

Angeborene Immunität in der Tumorimmuntherapie

Aus der

Abteilung für Klinische Pharmakologie

Direktor: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik und Poliklinik IV

Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

Habilitationsschrift

vorgelegt von

Dr. rer. nat. Lars M. König

2023

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung und Hintergrund.....	2
1.1	Mustererkennungsrezeptoren der angeborenen Immunität	3
2.	Forschungsprojekte	5
2.1	5'-Triphosphat-RNA-basierte <i>in situ</i> -Vakzinierung zur Tumormimmuntherapie	5
2.2	Molekulare Mechanismen der Zelltodinduktion durch doppelsträngige 5'-Triphosphat RNA.....	7
2.3	Aktivierung der angeborenen Immunität verstärkt die Infiltration von CAR-T-Zellen ins Tumorgewebe	9
2.4	Die Kehrseite der Medaille - Fehlregulierung der angeborenen Immunität kann zu Immundefekten und autoinflammatorischen Erkrankungen führen.....	10
2.5	Immunsuppression durch myeloide Zellen im Tumorgewebe	12
2.6	Neutrophile in COVID-19 und potenzielle Therapie durch CXCR2-Antagonisten.....	13
3	Zusammenfassung und Ausblick.....	14
4	Literaturverzeichnis.....	16
5	Lebenslauf (nicht in elektronischer Version)
6	Schriftenverzeichnis (nicht in elektronischer Version)
7	Danksagung	22
8	Übersicht der Publikationen der kumulativen Habilitationsschrift.....	23

1. Einleitung und Hintergrund

Das angeborene Immunsystem spielt in der Bekämpfung von Pathogenen eine zentrale Rolle, da es sehr schnell auf Eindringlinge reagieren und diese eliminieren oder eine hochspezifische adaptive Immunantwort initiieren kann. Die Erkennung von Pathogenen beruht dabei auf molekularen Strukturen, die beispielsweise auf Bakterien und Viren vorhanden sind oder von diesen produziert werden. Diese *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) werden durch Mustererkennungsrezeptoren (*pathogen recognition receptors*, PRR) des angeborenen Immunsystems erkannt, zu denen unter anderen die *Toll-like*-Rezeptoren (TLRs), *NOD-like*-Rezeptoren (NLRs) und *RIG-I-like*-Helikasen (RLHs) gehören. Allen ist gemein, dass sie bei Aktivierung durch die konzertierte Ausschüttung von Alarmsignalen und die Aktivierung weiterer Immunzellen eine Immunantwort gegen Pathogene initiieren. Durch die Identität dieser Alarmsignale, auch Zytokine genannt, kann die Immunantwort so modifiziert werden, dass sie für die Abwehr der jeweiligen Pathogene optimal ist. So führt die Aktivierung von RLHs nach Erkennung viraler RNA neben einer humoralen Immunantwort auch zu einer zellulären Immunantwort, die Virus-infizierte Körperzellen erkennen und beseitigen kann. Letztere ist auch in der Eliminierung von Tumorzellen durch das Immunsystem von zentraler Bedeutung. Die Überlappung der Ausprägung der Immunantwort kann man sich in der Tumorthherapie zu Nutze machen kann, in dem man durch Aktivierung dieser PRRs eine zelluläre Immunantwort gegen Tumorantigene initiiert.

Zusätzlich zur Abwehr von Pathogenen und entarteten Zellen vermitteln die Botenstoffe und Zellen der angeborenen Immunität wichtige Prozesse in der Homöostase wie beispielsweise die Elimination von apoptotischen Zellen/Proteinaggregaten in Geweben, Reparatur und Wundheilung, Angiogenese und Regulation der adaptiven Immunität. Eine Fehlregulation der angeborenen Immunität kann schwerwiegende Folgen für den Organismus haben, wie sich an der Vielzahl von chronisch-entzündlichen und auto-inflammatorischen Erkrankungen verdeutlicht. In Tumoren können inflammatorische Prozesse sowohl positive wie auch negative Aspekte besitzen. Akute inflammatorische Prozesse können zu einer antitumoralen Immunantwort führen, während chronisch-inflammatorische Signaturen, wie sie häufig in Tumoren zu finden sind, das adaptive Immunsystem inhibieren. Besonders Zellen der myeloiden Ontogenese reichern sich in Tumoren an und zeigen einen alternativ-aktivierten Phänotyp. Sogenannte M2-polarisierte Makrophagen, oder auch Tumor-assoziierte Makrophagen (TAMs) und unreifere Untergruppen von Monozyten und Neutrophilen, die im Tumor als *myeloid-derived suppressor cells* (MDSCs) zusammengefasst werden, können über diverse Mechanismen eine antitumorale T-Zellantwort torpedieren. Die Immunzellensignatur ähnelt dabei Wundheilungs- oder Entzündungs-Resolutions-Prozessen, die im Tumor chronifiziert ablaufen, durch Angiogenese und Wachstumssignale das Tumorwachstum zusätzlich fördern und durch die immunsuppressiven Eigenschaften dieser Zellen einen sogenannten *immune escape* des Tumors ermöglichen (DeNardo & Ruffell, 2019; Schreiber et al., 2011; Veglia et al., 2018).

Für eine erfolgreiche Tumorummuntherapie ist deshalb nicht nur die Initiation einer zielgerichteten und ausbalancierten Immunantwort erforderlich, sondern es ist essenziell, dass diese auf eine nicht-immunsuppressive Umgebung im Gewebe trifft. Meine Forschung fokussiert sich auf beide Aspekte – die fördernde und die hemmende Wirkung der angeborenen Immunität im Kontext der Tumorummuntherapie. Das übergeordnete Ziel ist es, grundlegende Mechanismen der angeborenen Immunität besser zu verstehen, um mit diesen Erkenntnissen effektive Tumorummuntherapien zu entwickeln.

1.1 Mustererkennungsrezeptoren der angeborenen Immunität

Nukleinsäuren stellen eine wichtige Gruppe von PAMPs dar, besonders in der Erkennung von viraler Replikation in der Zelle. Um Autoimmunreaktion zu verhindern, ist es von besonderer Bedeutung, fremde Nukleinsäuren von zelleigenen differenzieren zu können. Strukturelle Merkmale wie Doppelsträngigkeit, chemische Modifikationen oder deren Ausbleiben und die Lokalisation können dabei wichtige Unterscheidungsmerkmale gegenüber körpereigenen Nukleinsäuren sein (Roers et al., 2016). Man unterscheidet grundsätzlich die klassischen Mustererkennungsrezeptoren, die über eine Signalkaskade Zytokine und Chemokine induzieren und somit die Rekrutierung von weiteren Immunzellen vermitteln von RNA-Rezeptoren mit direkter antiviraler Aktivität, die über Translationsarrest in der Zelle eine weitere Replikation von Viren verhindern (Chen & Hur, 2022; Schlee & Hartmann, 2016).

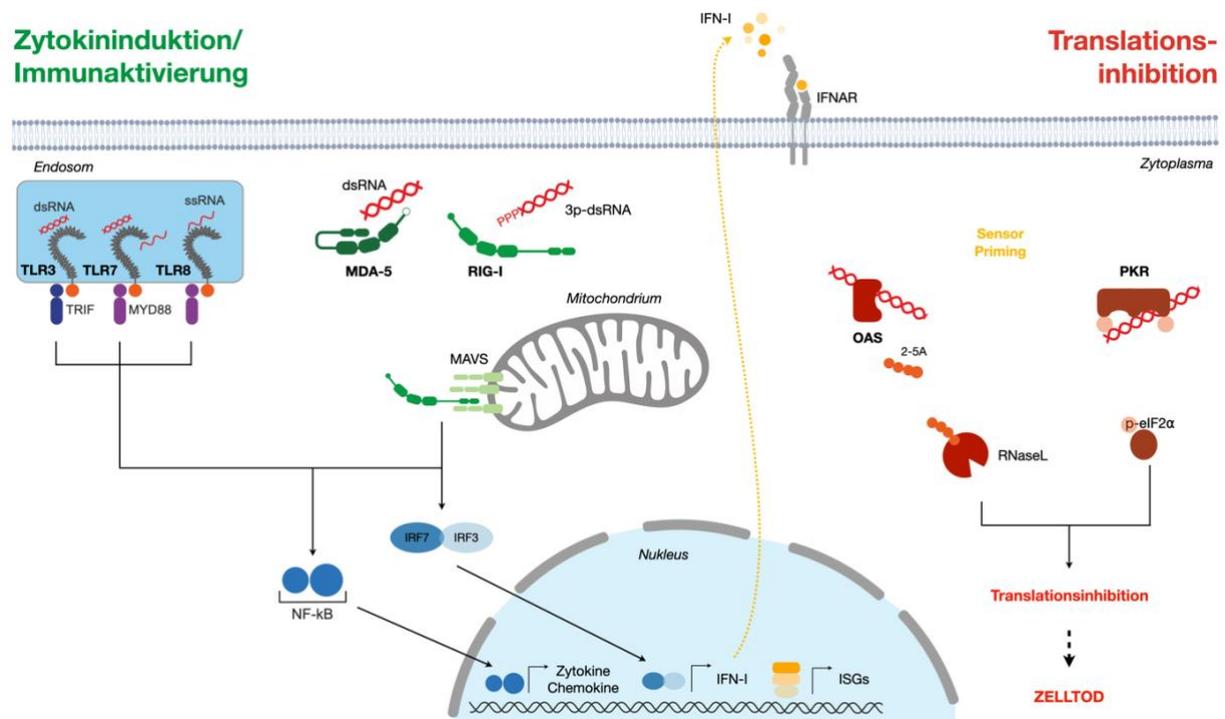


Abbildung 1: Schematische Darstellung wichtiger RNA-Rezeptoren und deren Signalwege. RNAs, die von außen in die Zelle aufgenommen werden, können im endosomalen Kompartiment durch TOLL-like-Rezeptoren erkannt werden. Zytoplasmatische Doppelstrang-RNAs (dsRNAs) werden durch die RIG-I-like Helikasen, RIG-I und MDA5, detektiert. Durch Aktivierung dieser Rezeptoren wird eine Signalkaskade ausgelöst, die zur Translokation der Transkriptionsfaktoren NFκB und IRF3/7 in den Zellkern führt, die die Expression von Alarmsignalen (Zytokine, Chemokine, Interferone (IFN-I)) vermitteln. IFN agiert auto- und parakrin und führt zur Induktion von Interferon-induzierten Genen (ISGs), die die Zelle in einen antiviralen Alarmzustand versetzen und zu denen auch die dsRNA-Rezeptoren OAS und PKR gehören, die durch die Inhibition der Translation antiviral wirken. Bei anhaltend hoher Konzentration von viralen RNAs kann diese Translationsinhibition auch zum programmierten Zelltod führen. Modifiziert aus Schlee and Hartmann, 2016.

Abbildung 1 zeigt eine Übersicht der wichtigsten RNA-Rezeptoren und ihrer Signalwege. TOLL-like Rezeptoren (TLR) detektieren RNAs aus extrazellulären Quellen im endosomalen Kompartiment. TLR3 erkennt doppelsträngige (ds) RNA, während die hauptsächlich in Antigen-präsentierenden Zellen (APC) exprimierten TLR7 und 8 einzelsträngige RNAs detektieren. Sie

leiten das Signal über Ihre Adapterproteine TRIF und MyD88 weiter. Im Zytoplasma übernehmen die RIG-I-like Helikasen (RLH), *retinoic acid inducible gene 1* (RIG-I) und *melanoma differentiation-associated gene 5* (MDA5), die Erkennung viraler dsRNA. RIG-I im Speziellen ist entscheidend für die Erkennung bedeutender humanpathogener Viren wie Influenzaviren (Kell & Gale, 2015). Es ist ein ubiquitär exprimierter Sensor für virale RNA, der kurze doppelsträngige RNA-Moleküle mit einer für virale RNA typischen 5'-Triphosphat-Gruppe (3p-RNA) erkennt (Hornung et al., 2006; Schlee et al., 2009; Schmidt et al., 2009). Zelleigene RNA hingegen wird durch eine 5'-cap-Struktur von der Erkennung abgeschirmt. Die Bindung eines Liganden an RIG-I führt zur Aktivierung einer Signalkaskade, die über die Bindung von RIG-I an das *mitochondrial antiviral signaling protein* (MAVS) zur Aktivierung von IRF-3/-7, MAPK und NFκB und damit zur Sekretion von Typ I-Interferonen (IFN-I) und anderen proinflammatorischen Zytokinen führt (Kato et al., 2006; Yoneyama et al., 2004) (vgl. Abbildung 1). Das sezernierte IFN-I aktiviert durch Bindung an den Interferon-alpha-Rezeptor (IFNAR1/2) eine Feed-forward-Schleife und induziert die Expression hunderter antiviraler Gene, zu denen auch die RLHs selbst zählen. Diese sogenannten *interferon-stimulated genes* (ISG) dienen zum einen der Abwehr von viralen Pathogenen in der Zielzelle selbst und zum anderen als Alarmsignal für Nachbarzellen. Zu den ISGs gehören auch weitere RNA-Sensoren mit direkter antiviraler Aktivität wie *protein kinase R* (PKR) und *oligoadenylate synthetase 1-3* (OAS1-3) (Schlee & Hartmann, 2016). Diese Rezeptoren inhibieren die virale Replikation, indem sie einen Translationsarrest in der Zelle hervorrufen. PKR vermittelt dies durch Phosphorylierung des *eukaryotic translation initiation factor 2A* (eIF2A) (Taniuchi et al., 2016), die drei homologen OAS1-3 produzieren nach Bindung doppelsträngiger RNA den *second messenger 2'-5'-Oligoadenylat* (2-5A) und bewirken damit die Aktivierung von RNase L, die durch Abbau viraler und zellulärer mRNA die Translation in der Zelle inhibiert (Burke et al., 2019; Rath et al., 2019; Schwartz & Conn, 2019). Die Aktivität von PKR und RNase L kann zum Zelltod führen. Eine einzelne Zelle wird dadurch zur Eindämmung der Virusvermehrung für den Organismus geopfert.

Zytokininduktion und Zelltod führen gemeinsam zur effektiven Initiation einer adaptiven Immunantwort. Chemokine locken dabei Immunzellen an den Infektionsort, werden durch das Zytokinmilieu aktiviert, und das Sterben von infizierten Zellen erhöht die Verfügbarkeit von Zellfragmenten mit spezifischen Antigenen für die Aufnahme durch Antigen-präsentierenden Zellen. Die Polarisierung der entstehenden Immunantwort gegen intrazelluläre Pathogene ist eine sogenannte Th1-Antwort, die auf der Aktivität von zytotoxischen T-Zellen basiert. Diese Art von Immunantwort ist nicht nur in der antiviralen Immunität wichtig, sondern auch während einer Immunantwort gegen Tumore. Dabei zielt die Immunantwort nicht auf virale Antigene, sondern auf Veränderungen in den Tumorzellen ab, die sie von gesunden Zellen unterscheidbar machen, sogenannte Tumorantigene. Auf diesem Prinzip basieren die immuntherapeutischen Ansätze der nächsten Kapitel.

2. Forschungsprojekte

2.1 5'-Triphosphat-RNA-basierte *in situ*-Vakzinierung zur Tumormimmuntherapie

Die oben beschriebenen Mechanismen der Immunaktivierung können durch die gezielte Ansteuerung von Mustererkennungsrezeptoren, wie den RIG-I-like Helikasen (RLH), therapeutisch genutzt werden (Ellermeier et al., 2013; Fu et al., 2015; Poeck et al., 2008; Schnurr & Duewell, 2013), um das immunsuppressive Tumormilieu zu reprogrammieren und eine adaptive Immunantwort zu initiieren. Ein Vorteil der RLHs gegenüber anderen Mustererkennungsrezeptoren wie den TLRs besteht unter anderem darin, dass sie ubiquitär in somatischen Zellen wie auch in Tumorzellen exprimiert werden. Synthetische Liganden – kurze doppelsträngige RNAs mit 5'-Triphosphatgruppe (3p-RNA) – können durch gezielte Applikation eine virale Infektion im Tumorgewebe imitieren. Dabei beruht die antitumorale Wirkung einerseits auf der direkten Induktion von Zelltod in Tumorzellen, auf die ich im nächsten Kapitel noch im Speziellen eingehen werde, andererseits auf der Sekretion von Zytokinen und Chemokinen, die wie oben beschrieben APCs and Effektor-Immunzellen rekrutieren, aktivieren und somit eine spezifische Immunantwort auslösen. Da die Wirkweise einer Vakzinierung gleichkommt, spricht man auch von einer *in situ*-Vakzinierung.

In einem Kooperationsprojekt mit Sanofi haben wir die therapeutische Anwendung von synthetischen 3p-RNA für die Therapie des Melanoms untersucht (**Helms et al., 2019**). Durch eine Analyse von Datensätzen des *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) konnten wir zeigen, dass die Expression von RIG-I neben der erwarteten Korrelation mit einer IFN-Genexpressionssignatur auch mit der Infiltration von dendritischer Zellen, CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen korreliert. In einem Panel von sieben humanen Melanomzelllinien wurde das Ansprechen von 3p-RNA untersucht. Besonderer Fokus lag dabei auf der Synthese der 3p-RNA, deren Struktur, Sequenz und der Notwendigkeit der 5'-Triphosphatgruppe für die Entfaltung ihrer therapeutischen Wirkung. Es konnte gezeigt werden, dass der RIG-I-Signalweg in fast allen Zellen durch Transfektion mit diversen 3p-RNAs aktiviert wird, die Zellen aber unterschiedlich auf das Vorhandensein einer Haarnadel-Struktur der RNA reagieren. In einigen Zellen konnte die Haarnadel-RNA ein Fehlen der 5'-Triphosphatgruppe kompensieren, wobei der Mechanismus noch genauerer Aufklärung bedarf. Im murinen syngenem Melanommodell konnte die intratumorale Applikation nicht nur den behandelten Tumor verkleinern, sondern auch einen Tumor, der s.c. in die distale Flanke der Maus injiziert war. Dieser systemische Immuneffekt war strikt abhängig von der 5'-Triphosphatgruppe und korrelierte mit der Induktion von Typ I IFN, Zytokinen und der Aktivierung von T- und NK-Zellen.

Bislang war die Anwendung von RIG-I-Agonisten lediglich in soliden Tumormodellen beschrieben. Um herauszufinden, ob sich eine systemische Aktivierung von RIG-I auch eignet, um nicht-solide Tumoren zu behandeln, haben wir ein sygenes präklinisches Modell der akuten myeloiden Leukämie untersucht (**Ruzicka, Koenig et al., 2020**). Die *i.v.*-Administration von komplexierter 3p-RNA führte zu einer reduzierten Tumormass, Verlängerung des mittleren Überlebens und in einigen Mäusen zu einer kompletten Remission dieses sehr aggressiven Tumormodells. Durch ein *engraftment* der Tumorzelllinie in immun-defizienten NSG-Mäusen mit anschließender 3p-RNA-Therapie, die keinerlei therapeutische Wirkung entfaltete, konnte die essenzielle Rolle des adaptiven Immunsystems für die Kontrolle der AML-Zellen gezeigt werden. Eine Antikörper-basierte Depletion verschiedener Immunzellen ergab, dass der therapeutische Effekt von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen vermittelt wurde, nicht aber von NK- und B-Zellen. Da die

verwendete AML-Zelllinie, C1498, nicht durch komplexierte 3p-RNA transfizierbar ist, um den therapeutischen Effekt zu erklären, haben wir untersucht, inwiefern die Therapie von einer intakten RIG-I- und Typ I IFN-Signalgebung in anderen Zellen abhängt. Mäusen, denen der Typ I IFN Rezeptor (IFNAR) fehlte, zeigten auch keinen Therapieeffekt mehr. Die Therapieeffizienz in diesem nicht-soliden Tumor basiert folglich auf einer systemischen Aktivierung des adaptiven Immunsystems mit einer essenziellen Bedeutung des IFN-*signaling*.

Neben der Aktivierung von RLHs ist auch der *cyclic GMP-AMP synthase (cGAS)-stimulator of interferon genes (STING)*-Signalweg in den Fokus der Immuntherapie gerückt. cGAS ist ein Sensor für doppelsträngige DNA im Zytoplasma und kann durch die Synthese des *second messengers 2'3' cyclic GMP-AMP (cGAMP)* das in der endoplasmatischen Membran lokalisierte Protein STING aktivieren, was seinerseits eine Signalkaskade zur Induktion von IFN und anderen Zytokinen und Chemokinen auslöst. Agonisten von STING werden in mehreren klinischen Studien zur Immuntherapie von Tumoren und als antivirales Agens erforscht (Naour et al., 2020). cGAMP selbst wird nicht effektiv genug in Zielzellen aufgenommen und schnell von extrazellulären oder viralen Endonukleasen abgebaut. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Thomas Carrell konnten wir zeigen, dass dideoxy-cGAMP-Derivate, dd-cGAMP und dd-cAAMP, zwar eine geringere Affinität zu STING haben, aber eine verbesserte Stabilität gegenüber viralen Endonukleasen und eine deutlich verstärkte Tumorkontrolle im Vergleich zu cGAMP in einem murinen subkutanen Tumormodell bei intratumoraler Applikation besitzen (**Stazzoni et al, 2022, akzeptiert**). Weitere Untersuchungen sollen den verbesserten Wirkmechanismus untersuchen.

IFN hat eine Vielzahl von Funktionen in der Immuntherapie. Wie ich in Kapitel 2.5 beschreibe, führt IFN zu einer Reprogrammierung der myeloiden Zellen und führt zu einer weniger suppressiven *tumor microenvironment* (TME). IFN ist auch wichtig für die Aktivierung von dendritischen Zellen und der von ihnen bewirkten Kreuzpräsentation von Tumorantigenen. Jedoch hat IFN nicht nur positive Effekte in für die Tumorummuntherapie. Durch die enorme Potenz des Immunsystems, ist die Regulation und Balance zwischen aktivierenden und inhibierenden Signalen von besonderer Bedeutung, um eine überschießende Immunreaktion bzw. Autoimmunität zu verhindern. Ein Beispiel dafür ist die IFN-induzierte Expression von immuninhibierenden Rezeptoren wie PD-L1 (Minn, 2015) auf Immun- und Tumorzellen. Viele präklinische Studien deuten darauf hin, dass IFN-I-induzierende Therapien, wie Liganden von PRR des angeborenen Immunsystems, das Ansprechen auf Immuncheckpoint-Inhibitoren (ICI) deutlich verbessern können (Bald et al., 2014). Diesen synergistischen Effekt durch die Kombination aus 3p-RNA als IFN-I-induzierenden und immunaktivierenden RIG-I-Liganden und anti-PD-1 als ICI konnten wir sowohl für das oben beschriebene AML-Modell (**Ruzicka, Koenig et al., 2020**) sowie im präklinischen Modell des hepatozellulären Karzinoms (**Koenig et al., Manuskript in Vorbereitung**) beobachten (Abbildung 2).

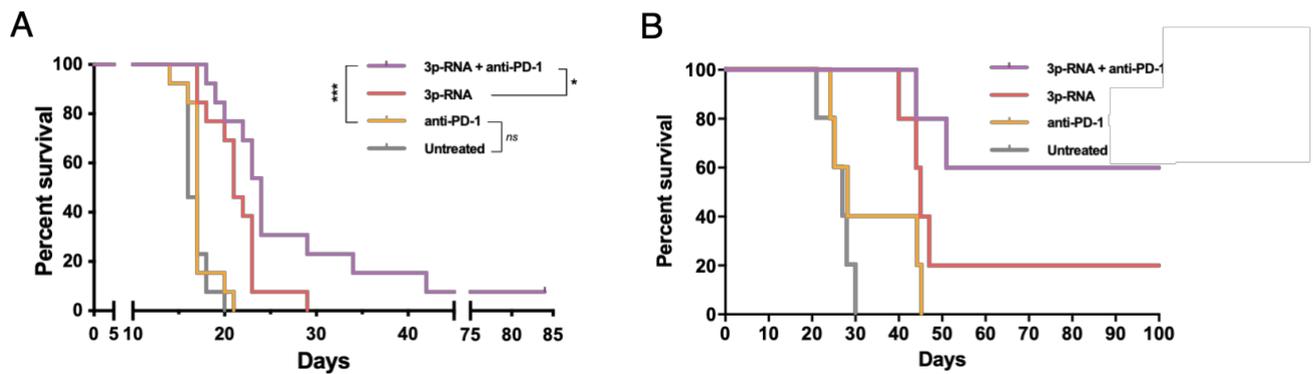


Abbildung 2: Kaplan-Meier-Kurven des Überlebens von C57BL/6-Mäusen nach Therapie mit 3p-RNA, anti-PD-1 Immuncheckpoint-Inhibitor oder der Kombination aus beiden in einem präklinischen Modell der AML (C1498) (A) (modifiziert von Ruzicka et al., 2020) bzw. des hepatozellulären Karzinoms (RIL-175) (B) (unveröffentlicht).

2.2 Molekulare Mechanismen der Zelltodinduktion durch doppelsträngige 5'-Triphosphat RNA

Die Aktivierung von RIG-I durch doppelsträngige 3p-RNA führt zur Freisetzung von IFN-I, proinflammatorischen Zytokinen und zu einer immunogenen Form von Zelltod (Bek et al., 2019; Duewell et al., 2014). Während die Induktion von IFN-I und Zytokinen durch RIG-I in der Literatur überzeugend dargelegt ist, ist die Datenlage zu den Zelltodmechanismen unzureichend und teils widersprüchlich gewesen. Insbesondere waren bislang die beiden Signalwege zur IFN-I-Induktion und zum Zelltod nicht voneinander diskriminiert.

Nach vorherrschender Meinung waren beide Prozesse direkten Signalwegen distal der RLH-Aktivierung zugeordnet (Besch et al., 2009; Chattopadhyay et al., 2016; Tormo et al., 2009). Hier sind vor allem die Arbeiten von Besch et al. (2009) und Tormo et al., (2009) von Bedeutung, die erstmals zeigten, dass die Aktivierung von RIG-I und MDA5 zu Zelltod in Melanomzellen führte. Beide demonstrierten, dass die IFN-unabhängige Induktion von pro-apoptotischen BH3-Proteinen PUMA und NOXA für die Zelltodinduktion in Melanomzellen wichtig ist, während sich PUMA als entscheidend für die Zelltodinduktion in Pankreaskarzinomzellen herausstellte (Ellermeier et al., 2013). Eine erhöhte Tumorzellspezifität konnte dadurch erklärt werden, dass nicht-maligne Zellen durch eine höhere BCL-X_L-Expression teilweise vor der Aktivität von PUMA und NOXA geschützt sind (Besch et al., 2009). In weiteren Arbeiten wurden verschiedene Mechanismen beschrieben, die Zelltod in Tumorzellen in Abhängigkeit von RLHs induzieren, wie die Hochregulation und Aktivierung von TRAIL (Matsushima-Miyagi et al., 2012), eine Herunterregulation von BCL-2, BIRC3 und PRKCE (Kumar et al., 2019), eine direkte Interaktion zwischen MAVS und Caspase 8 (Maadidi et al., 2014) sowie die direkte Bindung vom pro-apoptotischen BAX und IRF3 (Chattopadhyay et al., 2010, 2016), die zur Folge hat, dass BAX und BAK in der mitochondrialen Membran eine Pore bilden, wodurch Apoptose ausgelöst wird. Neben den Mechanismen der Induktion intrinsischer und extrinsischer Apoptose wurde auch die prominente Rolle von Autophagie (Tormo et al., 2009) hervorgehoben sowie andere Arten des Zelltods wie Nekroptose (Schock et al., 2017) und Pyroptose (Elion et al., 2018; Franchi et al., 2014; Poeck et al., 2008; Pothlichet et al., 2013).

Durch systematische Analyse der Zelltodinduktion mittels CRISPR/Cas9-generierten *knockout* (KO)-Zelllinien konnten wir die Mechanismen der Zytokin- und Zelltodinduktion nach 3p-RNA-Transfektion deutlich detaillierter beschreiben. Hier kamen mir die langjährigen Erfahrungen in der Aufschlüsselung von Signalwegen unterhalb des B-Zell-Rezeptors (Engels et al., 2009; Engels, König et al., 2014) zugute. Bekanntermaßen sind sowohl IFN-I-Produktion als auch Zelltodinduktion von einer intakten RIG-I-Signalkaskade abhängig (Besch et al., 2009; Tormo et al., 2009). Überraschenderweise führte jedoch die Co-Kultivierung von RIG-I-defizienten Zellen mit Wildtypzellen zu einer Wiederherstellung der 3p-RNA-abhängigen Zelltodinduktion in RIG-I-KO-Zellen. Dasselbe Ergebnis ergab sich, wenn RIG-I-defiziente Zellen durch exogenes IFN-I vorstimuliert wurden. Unseren Untersuchungen zufolge führt RIG-I über IFN-I zur Hochregulation eines weiteren 3p-RNA-Sensors, der im zweiten Schritt Zelltod auslöst. Durch Affinitätsaufreinigung mit anschließender massenspektrometrischen Analyse konnte Oligoadenylatsynthetase 1 (OAS1) als spezifischer Bindepartner von 3p-RNA identifiziert werden. OAS1 ist ein dsRNA-Sensor, der über die Produktion des *second messengers* 2-5A zur Aktivierung von RNase L führt. RNase L bewirkt, wie in der Einleitung beschrieben, durch den Abbau von zellulären RNAs einen Translationsarrest und Zelltod. Zellen, denen RNase L als Effektorprotein von OAS1 fehlte, zeigten eine deutlich reduzierte Zelltodinduktion nach 3p-RNA-Stimulation, was die Signifikanz dieses Signalwegs in der Zelltodinduktion nach 3p-RNA-Erkennung unterstreicht (Boehmer et al., 2021). Unsere Daten zeigen, dass Zytokin- und Zelltodinduktion klar voneinander abgegrenzt werden können und in einen *Priming*- und einen Effektor-Schritt unterteilt werden kann (Abbildung 3).

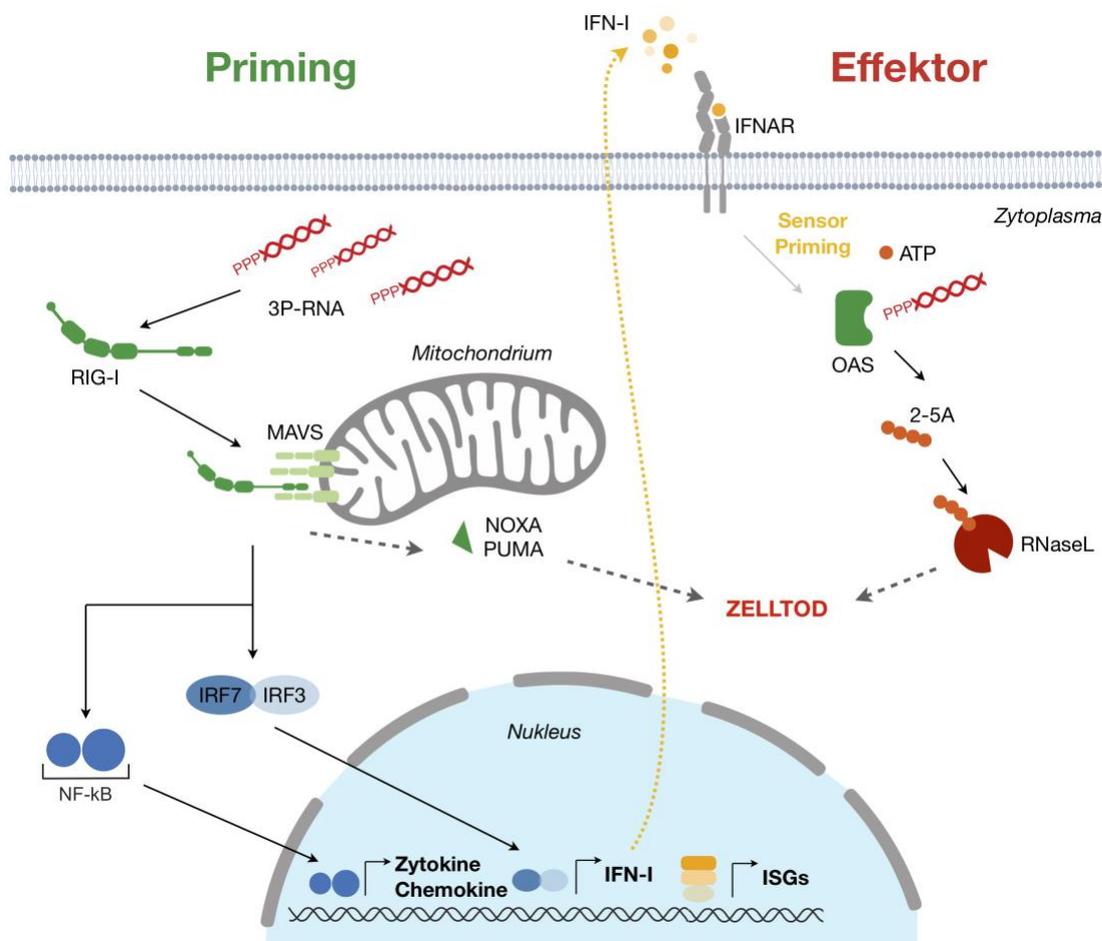


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Signalwege nach zellulärer Detektion von 3p-RNA. Durch unsere Vorarbeiten konnte bereits das bisherige Credo der Zelltodinduktion in direktem Zusammenhang der RIG-I/MAVS-Signalkaskade widerlegt werden. Das neu aufgestellte Modell zur Wirkweise beinhaltet einen durch RIG-I *signaling* ausgelösten *Priming*-Schritt, der einerseits über die IFN-I-Induktion zur Expression von OAS1 führt, andererseits durch die Hochregulation des pro-apoptotischen Proteins NOXA ein mitochondrielles *Priming* hervorruft. Im zweiten Effektor-Schritt aktiviert 3p-RNA OAS1, was über die Produktion des *second messenger* 2-5A RNase L aktiviert, welche durch den Abbau von mRNAs einen Translationsarrest auslöst und zusammen mit NOXA zum Zelltod führt.

2.3 Aktivierung der angeborenen Immunität verstärkt die Infiltration von CAR-T-Zellen ins Tumorgewebe

Die beobachtete verstärkte Infiltration von T-Zellen in den Tumor nach 3p-RNA-Therapie hat uns dazu motiviert, zu untersuchen, ob durch Kombination von 3p-RNA mit einer CAR-T-Zelltherapie die Infiltration der CAR-T-Zellen in soliden Tumoren erhöht werden kann. Die limitierte Infiltration von CAR-T-Zellen stellt eine große Hürde in der effektiven Anwendung von CAR-T-Zelltherapie bei soliden Tumoren dar. Die Arbeitsgruppe von Prof. Sebastian Kobold konnte zeigen, dass eine zusätzliche Expression des Chemokinrezeptors CXCR6 in CAR-T-Zellen zu einer verstärkten Infiltration in Tumoren führt, die dessen Liganden CXCL16 sekretieren (Lesch et al., 2021). Mit der Anpassung des Chemokinrezeptor-Repertoires auf Seiten der CAR-T-Zelle an das Tumorgewebe kann folglich ein Chemokin-/Rezeptor-*Matching* produziert werden. Eine andere Möglichkeit ist, die Ausschüttung von Chemokinen im Tumor so zu manipulieren, dass sie dem Rezeptor-Repertoire auf CAR-T-Zellen (und endogenen T-Zellen) entspricht. Durch die gezielte Aktivierung von RIG-I im Tumorgewebe durch die therapeutische Anwendung von 3p-RNA werden wichtige Botenstoffe in der T-Zellrekrutierung wie CXCL9, CXCL10, CXCL11 und CCL5 induziert. Dies sind Liganden der Chemokinrezeptoren CXCR3 und CCR5 und für die Infiltration von T-Zellen ins Gewebe verantwortlich (Srivastava et al., 2020). In der Tat konnten wir durch die Präkonditionierung des Tumorgewebes mittels 3p-RNA eine deutlich verbesserte CAR-T-Zellinfiltration in verschiedenen präklinischen Modellen solider Tumoren zeigen, wodurch sich gleichzeitig ein optimierter Therapieeffekt einstellte. Neben der verbesserten Infiltration der CAR-T-Zellen könnte auch eine weitere Komponente der Kombinationstherapie eine wichtige Rolle spielen: die Art des ausgelösten Zelltods. Je nach Begleitsignalen kann ein Zelltod immunologisch aktivierend oder für das Immunsystem unsichtbar ablaufen (Galluzzi et al., 2016). Kürzlich wurde veröffentlicht, dass ein T-Zell-Rezeptor-abhängig ausgelöster Tumorzelltod zu einer immunogenen Form des Zelltods führt und somit eine *de novo*-Immunantwort auch gegen andere Antigene als das Ziel des primären T-Zell-Rezeptors auslösen kann (Jaime-Sanchez et al., 2020; Minute et al., 2020). Unsere *in vitro*-Ergebnisse legen nahe, dass ein CAR-vermittelter Zelltod einige entscheidende immunogene Signale vermissen lässt, wodurch auch der fehlende Antigen-*spread* mit nachhaltiger Immunkontrolle von Tumoren bei einer CAR-T-Zelltherapie erklärt werden könnte. Die Kombination aus 3p-RNA und CAR-T-Zell-induziertem Zelltod zeigte *in vitro* wieder die Merkmale eines immunogenen Zelltods. Im präklinischen Tumormodell, welches sowohl EpCAM als Zielstruktur des CARs als auch das Modellantigen Hühner-Ovalbumin exprimierten, konnten nach Kombinationstherapie vermehrt OVA-spezifische T-Zellen festgestellt werden, was darauf hindeutet, dass es zu einem Antigen-*spreading* kommt (Senz...Koenig, Manuskript in Vorbereitung).

2.4 Die Kehrseite der Medaille - Fehlregulierung der angeborenen Immunität kann zu Immundefekten und autoinflammatorischen Erkrankungen führen

Das gemeinsame Arbeiten an dem Protein OAS1 führte zu einer Kollaboration mit PD Dr. Fabian Hauck (Dr. von Hauner Kinderspital, LMU Klinikum, München). Dr. Hauck hat mehrere Patienten mit einer heterozygoten *de novo*-Mutation in OAS1 gefunden (Abb. 6A), die sich mit autoinflammatorischen Symptomen, Fieberschüben, Dermatitis, einer alveolaren Proteinose und humoralen Immundefizienz präsentierten. Wir konnten gemeinsam den Pathomechanismus aufklären und durch *in vitro*-Experimente zeigen, dass alle vier Mutationen in OAS1 zu einer konstitutiv-aktiven Form (*gain-of-function*, GOF) von OAS1 führen (Abb. 6B und C). Vor allem Monozyten/Makrophagen und B-Zellen zeigten sich sensitiv gegenüber der OAS1-GOF. Der Zelltod von alveolaren Makrophagen, die wichtig für die Beseitigung von Proteinablagerungen in der Lunge sind konnte das klinische Bild der alveolaren Proteinose erklären helfen, während die Anfälligkeit der B-Zellen nach Aktivierung die Hypogammaglobulinämie mechanistisch erklären konnte (Magg, Okano, Koenig et al., 2021).

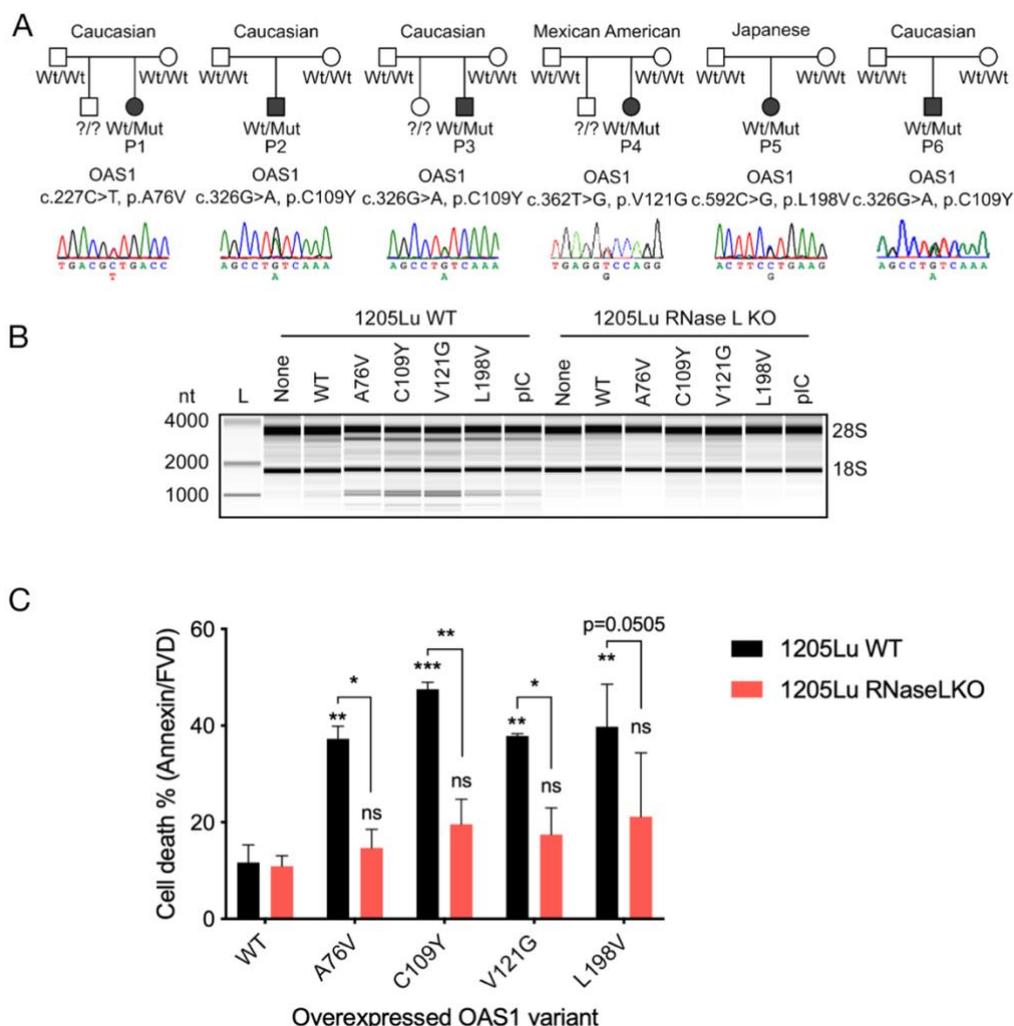


Abbildung 4: Vier heterozygote *de novo*-Mutationen im Gen *OAS1* in sechs verschiedenen Patienten (A) manifestierten sich klinisch in einer alveolaren Proteinose und autoinflammatorischen Symptomen und einer Dysfunktion von Monozyten und B-Zellen. Durch Klonierung der Mutationen und Untersuchung im Zellkultursystem konnten wir zeigen, dass alle Mutation zu einer konstitutiv-aktiven Variante von OAS1

führen, die RNase L aktiviert und zur Degradation von rRNA führt (B) und RNase L-abhängig Zelltod auslöst (C) (modifiziert aus Magg et al, 2021).

In einer weiteren gemeinsamen Arbeit mit der AG Hauck haben wir eine autosomal-rezessive Form einer *loss-of-function*-Mutation in STAT1 beschrieben (Boehmer et al., 2020). Die Mutation führt zu einem Verschieben des Leserasters und somit zum kompletten Fehlen von STAT1 im Patienten. Klinisch wurde ein Immundefizienz mit wiederkehrenden starken viralen Infektionen und einer hämophagozytische Lymphohistiozytose (HLH) beschrieben. PBMC des Patienten reagierten wie erwartet nicht auf die Stimulation mit IFN- α . Durch die fehlende antivirale Programmierung der Zellen wurde in einem *in vitro*-Virusmodell (Vesikuläres Stomatitis Virus, VSV) eine erhöhte Permissivität festgestellt. Wir stellten die Hypothese auf, dass es durch die erhöhte Viruslast zu einer verstärkten Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine kommt, die die HLH erklären könnte. In der Tat konnten wir eine verstärkte Sekretion von IL1 β , IL-6 und IL-18 in VSV-Infizierten Monozyten *in vitro* messen. Da diese Zytokine mit einer HLH assoziiert sind, könnte dies ein Pathomechanismus der HLH im untersuchten Patienten darstellen.

Neben Defekten in Proteinen immunologischer Signalwege können auch andere zelluläre Prozesse immunologische Auswirkungen haben, wenn ihre Homöostase gestört ist. In den letzten Jahren ist immer deutlicher geworden, dass bestimmte zelluläre Stresssituation wie beispielsweise die Auflösung der mitochondrialen Integrität, Replikationsstress oder DNA-Doppelstrangbrüche auch zur Aktivierung von Nukleinsäurerezeptoren der angeborenen Immunität führen können, indem es zur Relokalisation oder Produktion von endogenen Liganden kommt (Chen & Hur, 2022). Damit sind diese Rezeptoren nicht nur für die Erkennung von Pathogenen, sondern auch für die Erkennung von Zellveränderungen entscheidend. Ein Beispiel für einen homöostatischen Prozess, dessen Fehlen eine IFN-Antwort auslöst, konnte ich zusammen mit der Gruppe von Prof. Travis Stracker (IRB, Barcelona) beschreiben (Segura-Bayona et al., 2020). Die *Tousled-like kinases 1* und *2* (TLK1/2) kontrollieren die Funktionen von H3/H4 Histon-Chaperonen und sind wichtig für die Erhaltung der DNA-Stabilität während der Replikation, DNA-Reparatur und Transkription. Bei Depletion von TLK1/2 kommt es zu einer epigenetischen Deregulation, wodurch repetitive Elemente des Genoms, wie zum Beispiel endogene retrovirale Elemente, *non-coding (nc)* RNA und *extrachromosomale telomeric repeats*, wieder transkribiert werden. Die entstehenden Nukleinsäuren werden über den zytoplasmatischen DNA-Sensor cGAS erkannt, der über Aktivierung des Adapterproteins STING eine IFN-Antwort auslöst. Es konnte gezeigt werden, dass TLK1/2 in einigen Tumoren überexprimiert sind, um eine Erkennung durch das Immunsystem zu verhindern.

Mit diesen Beiträgen konnten ich zum Verständnis einiger autoinflammatorischer Pathomechanismen beitragen und wichtige Hinweise auf die Funktionsweise verschiedener Signalwege in der angeborenen Immunität geben.

2.5 Immunsuppression durch myeloide Zellen im Tumorgewebe

Spätestens durch den großen Erfolg von sogenannten Immuncheckpoint-Inhibitoren (ICI) - therapeutische Antikörper, die gegen CTLA-4 oder PD(-L)1 gerichtet sind - wurde deutlich, dass das Immunsystem in der Lage ist, Tumorzellen von normalen Zellen zu unterscheiden und zu eliminieren. Die ICI-Therapie führt allerdings nur bei einem Teil der Patienten zum langhaltenden Therapieerfolg. Die meisten Patienten profitieren nicht oder entwickeln im Therapieverlauf Resistenzmechanismen (Sharma et al., 2017). Die Gründe dafür können vielfältig sein, jedoch zeichnet sich ab, dass Tumoren, die bereits eine Infiltration von Lymphozyten haben, ein besseres Ansprechen auf die Therapie aufweisen. Außerdem hat die *tumor immune microenvironment* (TIME) einen großen Einfluss auf die antitumorale Immunantwort (Binnewies et al., 2018). Dabei können sowohl immuninhibierende Rezeptoren auf Tumorzellen wie der beschriebene PD-L1-Rezeptor, als auch die Sekretion von inhibitorischen Zytokinen, wie IL-10 und TGF- β , sowie die Rekrutierung von immunregulatorischen Zellen, wie regulatorischen T-Zellen (T_{regs}), *myeloid-derived suppressor cells* (MDSCs) und Makrophagen dazu führen, dass eine Immunantwort gegen den Tumor unterdrückt wird. Viele Studien zeigen, dass eine Immunzellphänotypisierung von Tumoren einen genaueren prognostischen Wert besitzt als die klassische *Staging*- und *Grading*-Klassifikation und eine Basis für gezieltere Therapien liefern könnte (Bruni et al., 2020; Thorsson et al., 2018).

Das Pankreaskarzinom ist durch eine besonders starke immunsuppressive Stromabildung charakterisiert. Insbesondere tragen sogenannte MDSCs zum immunsuppressiven Milieu des Tumors bei (Jiang et al., 2016). MDSCs sind kurzlebige Zellen, die von ihrer Abstammung in polymorphonukleäre MDSCs (PMN-MDSCs) und monozytäre MDSCs (M-MDSCs) unterteilt werden (Bronte et al., 2016). Bekanntermaßen geht eine erhöhte Frequenz von suppressiven Immunzellen mit einer schlechteren Prognose einher (Porembka et al., 2012). Durch vom Tumor sezernierte Faktoren führen zu einer Expansion dieser Zellpopulationen bei Tumorpatienten (Markowitz et al., 2015) und zu einer verstärkten Rekrutierung in das Tumorgewebe (Jiang et al., 2016). Dort inhibieren sie die Immunantwort gegen die Tumorzellen und fördern das Tumorstadium durch Aktivierung von Angiogenese- und Wundheilungsprogrammen. Ein Ziel der Immuntherapie muss folglich sein, die immunsuppressive TIME so umzuprogrammieren, dass eine antitumorale adaptive Immunantwort effektiv wirken kann. Aus diesem Grund haben wir den Einfluss der oben beschriebenen RNA-Liganden von RLHs auf die immunsuppressiven Eigenschaften von MDSCs untersucht. Dazu wurde die Immuninfiltration in einem präklinischen orthotopen Mausmodell des Pankreaskarzinoms analysiert. Mit zunehmender Tumorgroße stieg auch die Anzahl der MDSCs in der Peripherie und im Tumor an und korrelierte im Tumor invers mit dem Vorhandensein von Lymphozyten. Die MDSCs von Tumor-tragenden Mäusen zeigte eine deutliche Inhibition der T-Zellproliferation in *in vitro*-Experimenten. Vergleichspopulationen von M- und PMN-MDSCs aus gesunden Mäusen hatten diese Eigenschaften nicht. Nach systemischer Gabe von polyinosinic-polycytidylic acid (poly(I:C)), einem synthetischen Doppelstrang-RNA-Analogon, welches MDA5 aktiviert und analog zur RIG-I-Aktivierung zur Ausschüttung von Typ I IFN und anderen proinflammatorischen Zytokinen führt, wurde die TIME deutlich umstrukturiert. Der Anteil an PMN-MDSCs wurde durch die Therapie reduziert und die inhibitorischen Eigenschaften von PMN-MDSCs und M-MDSCs auf T-Zellproliferation signifikant reduziert. Durch eine Transkriptomanalyse beider MDSCs-Populationen konnten wir zeigen, dass die Zellen eine IFN-Signatur aufweisen und die Genexpressionsmuster weniger einer immunsuppressiven M2-Signatur als einer proinflammatorischen M1-Polarisation entsprechen, die mit einer antitumoralen Aktivität

verbunden ist. Die Daten zeigen, dass eine Aktivierung von RLH zu einer Reprogrammierung von MDSCs in einen weniger immunsuppressiven Zustand führen (**Metzger et al., 2019**). Dies könnte ein weiterer Faktor in der erfolgreichen Kombination aus RIG-I-Liganden mit Immuncheckpoint-Inhibitoren sein, wie sie in Kapitel 2.1 aufgezeigt wurde.

Neben der direkten Umprogrammierung von MDSCs in der TIME könnte unter Umständen auch die Differenzierung von Vorläuferzellen in MDSCs als therapeutisches Ziel genutzt werden. *Interferon regulatory factor 4* (IRF4) ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor in der Entwicklung von B- und T-Zellen, aber auch myeloiden Zellen. Die IRF4-Expression wird durch Zytokine induziert, die eine M2 Makrophagenpolarisation vermitteln (IL-4 und IL-13) (Chartouni et al., 2010). IRF4 reguliert selbst die M2-Polarisation, indem es M2-Effektorgene wie Arg1 induziert (Sato et al., 2010). Eine Studie gab Hinweise darauf, dass IRF4 die Differenzierungs- und Suppressionsfunktion von MDSCs regulieren kann (Nam et al., 2016), was uns veranlasst hat, die Rolle von IRF4 spezifisch für PMN- und M-MDSCs zu untersuchen. Wir konnten zunächst zeigen, dass Mäuse mit globalem IRF4-*knockout* ein deutlich beschleunigtes Wachstum von Tumoren in einem orthotopen Pankreaskarzinom (PDAC)-Mausmodell aufzeigen. Dies ging mit einer erhöhten Anzahl von PMN-MDSCs in der Milz und im Tumor der Mäuse einher. Um den zellspezifischen Effekt der IRF4-Expression in PMN- und M-MDSCs zu untersuchen, haben wir Mäuse mit zellspezifischer IRF4-Defizienz in PMN- (*Ly6G^{Cre}Irf4^{fl/fl}*) und M-MDSCs (*LysM^{Cre}Irf4^{fl/fl}*) erzeugt. Wir konnten zeigen, dass - anders als publiziert - M-MDSCs, aber nicht PMN-MDSCs, IRF4 exprimieren. Die zellspezifische Deletion von IRF4 hatte jedoch keinen Einfluss auf das Tumorstadium. IRF4 ist für die Immunsuppressivität von MDSCs folglich nicht von Bedeutung (**Metzger et al., 2020**).

In einer eher technischen Arbeit konnten wir einen wichtigen Fallstrick in der Untersuchung der Wirkweise von ICI aufzeigen. Aufgrund der enormen Erfolge der PD-(L)1-Blockade in der Immuntherapie wurde im Versuch der mechanistischen Aufklärung die Expression von PD-1 auf einer Vielzahl von Immunzellen untersucht. Einige Publikationen zeigten die Expression auf einer kleinen Population von myeloiden Zellen und Tumorzellen. Beim Versuch der Reproduktion, eine PD-1-Expression auf myeloiden Zellen nachzuweisen, ist aufgefallen, dass vor allem tote Zellen positiv wurden. Wir konnten zeigen, dass der allgemein genutzte anti-PD-1 Antikörper (Klon: 29F.1A12) ein intrazelluläres Antigen erkennt, sobald die Membranintegrität gestört ist. Eine PD-1-Färbung auf Zellen setzt folglich einen sehr sorgfältigen Ausschluss von toten Zellen während der durchflusszytometrischen Analyse voraus, um falsche Interpretation der Daten zu vermeiden (**Metzger et al., 2018**).

2.6 Neutrophile in COVID-19 und potenzielle Therapie durch CXCR2-Antagonisten

In den ersten Monaten der Pandemie mehrten sich die Hinweise, dass eine überschießende Immunreaktion deutlich zur Pathogenese von COVID-19 beiträgt. Während der Großteil der Arbeiten inflammatorische Monozyten untersuchten, gab es in mehreren Arbeiten deutliche Hinweise auf eine Dysbalance der Immunantwort gegen SARS-CoV-2-infizierte Zellen. Dabei bewirken Virusproteine selbst, dass die Produktion bestimmter antivirale Zytokine, vor allem Typ I Interferon, inhibiert wird und stattdessen Zytokine und Chemokine produziert werden, die zwar adäquat für die Bekämpfung einer bakteriellen Infektion geeignet sind, nicht aber einer Virusinfektion. Passend dazu gab es Beschreibungen, dass überaktivierte Neutrophile, die durch

Produktion von *neutrophil extracellular traps* (NETs) und *reactive oxygen species* (ROS) – während einer bakteriellen Infektion essenzielle Abwehrmechanismen – die beobachteten Beschädigungen des Lungengewebes verursachen könnten (vgl. Abb 7). In einem Viewpoint-Artikel im *Journal of Experimental Medicine* haben wir diese Hinweise zusammengefasst und die Inhibition des Chemokin-Rezeptors CXCR2, der die Rekrutierung und Aktivierung von Neutrophilen vermittelt, als mögliche Therapieoption diskutiert (Koenig et al., 2020). Einige Monate später wurde eine klinische Studie mit Reparixin, einem von Dompé Farmaceutical entwickelter CXCR2-Antagonist, initiiert. Ergebnisse liegen jedoch noch nicht vor.

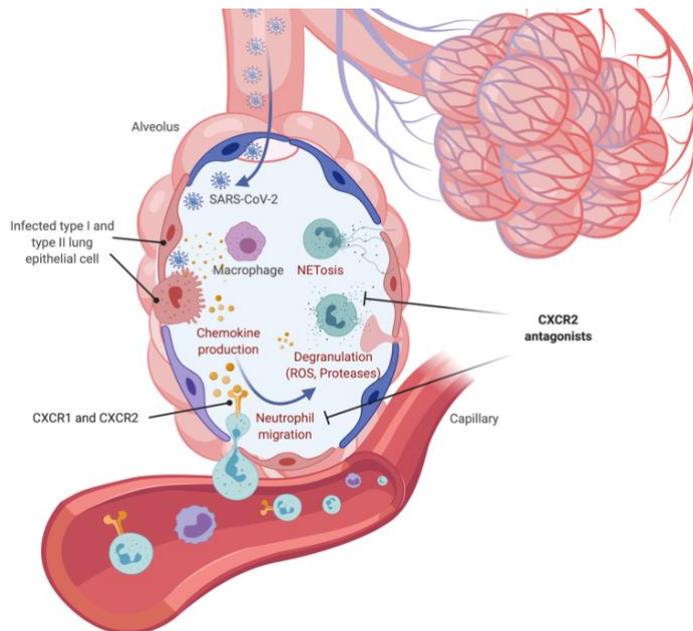


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Infiltration und Aktivierung von Neutrophilen in SARS-CoV-2-infizierte Lungen. Nach Infektion produzieren Epithelzellen der Lunge und Zellen des angeborenen Immunsystems Chemokine wie CXCL1, CXCL2, CXCL5 und CXCL8, die neutrophile Granulozyten durch ihre Chemokinrezeptoren CXCR1 und CXCR2 rekrutieren. Durch eine unbalancierte und übertriebene Aktivierung der Neutrophilen kommt es zu einer Ausschüttung von antimikrobiellen Substanzen wie ROS, Proteasen und NETs, die starke Kollateralschäden im Lungengewebe verursachen können. Eine Blockade der Neutrophilrekrutierung und -aktivierung durch CXCR2-Antagonisten könnte somit eine vielversprechende Therapieoption darstellen (aus König et al. 2020).

3 Zusammenfassung und Ausblick

Meine wissenschaftlichen Beiträge tragen zum besseren Verständnis von Prozessen der angeborenen Immunität im Kontext der Tumormimmuntherapie und autoinflammatorischen Erkrankungen bei. Wir konnten zeigen, dass eine RIG-I-basierte Immuntherapie nicht nur in soliden, sondern auch nicht-soliden Tumoren durch eine systemische Immunaktivierung therapeutische Wirkung entfaltet. Die Aufschlüsselung der Zelltodmechanismen nach 3p-RNA in Tumorzellen verbessert das Verständnis der zellulären Entscheidung zwischen Zytokininduktion und Zelltod während einer viralen Infektion und legt den Grundstein für optimierte 3p-RNA-basierte Liganden für die Tumormimmuntherapie. Mit dem Wissen, dass zwei Rezeptorsystem, RIG-I und OAS1, die unterschiedlichen Zelleffekte auslösen, kann die Balance zwischen Zytokinachse und Zelltodachse durch Anpassung der Ligandeneigenschaften neu justiert werden. Wir konnten bereits Zelltod-optimierte Liganden erstellen, die eine verbesserte Wirkung in der Immuntherapie gegen Tumoren zeigen und verfolgen eine mögliche Translation dieser Ergebnisse. Es ist davon auszugehen, dass eine nachhaltige Immuntherapie von Tumoren nur mit einer Kombination verschiedener immuntherapeutischer Ansätze erzielt werden kann. Wir konnten zudem zeigen, dass die Kombination mit ICI den Therapieeffekt einer Monotherapie mit 3p-RNA oder ICI deutlich überlegen ist. Zusätzlich erhöht eine vorbereitende Therapie mit 3p-RNA die Infiltration, Aktivierung und Persistenz von CAR-T-Zellen in soliden

präklinischen Tumormodellen. Interessanterweise wurde auch die Immunogenität des durch CAR-T-Zellen in Tumorzellen ausgelösten Zelltods gesteigert, wodurch eine endogene *de novo*-Immunantwort gegen verschiedene Tumorantigene erzeugt werden kann (*Antigen-spreading*), die den Tumor unabhängig von der CAR-Zielstruktur angreifbar macht. *Antigen-spreading* gilt als zentraler Faktor in der Entstehung einer nachhaltigen Immunantwort gegen Tumoren.

Die Therapie mit Liganden von RLHs führen zu einer Typ I IFN-abhängigen Reprogrammierung von immunsuppressiven myeloiden Zellen im Tumorgewebe in einen weniger suppressiven Zustand, was eine erfolgreiche Immuntherapie begünstigt. Myeloide Zellen wie MDSCs, Neutrophile und Tumor-assoziierte Makrophagen sind in vielen Tumoren mit einer negativen Prognose assoziiert. Erst in den letzten Jahren wurden die verschiedenen Subtypen dieser myeloiden Zellen besser definiert und der Versuch unternommen, anti- und protumorale Subpopulationen zu unterscheiden. Besonders neutrophile Granulozyten oder PMN-MDSCs sind noch immer ungenügend definiert. In aktuellen Projekten untersucht meine Arbeitsgruppe diese Zellen mit einem hochdimensionalen Oberflächenmarker-Screen phänotypisch und funktionell, um neue spezifische Zielstrukturen für die Inhibition protumoraler myeloider Zellen zu definieren und die Immuntherapie von Tumoren mit starker immunsuppressiver TIME zu verbessern.

4 Literaturverzeichnis

- Bald, T., Landsberg, J., Lopez-Ramos, D., Renn, M., Glodde, N., Jansen, P., Gaffal, E., Steitz, J., Tolba, R., Kalinke, U., Limmer, A., Jönsson, G., Hölzel, M., & Tüting, T. (2014). Immune Cell-Poor Melanomas Benefit from PD-1 Blockade after Targeted Type I IFN Activation. *Cancer Discovery*, 4(6), 674–687.
- Bek, S., Stritzke, F., Wintges, A., Nedelko, T., Böhmer, D. F. R., Fischer, J. C., Haas, T., Poeck, H., & Heidegger, S. (2019). Targeting intrinsic RIG-I signaling turns melanoma cells into type I interferon-releasing cellular antitumor vaccines. *Onc Immunology*, 8(4), 1–9.
- Besch, R., Poeck, H., Hohenauer, T., Senft, D., Häcker, G., Berking, C., Hornung, V., Endres, S., Ruzicka, T., Rothenfusser, S., & Hartmann, G. (2009). Proapoptotic signaling induced by RIG-I and MDA-5 results in type I interferon-independent apoptosis in human melanoma cells. *Journal of Clinical Investigation*, 119(8), 2399–2411.
- Binnewies, M., Roberts, E. W., Kersten, K., Chan, V., Fearon, D. F., Merad, M., Coussens, L. M., Gabilovich, D. I., Ostrand-Rosenberg, S., Hedrick, C. C., Vonderheide, R. H., Pittet, M. J., Jain, R. K., Zou, W., Howcroft, T. K., Woodhouse, E. C., Weinberg, R. A., & Krummel, M. F. (2018). Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nature Medicine*, 24(5), 541–550.
- Boehmer, D. F. R., Formisano, S., Mann, C. C. de O., Mueller, S. A., Kluge, M., Metzger, P., Rohlf, M., Hörth, C., Kocheise, L., Lichtenthaler, S. F., Hopfner, K.-P., Endres, S., Rothenfusser, S., Friedel, C. C., Duewell, P., Schnurr, M., & Koenig, L. M. (2021). OAS1/RNase L executes RIG-I ligand-dependent tumor cell apoptosis. *Science Immunology*, 6(61), eabe2550.
- Boehmer, D. F. R., Koehler, L. M., Magg, T., Metzger, P., Rohlf, M., Ahlfeld, J., Rack-Hoch, A., Reiter, K., Albert, M. H., Endres, S., Rothenfusser, S., Klein, C., Koenig, L. M., & Hauck, F. (2020). A novel complete autosomal recessive STAT1 LOF variant causes immunodeficiency with hemophagocytic lymphohistiocytosis-like hyperinflammation. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, 8(9), 3102–3111.
- Bronte, V., Brandau, S., Chen, S.-H., Colombo, M. P., Frey, A. B., Greten, T. F., Mandruzzato, S., Murray, P. J., Ochoa, A., Ostrand-Rosenberg, S., Rodriguez, P. C., Sica, A., Umansky, V., Vonderheide, R. H., & Gabilovich, D. I. (2016). Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nature Communications*, 7(1), 12150.
- Bruni, D., Angell, H. K., & Galon, J. (2020). The immune contexture and Immunoscore in cancer prognosis and therapeutic efficacy. *Nature Reviews Cancer*, 20(11), 662–680.
- Burke, J. M., Moon, S. L., Matheny, T., & Parker, R. (2019). RNase L Reprograms Translation by Widespread mRNA Turnover Escaped by Antiviral mRNAs. *Molecular Cell*, 75(6), 1203–1217.e5.
- Chartouni, C. E., Schwarzfischer, L., & Rehli, M. (2010). Interleukin-4 induced interferon regulatory factor (Irf) 4 participates in the regulation of alternative macrophage priming. *Immunobiology*, 215(9–10), 821–825.

- Chattopadhyay, S., Kuzmanovic, T., Zhang, Y., Wetzel, J. L., & Sen, G. C. (2016). Ubiquitination of the Transcription Factor IRF-3 Activates RIPA, the Apoptotic Pathway that Protects Mice from Viral Pathogenesis. *Immunity*, *44*(5), 1151–1161.
- Chattopadhyay, S., Marques, J. T., Yamashita, M., Peters, K. L., Smith, K., Desai, A., Williams, B. R. G., & Sen, G. C. (2010). Viral apoptosis is induced by IRF-3-mediated activation of Bax. *The EMBO Journal*, *29*(10), 1762–1773.
- Chen, Y. G., & Hur, S. (2022). Cellular origins of dsRNA, their recognition and consequences. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *23*(4), 286–301.
- DeNardo, D. G., & Ruffell, B. (2019). Macrophages as regulators of tumour immunity and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, *19*(6), 369–382.
- Duewell, P., Steger, A., Lohr, H., Bourhis, H., Hoelz, H., Kirchleitner, S. V., Stieg, M. R., Grassmann, S., Kobold, S., Siveke, J. T., Endres, S., & Schnurr, M. (2014). RIG-I-like helicases induce immunogenic cell death of pancreatic cancer cells and sensitize tumors toward killing by CD8+ T cells. *Cell Death & Differentiation*, *21*(12), 1825–1837.
- Elion, D. L., Jacobson, M. E., Hicks, D. J., Rahman, B., Sanchez, V., Gonzalez-Ericsson, P. I., Fedorova, O., Pyle, A. M., Wilson, J. T., & Cook, R. S. (2018). Therapeutically active RIG-I agonist induces immunogenic tumor cell killing in breast cancers. *Cancer Research*, *78*(21), canres.0730.2018.
- Ellermeier, J., Wei, J., Duewell, P., Hoves, S., Stieg, M. R., Adunka, T., Noerenberg, D., Anders, H.-J., Mayr, D., Poeck, H., Hartmann, G., Endres, S., & Schnurr, M. (2013). Therapeutic Efficacy of Bifunctional siRNA Combining TGF- β 1 Silencing with RIG-I Activation in Pancreatic Cancer. *Cancer Research*, *73*(6), 1709–1720.
- Engels, N., König, L. M., Heemann, C., Lutz, J., Tsubata, T., Griep, S., Schrader, V., & Wienands, J. (2009). Recruitment of the cytoplasmic adaptor Grb2 to surface IgG and IgE provides antigen receptor–intrinsic costimulation to class-switched B cells. *Nature Immunology*, *10*(9), 1018–1025.
- Engels, N., König, L. M., Schulze, W., Radtke, D., Vanshylla, K., Lutz, J., Winkler, T. H., Nitschke, L., & Wienands, J. (2014). The immunoglobulin tail tyrosine motif upgrades memory-type BCRs by incorporating a Grb2-Btk signalling module. *Nature Communications*, *5*(1), 5456.
- Franchi, L., Eigenbrod, T., Muñoz-Planillo, R., Ozkurede, U., Kim, Y.-G., Chakrabarti, A., Gale, M., Silverman, R. H., Colonna, M., Akira, S., & Núñez, G. (2014). Cytosolic Double-Stranded RNA Activates the NLRP3 Inflammasome via MAVS-Induced Membrane Permeabilization and K⁺ Efflux. *The Journal of Immunology*, *193*(8), 4214–4222.
- Fu, J., Kanne, D. B., Leong, M., Glickman, L. H., McWhirter, S. M., Lemmens, E., Mechette, K., Leong, J. J., Lauer, P., Liu, W., Sivick, K. E., Zeng, Q., Soares, K. C., Zheng, L., Portnoy, D. A., Woodward, J. J., Pardoll, D. M., Dubensky, T. W., & Kim, Y. (2015). STING agonist formulated cancer vaccines can cure established tumors resistant to PD-1 blockade. *Science Translational Medicine*, *7*(283), 283ra52-283ra52.
- Galluzzi, L., Buqué, A., Kepp, O., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2016). Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. *Nature Reviews Immunology*, *17*(2), 97–111.

- Helms, M. W., Jahn-Hofmann, K., Gnerlich, F., Metz-Weidmann, C., Braun, M., Dietert, G., Scherer, P., Grandien, K., Theilhaber, J., Cao, H., Wagenaar, T. R., Schnurr, M. M., Endres, S., Wiederschain, D., Scheidler, S., Rothenfußer, S., Brunner, B., & König, L. M. (2019). Utility of the RIG-I Agonist Triphosphate RNA for Melanoma Therapy. *Molecular Cancer Therapeutics*, 18(12), 2343–2356.
- Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzózka, K., Jung, A., Kato, H., Poeck, H., Akira, S., Conzelmann, K.-K., Schlee, M., Endres, S., & Hartmann, G. (2006). 5'-Triphosphate RNA Is the Ligand for RIG-I. *Science*, 314(5801), 994–997.
- Jaime-Sanchez, P., Uranga-Murillo, I., Aguilo, N., Khouili, S. C., Arias, M. A., Sancho, D., & Pardo, J. (2020). Cell death induced by cytotoxic CD8+ T cells is immunogenic and primes caspase-3–dependent spread immunity against endogenous tumor antigens. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 8(1), e000528.
- Jiang, H., Hegde, S., Knolhoff, B. L., Zhu, Y., Herndon, J. M., Meyer, M. A., Nywening, T. M., Hawkins, W. G., Shapiro, I. M., Weaver, D. T., Pachter, J. A., Wang-Gillam, A., & DeNardo, D. G. (2016). Targeting focal adhesion kinase renders pancreatic cancers responsive to checkpoint immunotherapy. *Nature Medicine*, 22(8), 851–860.
- Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T., Ishii, K. J., Yamaguchi, O., Otsu, K., Tsujimura, T., Koh, C.-S., Sousa, C. R. e, Matsuura, Y., Fujita, T., & Akira, S. (2006). Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature*, 441(7089), 101–105.
- Kell, A. M., & Gale, M. (2015). RIG-I in RNA virus recognition. *Virology*, 479(C), 110–121.
- Koenig, L. M., Boehmer, D. F. R., Metzger, P., Schnurr, M., Endres, S., & Rothenfusser, S. (2020). Blocking inflammation on the way: Rationale for CXCR2 antagonists for the treatment of COVID-19. *Journal of Experimental Medicine*, 217(9).
- Kumar, S., Ingle, H., Mishra, S., Mahla, R. S., Kumar, A., Kawai, T., Akira, S., Takaoka, A., Raut, A. A., & Kumar, H. (2019). IPS-1 differentially induces TRAIL, BCL2, BIRC3 and PRKCE in type I interferons-dependent and -independent anticancer activity. *Cell Death & Disease*, 6(5), e1758–e1758.
- Lesch, S., Blumenberg, V., Stoiber, S., Gottschlich, A., Ogonek, J., Cadilha, B. L., Dantes, Z., Rataj, F., Dorman, K., Lutz, J., Karches, C. H., Heise, C., Kurzay, M., Larimer, B. M., Grassmann, S., Rapp, M., Nottebrock, A., Kruger, S., Tokarew, N., ... Kobold, S. (2021). T cells armed with C-X-C chemokine receptor type 6 enhance adoptive cell therapy for pancreatic tumours. *Nature Biomedical Engineering*, 1–15.
- Maadidi, S. E., Faletti, L., Berg, B., Wenzl, C., Wieland, K., Chen, Z. J., Maurer, U., & Borner, C. (2014). A Novel Mitochondrial MAVS/Caspase-8 Platform Links RNA Virus–Induced Innate Antiviral Signaling to Bax/Bak-Independent Apoptosis. *The Journal of Immunology*, 192(3), 1171–1183.
- Magg, T., Okano, T., Koenig, L. M., Boehmer, D. F. R., Schwartz, S. L., Inoue, K., Heimall, J., Licciardi, F., Ley-Zaporozhan, J., Ferdman, R. M., Caballero-Oteyza, A., Park, E. N., Calderon, B. M., Dey, D., Kanegane, H., Cho, K., Montin, D., Reiter, K., Griese, M., ... Hauck, F. (2021). Heterozygous OAS1 gain-of-function variants cause an autoinflammatory immunodeficiency. *Science Immunology*, 6(60), eabf9564.

- Markowitz, J., Brooks, T. R., Duggan, M. C., Paul, B. K., Pan, X., Wei, L., Abrams, Z., Luedke, E., Lesinski, G. B., Mundy-Bosse, B., Bekaii-Saab, T., & Carson, W. E. (2015). Patients with pancreatic adenocarcinoma exhibit elevated levels of myeloid-derived suppressor cells upon progression of disease. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, *64*(2), 149–159.
- Matsushima-Miyagi, T., Hatano, K., Nomura, M., Li-Wen, L., Nishikawa, T., Saga, K., Shimbo, T., & Kaneda, Y. (2012). TRAIL and Noxa Are Selectively Upregulated in Prostate Cancer Cells Downstream of the RIG-I/MAVS Signaling Pathway by Nonreplicating Sendai Virus Particles. *Clinical Cancer Research*, *18*(22), 6271–6283.
- Metzger, P., Kirchleitner, S. V., Boehmer, D. F. R., Hörth, C., Eisele, A., Ormanns, S., Gunzer, M., Lech, M., Lauber, K., Endres, S., Duester, P., Schnurr, M., & König, L. M. (2020). Systemic but not MDSCs-specific IRF4 deficiency promotes an immunosuppressed tumor microenvironment in a murine pancreatic cancer model. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, *69*(10), 2101–2112.
- Metzger, P., Kirchleitner, S. V., Kluge, M., Koenig, L. M., Hörth, C., Rambuschek, C. A., Böhmer, D., Ahlfeld, J., Kobold, S., Friedel, C. C., Endres, S., Schnurr, M., & Duester, P. (2019). Immunostimulatory RNA leads to functional reprogramming of myeloid-derived suppressor cells in pancreatic cancer. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, *7*(1), 288.
- Metzger, P., Kirchleitner, S. V., Koenig, L. M., Hörth, C., Kobold, S., Endres, S., Schnurr, M., & Duester, P. (2018). Dying cells expose a nuclear antigen cross-reacting with anti-PD-1 monoclonal antibodies. *Scientific Reports*, *8*(1), 8810.
- Minn, A. J. (2015). Interferons and the Immunogenic Effects of Cancer Therapy. *Trends in Immunology*, *36*(11), 725–737.
- Minute, L., Teijeira, A., Sanchez-Paulete, A. R., Ochoa, M. C., Alvarez, M., Otano, I., Etxeberria, I., Bolaños, E., Azpilikueta, A., Garasa, S., Casares, N., Gracia, J. L. P., Rodriguez-Ruiz, M. E., Berraondo, P., & Melero, I. (2020). Cellular cytotoxicity is a form of immunogenic cell death. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, *8*(1), e000325.
- Nam, S., Kang, K., Cha, J. S., Kim, J. W., Lee, H. G., Kim, Y., Yang, Y., Lee, M.-S., & Lim, J.-S. (2016). Interferon regulatory factor 4 (IRF4) controls myeloid-derived suppressor cell (MDSCs) differentiation and function. *Journal of Leukocyte Biology*, *100*(6), 1273–1284.
- Naour, J. L., Zitvogel, L., Galluzzi, L., Vacchelli, E., & Kroemer, G. (2020). Trial watch: STING agonists in cancer therapy. *Oncoimmunology*, *9*(1), 1777624.
- Poock, H., Besch, R., Maihoefer, C., Renn, M., Tormo, D., Morskaya, S. S., Kirschnek, S., Gaffal, E., Landsberg, J., Hellmuth, J., Schmidt, A., Anz, D., Bscheider, M., Schwerd, T., Berking, C., Bourquin, C., Kalinke, U., Kremmer, E., Kato, H., ... Hartmann, G. (2008). 5'-triphosphate-siRNA: turning gene silencing and RIG-I activation against melanoma. *Nature Medicine*, *14*(11), 1256–1263.
- Porembka, M. R., Mitchem, J. B., Belt, B. A., Hsieh, C.-S., Lee, H.-M., Herndon, J., Gillanders, W. E., Linehan, D. C., & Goedegebuure, P. (2012). Pancreatic adenocarcinoma induces bone marrow mobilization of myeloid-derived suppressor cells which promote primary tumor growth. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, *61*(9), 1373–1385.

- Pothlichet, J., Meunier, I., Davis, B. K., Ting, J. P.-Y., Skamene, E., Messling, V. von, & Vidal, S. M. (2013). Type I IFN Triggers RIG-I/TLR3/NLRP3-dependent Inflammasome Activation in Influenza A Virus Infected Cells. *PLoS Pathogens*, *9*(4), e1003256.
- Rath, S., Prangle, E., Donovan, J., Demarest, K., Wingreen, N. S., Meir, Y., & Korennykh, A. (2019). Concerted 2-5A-Mediated mRNA Decay and Transcription Reprogram Protein Synthesis in the dsRNA Response. *Molecular Cell*, *75*(6), 1218-1228.e6.
- Roers, A., Hiller, B., & Hornung, V. (2016). Recognition of Endogenous Nucleic Acids by the Innate Immune System. *Immunity*, *44*(4), 739–754.
- Ruzicka, M., Koenig, L. M., Formisano, S., Boehmer, D. F. R., Vick, B., Heuer, E.-M., Meini, H., Kocheise, L., Zeithöfler, M., Ahlfeld, J., Kobold, S., Endres, S., Subklewe, M., Duewell, P., Schnurr, M., Jeremias, I., Lichtenegger, F. S., & Rothenfusser, S. (2020). RIG-I-based immunotherapy enhances survival in preclinical AML models and sensitizes AML cells to checkpoint blockade. *Leukemia*, *34*(4), 1017–1026.
- Satoh, T., Takeuchi, O., Vandenbon, A., Yasuda, K., Tanaka, Y., Kumagai, Y., Miyake, T., Matsushita, K., Okazaki, T., Saitoh, T., Honma, K., Matsuyama, T., Yui, K., Tsujimura, T., Standley, D. M., Nakanishi, K., Nakai, K., & Akira, S. (2010). The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection. *Nature Immunology*, *11*(10), 936–944.
- Schlee, M., & Hartmann, G. (2016). Discriminating self from non-self in nucleic acid sensing. *Nature Reviews Immunology*, *16*(9), 566–580.
- Schlee, M., Roth, A., Hornung, V., Hagmann, C. A., Wimmenauer, V., Barchet, W., Coch, C., Janke, M., Mihailovic, A., Wardle, G., Juranek, S., Kato, H., Kawai, T., Poeck, H., Fitzgerald, K. A., Takeuchi, O., Akira, S., Tuschl, T., Latz, E., ... Hartmann, G. (2009). Recognition of 5' Triphosphate by RIG-I Helicase Requires Short Blunt Double-Stranded RNA as Contained in Panhandle of Negative-Strand Virus. *Immunity*, *31*(1), 25–34.
- Schmidt, A., Schwerd, T., Hamm, W., Hellmuth, J. C., Cui, S., Wenzel, M., Hoffmann, F. S., Michallet, M.-C., Besch, R., Hopfner, K.-P., Endres, S., & Rothenfusser, S. (2009). 5'-triphosphate RNA requires base-paired structures to activate antiviral signaling via RIG-I. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(29), 12067–12072.
- Schnurr, M., & Duewell, P. (2013). Breaking tumor-induced immunosuppression with 5'-triphosphate siRNA silencing TGF β and activating RIG-I. *Oncotarget*, *2*(5), e24170.
- Schock, S. N., Chandra, N. V., Sun, Y., Irie, T., Kitagawa, Y., Gotoh, B., Coscoy, L., & Winoto, A. (2017). Induction of necroptotic cell death by viral activation of the RIG-I or STING pathway. *Cell Death & Differentiation*, *24*(4), 615–625.
- Schreiber, R. D., Old, L. J., & Smyth, M. J. (2011). Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science*, *331*(6024), 1565–1570.
- Schwartz, S. L., & Conn, G. L. (2019). RNA regulation of the antiviral protein 2'-5'-oligoadenylate synthetase. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, *10*(4), e1534.
- Segura-Bayona, S., Villamor-Payà, M., Attolini, C. S.-O., Koenig, L. M., Sanchiz-Calvo, M., Boulton, S. J., & Stracker, T. H. (2020). Tinsled-Like Kinases Suppress Innate Immune Signaling Triggered by Alternative Lengthening of Telomeres. *Cell Reports*, *32*(5), 107983.

- Sharma, P., Hu-Lieskovan, S., Wargo, J. A., & Ribas, A. (2017). Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell*, *168*(4), 707–723.
- Srivastava, S., Furlan, S. N., Jaeger-Ruckstuhl, C. A., Sarvothama, M., Berger, C., Smythe, K. S., Garrison, S. M., Specht, J. M., Lee, S. M., Amezquita, R. A., Voillet, V., Muhunthan, V., Yechan-Gunja, S., Pillai, S. P. S., Rader, C., Houghton, A. M., Pierce, R. H., Gottardo, R., Maloney, D. G., & Riddell, S. R. (2020). Immunogenic Chemotherapy Enhances Recruitment of CAR-T Cells to Lung Tumors and Improves Antitumor Efficacy when Combined with Checkpoint Blockade. *Cancer Cell*, *39*(2).
- Taniuchi, S., Miyake, M., Tsugawa, K., Oyadomari, M., & Oyadomari, S. (2016). Integrated stress response of vertebrates is regulated by four eIF2 α kinases. *Scientific Reports*, *6*(1), 32886.
- Thorsson, V., Gibbs, D. L., Brown, S. D., Wolf, D., Bortone, D. S., Yang, T.-H. O., Porta-Pardo, E., Gao, G. F., Plaisier, C. L., Eddy, J. A., Ziv, E., Culhane, A. C., Paull, E. O., Sivakumar, I. K. A., Gentles, A. J., Malhotra, R., Farshidfar, F., Colaprico, A., Parker, J. S., ... Shmulevich, Ilya. (2018). The Immune Landscape of Cancer. *Immunity*, *48*(4), 812-830.e14.
- Tormo, D., Chęcińska, A., Alonso-Curbelo, D., Pérez-Guijarro, E., Cañón, E., Riveiro-Falkenbach, E., Calvo, T. G., Larribere, L., Megías, D., Mulero, F., Piris, M. A., Dash, R., Barral, P. M., Rodríguez-Peralto, J. L., Ortiz-Romero, P., Tüting, T., Fisher, P. B., & Soengas, M. S. (2009). Targeted Activation of Innate Immunity for Therapeutic Induction of Autophagy and Apoptosis in Melanoma Cells. *Cancer Cell*, *16*(2), 103–114.
- Veglia, F., Perego, M., & Gabrilovich, D. (2018). Myeloid-derived suppressor cells coming of age. *Nature Immunology*, *19*(2), 108–119.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S., & Fujita, T. (2004). The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nature Immunology*, *5*(7), 730–737.

7 Danksagung

Zunächst möchte ich mich herzlich bei meinem Fachmentor Prof. Stefan Endres bedanken, der mich sehr gefördert hat und von dem ich sehr viel auf dem Weg bis zu dieser Habilitationsschrift lernen durfte. Seine unterstützende und motivierende Art - an der richtigen Stelle lenkend und dennoch viel Freiraum lassend – hat es mir ermöglicht, mich weiterzuentwickeln und meine Begeisterung für die akademischen Forschung nicht zu verlieren. Ein besonderer Dank gilt den weiteren Mitgliedern des Fachmentorats, Prof. Martin Kerschensteiner und Prof. Tobias Feuchtinger, die mich auf dem Weg zur Habilitation begleitet haben, unterstützend und fachlich wertvoll beratend zur Seite standen.

Prof. Max Schnurr, mit dem ich die Arbeitsgruppe leite und der mir ein guter Mentor und Freund ist. Seine fachlichen, beruflichen und persönlichen Ratschläge waren und sind für mich sehr wertvoll. Bei Prof. Simon Rothenfußer möchte ich mich ebenfalls für die guten fachlichen Diskussionen, dem guten persönlichen Austausch und die gemeinsamen Projekte bedanken. Daniel Böhmer hat als Doktorand in unsere Gruppe angefangen und ist lange Jahre als Postdoc ein treuer Wegbegleiter geblieben. Sein außerordentlicher Einsatz hat viele der hier vorgestellten Erkenntnisse hervorgebracht. Dafür möchte ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken. Vielen Dank auch an Peter Düwell, meinem Vorgänger und guten Freund, der mich sehr unterstützt hat und in und außerhalb des Labors ein hervorragender Weggefährte ist.

Die hier präsentierten Daten sind das Ergebnis einer gemeinsamen Arbeit vieler Mitglieder unserer Arbeitsgruppe und Kooperationspartner, bei denen ich mich hiermit herzlich für Ihren Einsatz, Ideen, Motivation und Unterstützung bedanken möchte. Sowohl die ehemaligen als auch die jetzigen Mitglieder der Arbeitsgruppe haben einen unvergleichlichen *spirit* und ich bin sehr dankbar für die hervorragende Zusammenarbeit. Neben den vielen Doktoranden, Masteranden und Postdocs sei hier vor allem Christine Hörth erwähnt, die seit Jahren hervorragende Arbeit im Labor abliefert.

Ich bedanke mich herzlich bei Monika Fahrenkamp, Katharina Dennemarck, Simone Gautier und Sonia Theodoridou, die die Abteilung perfekt am Laufen halten und eine große Hilfe sind.

Zu guter Letzt gilt mein besonderer Dank meiner Familie und meinen Freunden, die mich immer unterstützen, ermutigen und ermuntern und für gute Erholung neben und von der Arbeit sorgen! Die besonderen Menschen in meinem Leben mögen sich an dieser Stelle bitte persönlich angesprochen fühlen!

8 Der kumulativen Habilitationsschrift liegen folgende Originalarbeiten zu Grunde:

1. Niklas Engels, **Lars M. König**, Christina Heemann, Johannes Lutz, Sebastian Griep, Takeshi Tsubata, Verena Schrader, Jürgen Wienands. The immunoglobulin tail tyrosine of surface IgG and IgE provides antigen receptor-intrinsic costimulation to class-switched B cells. *Nature Immunology* **10**, 1018-1025 (2009). doi: [10.1038/ni.1764](https://doi.org/10.1038/ni.1764)
2. Juliane Winkler, Anja Seybert, **Lars König**, Sabine Pruggnaller, Uta Haselmann, Victor Sourjik, Matthias Weiss, Achilleas S. Frangakis, Axel Mogk, Bernd Bukau. Quantitative and spatio-temporal features of protein aggregation in *E. coli* and consequences on protein quality control and cellular aging. *The EMBO Journal* **29**, 910–923 (2010). doi: [10.1038/emboj.2009.412](https://doi.org/10.1038/emboj.2009.412)
3. Niklas Engels*, **Lars M. König***, Wiebke Schulze, Kanika Vanshylla, Johannes Lutz, Lars Nitschke, and Jürgen Wienands. The immunoglobulin tail tyrosine of mIgG amplifies B cell antigen receptor signaling via a Grb2-Btk axis. *Nature Communications* **5**, 5456 (2014). doi: [10.1038/ncomms6456](https://doi.org/10.1038/ncomms6456)
4. Philipp Metzger, Sabrina Kirchleitner, **Lars M. König**, Christine Hörth, Sebastian Kobold, Stefan Endres, Max Schnurr, Peter Duewell. Dying cells expose a nuclear antigen cross-reacting with anti-PD-1 monoclonal antibodies. *Scientific Reports*, **8**, 8810 (2018). doi: [10.1038/s41598-018-27125-6](https://doi.org/10.1038/s41598-018-27125-6)
5. Maximilian A. Ardelt, Thomas Fröhlich, Emanuele Martin, Martin Müller, Veronika Kanitz, Carina Atzberger, Laura Posselt, Thorsten Lehr, Melanie Ulrich, Georg J. Arnold, **Lars M. König**, Sara Sigismund, Dario Parazzoli, Stefan Zahler, Simon Rothenfußler, Doris Mayr, Alexander Gerbes, Giorgio Scita, Angelika M. Vollmar, Johanna Pachmayr. Inhibition of Cyclin-dependent Kinase 5 – a novel strategy to improve sorafenib response in HCC therapy. *Hepatology* **69**, 376–393 (2019). doi: [10.1002/hep.30190](https://doi.org/10.1002/hep.30190)
6. Mike W. Helms, Kerstin Jahn-Hofmann, Felix Gnerlich, Christiane Metz-Weidmann, Monika Braun, Gabriele Dietert, Kaj Grandien, Joachim Theilhaber, Hui Cao, Tim Wagenaar, Max Schnurr, Stefan Endres, Dmitri Wiederschain, Sabine Scheidler, Simon Rothenfusser, Bodo Brunner, **Lars M. König**. Utility of the natural RIG-I agonist triphosphate RNA for melanoma therapy. *Molecular Cancer Therapeutics* **18**, 2343–2356 (2019). doi: [10.1158/1535-7163.mct-18-1262](https://doi.org/10.1158/1535-7163.mct-18-1262)
7. Philipp Metzger, Sabrina Kirchleitner, Michael Kluge, **Lars M. König**, Christine Hörth, Daniel Böhmer, Julia Ahlfeld, Sebastian Kobold, Caroline Friedel, Stefan Endres, Max Schnurr, Peter Duewell. Immunostimulatory RNA leads to functional reprogramming of myeloid-derived suppressor cells in pancreatic cancer. *Journal for Immunotherapy of Cancer* **7**, 288 (2019). doi: [10.1186/s40425-019-0778-7](https://doi.org/10.1186/s40425-019-0778-7)
8. Michael Ruzicka*, **Lars M. König***, Simone Formisano, Daniel F. R. Boehmer, Binje Vick, Eva-M. Heuer, Hanna Meinl, Lorenz Kocheise, Marcus Zeitlhöfler, Julia Ahlfeld, Sebastian Kobold, Stefan Endres, Marion Subklewe, Peter Duewell, Max Schnurr, Irmela Jeremias, Felix S. Lichtenegger* and Simon Rothenfusser*#. RIG-I-based immunotherapy enhances survival in preclinical AML models and sensitizes AML cells to checkpoint blockade. *Leukemia* **34**, 1017–1026 (2020). doi: [10.1038/s41375-019-0639-x](https://doi.org/10.1038/s41375-019-0639-x)
9. Philipp Metzger, Sabrina V. Kirchleitner, Daniel F. R. Boehmer, Christine Hörth, Angelika Eisele, Steffen Ormanns, Matthias Gunzer, Maciej Lech, Kirsten Lauber, Stefan Endres, Peter Duewell, Max Schnurr*, **Lars M. König***. Systemic but not MDSCs-specific IRF4 deficiency promotes an immunosuppressed tumor microenvironment in a murine pancreatic cancer model. *Cancer Immunology, Immunotherapy* **331**, 1565 (2020). doi: [10.1007/s00262-020-02605-9](https://doi.org/10.1007/s00262-020-02605-9)

10. Daniel F.R. Boehmer, Lisa M. Koehler, MD, Thomas Magg, PhD, Philipp Metzger, PhD, Meino Rohlf, PhD, Julia Ahlfeld, PhD, Anita Rack-Hoch, MD, Karl Reiter, MD, Michael H. Albert, MD, Stefan Endres, MD, Simon Rothenfusser, MD, Christoph Klein, MD, PhD, **Lars M. Koenig, PhD**, Fabian Hauck, MD, PhD. A novel complete autosomal recessive STAT1 LOF variant causes immunodeficiency with HLH-like hyperinflammation. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice* **8**, 3102–3111 (2020). doi: [10.1016/j.jaip.2020.06.034](https://doi.org/10.1016/j.jaip.2020.06.034)
11. Martina Meßner, Sabine Schmitt, Maximilian A. Ardelt, Thomas Fröhlich, Martin Müller, Helmut Pein, Petra Huber-Cantonati, Carina Ortler, **Lars M. Koenig**, Lena Zobel, Andreas Koeberle, Georg J. Arnold, Simon Rothenfußer, Alexandra K. Kiemer, Alexander L. Gerbes, Hans Zischka, Angelika M. Vollmar, Johanna Pachmayr. Metabolic implication of tigecycline as an efficacious second-line treatment for sorafenib-resistant hepatocellular carcinoma. *The FASEB Journal* **34**, 11860–11882 (2020). doi: [10.1096/fj.202001128r](https://doi.org/10.1096/fj.202001128r)
12. Sandra Segura-Bayona, Marina Villamor-Payà, Camille Stephan-Otto Attolini, **Lars M. Koenig**, Maria Sanchiz-Calvo, Simon J. Boulton, Travis H. Stracker. Tinsled-like Kinases Suppress Innate Immune Signaling Triggered by Alternative Lengthening of Telomeres. *Cell Reports* **32**, 5 (2020). doi: [10.1016/j.celrep.2020.107983](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107983)
13. **Lars M. Koenig***, Daniel F.R. Boehmer, Philipp Metzger, Max Schnurr, Stefan Endres, Simon Rothenfusser. Blocking inflammation on the Way – Rationale for CXCR2 Antagonists for the Treatment of COVID-19. *Journal of Experimental Medicine* **217**, (9): e20201342, (2020). doi: [10.1084/jem.20201342](https://doi.org/10.1084/jem.20201342)
14. Lesch, S., Blumenberg, V., Stoiber, S., Gottschlich, A., Ogonek, J., Cadilha, B.L., Dantes, Z., Rataj, F., Dorman, K., Lutz, J., Karches, C.H., Heise, C., Kurzay, M., Larimer, B.M., Grassmann, S., Rapp, M., Nottebrock, A., Kruger, S., Tokarew, N., Metzger, P., Hoerth, C., Benmebarek, M.-R., Dhoqina, D., Grünmeier, R., Seifert, M., Oener, A., Umut, Ö., Joaquina, S., Vimeux, L., Tran, T., Hank, T., Baba, T., Huynh, D., Megens, R.T.A., Janssen, K.-P., Jastroch, M., Lamp, D., Ruehland, S., Pilato, M.D., Pruessmann, J.N., Thomas, M., Marr, C., Ormanns, S., Reischer, A., Hristov, M., Tartour, E., Donnadiou, E., Rothenfusser, S., DUEWELL, P., **König, L.M.**, Schnurr, M., Subklewe, M., Liss, A.S., Halama, N., Reichert, M., Mempel, T.R., Endres, S., Kobold, S. T cells armed with C-X-C chemokine receptor type 6 enhance adoptive cell therapy for pancreatic tumours. *Nature Biomedical Engineering* **5**, 1246–1260 (2021). doi: [10.1038/s41551-021-00737-6](https://doi.org/10.1038/s41551-021-00737-6)
15. Andreas Linder, Viktoria Bothe, Nicolas Linder, Paul Schwarzlmüller, Frank Dahlström, Christoph Bartenhagen, Martin Dugas, Dharmendra Pandey, Julia Thorn-Seshold, Daniel F. R. Boehmer, **Lars M. König**, Sebastian Kobold, Max Schnurr, Johannes Rädler, Giulia Spielmann, Hadi Karimzadeh, Andreas Schmidt, Stefan Endres, Simon Rothenfusser. Defective interfering genomes and the full-length viral genome trigger RIG-I after infection with vesicular stomatitis virus in a replication dependent manner. *Frontiers in Immunology* **12**, 1302 (2021). doi: [10.3389/fimmu.2021.595390](https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.595390)
16. Thomas Magg*, T. Okano*, **Lars M. Koenig***, Daniel F.R. Boehmer, S.L. Schwartz, K. Inoue, J. Heimall, F. Licciardi, J. Ley-Zaporozhan, R.M. Ferdman, E.N. Park, B.M. Calderon, D. Dey, H. Kanegane, K. Cho, D. Montin, K. Reiter, M. Griese, M.H. Albert, M. Rohlf, P. Gray, C. Walz, G.L. Conn, K.E. Sullivan, Christian Klein, T. Morio*, Fabian Hauck*. Heterozygous OAS1 gain-of-function variants cause an autoinflammatory immunodeficiency. *Science Immunology* **6**, 60, eabf9564 (2021). doi: [10.1126/sciimmunol.abf9564](https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abf9564)
17. Daniel F.R. Boehmer, Simone Formisano, Carina C. de Oliveira Mann, Stephan A. Mueller, Michael Kluge, Philipp Metzger, Meino Rohlf, Christine Hörth, Lorenz Kocheise, Stefan F. Lichtenthaler, Karl-Peter Hopfner, Stefan Endres, Simon Rothenfusser, Caroline C. Friedel, Peter DUEWELL, Max Schnurr*, **Lars M. Koenig*#**. OAS1/RNase L executes RIG-I ligand-dependent tumor cell apoptosis. *Science Immunology*, **6**, 61, eabe2550 (2021). doi: [10.1126/sciimmunol.abe2550](https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abe2550)