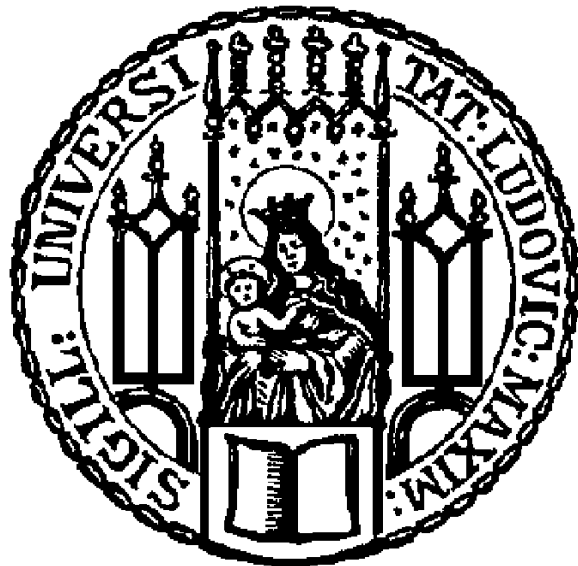


# **Interaktionen zytotoxischer T-Zellen mit myeloiden Zellen als Determinanten antigenspezifischer Immunantworten bei HIV-Infektionen und Malignomen**



**Raphael Tobias Kfuri Rubens**

**2024**

Center for Immunology and Inflammatory Diseases  
Massachusetts General Hospital, Boston

in Kooperation mit der

Abteilung für Klinische Pharmakologie

Direktor: Prof. Dr. Stefan Endres

Medizinische Klinik und Poliklinik IV

Klinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. Martin Reincke

**Interaktionen zytotoxischer T-Zellen mit myeloiden  
Zellen als Determinanten antigenspezifischer  
Immunantworten bei HIV-Infektionen und Malignomen**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Raphael Tobias Kfuri Rubens

aus São José do Rio Preto, Brasilien

Jahr

2024

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Max Schnurr

Mitberichterstatter: Prof. Dr. David Anz  
PD Dr. Reinhard Obst  
Prof. Dr. Tobias Feuchtinger

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. Thorsten Mempel

Dekan: Prof. Dr. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 01.02.2024

**Meinen Eltern Patricia und Thomas  
und meinem Bruder Christian**

# 1. Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>3</b>
2.1	Die Funktionsweise von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in chronisch viralen Infektionen und malignen Neoplasien .....	3
2.1.1	Aktivierung, intrazelluläre Signaltransduktion und Effektormechanismen zytotoxischer T-Zellen.....	3
2.1.2	Differenzierungszustände und resultierende hyporeaktive Stadien von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen.....	4
2.1.3	Die Rolle von antigenspezifischen, zytotoxischen T-Zellen in der HIV-Infektion und in soliden Tumoren.....	6
2.2	Migration und resultierende Interaktionen von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen mit myeloiden Zellen als Einflussfaktoren auf Krankheitsentstehung und -bekämpfung .....	7
2.2.1	Chemokine, neutrophile Granulozyten und potentielle Interaktionen mit zytotoxischen T-Zellen in HIV-Infektionen .....	7
2.2.2	Interaktionen mit dendritischen Zellen diktiert T-Zell-Aktivierung, -Rekrutierung und -Differenzierung in malignen Neoplasien .	10
2.3	Übergeordnete Fragestellung der einzelnen Publikationen und verbindende Aspekte .....	14
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse als veröffentlichte Originalarbeiten .....</b>	<b>15</b>
3.1	Publikation I: CXCR6 positions cytotoxic T cells to receive critical survival signals in the tumor microenvironment .....	15
3.2	Publikation II: Neutrophil subtypes shape HIV-specific CD8 T cell responses after vaccinia virus infection.....	16
3.3	Erklärung zum Beitrag der Veröffentlichungen .....	17
3.3.1	Beitrag zur Publikation I.....	17
3.3.2	Beitrag zur Publikation II.....	19
<b>4.</b>	<b>Deutsche Zusammenfassung .....</b>	<b>20</b>
4.1	Zusammenfassung der Publikation I .....	20
4.1.1	Der Chemokinrezeptor CXCR6 ist für die antitumorale Immunantwort zytotoxischer T-Zellen essentiell.....	20
4.1.2	Die Expansion und das Überleben von <i>effector-like</i> , zytotoxischen T-Zellen im Tumormikromilieu ist abhängig von CXCR6 .....	20
4.1.3	CXCR6 fördert intratumorale Interaktionen zwischen zytotoxischen T-Zellen und perivaskulären Clustern von CXCL16 <sup>+</sup> CCR7 <sup>+</sup> DC3 .....	21
4.1.4	DC3 transpräsentieren das Überlebenssignal IL-15 an <i>effector-like</i> , zytotoxische T-Zellen im tumoralen Mikromilieu .....	21
4.1.5	CXCR6-Expression als prognostischer Marker in humanen Krebserkrankungen .....	22
4.2	Zusammenfassung der Publikation II .....	23
4.2.1	Intrasplenische Akkumulation neutrophiler Granulozyten geht der HIV-spezifischen T-Zell-Immunantwort voraus .....	23

4.2.2	Die Subpopulationen $N\alpha$ und $N\beta$ neutrophiler Granulozyten zeigen intrasplenisch unterschiedliche Migrationsverhalten und Interaktionskapazitäten mit zytotoxischen T-Zellen auf .....	23
4.2.3	$N\alpha$ und $N\beta$ weisen lokalisationsspezifisch unterschiedliche $\alpha 4\beta 1$ -Integrin-Expressionen auf .....	24
4.2.4	Inhibition des $\alpha 4\beta 1$ -Integrins verbessert die HIV-spezifische zytotoxische T-Zell-Antwort durch Erhöhung des $N\beta/N\alpha$ -Quotienten .....	24
<b>5.</b>	<b>English Summary .....</b>	<b>26</b>
5.1	Summary of publication I .....	26
5.1.1	The chemokine receptor CXCR6 is pivotal for antitumor immune responses mediated by cytotoxic T cells .....	26
5.1.2	The expansion and survival of effector-like cytotoxic T cells in the tumor microenvironment is dependent on CXCR6 .....	26
5.1.3	CXCR6 promotes intratumoral interactions between cytotoxic T cells and perivascular clusters of CXCL16 <sup>+</sup> CCR7 <sup>+</sup> DC3s .....	27
5.1.4	DC3 <i>trans</i> -present the survival signal IL-15 to effector-like cytotoxic T cells in the tumor microenvironment .....	27
5.1.5	CXCR6 expression as prognostic marker in human cancer patients .....	28
5.2	Summary of publication II .....	28
5.2.1	Intrasplenic accumulation of neutrophils precedes HIV-specific CD8 <sup>+</sup> T-cell responses .....	28
5.2.2	Neutrophil subsets $N\alpha$ and $N\beta$ exhibit different dynamic migration behaviors and interaction capacities with cytotoxic T cells intrasplenically .....	29
5.2.3	$N\alpha$ and $N\beta$ display distinct localization-specific $\alpha 4\beta 1$ integrin expression..	29
5.2.4	Inhibition of $\alpha 4\beta 1$ integrin enhances HIV-specific cytotoxic T-cell responses by increasing $N\beta/N\alpha$ ratio .....	30
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>31</b>
<b>7.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>41</b>
<b>8.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>44</b>
<b>9.</b>	<b>Appendix .....</b>	<b>45</b>
9.1	Publikationsliste .....	45
9.2	Eidesstaatliche Versicherung .....	46
9.3	Erklärung zur kumulativen Dissertation .....	47

## 2. Einleitung

### 2.1 Die Funktionsweise von CD8<sup>+</sup> T-Zellen in chronisch viralen Infektionen und malignen Neoplasien

#### 2.1.1 Aktivierung, intrazelluläre Signaltransduktion und Effektormechanismen zytotoxischer T-Zellen

Zytotoxische T-Zellen gelten als einer der wichtigsten Effektorzellen in der antitumoralen und *Human Immunodeficiency Virus* (HIV)-spezifischen Immunantwort. Ihre Funktion ist die Basis einer Vielzahl von Krebsimmuntherapien, wie der Immuncheckpointblockade oder der chimären Antigenrezeptor (CAR)-T-Zell-Therapie (June *et al.*, 2018; Ribas and Wolchok, 2018; Waldman, Fritz and Lenardo, 2020). Außerdem spielen sie eine zentrale Rolle in der *Major Histocompatibility Complex*-(MHC)-Klasse-I-restringierten, spontanen HIV-Kontrolle und können als Vakzin-induzierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen anhaltende Remissionen hervorrufen (Collins, Gaiha and Walker, 2020).

Antigen-spezifisches T-Zell-*Priming* spielt sich in den meisten Fällen in sekundär lymphatischen Organen ab, wobei Antigene aus der Peripherie durch dendritische Zellen via MHC-I-Komplexe an naive antigenspezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen kreuzpräsentiert werden (Nouri-Shirazi *et al.*, 2000). Dabei sind neben dem MHC-I:Antigen-Komplex (Signal 1), kostimulatorische Rezeptoren (insbesondere CD28, Signal 2) und spezifische lösliche Faktoren (Signal 3), beispielsweise Interleukin (IL)-12 oder Typ-I-Interferone, notwendig, um eine robuste klonale Expansion, suffiziente Effektorfunktionen und Gedächtniszellformation hervorzurufen (Curtsinger and Mescher, 2010). Nach optimaler T-Zell-Aktivierung werden intrazellulär *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-, *c-jun N-terminal kinase* (JNK)-, *phosphatidylinositol 3-kinase-protein kinase B* (PI3K-AKT)- und *I $\kappa$ B kinase* (IKK)-Signalkaskaden induziert, welche zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren *nuclear factor of activated T cells* (NFAT) und *activator protein 1* (AP-1) führen. NFAT wird im Zytosol durch die Calmodulin-abhängige Phosphatase Calcineurin dephosphoryliert und transloziert in den Zellkern, in welchem es mit AP-1 als Transkriptionsfaktor Effektorgene aktiviert (Müller and Rao, 2010; Philip and Schietinger, 2022).

Als wichtige Effektorfunktion zytotoxischer T-Zellen gilt der induzierte Zelltod der Zielzelle mittels verschiedener Effektormechanismen. Hierbei gelten die durch Zellmotilität mechanisch begünstigte Membranporenbildung und die Zelltod-induzierende Sezernierung von Granula mit Perforinen, Granzymen, Kathepsin C und Granulysin innerhalb einer geformten immunologischen Synapse als zentrale

Effektorfunktionen. Zusätzlich ist die Expression des Fas-Ligands der *tumor necrosis factor* (TNF)-Familie durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen und die konsekutive Bindung dessen an Fas-Rezeptoren ein potenter Induktor der intrazellulären Todesdomänen *Fas-associated death domain protein* (FADD), was zur Aktivierung von Caspasen und Endonukleasen und letztlich zur Fragmentation der Zielzell-DNA führt (Dustin and Long, 2010; Basu *et al.*, 2016; Fu *et al.*, 2016; Raskov *et al.*, 2021). Schließlich sezernieren CD8<sup>+</sup> T-Zellen Zytokine, wie Interferon (IFN)- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-2, welche eine Vielzahl autokriner, parokriner und endokriner Effekte auf selbige Zelltypen, andere Immunzellpopulationen, Tumorzellen und weitere Zelltypen ausüben (Thomas and Massagué, 2005; Sáez-Cirión *et al.*, 2007; Parker, Rautela and Hertzog, 2016; Farhood, Najafi and Mortezaee, 2019; Liu *et al.*, 2021).

### 2.1.2 Differenzierungszustände und resultierende hyporeaktive Stadien von CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Während der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Differenzierung führt die molekulare Struktur des Antigens, der inflammatorische Kontext der Antigenpräsentation und die Dauer der Antigenexposition entweder zu funktionalen, effektiven T-Zell-Differenzierungszuständen, wie beispielsweise in akuten bakteriellen Infektionen, oder zu hyporeaktiven T-Zell-Zuständen, wie in Krebserkrankungen oder chronisch viralen Infektionen (Philip and Schietinger, 2022). Zusätzlich beeinflussen eine Bandbreite an weiteren Faktoren, wie Chemokine, Integrine, Zytokine, metabolische Signale und intrazelluläre Transkriptionsfaktoren den Differenzierungsverlauf von T-Zellen (Raskov *et al.*, 2021).

In verschiedenen Arbeiten zu intratumoralen CD8<sup>+</sup> T-Zell-Differenzierungszuständen und in chronisch viralen Infektionen konnten zwei verschiedene zytotoxische T-Zellpopulationen identifiziert werden: TCF-1<sup>pos</sup> *stem-like/memory-like* und weiter differenzierte TCF-1<sup>neg/low</sup> T-Zellen. Diese Populationen unterscheiden sich phänotypisch, transkriptorisch, epigenetisch und funktionell voneinander (He *et al.*, 2016; Im *et al.*, 2016; Leong *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2016). Daraus leiteten sich zwei unterschiedliche Modelle der T-Zell-Differenzierungsverläufe ab (Philip and Schietinger, 2022): Im verzweigten Differenzierungsmodell, wie es in chronischen Infektionen validiert wurde (Utzschneider *et al.*, 2016), differenzieren sich *effector-like* T-Zellen – vermutlich im Zuge asymmetrischer Zellteilung (Borsa *et al.*, 2019) – von CXCR5<sup>+</sup> PD-1<sup>mid</sup> TIM-3<sup>low</sup> EOMES<sup>low</sup> T-bet<sup>hi</sup> TCF-1<sup>pos</sup> *progenitor exhausted* T-Zellen, welche sich selbst regenerieren können, in CXCR5<sup>-</sup> PD-1<sup>hi</sup> TIM-3<sup>hi</sup> EOMES<sup>hi</sup> T-bet<sup>low</sup> TCF-1<sup>neg</sup> *terminally exhausted* T-Zellen innerhalb von peripheren Geweben oder der splenischen roten Pulpa. Zusätzlich wurde im *lymphocytic choriomeningitis virus* (LCMV)-Modell



chronisch viraler Infektion beschrieben, dass TCF-1<sup>pos</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen zunächst in ein transitorisches, proliferierendes Stadium übergehen, in denen CD101<sup>-</sup> TIM-3<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen den Chemokinrezeptor CX3CR1 (Gerlach *et al.*, 2016) exprimieren, bevor sie das terminal differenzierte CD101<sup>+</sup> TIM-3<sup>+</sup> *Exhausted*-Stadium erreichen (William H. Hudson *et al.*, 2019). Im linearen Differenzierungsmodell exprimieren infiltrierende T-Zellen initial TCF-1, nach Antigenexposition und suboptimalem *Priming* gehen sie in ein frühes dysfunktionelles Stadium über, welches sich phänotypisch durch die Expression von PD-1<sup>hi</sup> LAG-3<sup>hi</sup> CD38<sup>low</sup> CD39<sup>low</sup> TIM-3<sup>low</sup> TOX<sup>mid</sup> TCF-1<sup>pos</sup> auszeichnet. Nach anhaltender, chronischer Antigenexposition und dem Einfluss eines immunsuppressiven Mikromilieus geht dieser Differenzierungszustand in das späte dysfunktionelle Stadium über, gekennzeichnet durch die Expression von PD-1<sup>hi</sup> LAG-3<sup>hi</sup> CD38<sup>hi</sup> CD39<sup>hi</sup> TIM-3<sup>hi</sup> TOX<sup>hi</sup> TCF-1<sup>neg</sup>. Bisher wird vom linearen Differenzierungsmodell in malignen, neoplastischen Erkrankungen ausgegangen. Weitere Studien sind notwendig, um zu determinieren, ob die intratumorale tumorantigen-spezifische Population TCF-1<sup>neg</sup> T-Zellen durch TCF-1<sup>pos</sup> Vorläufer in sekundären lymphatischen Organen, insbesondere tumordrainierender Lymphknoten, aufrechterhalten wird oder ob tumorspezifische TCF-1<sup>neg</sup> fähig sind, sich selbst zu regenerieren (Philip and Schietinger, 2022), vor allem jene in tertiären lymphoiden Strukturen (TLS) oder intratumoralen Nischen.

CD8<sup>+</sup> T-Zell-Dysfunktion als Unterform hyporeaktiver T-Zell-Stadien, unter denen auch immunologische Anergie, Toleranz oder Ignoranz fallen, ist durch die Expression multipler inhibitorischer Rezeptoren, wie PD-1, CTLA-4, TIM-3 und LAG-3, und durch gleichzeitiger Insuffizienz Effektorzytokine, wie IFN- $\gamma$  oder TNF- $\alpha$ , oder Granula, mit beispielsweise Granzym B oder Perforine, zu sezernieren gekennzeichnet (McLane, Abdel-Hakeem and Wherry, 2019). In chronischen viralen Infektionen, in denen antigenspezifische T-Zellen durch ihr kognates Antigen chronisch stimuliert werden, beschreibt initial der Begriff *Exhaustion* hyporeaktive T-Zell-Stadien (Wherry *et al.*, 2007). Analog zur tumorinduzierten T-Zell-Dysfunktion wurde hierbei eine strikt orchestrierte Hochregulation inhibitorischer Rezeptoren und gleichzeitiger sukzessiver Verlust von Effektorfunktionen beobachtet, um vermutlich den Organismus vor exzessiver Immunpathologie zu schützen (Frebel *et al.*, 2012; Zinselmeyer *et al.*, 2013). Die Begriffe der T-Zell-Differenzierungsstadien *Exhaustion* und der Tumor-induzierten Dysfunktion werden jeweils in unterschiedlichem Kontext uneinheitlich verwendet, allerdings teilen diese wichtige phänotypische, transkriptorische und epigenetische Charakteristika (Philip and Schietinger, 2022).

### 2.1.3 Die Rolle von antigenspezifischen, zytotoxischen T-Zellen in der HIV-Infektion und in soliden Tumoren

Ein zentrales Charakteristikum der HIV-Infektion ist eine insuffiziente Viruskontrolle, wobei CD4<sup>+</sup> T-Zell-Depletion, *Escape*-Mutationen und CD8<sup>+</sup> T-Zell-*Exhaustion* eine effektive Immunantwort limitieren. Das Immunsystem einer Subgruppe HIV-infizierter Personen ist jedoch in der Lage, ohne jegliche therapeutische Intervention, die virale Replikation auf eine Virämie unter 2000 RNA-Kopien / ml zu supprimieren (Collins, Gaiha and Walker, 2020). Genomweite Assoziationsstudien und experimentelle Daten zum *Simian Immunodeficiency Virus* (SIV) suggerierten eine zentrale Rolle der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort in der spontanen Kontrolle von HIV-Infektionen (Schmitz *et al.*, 1999; Pereyra *et al.*, 2010; Chowdhury *et al.*, 2015). Die entscheidenden, zytotoxischen T-Zell-vermittelten Effektorfunktionen bestehen aus der Fähigkeit mehrere Zytokine und Effektormoleküle zu sezernieren, welche Polyfunktionalität genannt wird, der Expansionsfähigkeit von HIV-Antigen-stimulierten und -spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen *in vitro* und ihrer Kapazität die HIV-Replikation zu unterdrücken. Weitere Charakteristika einer effektiven HIV-Kontrolle ist die Fähigkeit von T-Zellen Gedächtnis- und Effektorpotential zu erhalten und frühzeitig infizierte Zellen zu eliminieren (Sacha *et al.*, 2007; Monel *et al.*, 2019). Aufgrund dessen werden aktuell – neben humoral-vermittelten Ansätzen – an einer Bandbreite von prophylaktischen und therapeutischen HIV-Vakzinen gearbeitet, welche diese CD8<sup>+</sup> T-Zell-vermittelte Immunität nutzen (Ng'uni, Chasara and Ndhlovu, 2020).

CD8<sup>+</sup> T-Zellen können nach *Priming* mit tumoralen Antigenen maligne Zellen spezifisch erkennen und eliminieren (van der Bruggen *et al.*, 1991; Coulie *et al.*, 1995). Bereits in den frühen 2000er wurden Tumor-infiltrierende *effector memory* T-Zellen mit der Absenz früher Metastasierung, einer weniger fortgeschrittenen, histopathologischen Klassifizierung und einem erhöhten Überleben in humanen kolorektalen Karzinomen korreliert (Pagès *et al.*, 2005). Seither wurde die zentrale Bedeutung zytotoxischer T-Zellen weiter etabliert, ihre Funktion mechanistisch in verschiedensten Krebsentitäten untersucht und als Basis von beachtenswerten Krebsimmuntherapien verwendet (Fridman *et al.*, 2012; Raskov *et al.*, 2021). Bereits vielversprechende Daten entstammen von der Immuncheckpointblockade, dem Einsatz T-Zell-Rezeptor-transduzierter T-Zellen und von CAR-T-Zell-Therapien (Waldman, Fritz and Lenardo, 2020). Allerdings wurde festgestellt, dass maligne Neoplasien trotz Infiltration von tumorspezifischen T-Zellen fortschreiten, welches als „Hellstrom-Paradoxon“ bezeichnet und auf immunsuppressive Mechanismen zurückgeführt wird (Hellstrom and Hellstrom, 2019). Hierbei wird zwischen kalten, immunexkludierten, immunsupprimierten und heißen beziehungsweise entzündeten Tumoren unterschieden, welche unter anderem

auf Basis der Infiltration und Funktionsfähigkeit von CD8<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen differenziert werden (Galon and Bruni, 2019). Aktuell werden die genauen funktionellen zellulären Zusammenhänge und molekulare Programme zytotoxischer T-Zellen untersucht, welche für die Differenzierung und Dysfunktion dieser Funktionsstadien verantwortlich sind, um diese im Zusammenspiel tumorimmunologischer Prozesse therapeutisch in der Krebsbekämpfung zu optimieren.

## **2.2 Migration und resultierende Interaktionen von CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit myeloiden Zellen als Einflussfaktoren auf Krankheitsentstehung und -bekämpfung**

### **2.2.1 Chemokine, neutrophile Granulozyten und potentielle Interaktionen mit zytotoxischen T-Zellen in HIV-Infektionen**

#### **2.2.1.1 Die Sonderrolle von Chemokinrezeptoren in der Pathogenese und CD8<sup>+</sup> T-Zell-Immunantworten von HIV-Infektionen**

Chemokine regulieren die gezielte Zellmigration, intraparenchymale Zellpositionierung, Adhäsion und Zell-Zell-Interaktionen durch Bindung an  $\alpha$ -Untereinheiten G-Protein-gekoppelter Chemokinrezeptoren aus der Chemokin-Superfamilie. Aktuell sind annähernd 50 verschiedene Chemokine, 20 klassische heptahelikale Transmembrandomänen-Chemokinrezeptoren und 4 atypische Chemokinrezeptoren (ACKR) bekannt. Aufgrund der Diversität, ihrer Expressionsdynamik und differenziellen Expression auf unterschiedlichen Zelltypen, wie Immunzellen, Stromazellen und Tumorzellen, gelten die Funktionen von Chemokinliganden und -rezeptoren in HIV-Infektionen und soliden Tumorerkrankungen als vielfältig (Griffith, Sokol and Luster, 2014; Nagarsheth, Wicha and Zou, 2017; Hughes and Nibbs, 2018).

Erste Arbeiten, welche Chemokine mit der HIV-Biologie in Verbindung brachten, identifizierten zunächst die HIV-supprimierenden Chemokinliganden CCL3, CCL4 und CCL5. Allerdings ging ebenfalls hervor, dass die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5 als Korezeptoren für HI-Viren fungieren können, was grundlegend zum Verständnis der Pathogenese des *Acquired Immunodeficiency Syndrome* (AIDS) beitrug (Cocchi *et al.*, 1995; Feng *et al.*, 1996). Hierbei wurde gezeigt, dass das externe Hüll-Glykoprotein gp120 des HI-Virus sequentiell mit CD4 und anschließend mit einem Chemokinrezeptor, CXCR4 oder CCR5, interagiert (Lusso, 2006). Dabei evolviert meist im Laufe einer HIV-Infektion der Chemokinrezeptortropismus in einer charakteristischen Reihenfolge: Die meisten transmittierten Stämme sind CCR5-trop und replizieren in aktivierten oder Gedächtnis-T-Zellen primär im *gut-associated lymphoid tissue* (GALT)

(Scarlati *et al.*, 1997; Veazey *et al.*, 1998). Im weiteren Krankheitsverlauf können, vermutlich durch Selektionsdruck von CCR5-Liganden, CXCR4-trope Stämme entstehen, welche meist fähig sind, weitere Co-Rezeptoren, wie CCR2b, CCR3, CCR8, CX3CR1 und CXCR6, zu nutzen. CXCR4 wird von einer größeren Bandbreite von Zellen exprimiert, unter anderem naiven T-Zellen und thymischen Vorläuferzellen, was der Aufrechterhaltung des viralen Reservoirs dient (Connor *et al.*, 1997; Balabanian *et al.*, 2005; Lusso, 2006).

In der HIV-Kontrolle spielt die T-Zell-Lokalisation eine entscheidende Rolle (Collins, Gaiha and Walker, 2020). HIV-spezifische T-Zellen müssen zur Krankheitsbekämpfung in die anatomischen Kompartimente der HIV-Reservoirs migrieren. Insbesondere sekundäre und Mukosa-assoziierte, gastrointestinale tertiäre lymphatische Gewebe, in denen sich HIV-infizierte follikuläre CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen in den B-Zell-Follikeln befinden, stellen einen Großteil des HIV-Reservoirs in chronischen Infektionen dar, welche von den meisten zytotoxischen T-Zellen nicht infiltriert werden können (Connick *et al.*, 2007; Perreau *et al.*, 2013; Banga *et al.*, 2016). Allerdings wurde gezeigt, dass einige follikuläre CD8<sup>+</sup> T-Zellen, welche CXCR5 exprimieren, in den Lymphknoten und teils in B-Zell-Follikeln und Keimzentren akkumulieren können (He *et al.*, 2016; Leong *et al.*, 2016). Zudem wurde beschrieben, dass HIV-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen den Phänotyp von CCR7<sup>+</sup> *tissue-resident memory* T cells (T<sub>rm</sub>) in verschiedenen peripheren Geweben aufzeigten und in sogenannten *elite controllers* angereichert waren (Mueller and Mackay, 2016; Buggert *et al.*, 2018; Nguyen *et al.*, 2019). Die Aufdeckung der funktionellen Bedeutung von follikulären CD8<sup>+</sup> T-Zellen und T<sub>rm</sub> und ihrer antiviralen Mechanismen werden vermutlich grundlegend für die Entwicklung von prophylaktischen und therapeutischen HIV-Therapien sein (Collins, Gaiha and Walker, 2020).

#### 2.2.1.2 Antivirale Effekte von neutrophilen Granulozyten in HIV-Infektionen

Die protektive Rolle von neutrophilen Granulozyten in HIV-Infektionen stammen insbesondere aus empirischen Studien. In einer Arbeit wurde festgestellt, dass eine hohe Neutrophilenzahl im peripheren Blut südafrikanischer Frauen mit einer erniedrigten vertikalen, perinatalen Transmissionswahrscheinlichkeit von HIV korrelierte (Kourtis, Hudgens and Kayira, 2012). Für die Exekution HIV-supprimierender Effekte werden mehrere mögliche antivirale Mechanismen diskutiert (Hensley-McBain and Klatt, 2018a): Von Neutrophilen sezernierte  $\alpha$ -Defensine haben eine antivirale Wirkung durch direkte Inaktivierung von HI-Viren und durch ihre Fähigkeit die Replikation mittels Beeinflussung intrazellulärer Signalwege von infizierten Zellen zu mindern. Zusätzlich wurde gezeigt, dass diese zur Rekrutierung von T-Zellen, Monozyten und unreifen dendritischen Zellen führen und damit die adaptive Immunität unterstützen (Klotman and

Chang, 2006). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Myeloperoxidase und reaktive Sauerstoffspezies von Neutrophilen viruzide Effekte auf HI-Viren ausüben (Klebanoff and Coombs, 1992). Diese antiviralen Mechanismen können Neutrophile potenzieren, indem diese HIV-1 durch *Toll-like-Rezeptoren* (TLR) 7 und 8 erkennen und mittels *neutrophil extracellular trap* (NET)-Generierung lokal binden (Saitoh *et al.*, 2012). Schließlich sind neutrophile Granulozyten in der Antikörper-abhängigen, zellvermittelten zytotoxischen Eliminierung und der Phagozytose HIV-infizierter Zellen involviert (Smalls-Mantey, Connors and Sattentau, 2013; Ackerman *et al.*, 2016).

### 2.2.1.3 Hinweise auf Interaktionen zwischen neutrophilen Granulozyten und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der HIV-Kontrolle

Die Bedeutung myeloider Zellen, wie Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen, in der Transmission, Zielzellinfektion und als Reservoir während der Pathogenese von HIV-Infektionen wurde in einer Vielzahl von Studien aufgezeigt (Wu and KewalRamani, 2006; Groot, Welsch and Sattentau, 2008; Rodrigues *et al.*, 2017). Allerdings haben dendritische Zellen ebenso die Fähigkeit CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zell-Immunantworten gegen HIV-Antigene zu erzeugen (Ng *et al.*, 2013; Manches, Frleta and Bhardwaj, 2014). Neutrophilen Granulozyten wurden sowohl pro- als auch antivirale Effekte zugeschrieben, wobei direkte und indirekte Inhibition der HIV-Replikation durch diese und ihre Rolle in der Unterstützung der adaptiven Immunantwort noch unvollständig untersucht sind (Hensley-McBain and Klatt, 2018; Dunsmore *et al.*, 2021; Reif *et al.*, 2021).

Neutrophile Granulozyten sind in der Lage in Lymphknoten zu migrieren und das *Priming* naiver T-Zellen durch Kreuzpräsentation durchzuführen (Beauvillain *et al.*, 2007; Chtanova *et al.*, 2008). Vor allem durch Exposition von *granulocyte macrophage-colony-stimulating factor* (GM-CSF), TNF- $\alpha$ , IL-4 oder IFN- $\gamma$  nehmen Neutrophile antigenpräsentierende Eigenschaften an (Matsushima *et al.*, 2013; Lin and Loré, 2017). Im Kontext der *attenuated vaccinia virus* (VACV)-Infektion wurde gezeigt, dass spezifische Subtypen neutrophiler Granulozyten, N $\alpha$  und N $\beta$ , generiert werden und diese Virus-spezifische zytotoxische T-Zellen in Lymphknoten und der Milz aktivieren können. Unterschiedliche Zytokin- und Chemokinprofile, insbesondere IL-6, *Keratinocyte chemoattractant* (KC), *Monocyte Chemoattractant Protein* (MCP)-1, *Macrophage inflammatory protein* (MIP) 1 $\beta$  und MIP 2, bestimmen differentielle Rekrutierungen dieser Subtypen. Dabei wurde beobachtet, dass diese Migration partiell von CCR1, allerdings nicht von CCR5, abhängig ist. In der gleichen Studie wurde aufgedeckt, dass eine erhöhte Neutrophilenmigration vom Infektionsherd zu sekundären lymphatischen Organen mit einer verbesserten HIV-spezifischen, zytotoxischen T-Zell-Antwort

korreliert. Vor allem exprimierten N $\beta$  vermehrt CD80 und CD86 und wiesen eine erhöhte Kapazität auf als antigenpräsentierende Zelle CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antworten zu generieren (di Pilato et al., 2015, 2017).

## **2.2.2 Interaktionen mit dendritischen Zellen diktiert T-Zell-Aktivierung, -Rekrutierung und -Differenzierung in malignen Neoplasien**

### **2.2.2.1 Chemokine als Einflussfaktoren auf zytotoxische T-Zell-Aktivierung in tumordrainierenden Lymphknoten**

Tumordrainierende Lymphknoten sind integrale immunologische Kompartimente, in denen durch ein System Chemokin-vermittelter Interaktionen zwischen residenten beziehungsweise migratorischen dendritischen Zellen und T-Zellen das *Priming* von tumorantigen-spezifischen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen stattfindet. Eine effektive CD8<sup>+</sup> T-Zell-Aktivierung bedingt die Expression von CCR4- und CCR5-Liganden durch dendritische Zellen, um stabile Interaktionen von naiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der peripheren interfollikulären Region nahe des subkapsulären Sinus zu ermöglichen (Lian and Luster, 2015). Zentrale Gedächtnis-T-Zellen T<sub>cm</sub> hingegen exprimieren hohe Mengen an CXCR3, um an CXCL10-reiche Regionen im Lymphknoten zu gelangen. Die anschließende Makrophagen- und Stromazellen-Sezernierung von CXCL9 verursacht ein *Feed-Forward*-Mechanismus, um unter anderem weitere Immunzellen zu rekrutieren (Sung et al., 2012).

Dabei ist für die Generierung zytotoxischer T-Zellen *de novo* die Kreuzpräsentation während des *Primings* durch meist CD103<sup>+</sup> konventionelle dendritische Zellen 1 (cDC1) notwendig, wobei angenommen wird, dass einige naive T-Zellen ebenfalls in der Nähe der Effektorkompartimente, wie beispielsweise dem tumoralen Mikromilieu, aktiviert werden (Thompson et al., 2010; Böttcher and Reis e Sousa, 2018). Hierbei werden CD8<sup>+</sup> T-Zellen und dendritische Zellen in Lymphknoten geleitet und ihre Interaktionen mittels CCR7 und dessen Liganden CCL19 und CCL21 optimiert (Griffith, Sokol and Luster, 2014). Zuvor exprimieren cDC1 bereits innerhalb maligner Neoplasien nach Exposition tumorassoziierter Antigene oder Neoantigene CCR7. Bei CCR7-Depletion konnte eine verminderte Migration dieser in tumordrainierende Lymphknoten und eine reduzierte antitumorale T-Zell-Antwort festgestellt werden (Roberts et al., 2016). Ebenso konnte eine Rolle für den atypischen Chemokinrezeptor ACKR4 als *scavenger* für CCL19, CCL21 und CCL25 in der Rekrutierung von cDC1 in das lymphatische System identifiziert werden (Heinzel, Benz and Bleul, 2007; Bryce et al., 2016).

Für cDC2 wurde beschrieben, dass deren Migrationsfähigkeit vom Tumormikromilieu bis zum tumordrainierenden Lymphknoten und somit das CD4<sup>+</sup> T-Zell-Priming ebenso von CCR7 abhängig ist (Binnewies *et al.*, 2019). Die Rolle der Chemokin-abhängigen Migration dieser ist ebenfalls von Bedeutung, da in einer weiteren Arbeit zusätzlich gezeigt werden konnte, dass IL-21-vermittelte CD4<sup>+</sup> T-Zell-Hilfe für die Differenzierung CX3CR1<sup>+</sup> zytolytischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen notwendig ist (Zander *et al.*, 2019). Schließlich wurde aufgedeckt, dass CCL21 von fibroblastischen retikulären Zellen (FRC) für die Rekrutierung von T-Zellen und dendritischen Zellen notwendig ist. Bei verminderter Expression von CCL21 und dem Zytokin IL-7 wurde eine veränderte intranodale Immunzelllokalisierung und -komposition identifiziert, was vermutlich eine verminderte tumorspezifische T-Zell-Antwort bedingte (Riedel *et al.*, 2016).

#### 2.2.2.2 Die Rolle von Chemokinen in der Rekrutierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen in das tumorale Mikromilieu

Bereits 2009 wurde eine Vielzahl von Chemokinen im humanen metastasierten Melanom mit der zytotoxischen T-Zell-Infiltration korreliert: CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9 und CXCL10 (Harlin *et al.*, 2009). Eine weitergehende Analyse multipler solider Tumore assoziierte insbesondere die CCL5- und CXCL9-Expression mit der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Infiltration und einem verlängertem Überleben (Dangaj *et al.*, 2019). Die CCR5-CCL5-Achse ist in der Rekrutierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen und regulatorischen T-Zellen (T<sub>reg</sub>) involviert (González-Martín *et al.*, 2011; Ozga, Chow and Luster, 2021). Insbesondere eine CXCR3-abhängige Migration von T-Zellen, welche Gradienten von CXCL9, CXCL10 und CXCL11 folgen, wurden in mehreren Tumorentitäten gezeigt (Reckamp *et al.*, 2007; Mikucki *et al.*, 2015; Chheda *et al.*, 2016). Außerdem wurde beobachtet, dass CXCR2-Expression in myeloiden Zellen zur vermehrten Infiltration von *myeloid derived suppressor cells* (MDSC) und Verminderung von CXCL11-produzierender B1b-Zellen im Tumormikromilieu (TME) führt und letztlich die Rekrutierung zytotoxischer T-Zellen reduziert (Yang *et al.*, 2021). Zudem wurde in mehreren Arbeiten gezeigt, dass CCL2, welches auch posttranslational mittels Nitrierung modifiziert werden kann, ebenfalls mit der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Infiltration korreliert (Molon *et al.*, 2011; Kerdidani *et al.*, 2019). In Tumormodellen kolorektaler Karzinome, welche CX3CL1 exprimieren, wurde eine rekrutierende Funktion von T-Zell-stammendem CX3CR1 aufgezeigt (Siddiqui *et al.*, 2016). Im Gegensatz dazu wurde aufgedeckt, dass die Expression von CXCL12 durch FAP<sup>+</sup> Karzinom-assoziierte Fibroblasten (CAF) zur Exklusion von T-Zellen in einem autochthonen pankreatischen duktalem Adenokarzinom-Modell führte (Feig *et al.*, 2013). In einigen therapeutischen Ansätzen wurden multiple Chemokinsysteme zur Steigerung der tumoralen T-Zell-Infiltration verwendet: CXCR6

(Lesch *et al.*, 2021), CCR8 (Cadilha *et al.*, 2021), CXCR2 (Idorn *et al.*, 2018) und CCR4 (Rapp *et al.*, 2016).

### 2.2.2.3 Intratumorale Interaktionen zwischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen und dendritischen Zellen und ihre Einflüsse auf die T-Zell-Funktion

Aufgrund der intratumoralen Heterogenität der Zellkomposition und des entstehenden Mikromilieus, hat die Lokalisation von Immunzellen im TME einen signifikanten Einfluss auf den Immunzellphänotyp und der -funktion. Dabei ist das intratumorale Wechselspiel zwischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen und myeloiden Zellen als wichtiger Einflussfaktor auf die zytotoxische T-Zell-Antwort etabliert, insbesondere sind cDC1 in der tumorspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort bedeutsam. cDC2 sind womöglich auch in der Lage tumorassoziierte Antigene zu kreuzpräsentieren, allerdings sind diese für die CD4<sup>+</sup> T-Zell-Funktion vermutlich relevanter. Interessanterweise wurde eine neuartige DC-Subpopulation beziehungsweise DC-Stadium beschrieben, namens LAMP3<sup>+</sup> DC, mregDC oder CCL22<sup>+</sup> cDC1. Ihr Ursprung und insbesondere ihre Rolle in der tumorspezifischen Immunantwort ist noch unvollständig untersucht (Zhang *et al.*, 2019; Maier *et al.*, 2020; Wculek *et al.*, 2020; Zhang, Li, Katarzyna M Skrzypczynska, *et al.*, 2020; Cheng *et al.*, 2021). Intratumorale cDC1 sind entscheidend an der Sezernierung von CXCL9 und CXCL10 und sind deswegen in der Rekrutierung von CXCR3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen in das Tumormikromilieu (Mikucki *et al.*, 2015) beteiligt. Die intratumorale Rekrutierung von cDC1 selbst ist von der XCL1-XCR1-Achse abhängig und damit indirekt für die Akkumulation zytotoxischer T-Zellen von Bedeutung. Zusätzlich ist CD8<sup>+</sup> DC-exprimiertes XCR1 im Rahmen von T-Zell-DC-Interaktionen für die zytotoxische T-Zell-Immunität nötig (Dorner *et al.*, 2009). Die intratumorale Akkumulation von cDC1 ist ebenfalls abhängig von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), welche CCL5 und XCL1 exprimieren. cDC1 selbst exprimieren XCR1, den einzig bekannten Rezeptor für XCL1, zusätzlich zu CCR1 und CCR5, welche beide CCL5 binden (Böttcher *et al.*, 2018). Interessanterweise wurde gezeigt, dass tumorintrinsisches  $\beta$ -Catenin-Signaling in einem murinen BRAF<sup>V600E</sup>/Pten<sup>-/-</sup>-Melanommodell zu einer Suppression von CCL4 und folglich zur reduzierten Rekrutierung von CD103<sup>+</sup> cDC1 führte (Spranger, Bao and Gajewski, 2015). Schließlich wurde eine erhöhte Infiltration dendritischer Zellen bei vermehrter Expression von tumorstammendem CCL20, einem Liganden von CCR6, beschrieben (Furumoto *et al.*, 2004).

Im Differenzierungsverlauf von TCF-1<sup>pos</sup> stem-like in TCF-1<sup>neg</sup> effector-like CD8<sup>+</sup> T-Zellen findet eine Hochregulation bestimmter Chemokinrezeptoren, wie CX3CR1 und CXCR6, und eine Reduktion von beispielsweise CXCR5 und CXCR3 statt (He *et al.*, 2016; Philip *et al.*, 2017). In diesem Kontext wurden ebenfalls differenzielle intratumorale



Lokalisationen dieser T-Zell-Differenzierungsstadien in murinen (Siddiqui *et al.*, 2019) und humanen (Jansen *et al.*, 2019) Tumoren – insbesondere in umschriebenen Nischen mit antigenpräsentierenden Zellen - gezeigt. Die Expression von CXCR3 in TCF-1<sup>pos</sup> *stem-like* T-Zellen könnte hierbei entscheidend in der Migration dieser zu CXCL9-/CXCL10-exprimierenden cDC1 sein, um vielleicht die weitere Effektor-Differenzierung und/oder Proliferation dieser zu ermöglichen (Broz *et al.*, 2014; Maurice *et al.*, 2019). Ebenso wird die Rolle von CXCR3 in der Unterstützung der Effektorfunktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch Positionierung dieser in die Nähe von IL-12-produzierenden dendritischen Zellen und Tumorzellen diskutiert (Ruffell *et al.*, 2014; Hickman *et al.*, 2015; Garris *et al.*, 2018).

Die Bedeutung und die Mechanismen, in welchen CD8<sup>+</sup> T-Zell-Interaktionen Immunzellphänotypen und -funktion innerhalb des Tumormikromilieus regulieren, sind Gegenstand aktueller Forschung. Insbesondere intratumorale Nischen, wie tertiäre lymphoide Strukturen (TLS) und myeloide Nischen stellen umschriebene anatomische Kompartimente dar, in welchen zelluläre Interaktionen zu transkriptionalen, epigenetischen, phänotypischen und letztlich funktionellen Veränderungen in Immunzellen führen können. Mit TLS-reichen soliden Tumoren wurden bereits eine erhöhte Anzahl von CD38<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup> T-Zellen und *effector memory* CD8<sup>+</sup> T-Zellen assoziiert. Zudem korrelierten diese mit einer erhöhten Expression von Genen, welche mit T-Zell-Aktivierung, -Zytotoxizität und Chemotaxis in Verbindung stehen (Sautès-Fridman *et al.*, 2019). Darüber hinaus korrelierte der DC-LAMP-Marker mit ebendiesen Genexpressionen, was eine intratumorale TLS-abhängige T<sub>H</sub>1-Polarisierung und CD8<sup>+</sup> T-Zell-Immunantwort nahelegt (Goc *et al.*, 2014). In diesem Zusammenhang wurde ebenfalls gezeigt, dass sich PD-1<sup>hi</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen und DC-LAMP<sup>+</sup> DC in den folliculären B-Zell-Zonen von TLS befinden und TLS damit antitumorale Effektor- und Gedächtnis-Immunantworten generieren und aufrechterhalten (Thommen *et al.*, 2018).

In weiteren Arbeiten wurden spezifische und abgegrenzte intratumorale Nischen, welche teils mit myeloiden Zellen besetzt sind, beschrieben, die sowohl pro- als auch antitumorale Effekte propagieren (Zhang, Li, Katarzyna M. Skrzypczynska, *et al.*, 2020; Casanova-Acebes *et al.*, 2021; Duraiswamy *et al.*, 2021; Pelka *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2021). Besonders beachtenswert ist eine Arbeit, in der der Verlust von Nischen antigenpräsentierender Zellen innerhalb humaner Nierenzellkarzinome als *Immune-Escape*-Mechanismus postuliert wurde, da innerhalb dieser die Aufrechterhaltung und Effektordifferenzierung von TCF-1<sup>pos</sup> *stem-like* CD8<sup>+</sup> T-Zellen festgestellt wurde (Jansen *et al.*, 2019).

### **2.3 Übergeordnete Fragestellung der einzelnen Publikationen und verbindende Aspekte**

Diese Arbeit setzt sich mit der Fragestellung auseinander, inwiefern Interaktionen zytotoxischer T-Zellen mit myeloiden Zellen im pathologischen Kontext – hier insbesondere in immunogenen, malignen Neoplasien und HIV-Infektionen – die adaptive, antigenspezifische Immunantwort zur Krankheitsbekämpfung reguliert. Des Weiteren wird in beiden Arbeiten auf das krankheitsspezifische anatomische Kompartiment, in welchen diese Interaktionen von Bedeutung sind, untersucht und dynamische migratorische Eigenschaften von CD8<sup>+</sup> T-Zellen und ihrer Interaktionspartner *in vivo* analysiert. Überdies werden zentrale Orchestratoren dieser Interaktionen aufgedeckt und deren Zusammenspiel mit weiteren Oberflächenproteinen mechanistisch untersucht. Schließlich wird auf die phänotypischen, transkriptionellen und funktionellen Charakteristika der interagierenden Subpopulationen myeloider Zelltypen eingegangen und das Ausmaß und die Mechanismen des Einflusses auf relevante Funktionen, der zellulären Homöostase und letztlich den Effektormechanismen dieser auf zytotoxische T-Zellen objektiviert. In jeweiliger Publikation werden außerdem translational-therapeutische Applikationen, in denen aufgedeckte Mechanismen bereits genutzt werden, diskutiert beziehungsweise bereits validiert.

### 3. Ergebnisse als veröffentlichte Originalarbeiten

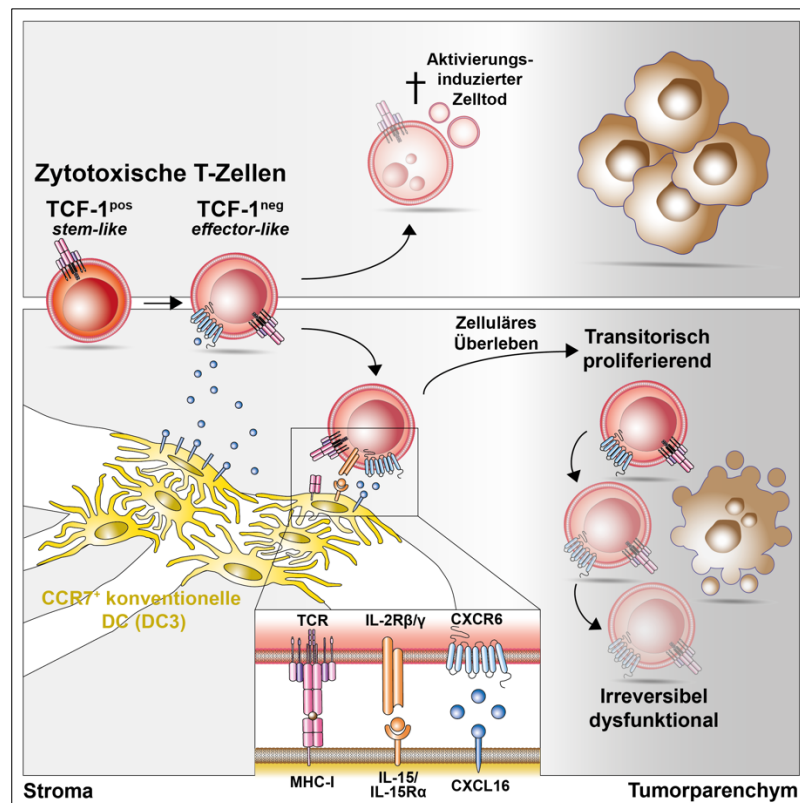
#### 3.1 Publikation I: CXCR6 positions cytotoxic T cells to receive critical survival signals in the tumor microenvironment

Mauro Di Pilato\*, **Raphael Kfuri-Rubens\***, Jasper N. Pruessmann\*, Aleksandra J. Ozga\*, Marius Messemaker, Bruno L. Cadilha, Ramya Sivakumar, Chiara Cianciaruso, Ross D. Warner, Francesco Marangoni, Esteban Carrizosa, Stefanie Lesch, James Billingsley, Daniel Perez-Ramos, Fidel Zavala, Esther Rheinbay, Andrew D. Luster, Michael Y. Gerner, Sebastian Kobold, Mikael J. Pittet, Thorsten R. Mempel.

\*Geteilte Erstautorenschaft

Cell, 2021

DOI: 10.1016/j.cell.2021.07.015



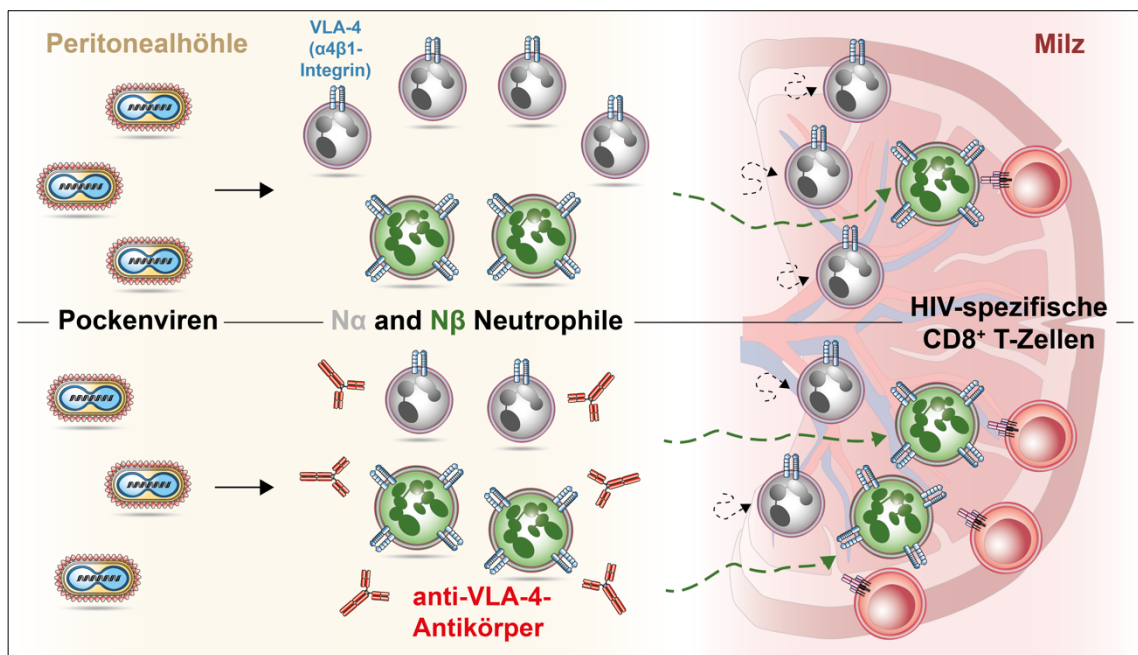
**Abbildung 1:** Der Chemokinrezeptor CXCR6 ist essentiell für das Überleben des CX3CR1-exprimierenden, hochfunktionellen transitorischen Stadiums CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Dieser führt *effector-like* zytotoxische T-Zellen in spezifische intratumorale Gewebenischen, in welchen selbige Zelltypen mit einem CCR7<sup>+</sup> Aktivierungsstadium dendritischer Zellen, den sogenannten DC3, interagieren. Diese Interaktionen werden durch DC3-exprimiertes CXCL16 optimiert und ermöglichen diesen zytotoxischen T-Zellen Überlebenssignale, unter anderem das Zytokin IL-15, zur Verfügung zu stellen, was eine effektive Tumorkontrolle ermöglicht (adaptiert von Di Pilato, Kfuri-Rubens *et al.*, 2021).

### 3.2 Publikation II: Neutrophil subtypes shape HIV-specific CD8 T cell responses after vaccinia virus infection

Mauro Di Pilato, Miguel Palomino-Segura, Ernesto Mejías-Pérez, Carmen E Gómez, Andrea Rubio-Ponce, Rocco D'Antuono, Diego Ulisse Pizzagalli, Patricia Pérez, **Raphael Kfuri-Rubens**, Alberto Benguría, Ana Dopazo, Iván Ballesteros, Carlos Oscar S. Sorzano, Andrés Hidalgo, Mariano Esteban and Santiago F. Gonzalez.

npj Vaccines, 2021

DOI: 10.1038/s41541-021-00314-7



**Abbildung 2:** Die Subpopulationen N $\alpha$  und N $\beta$  neutrophiler Granulozyten weisen nach *Vaccinia Virus* (VACV)-Infektion intrasplenisch unterschiedliche migratorische Verhalten und Interaktionskapazitäten mit zytotoxischen T-Zellen auf. Darüber hinaus zeigen diese differenzielle Expressionen von multiplen inflammatorischen und migratorischen Markern, wie IL-1R und CXCR2, und insbesondere von Adhäsionsmolekülen, wie das  $\alpha$ 4 $\beta$ 1-Integrin (*Very late antigen-4*, VLA-4) auf. Die Inhibition von VLA-4 führt zu einem höheren N $\beta$ /N $\alpha$ -Quotienten und folglich zu einer effektiveren VACV-induzierten zytotoxischen T-Zell-Antwort auf Pol-1-/Pol-2-HIV-Antigene (adaptiert von Di Pilato *et al.*, 2021, publiziert unter der *Creative Commons Attribution 4.0 International License*<sup>[1]</sup>).

<sup>[1]</sup> <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode>

### 3.3 Erklärung zum Beitrag der Veröffentlichungen

#### 3.3.1 Beitrag zur Publikation I

Als einer der vier Erstautoren der Publikation I: „CXCR6 positions cytotoxic T cells to receive critical survival signals in the tumor microenvironment“ (Cell, 2021) habe ich den Großteil der Experimente geplant, durchgeführt, die anschließenden Analysen vorgenommen und visualisiert.

Genauer habe ich das zugrundeliegende *single cell RNA sequencing*-Experiment (*scRNA seq*) mitgeplant und vollständig durchgeführt, in Form der Tumorimplantation und -explantation, der durchflusszytometrische Sortierung von CD45<sup>+</sup> Immunzellen und CD45<sup>-</sup> Nicht-Immunzellen und der anschließenden Einspeisung von Einzelzellen in Tropfsuspensionen (*inDrop*-Plattform). Bei der anschließenden bioinformatischen Auswertung war ich maßgeblich als Teil eines Bioinformatiker-Teams beteiligt. Auf Basis dieser Arbeit sind die Ergebnisse der *Figure 1 A, B, C, D, Figure 4 A, B, C, Figure 5 A* und *Figure 6 E, F* entstanden.

Bezüglich durchflusszytometrischer Analysen explantierter, tumorinfiltrierender Immunzellen und *ex vivo*-kultivierten TCF-1<sup>pos</sup> und TCF-1<sup>neg</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen habe ich die entsprechenden Experimente der *Figure 1 H, I, J, K, L, M, N, O*, teils in Zusammenarbeit mit Dr. Mauro Di Pilato geplant, allerdings sämtlich eigenständig durchgeführt und ausgewertet. Die *in vivo*-Proliferationsassays und die durchflusszytometrischen Experimente tumorinfiltrierender WT und *Cxcr6*<sup>-/-</sup>, CX3CR1<sup>+</sup> und CX3CR1<sup>-</sup> TCF-1<sup>neg</sup> und TCF-1<sup>pos</sup> zytotoxischer T-Zellen der *Figure 2 A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M* wurden von Dr. Mauro Di Pilato und mir geplant und schließlich von sämtlich von mir durchgeführt und ausgewertet.

Die Experimente der *Figure 3 A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P*, inklusive der Kultur und retroviralen Transduktion von TCF-1<sup>pos</sup> und TCF-1<sup>neg</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen, deren Injektion in murine, subkutane Tumormodelle, die Messung der Tumorumfänge und anschließender durchflusszytometrischer Auswertung multipler Immunzellsubpopulationen wurden alle von mir durchgeführt, ausgewertet und visualisiert. FACS-basierte Analysen intratumoraler myeloider Zellen, wie Makrophagen, cDC1, cDC2, CCR7<sup>int</sup> und CCR7<sup>hi</sup> DC3 in *Figure 4 D, E* und *Figure 5 B* wurden ebenfalls von mir durchgeführt.

Die intravitale Multiphoton-Mikroskopie (MP-IVM) intratumoraler zytotoxischer T-Zellen, IL-12<sup>+</sup> dendritischer Zellen im Tumorstroma und -parenchym wurden gänzlich von mir etabliert und ausgeführt, welche in der *Figure 5 C, D, F und G* abgebildet ist. Die konsekutive Analyse und Quantifizierung dynamischer *Tracking*-Parameter wurden von Dr. med. Jasper Prüßmann und mir in Zusammenarbeit durchgeführt (*Figure 5 H, I, J, K, L, M*).

Abschließend wurden weitergehende durchflusszytometrische Analysen von Tumor-assoziierten Makrophagen (TAM), cDC 1/2 und DC3 und von zytotoxischen T-Zellen in verschiedenen murinen Knochenmarkchimäre-Modellen von Dr. Mauro Di Pilato und mir geplant, durchgeführt und analysiert (*Figure 6 A, B, C, D und G, H, I, J, K, L, M, N, O*).

Die geteilte Erstautorenschaft kam dadurch zu Stande, dass Dr. Mauro Di Pilato und ich den Hauptanteil der Experimente zusammen geplant, durchgeführt, ausgewertet und visualisiert haben und gemeinsam das Projekt begonnen, inhaltlich weiterentwickelt und abgeschlossen haben. Dr. Jasper Prüßmann hatte zuvor wichtige Methoden etabliert und Dr. Aleksandra Ozga konnte während der Abwesenheit von Dr. Mauro Di Pilato und mir aufgrund der COVID-19-Pandemie abschließende Experimente im Rahmen des *Revision*-Prozesses ausführen.

### 3.3.2 Beitrag zur Publikation II

Als Co-Autor der Publikation II: „Neutrophil subtypes shape HIV-specific CD8 T cell responses after vaccinia virus infection” (npj Vaccines, 2021) war ich maßgeblich an der Planung, der Durchführung und der anschließenden Analyse und Visualisierung der Interaktionen zwischen den neutrophilen Granulozyten,  $N\alpha$  und  $N\beta$ , und zytotoxischen T-Zellen in murinen Milzen *in vivo* (Figure 3 A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K) beteiligt.

Dieser Prozess bestand aus der mikrochirurgischen Vorbereitung der Mausmodelle, den intravenösen Injektionen von GFP-markierten neutrophilen Granulozyten, der intraperitonealen Immunisierung mittels der Vakzine NYVAC-C  $\Delta 3$  und der anschließenden intravitalen Multiphotonenmikroskopie.

Die Rohdaten bestanden aus Videos multipler optischer Querschnitte, welche das bildgebende Volumen von  $N\alpha$ ,  $N\beta$  und  $CD8^+$  T-Zellen im Milzparenchym darstellten. Da das Migrationsverhalten der neutrophilen Granulozyten relativ zu den T-Zellen von Interesse war, wendete ich Matlab-Skripte an, um dynamische Zellbahnparameter zu kalkulieren, basierend auf zeitlich abhängigen Koordinaten rekonstruierter Zelloberflächen in Imaris. Daraus habe ich entscheidende Parameter, wie *Displacement Length*, *Speed* und mehrere Kontaktparameter ableiten können (Figure 3 H, I, J, K).

Letztlich habe ich die graphische Aufarbeitung dieser Arbeit, *Figure 7*, sämtlich konzeptionell erarbeitet und erstellt.

## 4. Deutsche Zusammenfassung

### 4.1 Zusammenfassung der Publikation I

#### 4.1.1 Der Chemokinrezeptor CXCR6 ist für die antitumorale Immunantwort zytotoxischer T-Zellen essentiell

Im immunogenen, murinen Melanommodell D4M.3A-pOVA konnte durch transkriptionelle Einzelzellanalysen gezeigt werden, dass intratumorale CD8<sup>+</sup> *effector-like* T-Zellen, welche durch Expression der Effektorgene *Gzmb* und *Havcr2* charakterisiert sind, und *memory-like* T-Zellen, gekennzeichnet durch *Nsg2*- und *Tcf7*-Expression, von allen Chemokinrezeptorgenen *Cxcr6* am stärksten exprimierten. Auf Proteinebene wurden PD-1<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen (CTL) untersucht, um die Chemokinrezeptorexpression auf aktivierten (Honda *et al.*, 2014), tumorspezifischen T-Zellen zu beschränken (Simoni *et al.*, 2018; Scheper *et al.*, 2019). Hierunter zeigte sich in TCF-1<sup>pos</sup> *stem-like* T-Zellen eine negative/niedrige, intermediäre und hohe Expression und in TCF-1<sup>neg</sup> *effector-like* T-Zellen eine homogen hohe Expression von CXCR6, was im Zusammenhang bekannter Differenzierungsverläufe antigenspezifischer T-Zellen (Utzschneider *et al.*, 2016; Siddiqui *et al.*, 2019) eine chemotaktische Reprogrammierung nach Verlust von TCF-1 suggeriert. Schließlich konnte in den Tumormodellen D4M.3A-pOVA, YUMM1.1 und LLC1 ein beschleunigtes Tumorwachstum in *Cxcr6*<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu wildtypischen (WT) Mäusen gezeigt werden.

#### 4.1.2 Die Expansion und das Überleben von *effector-like*, zytotoxischen T-Zellen im Tumormikromilieu ist abhängig von CXCR6

Nachdem eine größere Rolle von CXCR6 im *Priming* naiver CTL ausgeschlossen wurde, konnte allerdings eine signifikant stärkere Akkumulation und Persistenz von WT TCF-1<sup>neg</sup> OT-I-Zellen im Vergleich zu *Cxcr6*<sup>-/-</sup> OT-I-Zellen im Mikromilieu von D4M.3A-pOVA-Tumoren gezeigt werden. Diese Diskrepanz konnte insbesondere durch eine verminderte Proliferation und eine erhöhte Apoptoserate der hochfunktionellen, transitorischen TCF-1<sup>neg</sup> CTL der *Cxcr6*<sup>-/-</sup>-Zellen, welche durch die Expression von T-bet, Granzym B und CX3CR1 charakterisiert sind (William H Hudson *et al.*, 2019; Zander *et al.*, 2019), erklärt werden. Um eine Rolle CXCR6-abhängiger Programmierung des zellulären Überlebens von CTL in tumordrainierenden Lymphknoten auszuschließen, wurden *in vitro* differenzierte TCF-1<sup>neg</sup> WT und CXCR6-depletierte zytotoxische T-Zellen, welche sich phänotypisch und funktionell nicht unterschieden, in tumortragende Mäuse injiziert, wobei sich hier eine komplette Absenz jeglicher



antitumoralen Aktivität der *Cxcr6*<sup>-/-</sup> CTL zeigte. Dieser Effekt konnte hauptsächlich der höheren Apoptoserate der *Cxcr6*<sup>-/-</sup> CX3CR1<sup>hi</sup> TCF-1<sup>neg</sup> CTL innerhalb des Tumormikromilieus zugeschrieben werden. Folglich ist die Förderung des Zellüberlebens die zentrale Funktion von intratumoral exprimiertem CXCR6 in zytotoxischen T-Zellen.

#### **4.1.3 CXCR6 fördert intratumorale Interaktionen zwischen zytotoxischen T-Zellen und perivaskulären Clustern von CXCL16<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup> DC3**

Bei Exploration der transkriptionellen Einzelzelldaten intratumoraler Immunzellen in D4M.3A-pOVA-Tumoren stellte sich heraus, dass CCR7<sup>+</sup> dendritische Zellen 3 (DC3) die stärkste Expression des CXCR6-Liganden *Cxcl16* aufwiesen. Durchflusszytometrisch konnten sowohl bekannte Marker von cDC1, XCR1 und CD103, und von cDC2, wie CD172a, in Subpopulationen von DC3 identifiziert werden, was darauf hindeutet, dass diese von beiden cDC-Subtypen entstammen können. Um die Rolle von CXCR6 in der Orchestrierung von Interaktionen zwischen zytotoxischen T-Zellen und DC3 zu erproben, wurden DC3 im IL-12 p40-YFP-Mausmodell nach Implantation der amelanotischen H2B-Cerulean-markierten D4M.3A-Tumorzellen selektiv mittels intravitraler Multiphotonenmikroskopie (MP-IVM) dargestellt (Zilionis *et al.*, 2019; Maier *et al.*, 2020). Hierbei wurden DC3 hauptsächlich im Tumorstroma, insbesondere um umschriebene Blutgefäßabschnitte, identifiziert. Bei der Untersuchung des dynamischen Migrationsverhaltens von WT und *Cxcr6*<sup>-/-</sup> TCF-1<sup>neg</sup> OT-I-Zellen konnte eine signifikant präferenzielle Akkumulation von WT im Vergleich zu *Cxcr6*<sup>-/-</sup> OT-I-Zellen proximal der perivaskulären YFP<sup>+</sup> DC3-Cluster festgestellt werden. Nach Quantifizierung multipler Migrationsparameter konnte besonders in Regionen distal der DC3-Cluster eine langsamere, weniger gerade und vermindert gesamt-dislozierte Migration von WT im Vergleich zu *Cxcr6*<sup>-/-</sup> OT-I-Zellen beobachtet werden.

#### **4.1.4 DC3 transpräsentieren das Überlebenssignal IL-15 an effector-like, zytotoxische T-Zellen im tumoralen Mikromilieu**

Um die funktionelle Relevanz von CXCL16 auf DC3 zu testen, wurden murine *Cxcl16* KO: zDC<sup>DTR</sup> → B6 Knochenmarkchimäre generiert, in welchen cDC spezifisch durch systemische Diphtherietoxin-Gabe depletiert werden konnten. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sich nach DC-Ablation die Apoptoserate von WT OT-I-Zellen signifikant steigerte, was auf einen entscheidenden Einfluss der CXCL16-Expression in DC3 auf das Überleben von TCF-1<sup>neg</sup> CTL hindeutete. Zur Identifikation der verantwortlichen Faktoren, welche die Proliferation und das Überleben von zytotoxischen T-Zellen fördern können, wurden sämtliche Kandidaten auf transkriptioneller Ebene analysiert. Im

Vergleich aller intratumoralen antigenpräsentierenden Zellen (APC) exprimierten DC3 die höchsten mRNA-Level von *Cd80* und *Cd86* der B7-Familie, zusätzlich zu *Tnfsf4* (OX40-Ligand), *Tnfsf9* (4-1BB-Ligand) und an der p40-Untereinheit des Zytokins IL-12/IL-23 und schließlich IL-15. DC3, insbesondere CCR7<sup>hi</sup> DC3, wiesen zusätzlich die höchste Expression von IL-15R $\alpha$  auf, welches *in vivo* zur Transpräsentation von IL-15 an CTL nötig ist (Dubois *et al.*, 2002; Stonier *et al.*, 2008). Zur Klärung der spezifischen Rolle von IL-15R $\alpha$  auf cDC, wurden murine *Il15ra* KO:zDC<sup>DTR</sup>  $\rightarrow$  B6 Knochenmarkchimäre geschaffen, in welchen IL-15-kompetente cDC selektiv ablädiert werden konnten. Erneut konnte nach der Depletion eine Erhöhung der Apoptoserate und zusätzlich der Bim-Expression in WT TCF-1<sup>neg</sup> OT-I CTL festgestellt werden, was eine CXCR6-abhängige IL-15-Transpräsentation durch IL-15R $\alpha$ <sup>+</sup> cDC an TCF-1<sup>neg</sup> CTL zur Förderung des zellulären Überlebens und letztlich der intratumoralen Akkumulation der CTL nahelegt.

#### 4.1.5 CXCR6-Expression als prognostischer Marker in humanen Krebserkrankungen

In öffentlichen Datensätzen des *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) wurden RNA-Sequenzierungsdaten von Patienten mit malignen Melanomen analysiert. Hierbei korrelierte *CXCR6* im Tumorgewebe mit *CD8b*, allerdings weniger stark mit *CD4* oder der NK-Zell-Signatur, was – analog zu murinen Daten – auf eine präferenzielle Expression von *CXCR6* in zytotoxischen T-Zellen in humanen Melanomen hinweist. Darüber hinaus zeigten die Patienten im höchsten Drittel der *CXCR6*-Expression eine höhere Überlebenswahrscheinlichkeit auf als die Patienten im untersten Drittel. Des Weiteren korrelierte *CXCR6* mit der Expression seines Liganden *CXCL16*, mit *IL12B* und mit der NK-Zell-Signatur, allerdings erwies sich *CXCR6* unter diesen als besserer Prädiktor für das Gesamtüberleben. Bei Vergleich von stetigen, normalisierten Expressionslevels aller Chemokinrezeptoren, fiel *CXCR6* als bester Prädiktor für das Gesamtüberleben von Melanompatienten auf, gefolgt von *CCR2*, *CCR5* und *CXCR3*. Nach Heranziehen der Datensätze aller verfügbaren, soliden Tumorentitäten der TCGA-Datenbank stellte sich *CXCR6* zusätzlich als Prädiktor für das Gesamtüberleben von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren, Adenokarzinomen der Lunge und Brustkrebs heraus.

## 4.2 Zusammenfassung der Publikation II

### 4.2.1 Intrasplenische Akkumulation neutrophiler Granulozyten geht der HIV-spezifischen T-Zell-Immunantwort voraus

Nach intraperitonealer Injektion von  $10^7$  Plaque-bildender Einheiten (PFU) des *Vaccinia Virus* (VACV)-angehörigen Stamms NYVAC-C  $\Delta A52R\Delta B15R\Delta K7R$  (NYVAC-C  $\Delta 3$ ) (di Pilato et al., 2015, 2017) konnte nach zwei Stunden eine Akkumulation Ly6G<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> neutrophiler Granulozyten im Blut, der Peritonealhöhle und Milz von BALB/c-Mäusen beobachtet werden. Insbesondere im Bereich CD21/35<sup>+</sup> Regionen in den Marginalzonen der Milz und spezifisch um CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Areale konnte eine präferentielle Ansammlung von Ly6G<sup>+</sup> Neutrophilen im Gegensatz zu den Kontroll-Tieren identifiziert werden. Bei Anwendung eines heterologen Immunisierungsprotokolls, welches aus einer initialen intramuskulären Injektion rekombinanter DNA (rDNA) und einer anschließenden Applikation von NYVAC-C/NYVAC-C  $\Delta 3$  intraperitoneal bestand, konnte eine höhere T-Zell-spezifische Immunogenität erreicht werden (Gómez et al., 2007). Nach Stimulation von Splenozyten immunisierter Mäuse mittels HIV-1 Pol-1- oder Pol-2-Peptiden wurden höhere absolute und relative Mengen polyfunktioneller, HIV-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen gemessen, was anhand der Expression von IFN- $\gamma$  und/oder TNF und/oder *lysosomal-associated membrane protein-1* (LAMP-1 oder auch CD107a) durchflusszytometrisch erfasst wurde.

### 4.2.2 Die Subpopulationen N $\alpha$ und N $\beta$ neutrophiler Granulozyten zeigen intrasplenisch unterschiedliche Migrationsverhalten und Interaktionskapazitäten mit zytotoxischen T-Zellen auf

In der Peritonealhöhle NYVAC-C  $\Delta 3$ -infizierter Tiere konnten zwei Subpopulationen neutrophiler Granulozyten, N $\alpha$  und N $\beta$ , durch unterschiedliche Größe, transkriptioneller Aktivität und Ly6G/CD11b-Expression, bei ähnlicher Ly6B.2-Expression, differenziert werden. Durch Visualisierung GFP<sup>+</sup> Neutrophiler mittels intravitaler Multiphotonenmikroskopie konnten N $\alpha$  und N $\beta$  durch das mittlere Zellvolumen computergestützt unterschieden und das jeweilige dynamische, migratorische Verhalten *in vivo* untersucht werden. Hierbei wurden eine vergrößerte Dislokationslänge, eine höhere Geschwindigkeit und ein größerer Arrestkoeffizient für N $\beta$  im Vergleich zu N $\alpha$  gezeigt, was auf ein ausgeprägteres patrouillierendes Verhalten dieser Zellen hinwies. Zur Testung, ob das divergierende Migrationsverhalten mit einer veränderten Interaktionsfähigkeit mit CD8<sup>+</sup> T-Zellen korreliert, wurden zytotoxische T-Zellen Pockenvirus-infizierter Mäuse mit GFP-markierten neutrophilen Granulozyten in NYVAC-C3  $\Delta 3$ -immunisierte Tiere adoptiv transferiert. Obwohl beide Neutrophilen-

Subpopulationen ähnliche Interaktionsdauern und vergleichbare Kontaktzeiten relativ zur visualisierten Zeit aufzeigten, war ein höherer Prozentsatz von N $\beta$  in Kontakt mit CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Zudem wiesen diese eine höhere Kapazität auf längere Migrationsstrecken zu überwinden, um mit T-Zellen in Interaktion treten zu können.

#### **4.2.3 N $\alpha$ und N $\beta$ weisen lokalisationspezifisch unterschiedliche $\alpha$ 4 $\beta$ 1-Integrin-Expressionen auf**

Die Expressionen multipler Oberflächenproteine, welche in der Migration und Adhäsion neutrophiler Granulozyten involviert sind, wurden zur Klärung der verschiedenen Migrationsverhalten der Neutrophilen-Subpopulationen herangezogen. CXCR2 wurde in der Peritonealhöhle von NYVAC-C  $\Delta$ 3-infizierten C57Bl/6 J-Mäusen von N $\alpha$  und N $\beta$  ähnlich stark exprimiert, allerdings wiesen N $\beta$  eine signifikant höhere Expression von IL-1R, CD49d ( $\alpha$ 4) und CD29 ( $\beta$ 1) auf. Im Blut der gleichen Tiere zeigten N $\beta$  ebenfalls höhere Expressionen von CD49d und CD29 im Gegensatz zu N $\alpha$  auf, allerdings in höheren Mengen als N $\beta$  der Peritonealhöhle. In der Milz konnten vergleichbare Expressionen von IL-1R und CXCR2 auf sowohl N $\alpha$  und N $\beta$  beobachtet werden, allerdings überexprimierten N $\beta$  nach wie vor das  $\alpha$ 4 $\beta$ 1-Integrin, auch *very-late-antigen 4* (VLA-4) genannt. Schließlich konnten im Blut, der Peritonealhöhle und Milz signifikant größere Populationen von VLA-4<sup>hi</sup> N $\beta$  identifiziert werden, während in allen untersuchten Organen VLA-4 in N $\alpha$  homogen niedrig exprimiert wurden.

#### **4.2.4 Inhibition des $\alpha$ 4 $\beta$ 1-Integrins verbessert die HIV-spezifische zytotoxische T-Zell-Antwort durch Erhöhung des N $\beta$ /N $\alpha$ -Quotienten**

Zur Überprüfung, ob eine gezielte Manipulation des Neutrophilen-Infiltrats im primären Infektionsherd durch Inhibition des auf N $\alpha$  und N $\beta$  differentiell exprimierten VLA-4 zugunsten einer effektiveren, zytotoxischen T-Zell-Antwort möglich ist, wurden Mäuse mit dem inhibitorischen, monoklonalen anti- $\alpha$ 4 $\beta$ 1 Antikörper Natalizumab (Niino *et al.*, 2006) therapiert und anschließend mit NYVAC-C  $\Delta$ 3 infiziert. In der Peritonealhöhle und der Milz behandelte Mäuse fanden sich vergleichbare Mengen an CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, NK- und B-Zellen, sowie dendritischen Zellen und Makrophagen wie in den Organen der Tiere, die einen IgG2b-Kontrollantikörper erhielten. Allerdings konnte ein signifikant höherer N $\beta$ /N $\alpha$ -Quotient sowohl in der Peritonealhöhle als auch in der Milz Natalizumab-behandelter Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden, mutmaßlich aufgrund alterierter Neutrophilenrekrutierung und folglich Akkumulation. Um eine Veränderung der daraus resultierenden adaptiven zytotoxischen T-Zell-Antwort zu testen, wurden BALB/c-Mäuse mit dem oben erwähnten Protokoll heterolog immunisiert

und mit Natalizumab/IgG2b behandelt. Bei Quantifizierung der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort auf Pol-1-/Pol-2-Antigene konnte in Natalizumab-therapierten Tieren eine deutliche größere absolute und relative Menge Effektorzytokine-sezernierender CD8<sup>+</sup> T-Zellen (IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> und/oder TNF<sup>+</sup> und/oder CD107a<sup>+</sup>) festgestellt werden, bei vergleichbarer polyfunktionaler Kapazität, welche anhand der Möglichkeit mehr als eine dieser Effektorzytokine exprimieren zu können definiert wurde. Die Abhängigkeit dieser HIV-spezifischen zytotoxischen T-Zell-Antwort von neutrophilen Granulozyten wurde durch Depletion dieser mittels Injektion eines anti-Ly6G monoklonalen Antikörpers vor dem NYVAC-C  $\Delta$ 3-Booster überprüft. Dabei zeigte sich eine ähnliche, verminderte CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort sowohl in anti-VLA-4-Antikörper- als auch in Kontrollantikörper-behandelten Mäusen.

## 5. English Summary

### 5.1 Summary of publication I

#### 5.1.1 The chemokine receptor CXCR6 is pivotal for antitumor immune responses mediated by cytotoxic T cells

Utilizing the immunogenic, murine melanoma model D4M.3A-pOVA, we analyzed single cell transcriptomes of enriched intratumoral immune cells in order to systematically explore chemokine receptor expression levels of tumor-infiltrating cytotoxic T cells (CTL). Both the CD8<sup>+</sup> effector-like T cell state, which was characterized by *Gzmb* and *Havcr2* expression, and the memory-like T cell state, which was defined by expression of *Nsg2* and *Tcf7*, expressed among all chemokine receptor genes most highly *Cxcr6*. On protein level PD-1<sup>+</sup> CTL were assessed by flow cytometry to focus our analyses on activated (Honda *et al.*, 2014) and tumor-specific (Simoni *et al.*, 2018; Scheper *et al.*, 2019) CD8<sup>+</sup> T cells. Among these, TCF-1<sup>pos</sup> stem-like T cells displayed a negative/low, intermediate and high CXCR6 expression whereas TCF-1<sup>neg</sup> effector-like T cells showed a uniformly high expression. In the light of published differentiation trajectories of antigen-specific T cells in chronic viral infections and cancer (Utzschneider *et al.*, 2016; Siddiqui *et al.*, 2019), this suggests a major chemotactic reprogramming resulting from loss of TCF-1. Lastly, multiple immunogenic tumor types, such as D4M.3A-pOVA, YUMM1.1 and LLC1, exhibited accelerated tumor growth rates in *Cxcr6*<sup>-/-</sup> mice compared to wildtype (WT) animals.

#### 5.1.2 The expansion and survival of effector-like cytotoxic T cells in the tumor microenvironment is dependent on CXCR6

After excluding a significant role of CXCR6 in optimizing CTL priming, we identified significant accumulation and persistence of WT TCF-1<sup>neg</sup> OT-I cells compared to *Cxcr6*<sup>-/-</sup> OT-I cells within the D4M.3A-pOVA tumor microenvironment. This discrepancy was mainly due to reduced proliferation and higher apoptotic rates of a highly functional transitory TCF-1<sup>neg</sup> CTL subset of *Cxcr6*<sup>-/-</sup> cells, which is characterized by T-bet, granzyme B and CX3CR1 expression (William H Hudson *et al.*, 2019; Zander *et al.*, 2019). In order to exclude survival-enhancing CXCR6-dependent pre-programming in tumor-draining lymph nodes, we injected *in vitro* differentiated TCF-1<sup>neg</sup> WT and *Cxcr6*<sup>-/-</sup> cytotoxic T cells, which did not differ phenotypically and functionally, into tumor-bearing mice. Here, *Cxcr6*<sup>-/-</sup> TCF-1<sup>neg</sup> CTL were completely devoid of antitumoral effects compared to their WT counterparts. This effect could be mainly ascribed to higher apoptotic rates of CXCR6-deficient CX3CR1<sup>hi</sup> TCF-1<sup>neg</sup> CTL within the tumor

microenvironment. Thus, supporting cellular survival is the central function of intratumorally expressed CXCR6 in cytotoxic T cells.

### 5.1.3 CXCR6 promotes intratumoral interactions between cytotoxic T cells and perivascular clusters of CXCL16<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup> DC3s

When exploring single cell transcriptomes of intratumoral immune cells of D4M.3A-pOVA tumors we found that CCR7<sup>+</sup> dendritic cells 3 (DC3) displayed the highest expression of the CXCR6 ligand *Cxcl16*. By flow cytometry we detected that subsets of DC3 expressed known markers of both conventional dendritic cell (cDC) 1, such as XCR1 and CD103, and cDC2, like CD172a, which indicated that DC3 might derive from either cDC subset. To better understand the role of CXCR6 in orchestrating interactions between cytotoxic T cells and DC3, we implanted amelanotic H2B-Cerulean-tagged D4M.3A tumor cells into Interleukin (IL)-12 p40-YFP reporter mice, which allowed us to selectively visualize DC3 by intravital multiphoton microscopy (MP-IVM) (Zilionis *et al.*, 2019; Maier *et al.*, 2020). Hereby, DC3 mainly localized within the tumor stroma, especially aligned around discrete vessel segments. Analyzing the dynamic migration behavior of WT and *Cxcr6*<sup>-/-</sup> TCF-1<sup>neg</sup> OT-I cells we found enhanced accumulation of WT compared to *Cxcr6*<sup>-/-</sup> OT-I cells proximal of perivascular YFP<sup>+</sup> DC3 clusters. When quantifying multiple dynamic track parameters of migrating cytotoxic T cells we observed significantly reduced speeds, less straight paths and diminished displacements of WT OT-I cells in comparison to *Cxcr6*<sup>-/-</sup> CTL in regions distal of DC3 clusters.

### 5.1.4 DC3 *trans*-present the survival signal IL-15 to effector-like cytotoxic T cells in the tumor microenvironment

To test for the functional relevance of CXCL16 expressed by DC3, we generated murine *Cxcl16* KO: zDC<sup>DTR</sup> → B6 mixed bone marrow chimera, in which cDC could be specifically ablated by systemic diphtheria toxin treatment. Here, we could show that cDC depletion elevated apoptotic rates of WT OT-I cells significantly which suggested a critical role of CXCL16 expression in DC3 in regard to the cellular survival of TCF-1<sup>neg</sup> cytotoxic T cells. In order identify responsible factors, which might support proliferation and survival of CTL, we systematically explored potential candidates on transcriptional level. Comparing all intratumoral antigen presenting cells (APC) DC3 expressed the highest levels of B7 family *Cd80* and *Cd86* mRNA, in addition to *Tnfsf4* (OX40 ligand), *Tnfsf9* (4-1BB ligand) and the p40 subunit of the cytokine IL-12/IL-23 and finally IL-15. Furthermore, DC3, particularly CCR7<sup>hi</sup> DC3, exhibited the highest expression of IL-15R $\alpha$  which is required to *trans*-present IL-15 to CTL *in vivo* (Dubois *et al.*, 2002; Stonier *et al.*, 2008). To determine the role of IL-15R $\alpha$  specifically on cDC, murine *Il15ra* KO:zDC<sup>DTR</sup>

→ B6 mixed bone marrow chimera were created in which IL-15-competent cDC could be selectively ablated. Again, depletion of cDC subsets raised the apoptotic rate and additionally Bim expression of WT TCF-1<sup>neg</sup> OT-I CTL considerably which indicated CXCR6-dependent IL-15 *trans*-presentation via IL-15R $\alpha$ <sup>+</sup> cDC to TCF-1<sup>neg</sup> CTL in order foster cellular survival and thus intratumoral accumulation of the latter cell type.

### 5.1.5 CXCR6 expression as prognostic marker in human cancer patients

In publicly available data sets of The Cancer Genome Atlas (TCGA) we analyzed RNA sequencing data of melanoma patients. Here, we found that *CXCR6* strongly correlated with *CD8b* in tumor tissue, however less so with *CD4* or the NK cell signature, which – analogous to murine data – suggested a preferential expression of *CXCR6* in cytotoxic T cells in human melanoma. Moreover, the upper third of patients with the highest *CXCR6* expression displayed a significantly better survival probability compared to patients of the bottom third. In addition, *CXCR6* correlated with the expression of its ligand *CXCL16*, with *IL12B* and with the NK cell signature, *CXCR6*, however, revealed to be a better predictor for overall survival. When comparing continuous normalized expression levels of all chemokine receptor genes *CXCR6* turned out to be the best predictor for overall survival of melanoma patients, followed by *CCR2*, *CCR5* and *CXCR3*. After extending our analyses to all available solid tumor entities of the TCGA data base, we found that *CXCR6* was able to predict survival of patients with head and neck tumors, adenocarcinoma of lungs and breast cancer.

## 5.2 Summary of publication II

### 5.2.1 Intrasplenic accumulation of neutrophils precedes HIV-specific CD8<sup>+</sup> T-cell responses

After intraperitoneal injection of 10<sup>7</sup> plaque-forming units (PFU) of the vaccinia virus (VACV) strain NYVAC-C  $\Delta$ A52R $\Delta$ B15R $\Delta$ K7R (NYVAC-C  $\Delta$ 3) (di Pilato et al., 2015, 2017) into BALB/c mice, Ly6G<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> neutrophil granulocytes accumulated within two hours in the blood, peritoneal cavity and spleen of aforementioned animals. In particular within CD21/35<sup>+</sup> areas of the marginal zones in the spleen and more specifically around CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> regions Ly6G<sup>+</sup> neutrophils localized preferentially compared to PBS-injected mice. By deploying a heterologous immunization protocol, which consisted of an initial intramuscular injection of recombinant DNA (rDNA) and a following application of NYVAC-C/NYVAC-C  $\Delta$ 3 intraperitoneally we achieved a more immunogenic antigen-specific T cell response (Gómez *et al.*, 2007). After exposing splenocytes of immunized mice to human immunodeficiency virus (HIV)-1 pol-1 or pol-2 peptides, higher absolute



and relative amounts of polyfunctional, HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells were measured, which was assessed by the expression levels of interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) and/or tumor necrosis factor (TNF) and/or lysosomal-associated membrane protein-1 (LAMP-1 or CD107a).

### **5.2.2 Neutrophil subsets N $\alpha$ and N $\beta$ exhibit different dynamic migration behaviors and interaction capacities with cytotoxic T cells intrasplenically**

Within the peritoneal cavity of NYVAC-C  $\Delta$ 3-infected mice we could differentiate two subpopulations of neutrophil granulocytes, N $\alpha$  and N $\beta$ , by their different sizes, transcriptomic activity and Ly6G/CD11b expression. However, they exhibited similar Ly6B.2 expression. By visualizing GFP<sup>+</sup> neutrophils via intravital multiphoton microscopy N $\alpha$  and N $\beta$  could be discriminated computationally utilizing tracked mean volumes and their dynamic migratory behavior *in vivo* could be analyzed. Here, we found higher displacement lengths, speeds and arrest coefficients for N $\beta$  compared to N $\alpha$ , which suggested a pronounced patrolling behavior of these. To test whether the diverging migratory behavior resulted in different interaction capacities with CD8<sup>+</sup> T cells, we adoptively transferred cytotoxic T cells of poxvirus-infected mice with GFP-tagged neutrophil granulocytes into NYVAC-C3  $\Delta$ 3-immunized animals. Although both neutrophil subpopulations displayed comparable interaction durations and percentages of elapsed time in contact with CD8<sup>+</sup> T cells, a higher proportion of N $\beta$  demonstrated CD8<sup>+</sup> T cell contacts. In addition, N $\beta$  exhibited an enhanced capacity to overcome longer distances in order to establish CD8<sup>+</sup> T cell interactions.

### **5.2.3 N $\alpha$ and N $\beta$ display distinct localization-specific $\alpha$ 4 $\beta$ 1 integrin expression**

The expression levels of multiple surface proteins, which are involved in migration and adhesion of neutrophil granulocytes, were analyzed to investigate different migration behaviors of both neutrophil subpopulations. N $\alpha$  and N $\beta$  expressed comparable levels of CXCR2 within the peritoneal cavity of NYVAC-C  $\Delta$ 3-infected C57Bl/6 J mice, however, N $\beta$  showed significantly higher expressions of IL-1R, CD49d ( $\alpha$ 4) and CD29 ( $\beta$ 1). In the blood of the same animals N $\beta$  displayed higher expression levels of CD49d and CD29 compared to N $\alpha$  as well, even higher amounts than N $\beta$  in the peritoneal cavity. In the spleen IL-1R and CXCR2 in N $\alpha$  and N $\beta$  were similarly expressed, however, N $\beta$  still expressed increased amounts of  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 integrin respectively very-late-antigen-4 (VLA-4). Lastly, we could identify significantly larger populations of VLA-4<sup>hi</sup> N $\beta$  in blood, the

peritoneal cavity and the spleen, whereas in all tested organs  $N\alpha$  expressed VLA-4 in homogenously low levels.

#### **5.2.4 Inhibition of $\alpha 4\beta 1$ integrin enhances HIV-specific cytotoxic T-cell responses by increasing $N\beta/N\alpha$ ratio**

To investigate whether we could manipulate neutrophil subpopulations in the primary infection site by inhibiting differentially expressed VLA-4 by  $N\alpha$  and  $N$  to elicit an effective HIV-specific, cytotoxic T-cell response, we treated mice with the inhibitory monoclonal anti- $\alpha 4\beta 1$  antibody natalizumab (Niino *et al.*, 2006) and subsequently infected them with NYVAC-C  $\Delta 3$ . In the peritoneal cavity and the spleen of treated mice we found comparable amounts of  $CD4^+$  and  $CD8^+$  T cells, NK and B cells, as well as dendritic cells and macrophages compared to the organs of control IgG2b-injected mice. However, we identified significantly higher  $N\beta/N\alpha$  ratios in both the peritoneal cavity and the spleen of natalizumab-treated mice in comparison to the control group, putatively because of altered neutrophil recruitment and thus accumulation. To test whether this effect affected the resulting adaptive cytotoxic, HIV-specific T-cell response, BALB/c mice were immunized with aforementioned protocol and additionally treated with natalizumab or control IgG2b. When quantifying the  $CD8^+$  T cell response against HIV pol-1 and pol-2 antigens natalizumab-injected animals exhibited higher amounts of absolute and relative amounts of effector-cytokine secreting  $CD8^+$  T cells ( $IFN-\gamma^+$  and/or  $TNF^+$  and/or  $CD107a^+$ ). However, polyfunctionality, which was assessed by the capacity of CTL to express more than one effector cytokine, was not altered. The dependency of the HIV-specific, cytotoxic T-cell response on neutrophil granulocytes was tested by depleting the latter via injection of anti-Ly6G monoclonal antibodies before the NYVAC-C  $\Delta 3$  booster. Here, both anti-VLA-4 antibody and control antibody-treated mice showed a similar and diminished  $CD8^+$  T-cell response.

## 6. Literaturverzeichnis

Ackerman, M.E. *et al.* (2016) 'Polyfunctional HIV-Specific Antibody Responses Are Associated with Spontaneous HIV Control', *PLOS Pathogens*, 12(1), p. e1005315. Available at: .

Balabanian, K. *et al.* (2005) 'The Chemokine SDF-1/CXCL12 Binds to and Signals through the Orphan Receptor RDC1 in T Lymphocytes', *Journal of Biological Chemistry*, 280(42), pp. 35760–35766. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M508234200>.

Banga, R. *et al.* (2016) 'PD-1+ and follicular helper T cells are responsible for persistent HIV-1 transcription in treated aviremic individuals', *Nature Medicine*, 22(7), pp. 754–761. Available at: <https://doi.org/10.1038/nm.4113>.

Basu, R. *et al.* (2016) 'Cytotoxic T Cells Use Mechanical Force to Potentiate Target Cell Killing', *Cell*, 165(1), pp. 100–110. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.021>.

Beauvillain, C. *et al.* (2007) 'Neutrophils efficiently cross-prime naive T cells in vivo', *Blood*, 110(8), pp. 2965–2973. Available at: <https://doi.org/10.1182/blood-2006-12-063826>.

Binnewies, M. *et al.* (2019) 'Unleashing Type-2 Dendritic Cells to Drive Protective Antitumor CD4+ T Cell Immunity', *Cell*, 177(3), pp. 556-571.e16. Available at: .

Borsa, M. *et al.* (2019) 'Modulation of asymmetric cell division as a mechanism to boost CD8 + T cell memory', *Science Immunology*, 4(34). Available at: <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aav1730>.

Böttcher, J.P. *et al.* (2018) 'NK Cells Stimulate Recruitment of cDC1 into the Tumor Microenvironment Promoting Cancer Immune Control', *Cell*, 172(5), pp. 1022-1037.e14. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.004>.

Böttcher, J.P. and Reis e Sousa, C. (2018) 'The Role of Type 1 Conventional Dendritic Cells in Cancer Immunity', *Trends in Cancer*, 4(11), pp. 784–792. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2018.09.001>.

Broz, M.L. *et al.* (2014) 'Dissecting the Tumor Myeloid Compartment Reveals Rare Activating Antigen-Presenting Cells Critical for T Cell Immunity', *Cancer Cell*, 26(5), pp. 638–652. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.09.007>.

van der Bruggen, P. *et al.* (1991) 'A Gene Encoding an Antigen Recognized by Cytolytic T Lymphocytes on a Human Melanoma', *Science*, 254(5038), pp. 1643–1647. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1840703>.

Bryce, S.A. *et al.* (2016) 'ACKR4 on Stromal Cells Scavenges CCL19 To Enable CCR7-Dependent Trafficking of APCs from Inflamed Skin to Lymph Nodes', *The Journal of Immunology*, 196(8), pp. 3341–3353. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501542>.

Buggert, M. *et al.* (2018) 'Identification and characterization of HIV-specific resident memory CD8 + T cells in human lymphoid tissue', *Science Immunology*, 3(24). Available at: <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aar4526>.

Cadilha, B.L. *et al.* (2021) 'Combined tumor-directed recruitment and protection from immune suppression enable CAR T cell efficacy in solid tumors', *Science Advances*, 7(24). Available at: <https://doi.org/10.1126/sciadv.abi5781>.

- Casanova-Acebes, M. *et al.* (2021) 'Tissue-resident macrophages provide a pro-tumorigenic niche to early NSCLC cells', *Nature*, 595(7868), pp. 578–584. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03651-8>.
- Cheng, S. *et al.* (2021) 'A pan-cancer single-cell transcriptional atlas of tumor infiltrating myeloid cells', *Cell*, 184(3), pp. 792-809.e23. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.010>.
- Chheda, Z.S. *et al.* (2016) 'Chemoattractant Receptors BLT1 and CXCR3 Regulate Antitumor Immunity by Facilitating CD8<sup>+</sup> T Cell Migration into Tumors', *The Journal of Immunology*, 197(5), pp. 2016–2026. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502376>.
- Chowdhury, A. *et al.* (2015) 'Differential Impact of *In Vivo* CD8<sup>+</sup> T Lymphocyte Depletion in Controller versus Progressor Simian Immunodeficiency Virus-Infected Macaques', *Journal of Virology*, 89(17), pp. 8677–8686. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.00869-15>.
- Chtanova, T. *et al.* (2008) 'Dynamics of Neutrophil Migration in Lymph Nodes during Infection', *Immunity*, 29(3), pp. 487–496. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.07.012>.
- Cocchi, F. *et al.* (1995) 'Identification of RANTES, MIP-1 $\alpha$ , and MIP-1 $\beta$  as the Major HIV-Suppressive Factors Produced by CD8<sup>+</sup> T Cells', *Science*, 270(5243), pp. 1811–1815. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.270.5243.1811>.
- Collins, D.R., Gaiha, G.D. and Walker, B.D. (2020) 'CD8<sup>+</sup> T cells in HIV control, cure and prevention', *Nature Reviews Immunology*, 20(8), pp. 471–482. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0274-9>.
- Connick, E. *et al.* (2007) 'CTL Fail to Accumulate at Sites of HIV-1 Replication in Lymphoid Tissue', *The Journal of Immunology*, 178(11), pp. 6975–6983. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.11.6975>.
- Connor, R.I. *et al.* (1997) 'Change in Coreceptor Use Correlates with Disease Progression in HIV-1-Infected Individuals', *Journal of Experimental Medicine*, 185(4), pp. 621–628. Available at: <https://doi.org/10.1084/jem.185.4.621>.
- Coulie, P.G. *et al.* (1995) 'A mutated intron sequence codes for an antigenic peptide recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(17), pp. 7976–7980. Available at: [.org/10.1073/pnas.92.17.7976](https://doi.org/10.1073/pnas.92.17.7976).
- Curtsinger, J.M. and Mescher, M.F. (2010) 'Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation', *Current Opinion in Immunology*, 22(3), pp. 333–340. Available at: [.org/10.1016/j.coi.2010.02.013](https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.02.013).
- Dangaj, D. *et al.* (2019) 'Cooperation between Constitutive and Inducible Chemokines Enables T Cell Engraftment and Immune Attack in Solid Tumors', *Cancer Cell*, 35(6), pp. 885-900.e10. Available at: [.org/10.1016/j.ccell.2019.05.004](https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.05.004).
- Dorner, B.G. *et al.* (2009) 'Selective Expression of the Chemokine Receptor XCR1 on Cross-presenting Dendritic Cells Determines Cooperation with CD8<sup>+</sup> T Cells', *Immunity*, 31(5), pp. 823–833. Available at: [.org/10.1016/j.immuni.2009.08.027](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.08.027).
- Dubois, S. *et al.* (2002) 'IL-15R $\alpha$  Recycles and Presents IL-15 In trans to Neighboring Cells', *Immunity*, 17(5), pp. 537–547. Available at: [.org/10.1016/S1074-7613\(02\)00429-6](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(02)00429-6).
- Dunsmore, G. *et al.* (2021) 'Neutrophils promote T-cell activation through the regulated release of CD44-bound Galectin-9 from the cell surface during HIV infection', *PLOS Biology*, 19(8), p. e3001387. Available at: [.org/10.1371/journal.pbio.3001387](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001387).

- Duraiswamy, J. *et al.* (2021) 'Myeloid antigen-presenting cell niches sustain antitumor T cells and license PD-1 blockade via CD28 costimulation', *Cancer Cell*, 39(12), pp. 1623-1642.e20. Available at: [.org/10.1016/j.ccell.2021.10.008](https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.10.008).
- Dustin, M.L. and Long, E.O. (2010) 'Cytotoxic immunological synapses', *Immunological Reviews*, 235(1), pp. 24–34. Available at: [.org/10.1111/j.0105-2896.2010.00904.x](https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2010.00904.x).
- Farhood, B., Najafi, M. and Mortezaee, K. (2019) 'CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes in cancer immunotherapy: A review', *Journal of Cellular Physiology*, 234(6), pp. 8509–8521. Available at: [.org/10.1002/jcp.27782](https://doi.org/10.1002/jcp.27782).
- Feig, C. *et al.* (2013) 'Targeting CXCL12 from FAP-expressing carcinoma-associated fibroblasts synergizes with anti-PD-L1 immunotherapy in pancreatic cancer', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(50), pp. 20212–20217. Available at: [.org/10.1073/pnas.1320318110](https://doi.org/10.1073/pnas.1320318110).
- Feng, Y. *et al.* (1996) 'HIV-1 Entry Cofactor: Functional cDNA Cloning of a Seven-Transmembrane, G Protein-Coupled Receptor', *Science*, 272(5263), pp. 872–877. Available at: [.org/10.1126/science.272.5263.872](https://doi.org/10.1126/science.272.5263.872).
- Frebel, H. *et al.* (2012) 'Programmed death 1 protects from fatal circulatory failure during systemic virus infection of mice', *Journal of Experimental Medicine*, 209(13), pp. 2485–2499. Available at: [.org/10.1084/jem.20121015](https://doi.org/10.1084/jem.20121015).
- Fridman, W.H. *et al.* (2012) 'The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome', *Nature Reviews Cancer*, 12(4), pp. 298–306. Available at: [.org/10.1038/nrc3245](https://doi.org/10.1038/nrc3245).
- Fu, Q. *et al.* (2016) 'Structural Basis and Functional Role of Intramembrane Trimerization of the Fas/CD95 Death Receptor', *Molecular Cell*, 61(4), pp. 602–613. Available at: [.org/10.1016/j.molcel.2016.01.009](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.01.009).
- Furumoto, K. *et al.* (2004) 'Induction of potent antitumor immunity by in situ targeting of intratumoral DCs', *Journal of Clinical Investigation*, 113(5), pp. 774–783. Available at: [.org/10.1172/JCI19762](https://doi.org/10.1172/JCI19762).
- Galon, J. and Bruni, D. (2019) 'Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies', *Nature Reviews Drug Discovery*, 18(3), pp. 197–218. Available at: [.org/10.1038/s41573-018-0007-y](https://doi.org/10.1038/s41573-018-0007-y).
- Garris, C.S. *et al.* (2018) 'Successful Anti-PD-1 Cancer Immunotherapy Requires T Cell-Dendritic Cell Crosstalk Involving the Cytokines IFN- $\gamma$  and IL-12', *Immunity*, 49(6), pp. 1148-1161.e7. Available at: [.org/10.1016/j.immuni.2018.09.024](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.09.024).
- Gerlach, C. *et al.* (2016) 'The Chemokine Receptor CX3CR1 Defines Three Antigen-Experienced CD8 T Cell Subsets with Distinct Roles in Immune Surveillance and Homeostasis', *Immunity*, 45(6), pp. 1270–1284. Available at: [.org/10.1016/j.immuni.2016.10.018](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.10.018).
- Goc, J. *et al.* (2014) 'Dendritic Cells in Tumor-Associated Tertiary Lymphoid Structures Signal a Th1 Cytotoxic Immune Contexture and License the Positive Prognostic Value of Infiltrating CD8<sup>+</sup> T Cells', *Cancer Research*, 74(3), pp. 705–715. Available at: [.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1342](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1342).
- Gómez, C.E. *et al.* (2007) 'Generation and immunogenicity of novel HIV/AIDS vaccine candidates targeting HIV-1 Env/Gag-Pol-Nef antigens of clade C', *Vaccine*, 25(11), pp. 1969–1992. Available at: [.org/10.1016/j.vaccine.2006.11.051](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.11.051).

- González-Martín, A. *et al.* (2011) 'Maximal T Cell–Mediated Antitumor Responses Rely upon CCR5 Expression in Both CD4+ and CD8+ T Cells', *Cancer Research*, 71(16), pp. 5455–5466. Available at: [.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1687](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1687).
- Griffith, J.W., Sokol, C.L. and Luster, A.D. (2014) 'Chemokines and Chemokine Receptors: Positioning Cells for Host Defense and Immunity', *Annual Review of Immunology*, 32(1), pp. 659–702. Available at: [.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120145](https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120145).
- Groot, F., Welsch, S. and Sattentau, Q.J. (2008) 'Efficient HIV-1 transmission from macrophages to T cells across transient virological synapses', *Blood*, 111(9), pp. 4660–4663. Available at: [.org/10.1182/blood-2007-12-130070](https://doi.org/10.1182/blood-2007-12-130070).
- Harlin, H. *et al.* (2009) 'Chemokine Expression in Melanoma Metastases Associated with CD8+ T-Cell Recruitment', *Cancer Research*, 69(7), pp. 3077–3085. Available at: [.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2281](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2281).
- He, R. *et al.* (2016) 'Follicular CXCR5-expressing CD8+ T cells curtail chronic viral infection', *Nature*, 537(7620), pp. 412–416. Available at: [.org/10.1038/nature19317](https://doi.org/10.1038/nature19317).
- Heinzel, K., Benz, C. and Bleul, C.C. (2007) 'A silent chemokine receptor regulates steady-state leukocyte homing *in vivo*', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(20), pp. 8421–8426. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0608274104>.
- Hellstrom, K.E. and Hellstrom, I. (2019) 'From the Hellstrom paradox toward cancer cure', in, pp. 1–24. Available at: <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2018.11.002>.
- Hensley-McBain, T. and Klatt, N.R. (2018) 'The Dual Role of Neutrophils in HIV Infection', *Current HIV/AIDS Reports*, 15(1), pp. 1–10. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11904-018-0370-7>.
- Hickman, H.D. *et al.* (2015) 'CXCR3 Chemokine Receptor Enables Local CD8+ T Cell Migration for the Destruction of Virus-Infected Cells', *Immunity*, 42(3), pp. 524–537. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.02.009>.
- Honda, T. *et al.* (2014) 'Tuning of Antigen Sensitivity by T Cell Receptor-Dependent Negative Feedback Controls T Cell Effector Function in Inflamed Tissues', *Immunity*, 40(2), pp. 235–247. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.11.017>.
- Hudson, William H *et al.* (2019) 'Proliferating Transitory T Cells with an Effector-like Transcriptional Signature Emerge from PD-1(+) Stem-like CD8(+) T Cells during Chronic Infection.', *Immunity*, 51(6), pp. 1043-1058.e4. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.11.002>.
- Hudson, William H. *et al.* (2019) 'Proliferating Transitory T Cells with an Effector-like Transcriptional Signature Emerge from PD-1+ Stem-like CD8+ T Cells during Chronic Infection', *Immunity*, 51(6), pp. 1043-1058.e4. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.11.002>.
- Hughes, C.E. and Nibbs, R.J.B. (2018) 'A guide to chemokines and their receptors', *The FEBS Journal*, 285(16), pp. 2944–2971. Available at: <https://doi.org/10.1111/febs.14466>.
- Idorn, M. *et al.* (2018) 'Chemokine receptor engineering of T cells with CXCR2 improves homing towards subcutaneous human melanomas in xenograft mouse model', *Oncolimmunology*, p. e1450715. Available at: <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1450715>.
- Im, S.J. *et al.* (2016) 'Defining CD8+ T cells that provide the proliferative burst after PD-1 therapy', *Nature*, 537(7620), pp. 417–421. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature19330>.

- Jansen, C.S. *et al.* (2019) 'An intra-tumoral niche maintains and differentiates stem-like CD8 T cells', *Nature*, 576(7787), pp. 465–470. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1836-5>.
- June, C.H. *et al.* (2018) 'CAR T cell immunotherapy for human cancer', *Science*, 359(6382), pp. 1361–1365. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.aar6711>.
- Keridani, D. *et al.* (2019) 'Wnt1 silences chemokine genes in dendritic cells and induces adaptive immune resistance in lung adenocarcinoma', *Nature Communications*, 10(1), p. 1405. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09370-z>.
- Klebanoff, S.J. and Coombs, R.W. (1992) 'Viricidal effect of polymorphonuclear leukocytes on human immunodeficiency virus-1. Role of the myeloperoxidase system.', *Journal of Clinical Investigation*, 89(6), pp. 2014–2017. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI115810>.
- Klotman, M.E. and Chang, T.L. (2006) 'Defensins in innate antiviral immunity', *Nature Reviews Immunology*, 6(6), pp. 447–456. Available at: <https://doi.org/10.1038/nri1860>.
- Kourtis, A.P., Hudgens, M.G. and Kayira, D. (2012) 'Neutrophil Count in African Mothers and Newborns and HIV Transmission Risk', *New England Journal of Medicine*, 367(23), pp. 2260–2262. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMc1202292>.
- Leong, Y.A. *et al.* (2016) 'CXCR5+ follicular cytotoxic T cells control viral infection in B cell follicles', *Nature Immunology*, 17(10), pp. 1187–1196. Available at: <https://doi.org/10.1038/ni.3543>.
- Lesch, S. *et al.* (2021) 'T cells armed with C-X-C chemokine receptor type 6 enhance adoptive cell therapy for pancreatic tumours', *Nature Biomedical Engineering*, 5(11), pp. 1246–1260. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41551-021-00737-6>.
- Lian, J. and Luster, A.D. (2015) 'Chemokine-guided cell positioning in the lymph node orchestrates the generation of adaptive immune responses', *Current Opinion in Cell Biology*, 36, pp. 1–6. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.05.003>.
- Lin, A. and Loré, K. (2017) 'Granulocytes: New Members of the Antigen-Presenting Cell Family', *Frontiers in Immunology*, 8. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01781>.
- Liu, Y. *et al.* (2021) 'IL-2 regulates tumor-reactive CD8+ T cell exhaustion by activating the aryl hydrocarbon receptor', *Nature Immunology*, 22(3), pp. 358–369. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41590-020-00850-9>.
- Lusso, P. (2006) 'HIV and the chemokine system: 10 years later', *The EMBO Journal*, 25(3), pp. 447–456. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600947>.
- Maier, B. *et al.* (2020) 'A conserved dendritic-cell regulatory program limits antitumour immunity', *Nature*, 580(7802), pp. 257–262. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2134-y>.
- Manches, O., Frléta, D. and Bhardwaj, N. (2014) 'Dendritic cells in progression and pathology of HIV infection', *Trends in Immunology*, 35(3), pp. 114–122. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.10.003>.
- Matsushima, H. *et al.* (2013) 'Neutrophil differentiation into a unique hybrid population exhibiting dual phenotype and functionality of neutrophils and dendritic cells', *Blood*, 121(10), pp. 1677–1689. Available at: <https://doi.org/10.1182/blood-2012-07-445189>.

- Maurice, N.J. *et al.* (2019) 'CXCR3 enables recruitment and site-specific bystander activation of memory CD8<sup>+</sup> T cells', *Nature Communications*, 10(1), p. 4987. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12980-2>.
- McLane, L.M., Abdel-Hakeem, M.S. and Wherry, E.J. (2019) 'CD8 T Cell Exhaustion During Chronic Viral Infection and Cancer', *Annual Review of Immunology*, 37(1), pp. 457–495. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-041015-055318>.
- Mikucki, M.E. *et al.* (2015) 'Non-redundant requirement for CXCR3 signalling during tumoricidal T-cell trafficking across tumour vascular checkpoints', *Nature Communications*, 6(1), p. 7458. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncomms8458>.
- Molon, B. *et al.* (2011) 'Chemokine nitration prevents intratumoral infiltration of antigen-specific T cells', *Journal of Experimental Medicine*, 208(10), pp. 1949–1962. Available at: <https://doi.org/10.1084/jem.20101956>.
- Monel, B. *et al.* (2019) 'HIV Controllers Exhibit Effective CD8<sup>+</sup> T Cell Recognition of HIV-1-Infected Non-activated CD4<sup>+</sup> T Cells', *Cell Reports*, 27(1), pp. 142-153.e4. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.03.016>.
- Mueller, S.N. and Mackay, L.K. (2016) 'Tissue-resident memory T cells: local specialists in immune defence', *Nature Reviews Immunology*, 16(2), pp. 79–89. Available at: <https://doi.org/10.1038/nri.2015.3>.
- Müller, M.R. and Rao, A. (2010) 'NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age', *Nature Reviews Immunology*, 10(9), pp. 645–656. Available at: <https://doi.org/10.1038/nri2818>.
- Nagarsheth, N., Wicha, M.S. and Zou, W. (2017) 'Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy', *Nature Reviews Immunology*, 17(9), pp. 559–572. Available at: <https://doi.org/10.1038/nri.2017.49>.
- Ng, C.T. *et al.* (2013) 'Networking at the Level of Host Immunity: Immune Cell Interactions during Persistent Viral Infections', *Cell Host & Microbe*, 13(6), pp. 652–664. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.05.014>.
- Ng'uni, T., Chasara, C. and Ndhlovu, Z.M. (2020) 'Major Scientific Hurdles in HIV Vaccine Development: Historical Perspective and Future Directions', *Frontiers in Immunology*, 11. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.590780>.
- Nguyen, S. *et al.* (2019) 'Elite control of HIV is associated with distinct functional and transcriptional signatures in lymphoid tissue CD8<sup>+</sup> T cells', *Science Translational Medicine*, 11(523). Available at: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aax4077>.
- Niino, M. *et al.* (2006) 'Natalizumab effects on immune cell responses in multiple sclerosis', *Annals of Neurology*, 59(5), pp. 748–754. Available at: <https://doi.org/10.1002/ana.20859>.
- Nouri-Shirazi, M. *et al.* (2000) 'Dendritic Cells Capture Killed Tumor Cells and Present Their Antigens to Elicit Tumor-Specific Immune Responses', *The Journal of Immunology*, 165(7), pp. 3797–3803. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.7.3797>.
- Ozga, A.J., Chow, M.T. and Luster, A.D. (2021) 'Chemokines and the immune response to cancer', *Immunity*, 54(5), pp. 859–874. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.01.012>.



- Pagès, F. *et al.* (2005) 'Effector Memory T Cells, Early Metastasis, and Survival in Colorectal Cancer', *New England Journal of Medicine*, 353(25), pp. 2654–2666. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa051424>.
- Parker, B.S., Rautela, J. and Hertzog, P.J. (2016) 'Antitumour actions of interferons: implications for cancer therapy', *Nature Reviews Cancer*, 16(3), pp. 131–144. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.14>.
- Pelka, K. *et al.* (2021) 'Spatially organized multicellular immune hubs in human colorectal cancer', *Cell*, 184(18), pp. 4734–4752.e20. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.08.003>.
- Pereyra, F. *et al.* (2010) 'The Major Genetic Determinants of HIV-1 Control Affect HLA Class I Peptide Presentation', *Science*, 330(6010), pp. 1551–1557. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1195271>.
- Perreau, M. *et al.* (2013) 'Follicular helper T cells serve as the major CD4 T cell compartment for HIV-1 infection, replication, and production', *Journal of Experimental Medicine*, 210(1), pp. 143–156. Available at: <https://doi.org/10.1084/jem.20121932>.
- Philip, M. *et al.* (2017) 'Chromatin states define tumour-specific T cell dysfunction and reprogramming', *Nature*, 545(7655), pp. 452–456. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature22367>.
- Philip, M. and Schietinger, A. (2022) 'CD8+ T cell differentiation and dysfunction in cancer', *Nature Reviews Immunology*, 22(4), pp. 209–223. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00574-3>.
- di Pilato, M. *et al.* (2015) 'NFκB activation by modified vaccinia virus as a novel strategy to enhance neutrophil migration and HIV-specific T-cell responses', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(11). Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1424341112>.
- di Pilato, M. *et al.* (2017) 'Distinct Roles of Vaccinia Virus NF-κB Inhibitor Proteins A52, B15, and K7 in the Immune Response', *Journal of Virology*, 91(13). Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.00575-17>.
- Raskov, H. *et al.* (2021) 'Cytotoxic CD8+ T cells in cancer and cancer immunotherapy', *British Journal of Cancer*, 124(2), pp. 359–367. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41416-020-01048-4>.
- Reckamp, K.L. *et al.* (2007) 'Expression of CXCR3 on Mononuclear Cells and CXCR3 Ligands in Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma in Response to Systemic IL-2 Therapy', *Journal of Immunotherapy*, 30(4), pp. 417–424. Available at: <https://doi.org/10.1097/CJI.0b013e31802e089a>.
- Reif, T. *et al.* (2021) 'Contact-dependent inhibition of HIV-1 replication in ex vivo human tonsil cultures by polymorphonuclear neutrophils', *Cell Reports Medicine*, 2(6), p. 100317. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100317>.
- Ribas, A. and Wolchok, J.D. (2018) 'Cancer immunotherapy using checkpoint blockade', *Science*, 359(6382), pp. 1350–1355. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.aar4060>.
- Riedel, A. *et al.* (2016) 'Tumor-induced stromal reprogramming drives lymph node transformation', *Nature Immunology*, 17(9), pp. 1118–1127. Available at: <https://doi.org/10.1038/ni.3492>.

- Roberts, E.W. *et al.* (2016) 'Critical Role for CD103+/CD141+ Dendritic Cells Bearing CCR7 for Tumor Antigen Trafficking and Priming of T Cell Immunity in Melanoma', *Cancer Cell*, 30(2), pp. 324–336. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.06.003>.
- Rodrigues, V. *et al.* (2017) 'Myeloid Cell Interaction with HIV: A Complex Relationship', *Frontiers in Immunology*, 8. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01698>.
- Ruffell, B. *et al.* (2014) 'Macrophage IL-10 Blocks CD8+ T Cell-Dependent Responses to Chemotherapy by Suppressing IL-12 Expression in Intratumoral Dendritic Cells', *Cancer Cell*, 26(5), pp. 623–637. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.09.006>.
- Sacha, J.B. *et al.* (2007) 'Gag-Specific CD8<sup>+</sup> T Lymphocytes Recognize Infected Cells before AIDS-Virus Integration and Viral Protein Expression', *The Journal of Immunology*, 178(5), pp. 2746–2754. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.5.2746>.
- Sáez-Cirión, A. *et al.* (2007) 'HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection *ex vivo* and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(16), pp. 6776–6781. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0611244104>.
- Saitoh, T. *et al.* (2012) 'Neutrophil Extracellular Traps Mediate a Host Defense Response to Human Immunodeficiency Virus-1', *Cell Host & Microbe*, 12(1), pp. 109–116. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.05.015>.
- Sautès-Fridman, C. *et al.* (2019) 'Tertiary lymphoid structures in the era of cancer immunotherapy', *Nature Reviews Cancer*, 19(6), pp. 307–325. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0144-6>.
- Scarlatti, G. *et al.* (1997) 'In vivo evolution of HIV-1 co-receptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression', *Nature Medicine*, 3(11), pp. 1259–1265. Available at: <https://doi.org/10.1038/nm1197-1259>.
- Scheper, W. *et al.* (2019) 'Low and variable tumor reactivity of the intratumoral TCR repertoire in human cancers', *Nature Medicine*, 25(1), pp. 89–94. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0266-5>.
- Schmitz, J.E. *et al.* (1999) 'Control of Viremia in Simian Immunodeficiency Virus Infection by CD8<sup>+</sup> Lymphocytes', *Science*, 283(5403), pp. 857–860. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.283.5403.857>.
- Siddiqui, I. *et al.* (2016) 'Enhanced recruitment of genetically modified CX3CR1-positive human T cells into Fractalkine/CX3CL1 expressing tumors: importance of the chemokine gradient', *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 4(1), p. 21. Available at: <https://doi.org/10.1186/s40425-016-0125-1>.
- Siddiqui, I. *et al.* (2019) 'Intratumoral Tcf1(+)/PD-1(+)/CD8(+) T Cells with Stem-like Properties Promote Tumor Control in Response to Vaccination and Checkpoint Blockade Immunotherapy.', *Immunity*, 50(1), pp. 195–211.e10. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.12.021>.
- Simoni, Y. *et al.* (2018) 'Bystander CD8<sup>+</sup> T cells are abundant and phenotypically distinct in human tumour infiltrates', *Nature*, 557(7706), pp. 575–579. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0130-2>.

- Smalls-Mantey, A., Connors, M. and Sattentau, Q.J. (2013) 'Comparative Efficiency of HIV-1-Infected T Cell Killing by NK Cells, Monocytes and Neutrophils', *PLoS ONE*, 8(9), p. e74858. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074858>.
- Spranger, S. *et al.* (2017) 'Tumor-Residing Batf3 Dendritic Cells Are Required for Effector T Cell Trafficking and Adoptive T Cell Therapy', *Cancer Cell*, 31(5), pp. 711-723.e4. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.04.003>.
- Spranger, S., Bao, R. and Gajewski, T.F. (2015) 'Melanoma-intrinsic  $\beta$ -catenin signalling prevents anti-tumour immunity', *Nature*, 523(7559), pp. 231-235. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature14404>.
- Stonier, S.W. *et al.* (2008) 'Dendritic cells drive memory CD8 T-cell homeostasis via IL-15 transpresentation', *Blood*, 112(12), pp. 4546-4554. Available at: <https://doi.org/10.1182/blood-2008-05-156307>.
- Sung, J.H. *et al.* (2012) 'Chemokine Guidance of Central Memory T Cells Is Critical for Antiviral Recall Responses in Lymph Nodes', *Cell*, 150(6), pp. 1249-1263. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.08.015>.
- Thomas, D.A. and Massagué, J. (2005) 'TGF- $\beta$  directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance', *Cancer Cell*, 8(5), pp. 369-380. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.10.012>.
- Thommen, D.S. *et al.* (2018) 'A transcriptionally and functionally distinct PD-1+ CD8+ T cell pool with predictive potential in non-small-cell lung cancer treated with PD-1 blockade', *Nature Medicine*, 24(7), pp. 994-1004. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0057-z>.
- Thompson, E.D. *et al.* (2010) 'Tumor masses support naive T cell infiltration, activation, and differentiation into effectors', *Journal of Experimental Medicine*, 207(8), pp. 1791-1804. Available at: <https://doi.org/10.1084/jem.20092454>.
- Utzschneider, D.T. *et al.* (2016) 'T Cell Factor 1-Expressing Memory-like CD8+ T Cells Sustain the Immune Response to Chronic Viral Infections', *Immunity*, 45(2), pp. 415-427. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.07.021>.
- Veazey, R.S. *et al.* (1998) 'Gastrointestinal Tract as a Major Site of CD4<sup>+</sup> T Cell Depletion and Viral Replication in SIV Infection', *Science*, 280(5362), pp. 427-431. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.280.5362.427>.
- Waldman, A.D., Fritz, J.M. and Lenardo, M.J. (2020) 'A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice', *Nature Reviews Immunology*, 20(11), pp. 651-668. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0306-5>.
- Wculek, S.K. *et al.* (2020) 'Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy', *Nature Reviews Immunology*, 20(1), pp. 7-24. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0210-z>.
- Wherry, E.J. *et al.* (2007) 'Molecular Signature of CD8+ T Cell Exhaustion during Chronic Viral Infection', *Immunity*, 27(4), pp. 670-684. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.09.006>.
- Wu, L. and KewalRamani, V.N. (2006) 'Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination', *Nature Reviews Immunology*, 6(11), pp. 859-868. Available at: <https://doi.org/10.1038/nri1960>.

- Wu, S.Z. *et al.* (2021) 'A single-cell and spatially resolved atlas of human breast cancers', *Nature Genetics*, 53(9), pp. 1334–1347. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00911-1>.
- Wu, T. *et al.* (2016) 'The TCF1-Bcl6 axis counteracts type I interferon to repress exhaustion and maintain T cell stemness', *Science Immunology*, 1(6). Available at: <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aai8593>.
- Yang, J. *et al.* (2021) 'Targeted Deletion of CXCR2 in Myeloid Cells Alters the Tumor Immune Environment to Improve Antitumor Immunity', *Cancer Immunology Research*, 9(2), pp. 200–213. Available at: <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-20-0312>.
- Zander, R. *et al.* (2019) 'CD4(+) T Cell Help Is Required for the Formation of a Cytolytic CD8(+) T Cell Subset that Protects against Chronic Infection and Cancer.', *Immunity*, 51(6), pp. 1028-1042.e4. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.10.009>.
- Zhang, L., Li, Z., Skrzypczynska, Katarzyna M, *et al.* (2020) 'Single-Cell Analyses Inform Mechanisms of Myeloid-Targeted Therapies in Colon Cancer.', *Cell*, 181(2), pp. 442-459.e29. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.048>.
- Zhang, Q. *et al.* (2019) 'Landscape and Dynamics of Single Immune Cells in Hepatocellular Carcinoma', *Cell*, 179(4), pp. 829-845.e20. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.003>.
- Zilionis, R. *et al.* (2019) 'Single-Cell Transcriptomics of Human and Mouse Lung Cancers Reveals Conserved Myeloid Populations across Individuals and Species', *Immunity*, 50(5), pp. 1317-1334.e10. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.009>.
- Zinselmeyer, B.H. *et al.* (2013) 'PD-1 promotes immune exhaustion by inducing antiviral T cell motility paralysis', *Journal of Experimental Medicine*, 210(4), pp. 757–774. Available at: <https://doi.org/10.1084/jem.20121416>.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

ACKR	<i>Atypical chemokine receptor</i>
AIDS	<i>Acquired immunodeficiency syndrome</i>
AKT	<i>Protein kinase B</i>
AP-1	<i>Activating protein-1</i>
APC	<i>Antigen-presenting cell</i>
B-Zelle	<i>B-Lymphozyt</i>
B6	<i>C57Bl/6 Mauslinie</i>
Bim	<i>Bcl-2-like Protein 11</i>
CAF	<i>Cancer-associated fibroblast</i>
CAR	<i>Chimeric antigen receptor</i>
CCL	<i>C-C-Chemokinligand</i>
CCR	<i>C-C-Chemokinrezeptor</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDC	<i>Conventional dendritic cell</i>
CTL	<i>Cytotoxic T lymphocyte</i>
CX3CL	<i>C-X3-C-Chemokinligand</i>
CX3CR	<i>C-X3-C-Chemokinrezeptor</i>
CXCL	<i>C-X-C-Chemokinligand</i>
CXCR	<i>C-X-C-Chemokinrezeptor</i>
DC	<i>Dendritic cell</i>
DC3	<i>Dendritic cell 3</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DTR	<i>Diphtherietoxin-Rezeptor</i>
EOMES	<i>Eomesodermin</i>
FADD	<i>FAS-associated death domain protein</i>
FAP	<i>Fibroblast activation protein alpha</i>
FRC	<i>Fibroblastic reticular cell</i>
G-Protein	<i>Guanosintriphosphat-bindendes Protein</i>
GALT	<i>Gut-associated lymphoid tissue</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
Gzmb	<i>Granzyme B Gene</i>
Havcr2	<i>Hepatitis A virus cellular receptor 2 gene</i>
hi	<i>High</i>
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
IFN	<i>Interferon</i>
Ig	<i>Immunglobulin</i>
IKK	<i>I<math>\kappa</math>B Kinase</i>
IL	<i>Interleukin</i>
int	<i>Intermediate</i>
JNK	<i>C-Jun N-terminal kinase</i>

---

KC	<i>Keratinocyte chemoattractant</i>
KO	<i>Knockout</i>
LAG-3	<i>Lymphocyte-activation gene 3</i>
LAMP	<i>Lysosomal-associated membrane protein</i>
LCMV	<i>Lymphocytic choriomeningitis virus</i>
Ly	<i>Lymphocyte antigen</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCP	<i>Monocyte chemoattractant protein</i>
MDSC	<i>Myeloid-derived suppressor cell</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MIP	<i>Macrophage inflammatory protein</i>
ml	<i>Milliliter</i>
MP-IVM	<i>Multiphoton intravital microscopy</i>
mregDC	<i>Mature dendritic cell enriched in immunoregulatory molecules</i>
N	<i>Neutrophil</i>
neg	<i>Negative</i>
NET	<i>Neutrophil extracellular traps</i>
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>
NK-Zelle	<i>Natürliche Killerzelle</i>
Nsg2	<i>Neuronal vesicle trafficking associated 2 gene</i>
NYVAC	<i>Highly attenuated vaccinia virus strain</i>
NYVAC-C $\Delta$ 3	<i>NYVAC-C <math>\Delta</math>A52R<math>\Delta</math>B15R<math>\Delta</math>K7R</i>
OT-I T cell	<i>SIINFEKL-specific CD8<sup>+</sup> T cell</i>
PD-1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
PFU	<i>Plaque-forming unit</i>
PI3	<i>Phosphatidylinositol 3-phosphate</i>
pos	<i>Positive</i>
OVA	<i>Ovalbumin</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
rDNA	<i>Recombinant DNA</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
scRNA seq	<i>Single Cell RNA Sequencing</i>
SIV	<i>Simian Immunodeficiency Virus</i>
T-bet	<i>T-box Transcription Factor TBX21</i>
T-Zelle	<i>T-Lymphozyt</i>
TAM	<i>Tumor-associated macrophage</i>
TCF	<i>T cell factor-1</i>
Tcf7	<i>Transcription factor 7 gene</i>
TCGA	<i>The cancer genome atlas</i>
T <sub>H</sub> 1	<i>Typ1-T-Helferzelle</i>
TIM-3	<i>T-cell Immunoglobulin and mucin-domain containing-3</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TLS	<i>Tertiary lymphoid structure</i>
TME	<i>Tumor microenvironment</i>

---

TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
tnfsf	<i>Tumor necrosis factor superfamily gene</i>
TOX	<i>Thymocyte selection-associated high mobility group box protein</i>
Treg	<i>Regulatory T cell</i>
T <sub>rm</sub>	<i>Tissue-resident memory T cell</i>
VACV	<i>Vaccinia virus</i>
VLA-4	<i>Very late antigen-4</i>
WT	<i>Wild type</i>
YFP	<i>Yellow fluorescent protein</i>
zDC	<i>Zinc finger and BTB domain containing 46 expressing DC</i>

## 8. Danksagung

Gerne würde ich mich bei Prof. Dr. med. Max Schnurr und Dr. rer. nat. Lars König bedanken, die mich engagiert betreut haben.

Herzlichen Dank auch an Herrn Prof. Dr. med. Stefan Endres, der als Abteilungsleiter ein sehr gutes Arbeitsumfeld geschaffen hat und mich ebenfalls bei meinen Auslandsvorhaben in Boston unterstützt hat.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Sebastian Kobold bedanke ich mich ebenfalls für die fachliche Unterstützung und der produktiven Kollaboration.

Queria agradecer muito ao meu amigo Dr. Bruno Cadilha. Seu apoio incrível começou logo no início do meu tempo em Munique. Naquela época você me ajudou com meus experimentos com seu enorme conhecimento, solicitude e humildade. Mais tarde, tive a sorte de conhecê-lo como um cientista incansável e brilhante, um pai carinhoso e um amigo fantástico que espero que fique comigo durante toda a minha vida.

Additionally, I would like express my deepest gratitude to Prof. Dr. med. Thorsten Mempel. It was an honor to learn from your expertise and experience, and to contribute to the fantastic science of your lab. Our intense discussions, meetings and your approach to biological questions in general really made me grow as a scientist and shaped my thinking for the rest of my life.

Furthermore, I would like to thank Prof. Dr. Mauro Di Pilato. I will be eternally grateful for your extraordinary efforts as scientist, mentor and friend. Not only did I learn from your exceptional passion, knowledge and proficiency, you also supported me enormously during my stay in Boston and beyond. I will never forget our time there until now and hope that our paths will cross many more times as scientists and – more importantly – as friends.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern, Patricia und Thomas, bedanken, die mich in jeglicher Form in all meinen Bestrebungen gänzlich und liebevoll ermutigt und gefördert haben. Ohne euch wären all meine Vorhaben zweifelsohne nicht möglich gewesen. Für eure bedingungslose, unermüdliche und grenzenlose Hilfe, Unterstützung und euer Mitwirken werde ich für immer zutiefst dankbar sein.



## 9. Appendix

### 9.1 Publikationsliste

#### Vorträge und Poster

1. **Kfuri-Rubens, R.** (2022) "Der Chemokin-Rezeptor CXCR6 führt zytotoxische T-Zellen zu kritischen Überlebenssignalen im tumoralen Mikromilieu" Vortrag im Rahmen der Preisverleihung des Doktoranden-Förderpreises an der Jahrestagung 2022 der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Fachgesellschaften für Hämatologie und Onkologie
2. Mauro Di Pilao, **Raphael Kfuri-Rubens**, Jasper N. Pruessmann, Ross D. Warner, Michael E. Xifaras, Thorsten R. Mempel (2019) "Intratumoral migration of TCF-1<sup>+</sup> stem-like und TCF-1<sup>-</sup> effector CTL." Poster at the 2019 Annual Retreat of the Division of Rheumatology, Allergy and Immunology, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School.

#### Originalarbeiten

3. Mauro Di Pilato\*, **Raphael Kfuri-Rubens\***, Jasper N. Pruessmann\*, Aleksandra J. Ozga\*, Marius Messemaker, Bruno L. Cadilha, Ramya Sivakumar, Chiara Cianciaruso, Ross D. Warner, Francesco Marangoni, Esteban Carrizosa, Stefanie Lesch, James Billingsley, Daniel Perez-Ramos, Fidel Zavala, Esther Rheinbay, Andrew D. Luster, Michael Y. Gerner, Sebastian Kobold, Mikael J. Pittet, Thorsten R. Mempel (2021) "CXCR6 positions cytotoxic T cells to receive critical survival signals in the tumor microenvironment." *Cell*, 184(17), pp. 4512-4530.e22. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.07.015>.

**\*Geteilte Erstautorenschaft**

4. Mauro Di Pilato\*, Miguel Palomino-Segura\*, Ernesto Mejías-Pérez, Carmen E Gómez, Andrea Rubio-Ponce, Rocco D'Antuono, Diego Ulisse Pizzagalli, Patricia Pérez, **Raphael Kfuri-Rubens**, Alberto Benguría, Ana Dopazo, Iván Ballesteros, Carlos Oscar S. Sorzano, Andrés Hidalgo, Mariano Esteban and Santiago F. Gonzalez (2021) "Neutrophil subtypes shape HIV-specific CD8 T-cell responses after vaccinia virus infection." *NPJ vaccines*, 6(1), p. 52. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41541-021-00314-7>.

**\*Geteilte Erstautorenschaft**

## 9.2 Eidesstaatliche Versicherung

Kfuri Rubens, Raphael Tobias

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

**Interaktionen zytotoxischer T-Zellen mit myeloiden Zellen als  
Determinanten antigenspezifischer Immunantworten bei HIV-Infektionen  
und Malignomen**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 11.02.2024

Raphael Tobias Kfuri Rubens

Ort, Datum

Unterschrift Doktorand

### 9.3 Erklärung zur kumulativen Dissertation

Bestätigung gem. § 4a Abs. 3 und 5 der Promotionsordnung für die Promotion zum Dr. med., Dr. med. dent. und Dr. rer. biol. hum. und gem. § 7 Abs. 4 der Promotionsordnung für die Promotion zum Dr. rer. nat. an der Medizinischen Fakultät.

#### **Titel der Publikationen:**

- 1) Mauro Di Pilato\*, **Raphael Kfuri-Rubens\***, Jasper N. Pruessmann\*, Aleksandra J. Ozga\*, Marius Messemaker, Bruno L. Cadilha, Ramya Sivakumar, Chiara Cianciaruso, Ross D. Warner, Francesco Marangoni, Esteban Carrizosa, Stefanie Lesch, James Billingsley, Daniel Perez-Ramos, Fidel Zavala, Esther Rheinbay, Andrew D. Luster, Michael Y. Gerner, Sebastian Kobold, Mikael J. Pittet, Thorsten R. Mempel (2021) "CXCR6 positions cytotoxic T cells to receive critical survival signals in the tumor microenvironment." *Cell*, 184(17), pp. 4512-4530.e22. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.07.015>.

**\*Geteilte Erstautorenschaft**

- 2) Mauro Di Pilato\*, Miguel Palomino-Segura\*, Ernesto Mejías-Pérez, Carmen E Gómez, Andrea Rubio-Ponce, Rocco D'Antuono, Diego Ulisse Pizzagalli, Patricia Pérez, **Raphael Kfuri-Rubens**, Alberto Benguría, Ana Dopazo, Iván Ballesteros, Carlos Oscar S. Sorzano, Andrés Hidalgo, Mariano Esteban and Santiago F. Gonzalez (2021) "Neutrophil subtypes shape HIV-specific CD8 T-cell responses after vaccinia virus infection." *NPJ vaccines*, 6(1), p. 52. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41541-021-00314-7>.

**\*Geteilte Erstautorenschaft**

Hiermit bestätige ich, dass keiner der zur Promotion eingereichten Fachartikel Gegenstand einer anderen (laufenden oder abgeschlossenen) kumulativen Dissertation ist.

München, 11.02.2024

Raphael Tobias Kfuri Rubens

Ort, Datum

Unterschrift Doktorand