Zudem ließ sich in Mäusen zeigen, dass diese ohne CD4⁺ Zellen nicht in der Lage waren, Melanomzellen mithilfe einer CTLA-4-Antikörper-Therapie zu bekämpfen (Simpson et al., 2013). Auch wenn CD8⁺ T-Lymphozyten bisher in der Krebsforschung mehr Aufmerksamkeit erhalten haben, sind sie auf die Unterstützung der CD4⁺ T-Zellen angewiesen. Doch die Rolle der CD4⁺ T-Zellen scheint nicht ausschließlich auf diese Hilfe begrenzt zu sein. Zu ihrer unterstützenden Wirkung auf CD8⁺ T-Zellen und CD20⁺ B-Zellen kommt eine direkte antitumorale Aktivität, welche ähnlich wie die der zytotoxischen Zellen durch die Produktion von IFN γ und TNF α wirkt (Tay et al., 2020). Sowohl die Verbindung der CD8⁺ und CD68⁺ Zellen sowie CD8⁺ und CD4⁺ Zellen spielen demnach wichtige, zum Teil entgegengesetzte Rollen in der Tumormikroumgebung.

Die Unterschiede zum Tumorgewebe waren nicht die einzigen Erkenntnisse unserer Analyse des Normalgewebes, vielmehr verdeutlichten sie zudem die generellen Differenzen zwischen den verschiedenen Immuncheckpoints. Die Expressionsunterschiede der inhibitorischen Immuncheckpoints PD-1, TIGIT und CD112R waren beispielsweise im Tonsillengewebe sichtbar. TIGIT und PD-1 zeigten in den Germinalzentren eine sehr hohe Expression auf CD4⁺ T-Zellen (Blessin et al., 2019). In unserer Analyse waren viele CD4⁺ Zellen CD112R⁺, jedoch sehr wenige von ihnen zeigten eine sehr hohe Expression in den Tonsillen. Im allgemeineren Vergleich von CD112R mit anderen inhibitorischen Immuncheckpoints fallen einige Gemeinsamkeiten aber auch Unterschiede auf: PD-1 wird auf T-, B- und NK-Zellen sowie myeloiden CD11c⁺ dendritischen Zellen und Monozyten exprimiert (Keir et al., 2008). PD-1 hat einen Expressionspeak an Tag 3 nach Aktivierung und inhibiert in der Effektor-Phase, wenn sich die Lymphozyten in peripheren Geweben befinden (Buchbinder und Desai, 2016, Whelan et al., 2019). Die Liganden von PD-1, PD-L1 und PD-L2, befinden sich ebenfalls auf Leukozyten und APZ sowie zusätzlich auf nicht-Immunzellen – inklusive Tumorzellen (Keir et al., 2008, Fife und Bluestone, 2008). TIGIT zeigte 3-5 Tage nach Aktivierung einen Peak der Expression (Whelan et al., 2019). Eine Expression konnte auf CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen, regulatorischen T-Zellen und NK-Zellen gezeigt werden (Blessin et al., 2019). TIGIT interagiert mit verschiedenen Liganden, darunter CD112, CD113 und CD155 (Sanchez-Correa et al., 2019). Die Verbindung zu CD155 sticht dabei durch die hohe Affinität hervor (Yu et al., 2009). Eine CD112R Expression konnte in unserer Analyse auf CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen, regulatorischen T-Zellen, NK-Zellen und B-Zellen nachgewiesen werden. Der Expressionspeak trat nach 11 Tagen vergleichsweise spät auf (Whelan et al., 2019). Der Ligand CD112 befindet sich hauptsächlich auf der Oberfläche von Monozyten, dendritischen Zellen und nicht-hämatologischen Tumorzellen (Zhu et al., 2016). Grundsätzlich verschieden ist CTLA-4. Es wird ausschließlich von T-Zellen exprimiert und hat nach deren Aktivierung seinen Expressionspeak bereits nach 24 Stunden, welcher nach nur 72 Stunden wieder auf ein basales Niveau abfällt (Perez-Garcia et al., 2013, Buchbinder und Desai, 2016). Dadurch wird während der Priming-Phase in die Aktivierung der Lymphozyten in lymphatischen Geweben eingegriffen (Buchbinder und Desai, 2016). Die Liganden für CTLA-4 – B7-1 und B7-2 – werden auf APZ exprimiert (ebd.). Letztendlich lässt sich also sagen, dass es einige Gemeinsamkeiten, aber keine richtige Ähnlichkeit, welche eine Zuordnung zulassen würde, zwischen diesen Immuncheckpoints gibt. Diese unterschiedlichen inhibitorische Wege zeigen sich auch in der vereinten Wirksamkeit von CD112R-, TIGIT- und PD-1-Inhibitoren. Diese konnten zusammen den höchsten Anstieg der IFN- γ -Produktion von T-Zellen bewirken (Whelan et al., 2019). Das gute Zusammenspiel der verschiedenen Inhibitoren könnte sich unter anderem durch die indirekte Verbindung zwischen CD112R und TIGIT

erklären lassen. Trotz ihrer Unabhängigkeit voneinander ist DNAM-1 ein Bindeglied dieser beiden Rezeptoren. Ein kombinierter Einsatz dieser Antikörper blockiert nicht nur die inhibitorischen Funktionen von CD112R und TIGIT, sondern befreit simultan deren Liganden CD112 und CD155, wodurch diese für eine Interaktion mit ihrem schwächeren Bindungspartner DNAM-1 befreit werden, welcher wiederum zusätzlich einen stimulierenden Effekt auf T- und NK-Zellen hat (Sanchez-Correa et al., 2019).

In den Clusteranalysen der von uns untersuchten Tumore war eine klare Differenzierung der Patientenproben in „*inflamed*“ und „*non-inflamed*“ entsprechend gängiger Immunphänotypen zu erkennen (Chen und Mellman, 2017). Abweichend von der Einteilung von Chen und Mellman (2017) war bei dieser TMA-basierten Analyse eine weitere Differenzierung des „*non-inflamed*“ Clusters in den „*immune-desert*“- oder „*immune-excluded*“-Phänotyps nicht möglich, da die gewonnenen TMA-Proben regelhaft aus der von einem Pathologen als Tumorzentrum markierten Bereich entnommen werden. Die unterschiedlichen Immunphänotypen von Tumoren besaßen in verschiedenen Studien eine Prognoserelevanz (Zhu et al., 2018, Edin et al., 2019). Zudem kommt dieser Typisierung eine therapeutische Bedeutsamkeit hinzu, da die „*inflamed*“ Tumoren im Allgemeinen besser auf eine Immuncheckpoint-Therapie ansprechen (Hegde et al., 2016, Chen und Mellman, 2017). Innerhalb des „*inflamed*“ Clusters zeigten die einzelnen Patienten eine große Heterogenität bezüglich der Dichte der einzelnen Leukozyten-Subgruppen. Dabei konnten Patienten-Untergruppen ausgemacht werden, die sich jeweils durch eine besonders hohe Dichte von CD8⁺ Zellen, CD56⁺ Zellen oder CD20⁺ Zellen auszeichneten. Diese Beobachtung zog sich durch alle Tumorentitäten. Deshalb stellt sich die Frage, ob die gängige Einteilung in „*inflamed*“ und „*non-inflamed*“ (auch „*hot*“ und „*cold*“) eventuell nicht ausreichend genau ist, da sich diese durch die Komposition ihrer Immunzellinfiltrate unterscheiden. Ein solche Komposition könnte als ein Hinweis auf eine unterschiedliche, dominierende Anti-Tumor-Immunreaktionen innerhalb der immunzellreichen Tumoren gewertet werden. Die Aufgaben der Tumorzellbekämpfung unterscheiden sich je nach Leukozyten-Subgruppen: Der größte Anteil der CD8⁺ T-Zellen wirkt auf maligne Zellen direkt zytotoxisch durch Perforine, Granzyme, IFN- γ und TNF- α (Tc1, Tc2 und Tc22), andere wirken hingegen regulierend bis hin zu tumorprotektiv (Tc17, CD8⁺FoxP3⁺) (Chaput et al., 2009, St Paul und Ohashi, 2020). Auch NK-Zellen bedienen sich beim Zerstören von Tumorzellen der Granzyme und Perforine, die Wahrnehmung ihrer Umgebung und Aktivierung wird jedoch durch eine Vielzahl an Rezeptoren gesteuert und nicht wie bei den CD8⁺ T-Zellen durch einen zentralen Rezeptor vermittelt (Guillerey et al., 2016, Rosenberg und Huang, 2018). Dies ermöglicht den NK-Zellen auch MHC-unabhängig auf Veränderungen zu reagieren (Rosenberg und Huang, 2018). CD20⁺ B-Zellen gehören zu den APZ, können T-Zellen aktivieren und als Plasmazellen Antikörper produzieren (Yuen

et al., 2016). Manche von ihnen sind in der Lage die zytotoxische Antwort der NK- und T-Zellen zu inhibieren und sogar das Tumorstadium zu fördern (ebd.). Trotz dieser festgestellten Differenzen scheint CD112R in allen diesen Leukozyten-Subgruppen und damit den verschiedenen Immunzell-Kompositionen eine Rolle zu spielen. Eine hohe Dichte CD112R⁺ Zellen war stets dem in „*inflamed*“ Immunphänotypen zugeordnet, unabhängig von der Immunzell-Komposition.

Ein weiterer Aspekt, der aus den Clusteranalysen hervorging, ist die, unabhängig von CD8 Dichte oder Immunphänotyp, herausstechende Fraktion von CD8⁺CD112R^{high} Zellen bei der Mehrheit der Krebspatienten. Dies zeigte, dass es in den untersuchten malignen Tumoren unabhängig von der generellen Immunzellinfiltration immer einen Anteil an CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen mit einer hohen Expression von CD112R gab. Bei allen neuen Erkenntnissen über spezifische CD8⁺ T-Zellsubtypen wäre es eine mögliche Annahme, dass dieser konstante, CD112R^{high} exprimierende Anteil einem bestimmten Subtyp angehört, welcher demnach immer einen Anteil der stark inhibierten Zellen in der Tumormikroumgebung ausmacht. Ob sich diese Theorie bestätigt oder sich die hohe CD112R Expression auf allen Subgruppen gleichmäßig verteilt, müssten weitere mFIHC oder hochdimensionale durchflusszytometrische Untersuchungen zeigen.

Die Grundlage für qualitativ hochwertige mFIHC Untersuchungen ist der optimale Zustand der fixierten Gewebeproben sowie der angefertigten Schnitte. Von der Beschaffenheit der Präparate einmal abgesehen, gibt es noch weitere essentielle Aspekte einer multiplex-fluoreszenz-immunhistochemischen Studie, welche über ihre Qualität entscheiden. Ein bedeutender Faktor ist die Qualität der verwendeten Antikörper. Hierbei gilt v.a. in der Multiplex-Fluoreszenz Antikörper mit hohem Signal-to-Noise-Ratio zu identifizieren. Der in Kooperation mit Dianova (Hamburg, Germany) für diese Studie entwickelte CD112R-Antikörper wurde daher vorab durch mehrere Verfahren geprüft (i.e. Western-Blot, ELISA und die Präabsorption des primären Antikörpers mit CD112R Protein). In allen Untersuchungen zeigte der CD112R-Antikörper eine zuverlässige Funktionalität und in der Analyse der Fluoreszenzfärbungen präsentierte sich ein konstant spezifisches membranöses Färbemuster. Ein weiterer wichtiger Faktor stellt die Bildanalyse der gefärbten Präparate dar. Die Verwendung des Deep Learning Algorithmus war eine Grundvoraussetzung um eine präzise und dennoch effiziente Analyse zu ermöglichen. Der anschließende Prozess beinhaltet unter anderem die Definierung eines Grenzwertes für die Positivität der einzelnen Marker. Dabei war es uns möglich, auch die schwankenden Belichtungszeiten einzelner Präparate, durch die individuelle aber standardisierten Schwellenwertfindung erfolgreich zu analysieren. Eine weitere Herausforderung der

Bildanalyse stellte die Zellsegmentierung dar. Dies lässt sich anhand der Detektion von CD112R auf Immunzellen mit vielen Zellausläufern verdeutlichen: Die t-SNE Analyse zeigte für die Subpopulation der CD68⁺ und CD11c⁺ Zellen zum größten Teil Expressionswerte im Bereich des Hintergrundes, jedoch vereinzelt wenige darüber liegende Expressionswerte. Bei der direkten Betrachtung war jedoch nie eine tatsächlich CD112R⁺ Zelle zu finden, sondern es zeigte sich, dass die langen Zellausläufer von Makrophagen und dendritischen Zellen in den mflHC Färbungen in enger räumlicher Beziehung zu Lymphozyten standen. Dies hatte zur Folge, dass ein starkes CD112R Signal der angrenzenden Zellen in einem kleinen Kollektiv der Makrophagen und dendritischen Zellen eine erhöhte Pixelintensität verursachte. Zukünftig könnten derartige Probleme mit einer Verbesserung der exakten Erkennung der Zellgrenzen von vielfältig geformten Immunzellen durch zwei Herangehensweisen behoben werden: Zum einen kann der Deep Learning Algorithmus nicht nur zur Detektion der Zellkerne genutzt werden, sondern auch für jeden Immunzelltyp individuell trainiert werden. Dies verbessert zwar die Genauigkeit im Detektieren solcher „besonderen“ Leukozyten, reduziert jedoch die Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Leukozyten-Subtypen, die derzeit alle standardisiert mit dem gleichen Algorithmus detektiert werden können. Zum Zweiten könnten eine auf APZ ausgerichtete Erweiterung der „Post-Processing-Steps“ des Deep Learning Algorithmus deren Erkennung weiter verbessern. Die kontinuierliche Verbesserung des Zellerkennungsalgorithmus sowie anderer Aspekte der Analyse sind ein grundlegender Anspruch, welcher bei jeder weiteren Auswertung berücksichtigt werden muss. Diese befanden sich jedoch zum Zeitpunkt der Analyse bereits auf einem sehr hohen Niveau.

Wir konnten in allen von uns untersuchten Tumorentitäten, Ovarial-, Blasen-, Lungen-, Kolon- und Pankreaskarzinom CD112R exprimierende Immunzellen finden. Zuvor waren diese bereits in einer durchflusszytometrischen Untersuchung in Blasen-, Mamma-, Nierenzell-, Bronchial-, Ovarial-, Prostata-, Endometrium- und Magenkarzinom sowie Tumoren des Kopf- und Halsbereichs und dem kolorektalen Karzinom nachgewiesen worden (Whelan et al., 2019). Die höchste Expression von CD112R wurde dabei in Ovarial-, Nieren-, Bronchial-, Endometrium und Mammakarzinomen auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sowie NK-Zellen detektiert, wobei NK-Zellen zusätzlich hohe Expressionswerte in Prostatakrebs aufwiesen (ebd.). In unserer Analyse stachen die serösen Ovarialkarzinome durch den höchsten Anteil an CD112R⁺ und CD112R^{high} Zellen sowie einen großen Anteil an CD8⁺CD112R^{high} Zellen hervor. Das Ovarialkarzinom ist die siebthäufigste maligne Erkrankung weltweit, wird meist erst in einem späten Stadium diagnostiziert und hat eine sehr schlechte Prognose (Zhang et al., 2019). Studien mit PD-1- oder PD-L1-Inhibitoren konnten bis jetzt nur Ansprechraten von 10-15 % erzielen und auch eine vorherige PD-L1

Bestimmung ließ einen Therapieerfolg nicht klarer voraussagen (Gonzalez-Martin und Sanchez-Lorenzo, 2019). Jedoch stellt die Infiltration durch CD8⁺ Lymphozyten sowie die PD-L1 Expression des Tumorgewebes im Ovarialkarzinom unabhängige prognostische Faktoren dar (Hamanishi et al., 2007). Diese Tatsachen unterstreichen zusätzlich die Rolle, die Immunoediting in dieser Tumorentität spielt und lassen vermuten, dass mit den bisherigen Behandlungsversuchen keine ausreichende Aufhebung der vorhandenen Inhibition erzielt werden konnte, um eine bessere Prognose zu erreichen. Dieser Umstand macht das fortgeschrittene Ovarialkarzinom zu einem vielversprechenden Ziel einer Anti-CD112R-Therapie. Dieser Erkrankung und anderen PD-L1 negativen Tumoren oder PD-1/PD-L1-Therapieversagern, welche CD112R/ CD112 exprimieren, wird ein großes Potential in der Behandlung mit CD112R-Antikörpern zugeschrieben (Whelan et al., 2019). Die Vermutung wird unterstützt durch die Tatsache, dass CD112 sowohl auf PD-L1⁺ als auch PD-L1⁻ Tumorzellen exprimiert wird und die CD112R-CD112 Interaktion demnach maßgeblich für die Inhibition der T-Zellen in PD-L1⁻ Tumoren verantwortlich sein könnte (ebd.). Die Anzahl an TIL korrelieren in vielen Tumoren mit der PD-L1-Expression (AiErken et al., 2017, Kitano et al., 2017, Yagi et al., 2019). Es gibt jedoch auch PD-L1 negative Tumore mit einer hohen Dichte von TILs und CD8⁺ T-Lymphozyten, bei denen vermutet wird, dass sie maßgeblich durch den CD112R- und/ oder TIGIT-Pfad inhibiert sein könnten (Kurozumi et al., 2019, Whelan et al., 2019). Ob eine Bestimmung der CD112 Expression von Tumorzellen, ähnlich der PD-L1-Testung, die Wahrscheinlichkeit eines Ansprechens vorauszusagen und eine Anti-CD112R Therapie sinnvoll zu steuern vermag, könnte im Rahmen der nächsten Studienphasen des ersten CD112R-Antikörpers COM701 geklärt werden.

Die jüngsten Ergebnisse der Studie mit dem ersten Anti-CD112R-Antikörper (COM701) waren vielversprechend: Von den insgesamt 28 eingeschlossenen Patienten erhielten 16 ausschließlich COM701 und 12 Patienten COM701 + Nivolumab (Sullivan et al., 2020a). Unter Monotherapie hatten 69% einen klinischen Nutzen und eine Person – mit einem primären Peritonealkarzinom – eine partielle Remission (Sullivan et al., 2020b). Im dualen Therapiearm lag die Rate des klinischen Nutzens bei 75% und es wurde bei einer Person mit einem Mikrosatelliten-stabilen Kolonkarzinom eine partielle Remission festgestellt (ebd.). Dieser Tumortyp zeichnet sich sonst durch ein geringes Ansprechen auf Therapien mit PD-1-Inhibitoren aus (Le et al., 2015, Le et al., 2017). In beiden Armen betrug die Rate an partiellen Remissionen zusammen mit stabilen Erkrankungen 57% (Sullivan et al., 2020a). Zu den am häufigsten beobachteten Nebenwirkungen im Monotherapie-Arm gehörten Fatigue (46%), Übelkeit (31%) und Angstzustände (23%). Im Kombinations-Arm waren es Anämie, Ödeme der unteren Extremitäten, Hautausschläge und Fatigue (ebd.). Nachdem diese Kombinationstherapie zu keiner dosislimitierenden Toxizität oder zu

Nebenwirkungen geführt hat, welche einen Therapieabbruch nach sich zieht, richtet sich der Fokus nun auch auf eine dreifache Blockade mit einem TIGIT-Antikörper (Sullivan et al., 2020a).

Dem gegenüber stehen die „*immune-related adverse events*“, welche bei früheren Kombinationstherapie-Ansätzen einen limitierenden Faktor dargestellt hatten. Der Anspruch dieser Kombinationstherapien ist zunächst eine Behandlungsoption für Patienten zu sein, die sich im palliativen Stadium ihrer Erkrankung befinden, weswegen mögliche Lebensqualitätseinschränkungen durch etwaige Nebenwirkungen noch stärker ins Gewicht fallen. Im September 2020 wurde bekannt gegeben, dass der erste Patient im neuen Arm der aktuellen Phase 1/2 Studie dosiert wurde, deren Ziel es ist, eine Dreifachkombination von Anti-CD112R-Antikörper (COM701, Compugen) mit einem PD-1-Inhibitor (Nivolumab, Opdivo®, Bristol Myers Squibb) und einem Anti-TIGIT-Antikörper (BMS-986207, Bristol Myers Squibb) zu bewerten (Compugen, 2020). Hier wird sich zeigen, ob eine Dreifachkombination bezüglich der irAE tolerabel ist und sich ein signifikanter Nutzen für die Patienten damit erzielen lässt. Der Behandlungsansatz aus der Kombination dieser drei Inhibitoren gründet sich auf in vitro Versuchen, welche einen additiven Effekt bei der Aktivierung von T-Zellen im Vergleich von mono, dualer und trialer Antikörperblockade von PD-1, TIGIT und CD112R zeigen konnten (Whelan et al., 2019).

Zusammenfassend konnten wir eine Hochregulation von CD112R im malignen Gewebe im Vergleich zu Normalgewebe zeigen. Dies unterstützt das Konzept, wonach es sich bei CD112R um eine vielversprechende Zielstruktur für eine Antikörperblockade zur Behandlung verschiedener maligner Tumorerkrankungen handelt. Gerade das konstant hohe Expressionsniveau von CD112R auf zytotoxischen T-Lymphozyten in allen analysierten Tumorentitäten deutet auf einen breiten Anwendungsbereich von CD112R-Immuncheckpoint-Inhibitoren hin.

5. Zusammenfassung

Die Entdeckung von Immuncheckpoints und die daraus folgende Entwicklung von Immuncheckpoint-Inhibitoren hat eine wahre Erfolgsgeschichte in der Therapie von immer mehr Tumorentitäten gezeigt. Es besteht jedoch nur limitiertes Wissen über die Ursachen der teilweise niedrigen Ansprechraten und Resistenzentwicklungen unter der Behandlung mit Immuncheckpoint-Inhibitoren. Ein vielversprechender Therapieansatz besteht in der Kombination mehreren Immuncheckpoint-Inhibitoren, sodass ein großer Fokus auf der Entdeckung und Charakterisierung weiterer Immuncheckpoints liegt. Diese Arbeit untersucht die Expression des kürzlich entdeckten inhibitorischen Immuncheckpoint CD112R auf Immunzellen im Tumormikromilieu im Vergleich zum Normalgewebe.

Unsere Studie umfasste Tumoren von 122 Patienten aus sieben unterschiedlichen Tumorentitäten sowie 17 Proben aus unterschiedlichen Normalgeweben. Es wurden multiplex-fluoreszenz-immunhistochemische Färbungen von 4mm *microenvironment*-Tissue MicroArrays (ME-TMAs) der Tumorproben sowie Großschnitten der Normalgewebe mit einem automatischen Deep Learning basierten Auswertungs-Algorithmus analysiert.

Die Expression von CD112R konnte auf CD8⁺ zytotoxischen Lymphozyten, CD4⁺ T-Helferzellen, FOXP3⁺ regulatorischen T-Zellen und auf CD56⁺ natürlichen Killerzellen, jedoch nicht auf CD11c⁺ dendritischen Zellen und CD68⁺ Makrophagen nachgewiesen werden. Alle analysierten Kompartimente aus Normalgeweben und malignen Tumoren zeigten einen kleinen Anteil von Immunzellen, welche eine besonders hohe CD112R Expression (CD112R^{high}) besaßen. Die größte Fraktion von CD112R^{high} Zellen wurde in der Subgruppe der CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen in der weißen Pulpa der Milz (52%), in den Peyer-Plaques des Ileums (44%), im Ovarialkarzinom (37%) und im Plattenepithelkarzinom der Lunge (29%) gefunden. Der durchschnittliche Anteil an CD112R^{high} exprimierenden zytotoxischen T-Zellen in malignen Tumoren war hoch variabel und reichten von 5% im Blasenkarzinom, über 13% im Pankreaskarzinom bis hin zu 37% im Ovarialkarzinom. Eine hohe Variabilität des CD112R^{high} Anteils zeigte sich zudem zwischen den Patienten derselben Tumorentität.

Zusammenfassend zeigt unsere Untersuchung eine Hochregulation der CD112R Expression auf CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen sowie CD20⁺ B-Zellen im Tumormikromilieu im Vergleich zum Normalgewebe. Innerhalb der analysierten Leukozyten wurde ein kleiner Anteil an Zellen identifiziert, der sehr hohe Level an CD112R exprimiert. Das konstante Vorkommen dieser CD112R^{high+} zytotoxischen T-Zellen in der Tumormikroumgebung, lässt annehmen, dass es sich bei CD112R um eine vielversprechende Zielstruktur für einen kombinierte Antikörperblockade zur Behandlung maligner Tumorerkrankungen handelt.

Abstract

CD112R is an inhibitory immune checkpoint receptor and a putative target for novel immune therapies, but little is known about its molecular epidemiology in healthy and diseased tissues. To study the prevalence and expression level of CD112R⁺ immune cells, we analyzed 122 samples of cancerous tissues in comparison with 17 normal tissue samples in a microenvironment tissue microarray format (4mm tissue spot diameter) and large sections. Multiplex fluorescent immunohistochemistry was used to stain various components of the tumor microenvironment and a deep learning based image analysis algorithm was applied for single cell analysis. CD112R expression was detected at variable intensity levels in CD8⁺ cytotoxic lymphocytes, CD4⁺ T helper cells, FOXP3⁺ regulatory T helper cells and in CD56⁺ natural killer cells, but no expression was seen in CD11c⁺ dendritic cells and CD68⁺ macrophages. All analyzed compartments across normal and cancerous tissues showed a small subset of immune cells with high CD112R expression. The highest fraction of cells with high CD112R expression was found in the subset of CD8⁺ cytotoxic T cells in the white pulp of the spleen (52%), in the Peyer's patches of ileum (44%), in ovarian cancer (37%) and in lung cancer (SCC) (29%). In cancerous tissues, the fraction of cytotoxic T cells with supramaximal CD112R expression was highly variable and ranged from 5% in bladder cancer to 13% in pancreatic cancer and 37% in ovarian cancer. A high variability in the number of cells with high CD112R expression was also seen between individual patients of the same tumor entity.

In summary, our analysis shows that CD112R expression is upregulated on CD8⁺, CD4⁺ T cells and CD20⁺ B cells in the cancer microenvironment compared to normal tissue. Across all analyzed Lymphocyte subsets and natural killer cells, a small fraction of cells with exceedingly high CD112R levels were identified. The widespread occurrence of CD112R⁺ cytotoxic T cells in the cancer microenvironment may suggest considerable opportunities for checkpoint inhibitors targeting CD112R.

6. Abkürzungsverzeichnis

APZ	Antigenpräsentierende Zellen
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
bzw.	beziehungsweise
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i>
DAPI	Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNAM-1	<i>DNAX Accessory Molecule-1</i> , auch CD226
ebd.	identische Quelle wie im vorherigen Satz („ebenda“)
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FoxP3	<i>Forkhead-Box-Protein P3</i>
HCC	hepatozelluläres Karzinom
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN	Interferon
irAE	<i>immune-related adverse event</i>
ITIM	<i>immunoreceptor tyrosin-based inhibitory motifs</i>
LAG-3	<i>lymphocyte activation gene 3</i>
mFIHC	multiplex-fluoreszenz-Immunhistochemie
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
mRNA	<i>messenger Ribonucleinsäure</i>
NAT	<i>normal adjacent tissue</i>
NFAT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NSCLC	<i>Non-Small Cell Lung Cancer</i> (Nichtkleinzelliges Lungenkarzinom)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PD-1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
PD-L1	<i>Programmed cell death 1 ligand 1</i>
PVR	<i>poliovirus receptor</i> , auch CD155
PVRIG	<i>Poliovirus receptor related immunoglobulin domain containing</i> , auch CD112R oder C7orf15 (Chromosom 7, <i>open reading frame 15</i>)
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay</i>
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis</i>

TACTILE	<i>T cell-activated increased late expression</i> , auch CD96
T _{CM}	<i>T central memory cells</i> (zentrale Gedächtniszellen)
T _{EM}	<i>T effector memory cells</i> (Effektor-Gedächtniszellen)
T _{EMRA}	<i>T effector memory RA cells</i> (Effektor-Gedächtnis-RA-Zellen)
TIGIT	<i>T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains</i>
TIL	Tumor-infiltrierende Lymphozyten
TIM-3	<i>T-cell immunoglobulin 3</i>
TMA	Tissue MicroArray
T _N	naive T-Zellen
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
t-SNE	<i>T-distributed stochastic neighbor embedding</i>
z.B.	zum Beispiel

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vereinfachtes Interaktionsnetzwerk von CD112R, rotes Minuszeichen indiziert einen inhibitorischen Effekt, ein grünes Plus einen stimulierenden Effekt, die gestrichelten Linien demonstrieren die bekannten Interaktionen (APZ = Antigenpräsentierende Zelle).....	10
Abbildung 2: Das Balkendiagramm zeigt den signifikanten Intensitätsunterschied zwischen den Zelllinien HELA und HELA-PVRIG. Korrespondierend darunter sind repräsentative Multiplex-Fluoreszenz-Immunhistochemie-Bilder der CD112R Expression der jeweiligen Zelllinien gezeigt.	20
Abbildung 3: Repräsentative Veranschaulichung der räumlichen Nähe verschiedener fluoreszenzgefärbter Immunzellen: Der Abstand von dem berechneten Mittelpunkt ihres Zellkerns (farbiger Punkt) zu dem Zellkern einer anderen Zelle ist als eine weiß-gestrichelte Linie eingezeichnet. Die weißen Umrisse markieren die durch Deep Learning erkannten Zellkerne. (Vergrößerung 242x, CD112R = grün, CD8 = orange, CD4 = pink, DAPI = blau)	22
Abbildung 4: Repräsentative Multiplex-Fluoreszenz-Immunhistochemie-Bilder der Ko-Expression von CD112R mit verschiedenen Leukozytenmarkern in gesundem Tonsillengewebe. Hierbei ist jeweils links die Färbung des charakterisierenden Markers gezeigt, in der Mitte die Färbung von CD112R und auf der rechten Seite die beiden Marker übereinandergelegt. (Vergrößerung 350x)	24
Abbildung 5: t-SNE der Subtypen von Leukozyten (a) in Tonsillengewebe und ihrer relativen CD112R-Expression (b). Die Achseinteilung wird in der t-SNE-Analyse willkürlich gesetzt und dient ausschließlich der Darstellung dieser reduzierten Dimension der Daten.	25
Abbildung 6: Verteilung der CD112R-Expressionsgruppen CD112R ^{high} (schwarz), CD112R ^{low} (dunkelgrau) und CD112R ^{negativ} (hellgrau) auf Immunzellen in den untersuchten Normalgeweben.....	27
Abbildung 7: t-SNE der Subtypen von Leukozyten (jeweils links) und der relativen CD112R-Expression (jeweils rechts) in verschiedenen Normalgeweben.....	28
Abbildung 8: Absolute Anzahl der Zellkontakte als Maß für den Grad der Zellinteraktion zwischen verschiedenen Immunzell-Subpopulationen im Tonsillengewebe. Die Anzahl der Interaktionen wird durch die Transparenz und den Durchmesser der verbindenden Linien indiziert, der farbige Punkt zeigt die Anzahl der Zellen der Immunzellsubgruppe.	29
Abbildung 9: t-SNE der Subtypen von verschiedenen Leukozyten-Subtypen (a) in kolorektalem Karzinom („invasive margin“ und „central tumor“) und ihrer relativen CD112R-Expression (b).....	30
Abbildung 10: Verteilung der CD112R-Expressionsgruppen CD112R ^{high} (schwarz), CD112R ^{low} (dunkelgrau) und CD112R ^{negativ} (hellgrau) auf Immunzellen in den untersuchten malignen Tumoren (NSCLC= „non-small cell lung cancer“, PE= Plattenepithel).....	31
Abbildung 11: Säulendiagramme der Fraktionen der CD112 ^{high+} und CD112R ^{low+} positiven Immunzellen in malignen Geweben (schwarz) gegenüber gesunden Tonsillen (grau).	32

Abbildung 12: Unüberwachte Clusteranalyse des relativen Anteils der CD112R ^{high} positiven Immunzellen (blau) und ihrer Dichte (rot) im Plattenepithelkarzinom der Lunge. Der Balken (rechts) verdeutlicht die Dendrogramm basierte Differenzierung des Patientenkollektivs in den „inflamed“ (dunkelgrau) und „non-inflamed“ (hellgrau) Immunphänotyp.	34
Abbildung 13: Repräsentative Darstellung der CD112R-Expression in der Multiplex-Fluoreszenz-Immunhistochemie von Plattenepithelkarzinomen der Lunge mit jeweils einem weiteren Immunzellmarker. Das erste und zweite Bild links oben zeigen Tonsillengewebe als Vergleich (Vergrößerung 10x).	35
Abbildung 14: Unüberwachte Clusteranalyse des relativen Anteils der CD112R ^{high} positiven Immunzellen (blau) und ihrer Dichte (rot) in NSCLC (Adeno). Der Balken (rechts) verdeutlicht die Dendrogramm basierte Differenzierung des Patientenkollektivs in den „inflamed“ (dunkelgrau) und „non-inflamed“ (hellgrau) Immunphänotyp.	36
Abbildung 15: Unüberwachte Clusteranalyse des relativen Anteils der CD112R ^{high} positiven Immunzellen (blau) und ihrer Dichte (rot) in Pankreaskarzinomen. Der Balken (rechts) verdeutlicht die Dendrogramm basierte Differenzierung des Patientenkollektivs in den „inflamed“ (dunkelgrau) und „non-inflamed“ (hellgrau) Immunphänotyp.	37
Abbildung 16: Unüberwachte Clusteranalyse des relativen Anteils der CD112R ^{high} positiven Immunzellen (blau) und ihrer Dichte (rot) in Blasenkarzinomen. Der Balken (rechts) verdeutlicht die Dendrogramm basierte Differenzierung des Patientenkollektivs in den „inflamed“ (dunkelgrau) und „non-inflamed“ (hellgrau) Immunphänotyp.	38
Abbildung 17: Unüberwachte Clusteranalyse des relativen Anteils der CD112R ^{high} positiven Immunzellen (blau) und ihrer Dichte (rot) in Ovarialkarzinomen. Der Balken (rechts) verdeutlicht die Dendrogramm basierte Differenzierung des Patientenkollektivs in den „inflamed“ (dunkelgrau) und „non-inflamed“ (hellgrau) Immunphänotyp.	39
Abbildung 18: Gegenüberstellung der unüberwachten Clusteranalysen der untersuchten malignen Tumoren (Abb. 12, 14-17).	40
Abbildung 19: Korrelations-Clusteranalyse der Zelldichte-[Zellen/mm ²] verschiedener CD112R exprimierender Immunzellen der analysierter ME-TMA-Tumorentitäten („PAN-Cancer“, n = 121). Die Kolorierung und die Größe der Kreise repräsentieren das Maß der Korrelation anhand des Spearman-Korrelationskoeffizienten ρ (rho, dunkelrot $\rho = -1$, weiß $\rho = 0$, dunkelblau $\rho = 1$) welcher im unteren Dreieck abzulesen ist. Korrelationen, welche einen p-Wert > 0,001 zeigten, sind mit einem X markiert, bzw. nicht angegeben.	41
Abbildung 20: Absolute Anzahl der Zellkontakte als Maß für den Grad der Zellinteraktion zwischen verschiedenen Immunzell-Subpopulationen in Kolonkarzinomgewebe. Die Dicke, Intensität und Transparenz der Grautöne repräsentieren die Anzahl der Zellkontakte. Die Größe des farbigen Punktes visualisiert die Anzahl der gemessenen Zellen der jeweiligen Immunzell-Subpopulation.	42

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Die benutzten Antikörper, der pH-Wert der Epitop-Demaskierungen und die zugehörigen Opal-Fluochrome (*Die Antikörper wurden in abwechselnden Reihenfolgen und Kombinationen mit unterschiedlichen Opalen gefärbt, da für die Interaktionsanalyse jede mögliche Markerkombination einmal zusammen auf einem Schnitt gefärbt werden musste).....	16
Tabelle 2: Vergleich Fraktionen der CD112 ^{high} und CD112R ^{low} positiven Immunzellen in malignen Geweben gegenüber gesunden Tonsillen.	33

9. Literaturverzeichnis

- AIERKEN, N., SHI, H. J., ZHOU, Y., SHAO, N., ZHANG, J., SHI, Y., YUAN, Z. Y. & LIN, Y. 2017. High PD-L1 Expression Is Closely Associated With Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Leads to Good Clinical Outcomes in Chinese Triple Negative Breast Cancer Patients. *Int J Biol Sci*, 13, 1172-1179.
- AKOYA BIOSCIENCES, I., USA 2018. Phenoptics Research Solutions - Opal Multiplex IHC Assay Development Guide. 19:30 Uhr ed.
- ANDERSON, A. C., JOLLER, N. & KUCHROO, V. K. 2016. Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation. *Immunity*, 44, 989-1004.
- ARAN, D., CAMARDA, R., ODEGAARD, J., PAIK, H., OSKOTSKY, B., KRINGS, G., GOGA, A., SIROTA, M. & BUTTE, A. J. 2017. Comprehensive analysis of normal adjacent to tumor transcriptomes. *Nat Commun*, 8, 1077.
- ARORA, S., VELICHINSKII, R., LESH, R. W., ALI, U., KUBIAK, M., BANSAL, P., BORGHAEI, H., EDELMAN, M. J. & BOUMBER, Y. 2019. Existing and Emerging Biomarkers for Immune Checkpoint Immunotherapy in Solid Tumors. *Adv Ther*, 36, 2638-2678.
- BEATTY, G. L. & GLADNEY, W. L. 2015. Immune escape mechanisms as a guide for cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res*, 21, 687-92.
- BILLADEAU, D. D. & LEIBSON, P. J. 2002. ITAMs versus ITIMs: striking a balance during cell regulation. *J Clin Invest*, 109, 161-8.
- BISWAS, S. K. & MANTOVANI, A. 2010. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol*, 11, 889-96.
- BLACKBURN, S. D., SHIN, H., HAINING, W. N., ZOU, T., WORKMAN, C. J., POLLEY, A., BETTS, M. R., FREEMAN, G. J., VIGNALI, D. A. & WHERRY, E. J. 2009. Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol*, 10, 29-37.
- BLESSIN, N. C., ... & CLAUDITZ, T. 2020. Prevalence of proliferating CD8+ cells in normal lymphatic tissues, inflammation and cancer. *Frontiers Oncology (under Review)*.
- BLESSIN, N. C., SIMON, R., KLUTH, M., FISCHER, K., HUBE-MAGG, C., LI, W., MAKRYPIDI-FRAUNE, G., WELLGE, B., MANDELKOW, T., DEBATIN, N. F., HOFLMAYER, D., LENNARTZ, M., SAUTER, G., IZBICKI, J. R., MINNER, S., BUSCHECK, F., UHLIG, R., DUM, D., KRECH, T., LUEBKE, A. M., WITTMER, C., JACOBSEN, F., BURANDT, E. C., STEURER, S., WILCZAK, W. & HINSCH, A. 2019. Patterns of TIGIT Expression in Lymphatic Tissue, Inflammation, and Cancer. *Dis Markers*, 2019, 5160565.
- BOS, R. & SHERMAN, L. A. 2010. CD4+ T-cell help in the tumor milieu is required for recruitment and cytolytic function of CD8+ T lymphocytes. *Cancer Res*, 70, 8368-77.
- BRAHMER, J., RECKAMP, K. L., BAAS, P., CRINO, L., EBERHARDT, W. E., PODDUBSKAYA, E., ANTONIA, S., PLUZANSKI, A., VOKES, E. E., HOLGADO, E., WATERHOUSE, D., READY, N., GAINOR, J., AREN FRONTERA, O., HAVEL, L., STEINS, M., GARASSINO, M. C., AERTS, J. G., DOMINE, M., PAZ-ARES, L., RECK, M., BAUDELET, C., HARBISON, C. T., LESTINI, B. & SPIGEL, D. R. 2015. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*, 373, 123-35.

- BUCHBINDER, E. I. & DESAI, A. 2016. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am J Clin Oncol*, 39, 98-106.
- BUGGERT, M., TAURIAINEN, J., YAMAMOTO, T., FREDERIKSEN, J., IVARSSON, M. A., MICHAELSSON, J., LUND, O., HEJDEMAN, B., JANSSON, M., SONNERBORG, A., KOUP, R. A., BETTS, M. R. & KARLSSON, A. C. 2014. T-bet and Eomes are differentially linked to the exhausted phenotype of CD8+ T cells in HIV infection. *PLoS Pathog*, 10, e1004251.
- BURNET, F. M. 1970. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res*, 13, 1-27.
- BUSCH, W. 1868. Aus der Sitzung der medicinischen Section vom 13. November 1867. *Berliner Klinische Wochenschrift*, 5?, 137-138.
- CHAPUT, N., LOUAFI, S., BARDIER, A., CHARLOTTE, F., VAILLANT, J. C., MENEGAUX, F., ROSENZWAJG, M., LEMOINE, F., KLATZMANN, D. & TAIEB, J. 2009. Identification of CD8+CD25+Foxp3+ suppressive T cells in colorectal cancer tissue. *Gut*, 58, 520-9.
- CHEN, D. S. & MELLMAN, I. 2017. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature*, 541, 321-330.
- COGDILL, A. P., ANDREWS, M. C. & WARGO, J. A. 2017. Hallmarks of response to immune checkpoint blockade. *Br J Cancer*, 117, 1-7.
- COLE, M. P., JONES, C. T. & TODD, I. D. 1971. A new anti-oestrogenic agent in late breast cancer. An early clinical appraisal of ICI46474. *Br J Cancer*, 25, 270-5.
- COLEY, W. 1893. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. *The American Journal of the Medical Sciences*, 105, 487-511.
- COMPUGEN. COM701/PVRIG - Status: Phase 1 study [Online]. Available: <https://www.cgen.com/pipeline/immuno-oncology/cgen-15029pvrig/> [Accessed 28.09.2020, 10:00 2020].
- COMPUGEN 2020. Compugen Doses First Patient in Phase 1/2 Triple Combination Study of COM701 with Bristol Myers Squibb's Opdivo® and Anti-TIGIT Antibody. *Study accelerates evaluation of Compugen's DNAM axis hypothesis and biomarker strategy*.
- DEUTSCHE KREBSGESELLSCHAFT, D. K., AWMF 2020. Leitlinienprogramm Onkologie: S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms, Langversion 2.0, AWMF-Registrierungsnummer 032/038OL. 23.06.2020, 17:30 Uhr ed.
- DUNN, G. P., BRUCE, A. T., IKEDA, H., OLD, L. J. & SCHREIBER, R. D. 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*, 3, 991-8.
- EDIN, S., KAPRIO, T., HAGSTROM, J., LARSSON, P., MUSTONEN, H., BOCKELMAN, C., STRIGARD, K., GUNNARSSON, U., HAGLUND, C. & PALMQVIST, R. 2019. The Prognostic Importance of CD20(+) B lymphocytes in Colorectal Cancer and the Relation to Other Immune Cell subsets. *Sci Rep*, 9, 19997.
- FARIA, A. M. & WEINER, H. L. 2005. Oral tolerance. *Immunol Rev*, 206, 232-59.
- FEHLEISEN, F. 1882. Ueber die Züchtung der Erysipelkokken auf künstlichem Nährboden und ihre Uebertragbarkeit auf den Menschen. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 8, 553-554.

- FIFE, B. T. & BLUESTONE, J. A. 2008. Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunol Rev*, 224, 166-82.
- GATTI, R. A. & GOOD, R. A. 1971. Occurrence of malignancy in immunodeficiency diseases. A literature review. *Cancer*, 28, 89-98.
- GHATALIA, P. & PLIMACK, E. 2019. Biomarkers for neoadjuvant checkpoint blockade response in urothelial cancer. *Nat Med*, 25, 1650-1651.
- GOLOMB, H. M., JACOBS, A., FEFER, A., OZER, H., THOMPSON, J., PORTLOCK, C., RATAIN, M., GOLDE, D., VARDIMAN, J., BURKE, J. S. & ET AL. 1986. Alpha-2 interferon therapy of hairy-cell leukemia: a multicenter study of 64 patients. *J Clin Oncol*, 4, 900-5.
- GONZALEZ-MARTIN, A. & SANCHEZ-LORENZO, L. 2019. Immunotherapy with checkpoint inhibitors in patients with ovarian cancer: Still promising? *Cancer*, 125 Suppl 24, 4616-4622.
- GRANT, R. M., MACKIE, R., COCHRAN, A. J., MURRAY, E. L., HOYLE, D. & ROSS, C. 1974. Results of administering B.C.G. to patients with melanoma. *Lancet*, 2, 1096-100.
- GUILLEREY, C., HUNTINGTON, N. D. & SMYTH, M. J. 2016. Targeting natural killer cells in cancer immunotherapy. *Nat Immunol*, 17, 1025-36.
- HAMANISHI, J., MANDAI, M., IWASAKI, M., OKAZAKI, T., TANAKA, Y., YAMAGUCHI, K., HIGUCHI, T., YAGI, H., TAKAKURA, K., MINATO, N., HONJO, T. & FUJII, S. 2007. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 3360-5.
- HEGDE, P. S., KARANIKAS, V. & EVERS, S. 2016. The Where, the When, and the How of Immune Monitoring for Cancer Immunotherapies in the Era of Checkpoint Inhibition. *Clin Cancer Res*, 22, 1865-74.
- HERBST, R. S., SORIA, J. C., KOWANETZ, M., FINE, G. D., HAMID, O., GORDON, M. S., SOSMAN, J. A., MCDERMOTT, D. F., POWDERLY, J. D., GETTINGER, S. N., KOHRT, H. E., HORN, L., LAWRENCE, D. P., ROST, S., LEABMAN, M., XIAO, Y., MOKATRIN, A., KOEPPEN, H., HEGDE, P. S., MELLMAN, I., CHEN, D. S. & HODI, F. S. 2014. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature*, 515, 563-7.
- HODI, F. S., CHESNEY, J., PAVLICK, A. C., ROBERT, C., GROSSMANN, K. F., MCDERMOTT, D. F., LINETTE, G. P., MEYER, N., GIGUERE, J. K., AGARWALA, S. S., SHAHEEN, M., ERNSTOFF, M. S., MINOR, D. R., SALAMA, A. K., TAYLOR, M. H., OTT, P. A., HORAK, C., GAGNIER, P., JIANG, J., WOLCHOK, J. D. & POSTOW, M. A. 2016. Combined nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab alone in patients with advanced melanoma: 2-year overall survival outcomes in a multicentre, randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol*, 17, 1558-1568.
- HODI, F. S., O'DAY, S. J., MCDERMOTT, D. F., WEBER, R. W., SOSMAN, J. A., HAANEN, J. B., GONZALEZ, R., ROBERT, C., SCHADENDORF, D., HASSEL, J. C., AKERLEY, W., VAN DEN EERTWEGH, A. J., LUTZKY, J., LORIGAN, P., VAUBEL, J. M., LINETTE, G. P., HOGG, D., OTTENSMEIER, C. H., LEBBE, C., PESCHEL, C., QUIRT, I., CLARK, J. I., WOLCHOK, J. D., WEBER, J. S., TIAN, J., YELLIN, M. J., NICHOL, G. M., HOOS, A. & URBA, W. J. 2010. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*, 363, 711-23.

- IKEDA, N., TOIDA, I., IWASAKI, A., KAWAI, K. & AKAZA, H. 2002. Surface antigen expression on bladder tumor cells induced by bacillus Calmette-Guerin (BCG): A role of BCG internalization into tumor cells. *Int J Urol*, 9, 29-35.
- IWAI, Y., ISHIDA, M., TANAKA, Y., OKAZAKI, T., HONJO, T. & MINATO, N. 2002. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 12293-7.
- JOOSSE, M. E., NEDERLOF, I., WALKER, L. S. K. & SAMSOM, J. N. 2019. Tipping the balance: inhibitory checkpoints in intestinal homeostasis. *Mucosal Immunol*, 12, 21-35.
- KANDALAF, L. E., ODUNSI, K. & COUKOS, G. 2020. Immune Therapy Opportunities in Ovarian Cancer. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, 40, 1-13.
- KEIR, M. E., BUTTE, M. J., FREEMAN, G. J. & SHARPE, A. H. 2008. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*, 26, 677-704.
- KIM, H. S. & SEO, H. K. 2018. Immune checkpoint inhibitors for urothelial carcinoma. *Investig Clin Urol*, 59, 285-296.
- KITANO, A., ONO, M., YOSHIDA, M., NOGUCHI, E., SHIMOMURA, A., SHIMOI, T., KODAIRA, M., YUNOKAWA, M., YONEMORI, K., SHIMIZU, C., KINOSHITA, T., FUJIWARA, Y., TSUDA, H. & TAMURA, K. 2017. Tumour-infiltrating lymphocytes are correlated with higher expression levels of PD-1 and PD-L1 in early breast cancer. *ESMO Open*, 2, e000150.
- KONONEN, J., BUBENDORF, L., KALLIONIEMI, A., BARLUND, M., SCHRAML, P., LEIGHTON, S., TORHORST, J., MIHATSCH, M. J., SAUTER, G. & KALLIONIEMI, O. P. 1998. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*, 4, 844-7.
- KUROZUMI, S., INOUE, K., MATSUMOTO, H., FUJII, T., HORIGUCHI, J., OYAMA, T., KUROSUMI, M. & SHIRABE, K. 2019. Clinicopathological values of PD-L1 expression in HER2-positive breast cancer. *Sci Rep*, 9, 16662.
- LARKIN, J., CHIARION-SILENI, V., GONZALEZ, R., GROB, J. J., COWEY, C. L., LAO, C. D., SCHADENDORF, D., DUMMER, R., SMYLIE, M., RUTKOWSKI, P., FERRUCCI, P. F., HILL, A., WAGSTAFF, J., CARLINO, M. S., HAANEN, J. B., MAIO, M., MARQUEZ-RODAS, I., MCARTHUR, G. A., ASCIERTO, P. A., LONG, G. V., CALLAHAN, M. K., POSTOW, M. A., GROSSMANN, K., SZNOL, M., DRENO, B., BASTHOLT, L., YANG, A., ROLLIN, L. M., HORAK, C., HODI, F. S. & WOLCHOK, J. D. 2015. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med*, 373, 23-34.
- LARKIN, J., CHIARION-SILENI, V., GONZALEZ, R., GROB, J. J., RUTKOWSKI, P., LAO, C. D., COWEY, C. L., SCHADENDORF, D., WAGSTAFF, J., DUMMER, R., FERRUCCI, P. F., SMYLIE, M., HOGG, D., HILL, A., MARQUEZ-RODAS, I., HAANEN, J., GUIDOBONI, M., MAIO, M., SCHOFFSKI, P., CARLINO, M. S., LEBBE, C., MCARTHUR, G., ASCIERTO, P. A., DANIELS, G. A., LONG, G. V., BASTHOLT, L., RIZZO, J. I., BALOGH, A., MOSHYK, A., HODI, F. S. & WOLCHOK, J. D. 2019. Five-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med*, 381, 1535-1546.
- LE, D. T., DURHAM, J. N., SMITH, K. N., WANG, H., BARTLETT, B. R., AULAKH, L. K., LU, S., KEMBERLING, H., WILT, C., LUBER, B. S., WONG, F., AZAD, N. S., RUCKI, A. A., LAHERU, D., DONEHOWER, R., ZAHEER, A.,

- FISHER, G. A., CROCENZI, T. S., LEE, J. J., GRETEN, T. F., DUFFY, A. G., CIOMBOR, K. K., EYRING, A. D., LAM, B. H., JOE, A., KANG, S. P., HOLDHOFF, M., DANILOVA, L., COPE, L., MEYER, C., ZHOU, S., GOLDBERG, R. M., ARMSTRONG, D. K., BEVER, K. M., FADER, A. N., TAUBE, J., HOUSSEAU, F., SPETZLER, D., XIAO, N., PARDOLL, D. M., PAPADOPOULOS, N., KINZLER, K. W., ESHLEMAN, J. R., VOGELSTEIN, B., ANDERS, R. A. & DIAZ, L. A., JR. 2017. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science*, 357, 409-413.
- LE, D. T., URAM, J. N., WANG, H., BARTLETT, B. R., KEMBERLING, H., EYRING, A. D., SKORA, A. D., LUBER, B. S., AZAD, N. S., LAHERU, D., BIEDRZYCKI, B., DONEHOWER, R. C., ZAHEER, A., FISHER, G. A., CROCENZI, T. S., LEE, J. J., DUFFY, S. M., GOLDBERG, R. M., DE LA CHAPELLE, A., KOSHIJI, M., BHAIJEE, F., HUEBNER, T., HRUBAN, R. H., WOOD, L. D., CUKA, N., PARDOLL, D. M., PAPADOPOULOS, N., KINZLER, K. W., ZHOU, S., CORNISH, T. C., TAUBE, J. M., ANDERS, R. A., ESHLEMAN, J. R., VOGELSTEIN, B. & DIAZ, L. A., JR. 2015. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med*, 372, 2509-20.
- LI, J., HE, Y., HAO, J., NI, L. & DONG, C. 2018. High Levels of Eomes Promote Exhaustion of Anti-tumor CD8(+) T Cells. *Front Immunol*, 9, 2981.
- LU, J., LI, Q., WU, Z., ZHONG, Z., JI, P., LI, H., HE, C., FENG, J. & ZHANG, J. 2020. Two gene set variation indexes as potential diagnostic tool for sepsis. *Am J Transl Res*, 12, 2749-2759.
- MA, J., SUN, D., WANG, J., HAN, C., QIAN, Y., CHEN, G., LI, X., ZHANG, J., CUI, P., DU, W., WU, Z., CHEN, S., ZHENG, X., YUE, Z., SONG, J., GAO, C., CAI, S. & HU, Y. 2020. Immune checkpoint inhibitors combined with chemotherapy for the treatment of advanced pancreatic cancer patients. *Cancer Immunol Immunother*, 69, 365-372.
- MACIAN, F. 2005. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol*, 5, 472-84.
- MAHONEY, K. M., RENNERT, P. D. & FREEMAN, G. J. 2015. Combination cancer immunotherapy and new immunomodulatory targets. *Nat Rev Drug Discov*, 14, 561-84.
- MANSH, M. 2011. Ipilimumab and cancer immunotherapy: a new hope for advanced stage melanoma. *Yale J Biol Med*, 84, 381-9.
- MARTINET, L. & SMYTH, M. J. 2015. Balancing natural killer cell activation through paired receptors. *Nat Rev Immunol*, 15, 243-54.
- MARTINS, F., SOFIYA, L., SYKIOTIS, G. P., LAMINE, F., MAILLARD, M., FRAGA, M., SHABAFROUZ, K., RIBI, C., CAIROLI, A., GUEX-CROSIER, Y., KUNTZER, T., MICHIELIN, O., PETERS, S., COUKOS, G., SPERTINI, F., THOMPSON, J. A. & OBEID, M. 2019. Adverse effects of immune-checkpoint inhibitors: epidemiology, management and surveillance. *Nat Rev Clin Oncol*, 16, 563-580.
- MARUYA, M., KAWAMOTO, S., KATO, L. M. & FAGARASAN, S. 2013. Impaired selection of IgA and intestinal dysbiosis associated with PD-1-deficiency. *Gut Microbes*, 4, 165-71.
- MELLMAN, I., COUKOS, G. & DRANOFF, G. 2011. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*, 480, 480-9.
- MICHOT, J. M., BIGENWALD, C., CHAMPIAT, S., COLLINS, M., CARBONNEL, F., POSTEL-VINAY, S., BERDELOU, A., VARGA, A., BAHLEDA, R., HOLLEBECQUE, A., MASSARD, C., FUEREA, A., RIBRAG, V., GAZZAH,

- A., ARMAND, J. P., AMELLAL, N., ANGEVIN, E., NOEL, N., BOUTROS, C., MATEUS, C., ROBERT, C., SORIA, J. C., MARABELLE, A. & LAMBOTTE, O. 2016. Immune-related adverse events with immune checkpoint blockade: a comprehensive review. *Eur J Cancer*, 54, 139-148.
- MIGDEN, M. R., RISCHIN, D., SCHMULTS, C. D., GUMINSKI, A., HAUSCHILD, A., LEWIS, K. D., CHUNG, C. H., HERNANDEZ-AYA, L., LIM, A. M., CHANG, A. L. S., RABINOWITS, G., THAI, A. A., DUNN, L. A., HUGHES, B. G. M., KHUSHALANI, N. I., MODI, B., SCHADENDORF, D., GAO, B., SEEBACH, F., LI, S., LI, J., MATHIAS, M., BOOTH, J., MOHAN, K., STANKEVICH, E., BABIKER, H. M., BRANA, I., GIL-MARTIN, M., HOMSI, J., JOHNSON, M. L., MORENO, V., NIU, J., OWONIKOKO, T. K., PAPAPOPOULOS, K. P., YANCOPOULOS, G. D., LOWY, I. & FURY, M. G. 2018. PD-1 Blockade with Cemiplimab in Advanced Cutaneous Squamous-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*, 379, 341-351.
- MORALES, A., EIDINGER, D. & BRUCE, A. W. 1976. Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. *J Urol*, 116, 180-3.
- MOWAT, A. M. 2003. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol*, 3, 331-41.
- MURTER, B., PAN, X., OPHIR, E., ALTEBER, Z., AZULAY, M., SEN, R., LEVY, O., DASSA, L., VAKNIN, I., FRIDMAN-KFIR, T., SALOMON, R., RAVET, A., TAM, A., LEVIN, D., VAKNIN, Y., TATIROVSKY, E., MACHLENKIN, A., PARDOLL, D. & GANGULY, S. 2019. Mouse PVRIG Has CD8(+) T Cell-Specific Coinhibitory Functions and Dampens Antitumor Immunity. *Cancer Immunol Res*, 7, 244-256.
- NEARCHOU, I. P., GWYTHYER, B. M., GEORGIAKAKIS, E. C. T., GAVRIEL, C. G., LILLARD, K., KAJIWARA, Y., UENO, H., HARRISON, D. J. & CAIE, P. D. 2020. Spatial immune profiling of the colorectal tumor microenvironment predicts good outcome in stage II patients. *NPJ Digit Med*, 3, 71.
- NEARCHOU, I. P., LILLARD, K., GAVRIEL, C. G., UENO, H., HARRISON, D. J. & CAIE, P. D. 2019. Automated Analysis of Lymphocytic Infiltration, Tumor Budding, and Their Spatial Relationship Improves Prognostic Accuracy in Colorectal Cancer. *Cancer Immunol Res*, 7, 609-620.
- NISHIMURA, H., NOSE, M., HIAI, H., MINATO, N. & HONJO, T. 1999. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity*, 11, 141-51.
- PARDOLL, D. & DRAKE, C. 2012. Immunotherapy earns its spot in the ranks of cancer therapy. *J Exp Med*, 209, 201-9.
- PARDOLL, D. M. 2012. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*, 12, 252-64.
- PENN, I. & STARZL, T. E. 1972. Malignant tumors arising de novo in immunosuppressed organ transplant recipients. *Transplantation*, 14, 407-17.
- PEREZ-GARCIA, A., OSCA, G., BOSCH-VIZCAYA, A., KELLEHER, N., SANTOS, N. Y., RODRIGUEZ, R., GONZALEZ, Y., RONCERO, J. M., COLL, R., SERRANDO, M., LLOVERAS, N., TUSET, E. & GALLARDO, D. 2013. Kinetics of the CTLA-4 isoforms expression after T-lymphocyte activation and role of the promoter polymorphisms on CTLA-4 gene transcription. *Hum Immunol*, 74, 1219-24.

- PFANNSTIEL, C., STRISSEL, P. L., CHIAPPINELLI, K. B., SIKIC, D., WACH, S., WIRTZ, R. M., WULLWEBER, A., TAUBERT, H., BREYER, J., OTTO, W., WORST, T., BURGER, M., WULLICH, B., BOLENZ, C., FUHRICH, N., GEPPERT, C. I., WEYERER, V., STOEHR, R., BERTZ, S., KECK, B., ERLMEIER, F., ERBEN, P., HARTMANN, A., STRICK, R., ECKSTEIN, M., BRIDGE CONSORTIUM, G., BRIDGE CONSORTIUM, G., BRIDGE CONSORTIUM, G. & BRIDGE CONSORTIUM, G. 2019. The Tumor Immune Microenvironment Drives a Prognostic Relevance That Correlates with Bladder Cancer Subtypes. *Cancer Immunol Res*, 7, 923-938.
- POSTOW, M. A., CHESNEY, J., PAVLICK, A. C., ROBERT, C., GROSSMANN, K., MCDERMOTT, D., LINETTE, G. P., MEYER, N., GIGUERE, J. K., AGARWALA, S. S., SHAHEEN, M., ERNSTOFF, M. S., MINOR, D., SALAMA, A. K., TAYLOR, M., OTT, P. A., ROLLIN, L. M., HORAK, C., GAGNIER, P., WOLCHOK, J. D. & HODI, F. S. 2015. Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma. *N Engl J Med*, 372, 2006-17.
- POSTOW, M. A., SIDLOW, R. & HELLMANN, M. D. 2018. Immune-Related Adverse Events Associated with Immune Checkpoint Blockade. *N Engl J Med*, 378, 158-168.
- QIAO, G. J., CHEN, L., WU, J. C. & LI, Z. R. 2019. Identification of an eight-gene signature for survival prediction for patients with hepatocellular carcinoma based on integrated bioinformatics analysis. *PeerJ*, 7, e6548.
- QUESADA, J. R., REUBEN, J., MANNING, J. T., HERSH, E. M. & GUTTERMAN, J. U. 1984. Alpha interferon for induction of remission in hairy-cell leukemia. *N Engl J Med*, 310, 15-8.
- REDELMAN-SIDI, G., GLICKMAN, M. S. & BOCHNER, B. H. 2014. The mechanism of action of BCG therapy for bladder cancer--a current perspective. *Nat Rev Urol*, 11, 153-62.
- RIBAS, A., PUZANOV, I., DUMMER, R., SCHADENDORF, D., HAMID, O., ROBERT, C., HODI, F. S., SCHACHTER, J., PAVLICK, A. C., LEWIS, K. D., CRANMER, L. D., BLANK, C. U., O'DAY, S. J., ASCIERTO, P. A., SALAMA, A. K., MARGOLIN, K. A., LOQUAI, C., EIGENTLER, T. K., GANGADHAR, T. C., CARLINO, M. S., AGARWALA, S. S., MOSCHOS, S. J., SOSMAN, J. A., GOLDINGER, S. M., SHAPIRA-FROMMER, R., GONZALEZ, R., KIRKWOOD, J. M., WOLCHOK, J. D., EGGERMONT, A., LI, X. N., ZHOU, W., ZERNHELT, A. M., LIS, J., EBBINGHAUS, S., KANG, S. P. & DAUD, A. 2015. Pembrolizumab versus investigator-choice chemotherapy for ipilimumab-refractory melanoma (KEYNOTE-002): a randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol*, 16, 908-18.
- ROBERT, C., SCHACHTER, J., LONG, G. V., ARANCE, A., GROB, J. J., MORTIER, L., DAUD, A., CARLINO, M. S., MCNEIL, C., LOTEM, M., LARKIN, J., LORIGAN, P., NEYNS, B., BLANK, C. U., HAMID, O., MATEUS, C., SHAPIRA-FROMMER, R., KOSH, M., ZHOU, H., IBRAHIM, N., EBBINGHAUS, S., RIBAS, A. & INVESTIGATORS, K.-. 2015. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med*, 372, 2521-32.
- RONNEBERGER, O., FISCHER, P. & BROX, T. U-Net: Convolutional Networks for Biomedical Image Segmentation. 2015 Cham. Springer International Publishing, 234-241.

- ROSENBERG, J. & HUANG, J. 2018. CD8(+) T Cells and NK Cells: Parallel and Complementary Soldiers of Immunotherapy. *Curr Opin Chem Eng*, 19, 9-20.
- ROSENBERG, S. A., LOTZE, M. T., MUUL, L. M., LEITMAN, S., CHANG, A. E., ETTINGHAUSEN, S. E., MATORY, Y. L., SKIBBER, J. M., SHILONI, E., VETTO, J. T. & ET AL. 1985. Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med*, 313, 1485-92.
- ROSENBERG, S. A., YANG, J. C., TOPALIAN, S. L., SCHWARTZENTRUBER, D. J., WEBER, J. S., PARKINSON, D. R., SEIPP, C. A., EINHORN, J. H. & WHITE, D. E. 1994. Treatment of 283 consecutive patients with metastatic melanoma or renal cell cancer using high-dose bolus interleukin 2. *JAMA*, 271, 907-13.
- SADA-OVALLE, I., TALAYERO, A., CHAVEZ-GALAN, L., BARRERA, L., CASTORENA-MALDONADO, A., SODA-MERHY, A. & TORRE-BOUSCOULET, L. 2012. Functionality of CD4+ and CD8+ T cells from tonsillar tissue. *Clin Exp Immunol*, 168, 200-6.
- SANCHEZ-CORREA, B., VALHONDO, I., HASSOUNEH, F., LOPEZ-SEJAS, N., PERA, A., BERGUA, J. M., ARCOS, M. J., BANAS, H., CASAS-AVILES, I., DURAN, E., ALONSO, C., SOLANA, R. & TARAZONA, R. 2019. DNAM-1 and the TIGIT/PVRIG/TACTILE Axis: Novel Immune Checkpoints for Natural Killer Cell-Based Cancer Immunotherapy. *Cancers (Basel)*, 11.
- SATHALIYAWALA, T., KUBOTA, M., YUDANIN, N., TURNER, D., CAMP, P., THOME, J. J., BICKHAM, K. L., LERNER, H., GOLDSTEIN, M., SYKES, M., KATO, T. & FARBER, D. L. 2013. Distribution and compartmentalization of human circulating and tissue-resident memory T cell subsets. *Immunity*, 38, 187-97.
- SAUCE, D., ALMEIDA, J. R., LARSEN, M., HARO, L., AUTRAN, B., FREEMAN, G. J. & APPAY, V. 2007. PD-1 expression on human CD8 T cells depends on both state of differentiation and activation status. *AIDS*, 21, 2005-13.
- SAUTER, G., SIMON, R. & HILLAN, K. 2003. Tissue microarrays in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 2, 962-72.
- SCHACHTER, J., RIBAS, A., LONG, G. V., ARANCE, A., GROB, J. J., MORTIER, L., DAUD, A., CARLINO, M. S., MCNEIL, C., LOTEM, M., LARKIN, J., LORIGAN, P., NEYNS, B., BLANK, C., PETRELLA, T. M., HAMID, O., ZHOU, H., EBBINGHAUS, S., IBRAHIM, N. & ROBERT, C. 2017. Pembrolizumab versus ipilimumab for advanced melanoma: final overall survival results of a multicentre, randomised, open-label phase 3 study (KEYNOTE-006). *Lancet*, 390, 1853-1862.
- SCHULZE, A. B., EVERS, G., GORLICH, D., MOHR, M., MARRA, A., HILLEJAN, L., REHKAMPER, J., SCHMIDT, L. H. & HEITKOTTER, B. 2020. Tumor infiltrating T cells influence prognosis in stage I-III non-small cell lung cancer. *J Thorac Dis*, 12, 1824-1842.
- SEN, D. R., KAMINSKI, J., BARNITZ, R. A., KURACHI, M., GERDEMANN, U., YATES, K. B., TSAO, H. W., GODEC, J., LAFLEUR, M. W., BROWN, F. D., TONNERRE, P., CHUNG, R. T., TULLY, D. C., ALLEN, T. M., FRAHM, N., LAUER, G. M., WHERRY, E. J., YOSEF, N. & HAINING, W. N. 2016. The epigenetic landscape of T cell exhaustion. *Science*, 354, 1165-1169.
- SEO, J. S., KIM, A., SHIN, J. Y. & KIM, Y. T. 2018. Comprehensive analysis of the tumor immune micro-environment in non-small cell lung cancer for efficacy of checkpoint inhibitor. *Sci Rep*, 8, 14576.

- SIMPSON, T. R., LI, F., MONTALVO-ORTIZ, W., SEPULVEDA, M. A., BERGERHOFF, K., ARCE, F., RODDIE, C., HENRY, J. Y., YAGITA, H., WOLCHOK, J. D., PEGGS, K. S., RAVETCH, J. V., ALLISON, J. P. & QUEZADA, S. A. 2013. Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma. *J Exp Med*, 210, 1695-710.
- SLEIJFER, S., BANNINK, M., VAN GOOL, A. R., KRUIT, W. H. & STOTER, G. 2005. Side effects of interferon-alpha therapy. *Pharm World Sci*, 27, 423-31.
- SMITH, K. A. 1988. Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science*, 240, 1169-76.
- ST PAUL, M. & OHASHI, P. S. 2020. The Roles of CD8(+) T Cell Subsets in Antitumor Immunity. *Trends Cell Biol*, 30, 695-704.
- STAMM, H., WELLBROCK, J. & FIEDLER, W. 2018. Interaction of PVR/PVRL2 with TIGIT/DNAM-1 as a novel immune checkpoint axis and therapeutic target in cancer. *Mamm Genome*, 29, 694-702.
- SULLIVAN, R., RASCO, D., LIM, E., SHARMA, M., SHEPARD, D., PATNAIK, A., HAMILTON, E., FLEMING, G., PAPADOPOULOS, K., ELNAGGAR, A., ADEWOYE, A. H., CHMIELOWSKI, B., DUMBRAVA, E. & VAENA, D. 2020a. Abstract CT031: COM701 demonstrates preliminary antitumor activity as monotherapy and in combination with nivolumab in patients with advanced solid tumors. *Cancer Research*, 80, CT031-CT031.
- SULLIVAN, R., RASCO, D., LIM, E., SHARMA, M., SHEPARD, D., PATNAIK, A., HAMILTON, E., FLEMING, G., PAPADOPOULOS, K., ELNAGGAR, A., ADEWOYE, A. H., CHMIELOWSKI, B., DUMBRAVA, E. & VAENA, D. 2020b. COM701 Demonstrates Antitumor Activity as Monotherapy and in Combination with Nivolumab in Patients with Advanced Malignancies. *AACR 2020*. Virtual.
- TANG, X., SHU, Z., ZHANG, W., CHENG, L., YU, J., ZHANG, M. & ZHENG, S. 2019. Clinical significance of the immune cell landscape in hepatocellular carcinoma patients with different degrees of fibrosis. *Ann Transl Med*, 7, 528.
- TAUBE, J. M., ANDERS, R. A., YOUNG, G. D., XU, H., SHARMA, R., MCMILLER, T. L., CHEN, S., KLEIN, A. P., PARDOLL, D. M., TOPALIAN, S. L. & CHEN, L. 2012. Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci Transl Med*, 4, 127ra37.
- TAY, R. E., RICHARDSON, E. K. & TOH, H. C. 2020. Revisiting the role of CD4(+) T cells in cancer immunotherapy-new insights into old paradigms. *Cancer Gene Ther*.
- THOMAS, L. 1982. On immunosurveillance in human cancer. *Yale J Biol Med*, 55, 329-33.
- TREPEL, F. 1974. Number and distribution of lymphocytes in man. A critical analysis. *Klin Wochenschr*, 52, 511-5.
- TUMEH, P. C., HARVIEW, C. L., YEARLEY, J. H., SHINTAKU, I. P., TAYLOR, E. J., ROBERT, L., CHMIELOWSKI, B., SPASIC, M., HENRY, G., CIOBANU, V., WEST, A. N., CARMONA, M., KIVORK, C., SEJA, E., CHERRY, G., GUTIERREZ, A. J., GROGAN, T. R., MATEUS, C., TOMASIC, G., GLASPY, J. A., EMERSON, R. O., ROBINS, H., PIERCE, R. H., ELASHOFF, D. A., ROBERT, C. & RIBAS, A. 2014. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature*, 515, 568-71.

- VADDEPALLY, R. K., KHAREL, P., PANDEY, R., GARJE, R. & CHANDRA, A. B. 2020. Review of Indications of FDA-Approved Immune Checkpoint Inhibitors per NCCN Guidelines with the Level of Evidence. *Cancers (Basel)*, 12.
- VALK, E., RUDD, C. E. & SCHNEIDER, H. 2008. CTLA-4 trafficking and surface expression. *Trends Immunol*, 29, 272-9.
- VAN DER MAATEN, L. & HINTON, G. 2008. Visualizing Data using t-SNE. *Journal of Machine Learning Research*, 9 (Nov), 2579-2605.
- WALUNAS, T. L., LENSCHOW, D. J., BAKKER, C. Y., LINSLEY, P. S., FREEMAN, G. J., GREEN, J. M., THOMPSON, C. B. & BLUESTONE, J. A. 1994. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity*, 1, 405-13.
- WATERS, J. C. 2009. Accuracy and precision in quantitative fluorescence microscopy. *J Cell Biol*, 185, 1135-48.
- WEBER, J. S., D'ANGELO, S. P., MINOR, D., HODI, F. S., GUTZMER, R., NEYNS, B., HOELLER, C., KHUSHALANI, N. I., MILLER, W. H., JR., LAO, C. D., LINETTE, G. P., THOMAS, L., LORIGAN, P., GROSSMANN, K. F., HASSEL, J. C., MAIO, M., SZNOL, M., ASCIERTO, P. A., MOHR, P., CHMIELOWSKI, B., BRYCE, A., SVANE, I. M., GROB, J. J., KRACKHARDT, A. M., HORAK, C., LAMBERT, A., YANG, A. S. & LARKIN, J. 2015. Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 16, 375-84.
- WHELAN, S., OPHIR, E., KOTTURI, M. F., LEVY, O., GANGULY, S., LEUNG, L., VAKNIN, I., KUMAR, S., DASSA, L., HANSEN, K., BERNADOS, D., MURTER, B., SONI, A., TAUBE, J. M., FADER, A. N., WANG, T. L., SHIH, I. M., WHITE, M., PARDOLL, D. M. & LIANG, S. C. 2019. PVRIG and PVRL2 Are Induced in Cancer and Inhibit CD8(+) T-cell Function. *Cancer Immunol Res*, 7, 257-268.
- WHERRY, E. J. 2011. T cell exhaustion. *Nat Immunol*, 12, 492-9.
- XIA, A., ZHANG, Y., XU, J., YIN, T. & LU, X. J. 2019. T Cell Dysfunction in Cancer Immunity and Immunotherapy. *Front Immunol*, 10, 1719.
- XU, F., SUNDERLAND, A., ZHOU, Y., SCHULICK, R. D., EDIL, B. H. & ZHU, Y. 2017. Blockade of CD112R and TIGIT signaling sensitizes human natural killer cell functions. *Cancer Immunol Immunother*, 66, 1367-1375.
- YAGI, T., BABA, Y., ISHIMOTO, T., IWATSUKI, M., MIYAMOTO, Y., YOSHIDA, N., WATANABE, M. & BABA, H. 2019. PD-L1 Expression, Tumor-infiltrating Lymphocytes, and Clinical Outcome in Patients With Surgically Resected Esophageal Cancer. *Ann Surg*, 269, 471-478.
- YU, X., HARDEN, K., GONZALEZ, L. C., FRANCESCO, M., CHIANG, E., IRVING, B., TOM, I., IVELJA, S., REFINO, C. J., CLARK, H., EATON, D. & GROGAN, J. L. 2009. The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nat Immunol*, 10, 48-57.
- YUEN, G. J., DEMISSIE, E. & PILLAI, S. 2016. B lymphocytes and cancer: a love-hate relationship. *Trends Cancer*, 2, 747-757.
- ZAMARIN, D., BURGER, R. A., SILL, M. W., JR, D. J. P., LANKES, H. A., FELDMAN, M. D., ZIVANOVIC, O., GUNDERSON, C., KO, E., MATHEWS, C., SHARMA, S., HAGEMANN, A. R., KHLEIF, S. & AGHAJANIAN, C. 2020. Randomized Phase II Trial of Nivolumab Versus Nivolumab and

- Ipilimumab for Recurrent or Persistent Ovarian Cancer: An NRG Oncology Study. *Journal of Clinical Oncology*, 38, 1814-1823.
- ZHANG, Q. W., LIU, L., GONG, C. Y., SHI, H. S., ZENG, Y. H., WANG, X. Z., ZHAO, Y. W. & WEI, Y. Q. 2012. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a meta-analysis of the literature. *PLoS One*, 7, e50946.
- ZHANG, Y., LUO, G., LI, M., GUO, P., XIAO, Y., JI, H. & HAO, Y. 2019. Global patterns and trends in ovarian cancer incidence: age, period and birth cohort analysis. *BMC Cancer*, 19, 984.
- ZHOU, X., YAO, Z., YANG, H., LIANG, N., ZHANG, X. & ZHANG, F. 2020. Are immune-related adverse events associated with the efficacy of immune checkpoint inhibitors in patients with cancer? A systematic review and meta-analysis. *BMC Med*, 18, 87.
- ZHU, Y., FU, H., LIU, Z., ZHANG, J. & YE, D. 2018. Immune-desert, immune-excluded and inflamed phenotypes predict survival and adjuvant chemotherapy response in patients with MIBC *European Urology Supplements*, 17, e128-e130.
- ZHU, Y., PANICCIA, A., SCHULICK, A. C., CHEN, W., KOENIG, M. R., BYERS, J. T., YAO, S., BEVERS, S. & EDIL, B. H. 2016. Identification of CD112R as a novel checkpoint for human T cells. *J Exp Med*, 213, 167-76.
- ZONG, Z., ZOU, J., MAO, R., MA, C., LI, N., WANG, J., WANG, X., ZHOU, H., ZHANG, L. & SHI, Y. 2019. M1 Macrophages Induce PD-L1 Expression in Hepatocellular Carcinoma Cells Through IL-1beta Signaling. *Front Immunol*, 10, 1643.

10. Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt vor allem Herrn Professor Dr. Guido Sauter für die Gelegenheit, eine so interessante und herausfordernde Möglichkeit erhalten zu haben an seinem Institut meine Doktorarbeit anfertigen zu dürfen. Seine konstruktive Kritik war mir eine große Hilfe beim Schreiben meiner Arbeit.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Herrn Niclas Blessin für die außergewöhnliche Chance, Teil eines innovativen Forschungsteams gewesen zu sein. Darüber hinaus waren seine stets zielführenden Ratschläge, der anregende Diskurs und sein Vertrauen in meine Entwicklung entscheidend für die Umsetzung meiner Dissertation.

Die Möglichkeit auch über mein Dissertationsthema hinaus an spannenden Projekten mitarbeiten zu können, haben mir einen prägenden Einblick in relevante Forschungsarbeit gegeben.

Auch Herrn Privatdozent Dr. Ronald Simon danke ich für seine hilfreichen Rückmeldungen, welche die finale Entwicklung der Arbeit unterstützt haben.

Meine besondere Dankbarkeit möchte ich ebenfalls Tim Mandelkow, Wenchao Li, Cheng Yang, Inge Brandt, Melanie Witt, Julia Ebner und Maren Eisenberg aussprechen für die überaus freundliche und gute Zusammenarbeit in den gemeinsamen arbeitsreichen Tagen im Labor. Außerdem gilt mein Dank Elena Bady, die mir die biologische Seite der Forschung praktisch nähergebracht hat.

Mir wird die durch Teamgeist und Engagement geprägte gemeinsame Arbeitszeit sehr positiv in Erinnerung bleiben.

Meiner Kommilitonin und Freundin Jule Runge bin ich überaus dankbar für ihre stets ehrliche Kritik zu meiner Arbeit und ihre Ermutigung.

Zum Abschluss möchte ich noch meiner Familie danken, meiner Mutter Rita Jansen und meinem Vater Klaus Wrage sowie meinem Partner Max, die mir immer eine große Unterstützung waren während des gesamten Weges bis hin zur Promotion.

11. Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

12. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: