

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie  
Abteilung der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. med. Stefan Endres

# **Einsatz von CXCR6-modifizierten OT-1-T-Zellen in einem murinen Pankreaskarzinommodell**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von  
Viktoria Blumenberg

2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Stefan Endres
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. Andreas Humpe Prof. Dr. med. Julia Mayerle
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Prof. Dr. med. Sebastian Kobold
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	17.12.2020

### **Eidesstattliche Versicherung**

Ich, Viktoria Blumenberg, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

#### **Einsatz von CXCR6-modifizierten OT-1-T-Zellen in einem murinen Pankreaskarzinommodell**

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 ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 19.01.2021

Viktoria Blumenberg

.....

Viktoria Blumenberg

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>4</b>
<b>1.1.</b>	<b>Tumorimmunologie</b> .....	<b>4</b>
1.1.1.	Tumor-Immunoediting-Konzept .....	4
1.1.2.	Tumor-Immunitäts-Zyklus.....	4
<b>1.2.</b>	<b>Adoptiver T-Zell-Transfer</b> .....	<b>6</b>
1.2.1.	Tumor infiltrierende Lymphozyten (TIL).....	6
1.2.2.	TCR-transduzierte T-Zellen.....	7
1.2.3.	CAR-transduzierte T-Zellen.....	8
1.2.4.	Limitationen.....	9
<b>1.3.</b>	<b>Chemokine</b> .....	<b>11</b>
1.3.1.	Eigenschaften und Funktion .....	11
1.3.2.	Chemotaxis .....	12
1.3.3.	Tumorimmunologische Bedeutung .....	13
<b>1.4.</b>	<b>Hypothese</b> .....	<b>13</b>
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>16</b>
<b>2.1.</b>	<b>Zellen und Medien</b> .....	<b>16</b>
2.1.1.	Zusätze und Grundmedien.....	16
2.1.2.	Zellkulturmedien.....	16
2.1.3.	Zelllinien.....	17
<b>2.2.</b>	<b>Versuchstiere</b> .....	<b>17</b>
<b>2.3.</b>	<b>E. coli Stämme</b> .....	<b>17</b>
<b>2.4.</b>	<b>Oligonukleotide</b> .....	<b>17</b>
<b>2.5.</b>	<b>Proteine</b> .....	<b>17</b>
2.5.1.	Enzyme .....	17
2.5.2.	Antikörper.....	18
2.5.3.	Rekombinante Proteine.....	18
<b>2.6.</b>	<b>Kits und Assays</b> .....	<b>18</b>
<b>2.7.</b>	<b>Chemikalien und Puffer</b> .....	<b>19</b>
<b>2.8.</b>	<b>Gebrauchsmaterialien und Geräte</b> .....	<b>21</b>
<b>2.9.</b>	<b>Software</b> .....	<b>22</b>
<b>2.10.</b>	<b>Zellbiologie</b> .....	<b>23</b>
2.10.1.	Kultivierung von Zelllinien.....	23
2.10.2.	Isolation von dendritischen Zellen aus dem Knochenmark.....	23
2.10.3.	Isolation von Splenozyten und CD8+T-Zellen aus der Milz.....	23
2.10.4.	Produktion von retroviralen Vektorüberständen.....	23
2.10.5.	Transduktion von Zelllinien und primären CD8+ T-Zellen.....	24
2.10.6.	Zellstimulation und Kokulturen .....	24
2.10.7.	Migrationassay.....	25

2.10.8.	Zytotoxizitätsassay .....	25
2.10.9.	Migration-Zytotoxizitätsassay .....	25
2.10.10.	<i>Clustering</i> von T-Zellen an dendritischen Zellen.....	26
<b>2.11.</b>	<b>Molekularbiologie.....</b>	<b>26</b>
2.11.1.	RNA-Isolation und reverse Transkription durch RT-PCR.....	26
2.11.2.	Gelelektrophorese, Restriktionsverdau, Ligation, Sequenzierung.....	26
2.11.3.	(Re-)Transformation von kompetenten <i>E.coli</i> und Plasmidamplifikation .....	27
2.11.4.	Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> .....	27
<b>2.12.</b>	<b>Durchflusszytometrie.....</b>	<b>28</b>
2.12.1.	Extrazelluläre Färbung .....	28
<b>2.13.</b>	<b>Mausmodell .....</b>	<b>28</b>
2.13.1.	Tierhaltung .....	28
2.13.2.	Tumormodell (subkutan) .....	28
2.13.3.	Adoptiver T-Zelltransfer (intravenös) .....	28
2.13.4.	Organentnahme, Zell- und Proteinisolation .....	28
<b>2.14.</b>	<b>Statistische Analyse .....</b>	<b>29</b>
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>30</b>
<b>3.1.</b>	<b>CXCL16-Expression in Tumorzellen .....</b>	<b>30</b>
3.1.1.	Murine Tumorzellen .....	30
3.1.2.	Tumorzellen nach Kokultur mit CD8+ T-Zellen .....	30
3.1.3.	Organe und Tumore <i>in vivo</i> .....	31
<b>3.2.</b>	<b>CXCR6-Expression in Leukozyten .....</b>	<b>32</b>
3.2.1.	Primäre T-Zellen .....	32
3.2.2.	Leukozyten <i>in vivo</i> .....	33
<b>3.3.</b>	<b>Migratorische Kapazität CXCR6-modifizierte CD8+ T-Zellen .....</b>	<b>34</b>
<b>3.4.</b>	<b>Anti-tumorales Potential CXCR6-modifizierter CD8+ T-Zellen .....</b>	<b>36</b>
3.4.1.	Aktivierung .....	36
3.4.2.	Tumorlyse .....	37
3.4.3.	Tumorlyse nach erfolgter Migration .....	37
<b>3.5.</b>	<b>Interaktion CXCR6-modifizierter CD8+ T-Zellen mit dendritischen Zellen .....</b>	<b>38</b>
3.5.1.	CXCL16-Expression in dendritischen Zellen .....	38
3.5.2.	Aggregation von CD8+ T-Zellen mit dendritischen Zellen.....	39
3.5.3.	Aktivierung von CD8+ T-Zellen durch dendritische Zellen .....	40
<b>3.6.</b>	<b>Therapeutische Wirksamkeit nach adoptiven Transfer <i>in vivo</i>.....</b>	<b>41</b>
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>43</b>
<b>4.1.</b>	<b>Die Expression und Bedeutung der CXCR6 - CXCL16-Achse in Tumoren .....</b>	<b>43</b>

4.1.1.	CXCL16 wird unter inflammatorischen Bedingungen vom Tumorgewebe sezerniert .....	43
4.1.2.	CXCR6 kann in zytotoxischen T-Zellen exprimiert werden .....	44
<b>4.2.</b>	<b>Effekte von CXCL16 auf CXCR6-modifizierte CD8+ T-Zellen .....</b>	<b>45</b>
4.2.1.	CXCR6-modifizierte CD8+ T-Zellen migrieren spezifisch über einen CXCL16 Gradienten <i>in vitro</i> .....	45
4.2.2.	CXCR6-modifizierte CD8+ T-Zellen zeigen erhöhtes anti-tumorales Potential <i>in vitro</i> .....	47
<b>4.3.</b>	<b>CXCR6-modifizierte CD8+ T-Zellen interagieren vermehrt mit dendritischen Zellen .....</b>	<b>48</b>
4.3.1.	CXCL16 wird von dendritischen Zellen sezerniert .....	48
4.3.2.	CXCR6-modifizierte CD8+ T-Zellen aggregieren verstärkt mit dendritischen Zellen und werden verstärkt durch dendritische Zellen aktiviert.....	49
<b>4.4.</b>	<b>CXCR6-modifizierte CD8+ T-Zellen zeigen therapeutische Wirksamkeit nach adoptiven Transfer <i>in vivo</i> .....</b>	<b>51</b>
<b>4.5.</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>53</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>54</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>55</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>70</b>

## **1. Einleitung**

### **1.1. Tumormmunologie**

#### **1.1.1. Tumor-Immunoediting-Konzept**

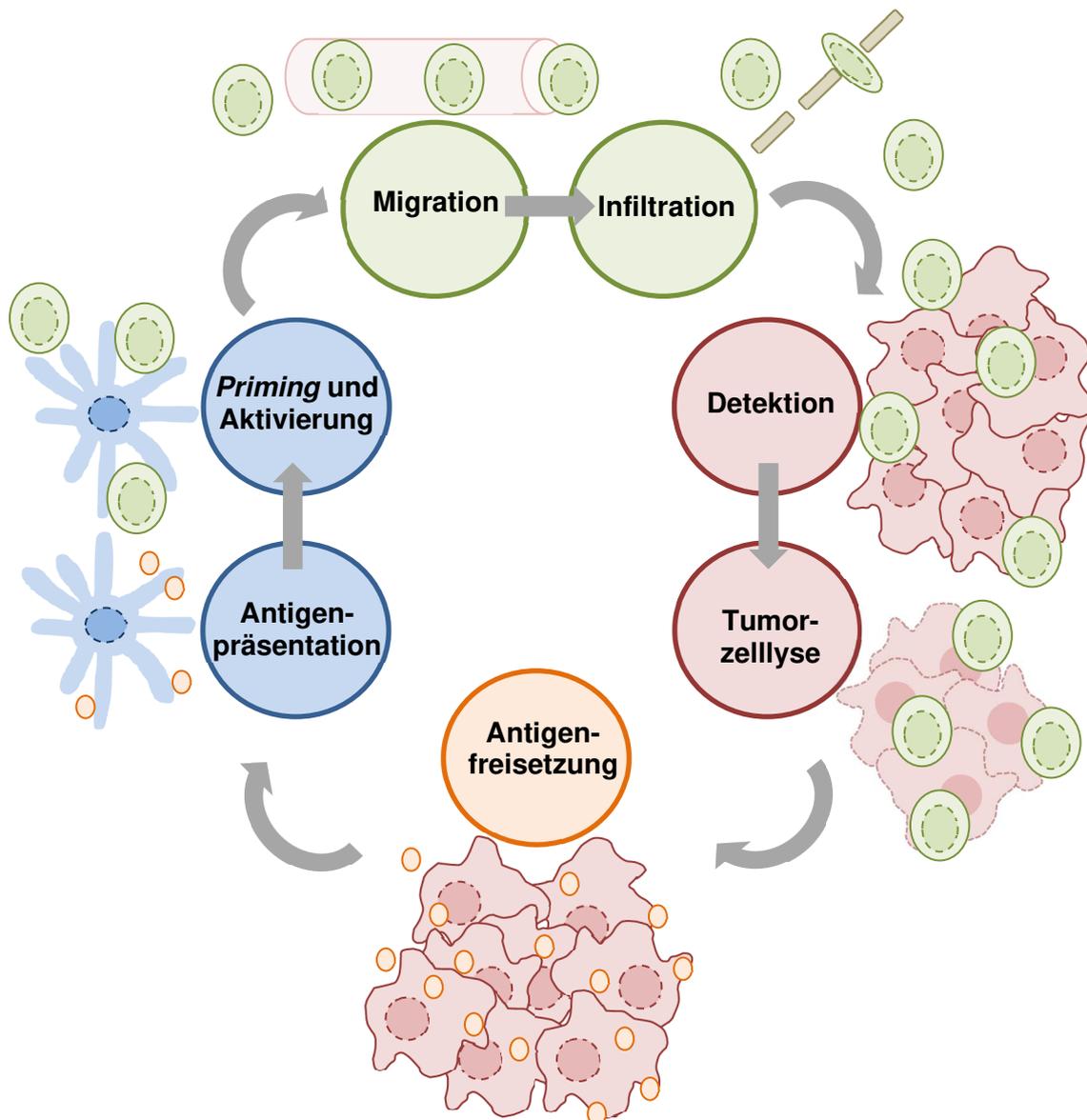
Die Tumor-Immunoediting-Hypothese erklärt den Prozess der Immunüberwachung und Tumorentwicklung und damit die Krebsentstehung in immunkompetenten Organismen.

Nach dieser Hypothese werden in der Interaktion von Tumorzellen und Immunzellen die drei Phasen Eliminierung, Equilibrium und Entkommen unterschieden. Die erste Phase postuliert die Immunüberwachung und Tumorsuppression durch das Immunsystem, das Tumorzellen detektieren und eliminieren kann. Eine unvollständige Elimination und die kontinuierlich ablaufenden Mutationen im Tumorgewebe können dabei die Entwicklung zahlreicher Tumorzellvariationen bewirken. Diese können die Phase der Elimination überleben und in die zweite Phase des Equilibriums eintreten. Die Phase des Equilibriums kennzeichnet eine veränderte tumorale Immunogenität, welche eine verminderte Detektion und Elimination durch das Immunsystem bedeuten kann. Das Equilibrium entspricht also der Balance zwischen immunologischer Kontrolle durch die Immunantwort und der Persistenz von Tumorzellklonen. Diese Balance kann durch die zunehmende Selektion genetisch instabiler Tumorzellen, anti-tumorale immunologische Mechanismen untergraben. In der letzte Phase des Entkommens kommt es schließlich zur klinischen Manifestation der Tumorerkrankung (Dunn et al. 2004, Matsushita et al. 2012).

Zusammengefasst postuliert die Immunoediting-Hypothese die protektive Kontrollfunktion durch Destruktion von Tumorzellen neben der Tumorprogression durch die Selektion oder Entstehung immunologisch silenter Tumorphänotypen (Khong and Restifo 2002, Schreiber et al. 2011).

#### **1.1.2. Tumor-Immunitäts-Zyklus**

Der Tumor-Immunitäts-Zyklus ist ein Modell, welches die molekularen und zellulären Mechanismen des Immunsystems zur Etablierung einer anti-tumoralen Antwort erklärt. Er liefert die konzeptuelle Grundlage, um Angriffspunkte für neue immuntherapeutische Strategien zu identifizieren. Im Folgenden wird die Theorie seiner einzelnen Schritte mit Beispielen translationaler Forschungsschwerpunkte erklärt, um die konzeptionelle Einbettung des Promotionsprojektes zu verdeutlichen (Chen and Mellman 2017).



**Abbildung 1: Tumor-Immunitäts-Zyklus. Abbildung nach (Chen and Mellman 2013).** Die Präsentation von Tumorantigenen durch Antigen-präsentierende Zellen bewirkt die T-Zellaktivierung und führt zur Tumorreaktion durch die Amplifikation der T-Zell-Antwort.

Die Freisetzung von Antigenen durch Tumorzellen initiiert die anti-tumorale Immunantwort. In Abgrenzung zu Tumor-assoziierten Antigenen und Tumor-Testis-Antigenen verfügen Tumor-spezifische Antigene als direkte Produkte tumor-spezifischer Mutationen über die größte Abweichung vom menschlichen Genom. Diese Neoantigene sind attraktive Zielstrukturen für die immunologische Unterscheidung zwischen Tumor- und Normalgewebe durch tumor-spezifische T-Zellen (Gubin et al. 2015, Yarchoan et al. 2017).

Die Aktivierung von T-Zellen erfolgt zunächst durch die Erkennung von Antigenen im

Kontext des *major histocompatibility complex* (MHC) auf z. B. Antigen-präsentierenden Zellen (APC) oder Tumorzellen. Gleichzeitig kommen an diesem Schaltpunkt zwischen T-Zelle und der Antigen-tragenden Zelle auch bedeutende suppressive Mechanismen zum Tragen, die eine Hemmung einer überschießenden Antwort bedingen. Solche Mechanismen werden im Allgemeinen als immunologische *check-points* bezeichnet und werden von Tumoren als Teil ihrer immunsuppressiven Strategie genutzt. Die Inhibition dieser *check-points* mit Antikörpern entfesselt T-Zellen gegen Tumorzellen und ist Teil der klinischen Routineversorgung in mehreren Tumorentitäten (Callahan et al. 2016, Wolchok et al. 2017). Jedoch führt die Aktivierung einer nicht tumor-spezifischen T-Zellreaktivität zu Autoimmunität, die wiederum die Anwendung einer solchen Strategie limitiert (June et al. 2017, Postow et al. 2018).

Nach Migration der T-Zellen in die Tumormikroumgebung (TME) kommt es zur Detektion und Eliminierung der Tumorzellen. Funktionelle Analysen dieser T-Zellen zeigen aber häufig eine ineffektive Zytokinproduktion und Reaktivität. Tumore entgehen weiterhin der immunologischen Kontrolle, indem immunsuppressive Zellen und Moleküle des Tumormikromilieus initial funktionale T-Zellen in einen Erschöpfungszustand versetzen. Außerdem können proinflammatorische Zytokine, die T-Zellen selbst ausschütten, T-Zellenergie begünstigen oder verstärken (Motz and Coukos 2013, Spranger et al. 2013). Ein Ansatz, um T-Zellen therapeutisch einzusetzen und gleichzeitig diese Limitationen zu umgehen, ist der adoptive T-Zell-Transfer (Andersen et al. 2016, Tran et al. 2016).

## 1.2. Adoptiver T-Zell-Transfer

Adoptiver T Zell-Transfer (AZT) ist der direkte therapeutische Einsatz von T-Zellen. Bei AZT wird das anti-tumorale Potential von T-Zellen eines Patienten durch Kultivierung und gegebenenfalls zusätzlich genetische Modifikation *in vitro* erhöht. Anschließend werden diese T-Zellen mit verbesserten tumorlytischer Kapazität autolog reinfundiert. Im Folgenden werden die unterschiedlichen Modalitäten von AZT erklärt.

### 1.2.1. Tumor infiltrierende Lymphozyten (TIL)

Den Beginn der T-Zell-Therapie bildete die Behandlung von Patienten mit Haut-, Lungen- und Leberkrebs mit TIL, die aus dem Tumorgewebe isoliert und *in vitro* expandiert wurden (Rosenberg et al. 1988). Die Zusammensetzung des zuvor im TME *in vivo* geprimten endogenen T-Zellrezeptorrepertoires bestimmt dabei die Erkennung

und Lyse von Tumorzellen durch den T-Zellrezeptor (TCR) der TIL. Nach Interaktion des T-Zellrezeptorkomplex bestehend aus einer  $\alpha$ -Kette und einer  $\beta$ -Kette mit dem CD3-Rezeptor komplettieren Antigen-unabhängige kostimulatorische Domänen das duale Signal für die Aktivierung der zytotoxischen Signalkaskade. Der T-Zellrezeptorkomplex kann dabei nur Antigene detektieren, die über MHC-Moleküle prozessiert und an der Oberfläche von Targetzellen präsentiert werden (Davis and Bjorkman 1988). Dieses betrifft intrazellulär synthetisierte Peptide inklusive der Proteinprodukte von tumorspezifischen Mutationen oder den schon beschriebenen Neoantigenen. Dieses intrazelluläre Proteom von Tumorzellen umfasst ein breites Spektrum von bisher therapeutisch ungenutzten Targetproteinen. Insofern eignen sich für den Einsatz von TIL Tumore mit hoher Mutationslast und in der Folge vielen tumorspezifischen T-Zellen. Dazu gehören z. B. das Melanom, das Nierenzell- und Ovarialkarzinom, für die in unterschiedlichen Phase I/II-Studien Ansprechraten von bis zu 50% gezeigt werden konnten. Dabei korrelierte die Dosis, der Anteil der CD8+ TIL sowie eine kurze Kulturzeit *in vitro* mit der therapeutischen Wirksamkeit (Besser et al. 2010, Chang et al. 2003, Fujita et al. 1995). Im Gegensatz dazu stehen „immunologisch kalte Tumore“ mit niedriger immunologischer Suszeptibilität, welche auch wenig nutzbare TIL besitzen und daher für diese Art der Therapie eher ungeeignet sind (Robbins et al. 2013, Schumacher and Schreiber 2015, Zhang et al. 2016). Zudem limitiert die deutlich niedrigere Affinität des TCR für Tumorantigene im Vergleich zu anderen Krankheitspathogenen sowie der häufige Erschöpfungszustand der TIL das zytotoxische Potential dieser T-Zellen und damit ihre therapeutische Aktivität (Aleksic et al. 2012, Lee et al. 1999).

### 1.2.2. TCR-transduzierte T-Zellen

Um T-Zellen eine in natürlicher Weise nicht vorhandene Spezifität zu verleihen, können diese gentechnisch modifiziert werden. Dabei muss unterschieden werden zwischen der genetischen Modifikation von T-Zellen mit tumorspezifischen TCR oder mit tumorspezifischen artifiziellen chimären Antigenrezeptoren (CAR) (June et al. 2015, Schumacher et al. 2015).

Die Generierung von T-Zellen mit tumorspezifischen TCR erfolgt über retro- oder lentivirale T-Zelltransduktion. Zuvor wird die kodierende genetische Sequenz für den TCR aus einem bekannten tumorspezifischen T-Zellklon extrahiert und in retro- oder lentivirale Vektoren kloniert. Bei Antigenen mit hoher Immunogenität kann die Sequenz für den Antigen-spezifischen TCR direkt aus Patientenmaterial mit spontan

vorkommenden reaktiven Antigen-spezifischen T-Zellklonen isoliert werden. Für Tumorantigene, gegen die aufgrund des Phänomens der Selbsttoleranz keine tumorspezifischen T-Zellen gebildet werden, können transgene Mäuse für humanes HLA nach Immunisierung mit entsprechendem Tumorantigen T-Zellen mit Antigen-spezifischen TCR produzieren. Zudem können mittels Phagen-Display tumorspezifische TCR mit hoher Affinität identifiziert werden (Chinnasamy et al. 2011, Hughes et al. 2005, Li et al. 2005). Die erste erfolgreiche Translation in eine klinische Studie betraf T-Zellen mit einem für das Melanom Antigen MART1 spezifischen TCR (Johnson et al. 2006). Aktuell werden T-Zellen mit tumorspezifischen TCR für diverse intrazelluläre und oberflächliche Tumorantigene wie z. B. MAGE-3, Mesothelin und NY-ESO-1 in zahlreichen klinischen Studien erprobt (Rapoport et al. 2015, Stadtmauer et al. 2019). Trotz der potenziell hohen Tumorspezifität der TCR-transduzierten T-Zellen birgt ihre MHC-Restriktion den Nachteil, dass analog zur Spenderkompatibilität bei der allogenen Stammzelltransplantation die HLA-Gewebemerkmale von Spender und Empfänger übereinstimmen müssen. Des Weiteren können Tumorzellen über die Herunterregulation von MHC-Molekülen der Antigendetektion durch T-Zellen mittels TCR und damit der immunologischen Kontrolle entkommen. Darüber hinaus ist z. B. durch molekulares Mimikry oder eine hohe Peptidhomologie auch die Vorhersage von *On-target-off-tumor*-Toxizitäten schwer vorherzusehen. Dieses bildet sowohl neben der MHC-abhängigen Antigenpräsentation als auch dem höchst aufwendig personalisierten HLA-gematchten Transfer der TCR-transduzierten T-Zellen die Rationale für die genetische Modifikation von T-Zellen mit chimären Antigenrezeptoren (Restifo et al. 1993, Thor Straten and Garrido 2016).

### 1.2.3. CAR-transduzierte T-Zellen

CAR sind synthetische Rezeptoren, die die variable Region eines Antikörpers für die Tumorzellerkennung nutzen. Dieser ist über Gelenkdomäne (*spacer*) sowie transmembranäre Domäne mit der intrazellulären Signalkaskade des TCR, der CD3 $\zeta$  Domäne, fusioniert. Die CD3 $\zeta$  Domäne ist assoziiert mit Immunrezeptor-Tyrosin-basierte aktivierenden Motive (ITAMs), die bedeutend für die Signaltransduktion sind. Diese artifiziellen Rezeptoren können als Chimäre die Spezifität eines Antikörpers mit dem zytotoxischen Potential eines TCR verbinden und ermöglichen die nicht MHC-restringierte Aktivierung der T-Zelle (Stoiber et al. 2019). Die initial reduzierte Expansion und Persistenz der ersten CAR-T-Zellen konnte durch die Erhöhung der Anzahl oder Kombination kostimulatorischer Domänen wie z. B. CD28 oder 4-1BB, welche CAR der zweiten und dritten Generation charakterisieren, verbessert werden

(Sadelain et al. 2003). In der Klinik haben bisher CD19-spezifische CAR-T-Zellen der zweiten Generation den größten therapeutischen Effekt gezeigt und sind seit August 2018 von der Europäischen Arzneimittelagentur (EMA) für die Behandlung der therapierefraktären rezidivierten (r/r) akuten lymphatischen B-Vorläuferzell-Leukämie (BCP – ALL) sowie des r/r diffus großzelligen B-Zell - Lymphoms (DLBCL) zugelassen (Locke et al. 2018, Maude et al. 2018). Darüber hinaus werden CAR-T-Zellen der dritten Generation und zahlreiche weitere CAR-Konstrukte in vielen anderen Tumorentitäten in klinischen Studien erprobt, wobei aktuell *B-cell maturation antigen*-spezifische CAR-T-Zellen zur Behandlung des r/r multiplen Myeloms die vielversprechendsten klinischen Daten zeigen (Hartmann et al. 2017, Madduri D 2019, Raje et al. 2019).

#### 1.2.4. Limitationen

Trotz initial hoher Ansprechraten von 50 bis 80 % nach Therapie hämatologischer Neoplasien mit CD19-spezifischen CAR-T-Zellen zeigen längere follow-up-Daten ein medianes Gesamtüberleben von 6 bis 12 Monaten, innerhalb dessen ein Großteil der Patienten rezidiviert. Dieses konnte nur zum Teil mit der Herunterregulation des Zielantigens CD19 auf Tumorzellen korreliert werden (Locke et al. 2018, Maude et al. 2018, Park et al. 2018, Schuster et al. 2019). In der Behandlung von soliden Tumoren konnten CAR-T-Zellen ihren therapeutischen Effekt bislang gar nicht reproduzieren (Beatty et al. 2018, Lamers et al. 2013, Park et al. 2007).

Folgende Immunescape- und Resistenzmechanismen wurden in soliden Tumoren identifiziert, die für das Therapieversagen von CAR-T-Zellen und ihre Etablierung als zellbasierte Immuntherapie in soliden Tumoren relevant sind. Dazu gehören die reduzierte Migration zum Tumorgewebe, die lokale Immunsuppression mit verminderter Persistenz und Effektorfunktion im TME sowie unzureichende Antigen-detektion und Tumor-spezifische Aktivierung von T-Zellen (Benmebarek et al. 2019, Tokarew et al. 2019).

Solide Tumore zeichnen sich durch die Architektur eines hypoxischen, schlecht vaskularisierten Stromas mit hohem Anteil extrazellulärer Matrix aus, dessen komplexe Interaktion immunsuppressiver zellulärer und molekularer Faktoren die Infiltration und Aktivierung von T-Zellen unterbinden kann (Ibe et al. 2001, Joyce and Fearon 2015). Diverse Gruppen konnten zeigen, dass das TME die Infiltration und Aktivierung von T-Zellen und damit auch auf das Ansprechen T-Zellbasierter Immuntherapien verhindern kann (Beatty and Moon 2014). Dieses betrifft unter anderem die Expression

von inhibitorischen Rezeptoren auf Tumorzellen, die eine T-Zelldysfunktion induziert. Die therapeutische Wirksamkeit von Immun-Checkpoint-Inhibitoren, welche die Bindung von T-Zellen an diese inhibitorischen Rezeptoren blockt, beruht auf der Aufhebung dieses Mechanismus (Huang et al. 2017, Riaz et al. 2017). Zudem zeichnen sich solide Tumoren durch eine veränderte Präsentation von Zielantigenen sowie eine höhere Antigenheterogenität im Vergleich zu hämatologischen Neoplasien aus, welches die Detektion von Tumorzellen durch T-Zellen und konsekutiv die T-Zellaktivierung inhibiert (Carretero et al. 2008)

Ansätze, die die Wirksamkeit von CAR-T-Zellen in soliden Tumoren verbessern, sind aktuell beschränkt auf eine verbesserte Aktivierung von CAR-T-Zellen im TME. Hierzu konnten CAR der vierten und fünften Generation in präklinischen Modellen ein verbessertes anti-tumorales Potential zeigen. CAR-T-Zellen der vierten Generation, sogenannte TRUCKs (*T cells redirected for antigen-unrestricted cytokine-initiated killing*), können nach der Aktivierung des CAR vermehrt proinflammatorisches Interleukin-12 sezernieren, welches dann die Produktion weiterer zytotoxischer Botenstoffe wie IFN- $\gamma$  oder Granzyme B triggern und die tumorlytische Aktivität potenzieren kann (Koneru et al. 2015, Pegram et al. 2012). Bei CAR-T-Zellen der fünften Generation kann über eine veränderte zytoplasmatische Bindungsdomäne des IL-2-Rezeptors der Transkriptionsfaktor STAT 3 simultan den physiologischen TCR aktivieren und bewirkt damit synergistisch die stärkere Aktivierung und Proliferation der CAR-T-Zelle (Kagoya et al. 2018). Andere Strategien beruhen auf Fusionsproteinen bestehend aus der extrazellulären Bindungsdomäne von inhibitorischen Rezeptoren wie z. B. PD-1 und intrazellulärer kostimulatorischer Domäne, sodass transduzierte T-Zellen bei Bindung an Immuncheckpoints wie z. B. PD-L1 aktiviert werden (Kobold, Grassmann, et al. 2015, Rataj et al. 2018).

Voraussetzung für jede tumorlytische Aktivität von T Zellen jedoch ist ihre Translokation an den Wirkungsort bzw. ihre Migration zum Tumorgewebe und ihre Persistenz im TME. Besonders in soliden Tumoren gilt die Anreicherung von T-Zellen im Tumorgewebe als wichtiger prädiktiver Marker (Lim and June 2017). Die Rekrutierung von zytotoxischen T-Zellen und konsekutiv die Effektivität T-Zell-basierter Tumorthapien kann jedoch durch die Präsenz immuninhibitorischer regulatorischer T-Zellen oder myeloider Suppressorzellen (MDSC) in Tumoren negativ beeinflusst werden (Bayne et al. 2012, Zhou et al. 2010). Allein schon die quantitative Änderung des Verhältnisses von zytotoxischen T-Zellen zu immunsuppressiven Stromazellen kann eine T-Zell-Immunität wirksam induzieren (Perna et al. 2014, Yao et al. 2012).

Eine mögliche Strategie, Effektorzellen im Tumormilieu anzureichern, repräsentieren bispezifische Antikörper, die sowohl an einen korrespondierenden synthetischen Rezeptor auf transduzierten T-Zellen als auch an Tumorantigene binden und so T-Zellen und Tumorzellen koppeln. Mit Hilfe eines anti-EGFRvIII x anti-EpCAM bispezifischen Antikörper konnte unsere Arbeitsgruppe die verbesserte Rekrutierung und Persistenz EGFRvIII-spezifischer T-Zellen präklinisch in unterschiedlichen Pankreskarzinommodellen nachweisen (Karches et al. 2019). Weitere Ansätze betreffen das Nutzen natürlicher Mechanismen durch die Immunzellen in Gewebe migrieren: sogenannte Chemokin-Chemokinrezeptor-Interaktionen.

### 1.3. Chemokine

#### 1.3.1. Eigenschaften und Funktion

Chemokine umfassen mit einer Größe von ca. 8 bis 10 kDa eine Gruppe von ca. 50 redundant sezernierten Proteinen. Sie repräsentieren die physiologischen zentralen Kommunikationssignale des Immunsystems mit der Fähigkeit, die Migration und Lokalisation von Zellen zu navigieren. Dazu binden lösliche Chemokinliganden an Immunzellen, die den korrespondierenden Chemokinrezeptor exprimieren (von Andrian and Mackay 2000). Die Signale von Chemokinrezeptoren werden kodiert durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen auf der Zelloberfläche. Die Ligandenbindung induziert eine Konformationsänderung und Dissoziation der Rezeptoruntereinheiten in  $\alpha$  und  $\beta\gamma$ . Diese aktivieren als sekundäre Signalmoleküle über den PI3K-PTEN-AKT-mTOR Signalweg diverse Effektorenzyme. Ein großes Repertoire von Chemokinrezeptoren bindet Chemokinliganden der gleichen Klasse mit hoher Affinität und kann mit unterschiedlichen Liganden interagieren. Aus dieser Redundanz und Promiskuität der Rezeptor-Ligandeninteraktion folgt eine Kombinationsdiversität mit einem multiplen biologischen Wirkungsspektrum des Chemokinnetzwerkes (Charo and Ransohoff 2006, Thelen and Stein 2008).

Funktionell müssen homöostatische Chemokine von Chemokinen abgegrenzt werden, die primär unter inflammatorischen Bedingungen exprimiert werden. Homöostatische Chemokine kontrollieren konstitutiv während normaler Stoffwechselprozesse die basale Leukozytenmigration wie das Leukozyten-*homing* zu sekundären lymphatischen Organen, Leukozyten-Endothel Interaktionen oder Leukozytenrezirkulation durch periphere Gewebe (Luster 1998, Moser and Loetscher 2001). Inflammatorische Chemokine können im Falle von Entzündungen die migratorische Kapazität von Immunzellen gegenüber physiologischen *steady-state*-Konditionen steigern und z. B.

mit APC kolokalisieren. Darüber hinaus sind Chemokine bedeutend für die Aktivierung, Differenzierung und Funktion von Immunzellen. Sie können Exozytose von Granula und oxidativen Burst initiieren und sind auch beteiligt an frühen Phasen der Wundheilung und der Angiogenese (Jones et al. 2006, Moser et al. 2001). Neben Homöostase und Funktion der angeborenen und adaptiven Immunität sind Chemokine auch von Bedeutung in der Ätiopathogenese zahlreicher Erkrankungen wie z. B. HIV-Infektion oder Arteriosklerose (Boring et al. 1998, Cocchi et al. 1995). Unterschiedliche pharmakologische Ansätze verwenden Chemokine als Zielstrukturen z. B. für die Behandlung von HIV und Multipler Sklerose oder zur Mobilisierung von Stammzellen vor hämatopoetischer Stammzelltransplantation (Kobold et al. 2011, Polman et al. 2006, Tan et al. 2013).

### 1.3.2. Chemotaxis

Voraussetzung für die Rekrutierung von Immunzellen ist die Etablierung eines Chemokingradienten im Zielgewebe, der durch die Sezernierung von löslichen Chemokinen in den Extrazellulärraum und ihre lokale Aufkonzentrierung entsteht. Dieser Vorgang wird auch als Chemotaxis bezeichnet (Boldajipour et al. 2008, Rot 1993). Die migratorische Kapazität der Zellen über diesen Konzentrationsgradienten ist abhängig von der Konzentration der Chemokinliganden sowie der Expressionsintensität des korrespondierenden Chemokinrezeptors. Beides kann durch Rezeptor-vermittelte Endozytose des Liganden sowie durch temporäre Rezeptorinternalisierung oder intrazellulären Abbau des Rezeptors beeinflusst werden (Boldajipour et al. 2008, Neel et al. 2005). Des Weiteren können inflammatorische Stimuli wie Zytokine über stabilisierende Wirkung auf die mRNA von Chemokinen die Intensität des Liganden bestimmen (Fan et al. 2005). Darüber hinaus kann die Aktivierung des Chemokinrezeptors die Expression oder Sekretion von weiteren Enzymen wie Proteasen induzieren, die durch posttranslationale Modifikation von Chemokinen deren Aktivität regulieren können. Dieses umfasst z. B. als eine positive Rückkopplungsschleife die Freisetzung weiterer Chemokinliganden durch *Shedding* von der Zelloberfläche und damit die Amplifikation des Chemokinrezeptorsignals (Van den Steen et al. 2000). Nach Rezeptor-Ligandeninteraktion bewirkt die intrazelluläre Signaltransduktion die Koaktivierung von Integrinrezeptoren, welche dann über eine Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts die Migration der Zelle einleiten (Bajenoff et al. 2007, Palamidessi et al. 2008). Im Unterschied zu anderen Chemokinliganden zeichnet sich die CXCR6 - CXCL16-Achse durch besondere Eigenschaften aus. Dazu gehört die fehlende Bindungs-Promiskuität von CXCL16, d.h. CXCL16 interagiert nur mit dem

Rezeptor CXCR6 (Wilbanks et al. 2001). Zudem verfügt CXCL16 durch sein Vorliegen in zwei unterschiedlichen morphologischen Formen über eine duale Funktion: Während das lösliche CXCL16 (s-CXCL16) vor allem Chemotaxis induziert, ist auch die transmembrane Form (TM-CXCL16) biologisch aktiv und vermittelt die Adhäsion von Zellen (Abel et al. 2004, Shimaoka et al. 2004). Diese duale Funktion ist bisher lediglich noch für die CX3CR1 - CX3CL1-Achse beschrieben (Bazan et al. 1997).

### 1.3.3. Tumorimmunologische Bedeutung

Im Tumorgewebe ermöglicht die pathophysiologisch aberrante Expression von Chemokinen Tumorzellen die multiplen Wirkungen des Chemokinnetzwerkes für protumorale Effekte wie Proliferation, Metastasierung und Angiogenese zu manipulieren (Balkwill 2004, Peng et al. 2015). Darüber hinaus haben Chemokine eine Schlüsselfunktion in Bezug auf die Definition des Phänotyps rekrutierter Leukozyten. Hier müssen immunsuppressive Zellpopulationen (z. B. iMC, TAMs) zur Tumorprotektion von der Rekrutierung zytotoxischer T-Zellen (z. B. CD4+ und CD8+ T-Zellen) zur Etablierung einer anti-tumoralen Immunität abgegrenzt werden (Curiel et al. 2004, Harlin et al. 2009). Auch die Wirkung von Checkpoint-Inhibitoren basiert neben der Aufhebung der T-Zellerschöpfung auch auf der vermehrten T-Zell-Infiltration ins TME durch vermehrte Sekretion von Chemokinen (Peng et al. 2012). Andere konnten zeigen, dass Chemokine auch die Wirksamkeit von AZT verbessern können, indem sie die Chemotaxis transferierter Effektorzellen ins TME fördern. Hierzu beobachteten Brown et al in einem heterotopen Xenograftmodell mit Glioblastomzellen eine vermehrte Anreicherung adoptiv transferierter T-Zellen im Tumorgewebe, die sie mit einer vermehrten tumoralen Expression von CCL2 *in vitro* korrelieren konnten (Brown et al. 2007). Dieses deutet darauf hin, dass korrespondierende Chemokinrezeptoren gezielt für die Verbesserung der migratorischen Kapazität von adoptiv transferierten T-Zellen genutzt werden können.

### 1.4. Hypothese

Das Ziel des Promotionsprojektes besteht in der Verbesserung der spezifischen Migration und verbesserten Persistenz adoptiv transferierter T-Zellen in das immunsuppressive Tumormilieu.

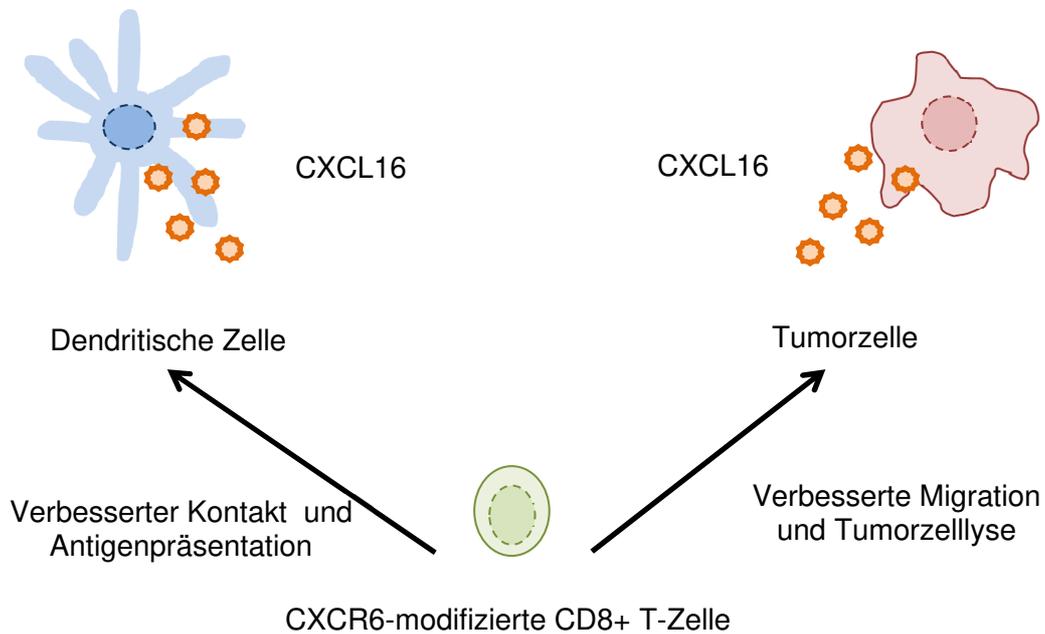
Die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse knüpfen an Vorarbeiten der Arbeitsgruppe an. Zentrale Bedeutung hat hier ein Chemokinarray mit den murinen

Pankreaskarzinomzelllinien PancO2OVA und T110299-OVA. Dieser zeigt auf RNA-Ebene im Vergleich zu anderen Chemokinliganden die Überexpression von CXCL16. Neben der dualen Funktion identifizierten diese Daten CXCL16 als ein attraktives Zielprotein. Folglich wurde der korrespondierende Rezeptor CXCR6 kloniert und seine Expression in T-Zellen mittels retroviraler Transduktion etabliert.

Die vorliegende Arbeit überprüft dabei die Hypothese, ob die *in vitro* erzeugte Überexpression von CXCR6 in zytotoxischen T-Zellen ihre Migration in das Mikromilieu eines Pankreaskarzinommodelles fördert, sofern die Tumorzellen den korrespondierenden Chemokinliganden sezernieren.

In der Arbeitsgruppe wurde bereits der Rezeptor CXCR6 erfolgreich kloniert und seine Expression mittels retroviraler Transduktion in primären murinen T-Zellen erprobt. Zudem wurde die Expression von CXCL16 im murinen Pankreaskarzinommodell PancO2OVA auf Proteinebene mittels CXCL16 ELISA nachgewiesen. Mit diesem Ausgangspunkt soll die vorliegende Arbeit die Funktionalität transduzierter, CXCR6-positiver OT1 T-Zellen zur Migration *in vitro* und *in vivo* im Mausmodell untersuchen. Dabei wurden die Pankreaskarzinomzelllinien PancO2OVA und T110299-OVA, die das Modellantigen OVA exprimieren, sowie primäre murine OT1-spezifische T-Zellen eingesetzt. Dabei sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. CXCL16-Expression in murinen Pankreaskarzinomzellen und Kokulturen mit T-Zellen sowie in primären Dendritischen Zellen (DC) *in vitro* und in Organ- und Tumorgewebe *in vivo* mittels ELISA
2. Migratorisches Potential CXCR6-positiver T-Zellen auf rekombinantes CXCL16 sowie auf den Überstand von Pankreaskarzinomzelllinien
3. Anti-tumorales Potential CXCR6 positiver T-Zellen in Kokulturen mit Pankreaskarzinomzelllinien *in vitro* mittels IFN- $\gamma$  ELISA und Zytotoxassays
4. Interaktion und Aktivierung CXCR6-positiver T-Zellen in Kokulturen mit DC *in vitro* mittels IFN- $\gamma$  ELISA und Konfokalmikroskopie
5. Therapeutische Wirksamkeit der adoptiven Zelltherapie mit CXCR6-transduzierten T-Zellen im heterotopen Pankreaskarzinommodell *in vivo*



**Abbildung 2: Hypothese dieser Arbeit zur Optimierung der T-Zell-Antwort durch Modifikation von T-Zellen mit CXCR6.** Die CXCR6 Expression in T-Zellen könnte ihre Migration sowie die Lyse CXCL16 exprimierender Tumorzellen verbessern. Zudem könnte die CXCR6 Expression in T-Zellen ihre Interaktion mit CXCL16 exprimierenden Dendritischen Zellen fördern.

**2. Material und Methoden****2.1. Zellen und Medien****2.1.1. Zusätze und Grundmedien**

Ampicillin	Invivogen, San Diego, CA, USA
Blasticidin	Invivogen, San Diego, CA, USA
BSA	Roth, Karlsruhe
DMEM (Gibco)	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
FKS (Gibco)	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Geneticin (G418) Sulfat	Santa Cruz, Dallas, TX, USA
HEPES Puffer	Sigma Aldrich, Steinheim
LB-Medium	Roth, Karlsruhe
L-Glutamin (200 mM)	Lonza, Basel, Schweiz
Natriumchlorid (0,9 %)	Baxter, Unterschleißheim
PBS w/o Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	Lonza, Basel, Schweiz
Penicillin, Streptomycin (100x)	Lonza, Basel, Schweiz
Puromycin	Invivogen, San Diego, CA, USA
RPMI 1640 (Gibco)	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
RPMI 1640	PAA, Pausching, Österreich

**2.1.2. Zellkulturmedien**DMEM +++

DMEM Vollmedium	500 ml
hitzeinaktiviertes FKS	10 %
L-Glutamin	1 %
Penicillin / Streptomycin	1 %

RPMI +++

RPMI Vollmedium	500 ml
hitzeinaktiviertes FKS	10 %
L-Glutamin	1 %
Penicillin / Streptomycin	1 %

DMEM +++++

DMEM +++	500 ml
Natriumpyruvat	1 % ml
HEPES	0, 1 %

RPMI +++++

RPMI +++	500 ml
Natriumpyruvat	1 %
HEPES	0,1 %

Plat-E Medium

DMEM +++	500 ml
Blasticidin	10 µg/ml
Puromycin	1 µg/ml

T-Zell-Medium

RPMI +++++	500 ml
β-Mercaptoethanol	50 mM

<u>Zytotoxmedium</u>		Migrationmedium	
RPMI +++++		RPMI Vollmedium	500 ml
Ohne Farbindikator	500 ml	BSA	0,5 %

### 2.1.3. Zelllinien

**Tabelle 1: Zelllinien**

Zelllinien	Spezies	Beschreibung	Medium	Quellen
Platinum-E	Human	Niere (embryonal)	Plat E	Morita et al., 2000
T110299-OVA	Murine	Pankreaskarzinom	DMEM+++++	Prof. Sieveke, Essen, Germany
PancO2-OVA	Murine	Pankreaskarzinom	DMEM+++	Jacobs et al., 2011

### 2.2. Versuchstiere

**Tabelle 2: Versuchstiere**

Stamm	Hintergrund	Herkunft	Eigenschaft
Wildtyp	C57BL/6J	Janvier	Wildtyp
OT1	C57BL/6J	Jackson	Ovalbumin-spezifische CD8+ T-Zellen

### 2.3. E. coli Stämme

OneShot Mach1-T1<sup>R</sup> Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

### 2.4. Oligonukleotide

CXCL16 (Maus) Uniprot Eintrag Q8BSU2

CXCR6 (Maus) Uniprot Eintrag Q9EQ16

### 2.5. Proteine

#### 2.5.1. Enzyme

EcorI	Thermo Scientific, Rockford, USA
NotI	Thermo Scientific, Rockford, USA
RevertAid <sup>TM</sup> M-MuLV Transkriptase	Thermo Scientific, Rockford, USA
T4 Ligase	Thermo Scientific, Rockford, USA
Q5 hot start high fidelity DNA Polymerase	New England Bio Labs, Ipswich, MA, USA
XhoI	Thermo Scientific, Rockford, USA

### 2.5.2. Antikörper

**Tabelle 3: Antikörper**

Antigen	Klon	Arbeitskonzentration	Spezies	Isotyp	Hersteller	Assay
CD3e	145-2C11	1 µg/ml	Armenischer Hamster	IgG	eBio-science	Zellkultur
CD3	17A2	2 µg/ml	Ratte	IgG2b, κ	Biolegend	FACS
CD4	GK1.5	1 µg/ml	Ratte	IgG2b, κ	Biolegend	FACS
CD8	53-6.7	1,5 µg/ml	Ratte	IgG2a, κ	Biolegend	FACS
CD19	6D5	1 µg/ml	Ratte	IgG2a, κ	Biolegend	FACS
CD28	37.51	0,1 µg/ml	Syrischer Hamster	IgG	eBio-science	Zellkultur
CD335	29A1.4	1 µg/ml	Ratte	IgG2a, κ	Biolegend	FACS
CXCR6	221002	1 µg/ml	Ratte	IgG2b	R&D Systems	FACS

### 2.5.3. Rekombinante Proteine

CXCL16, murine (rekombinant)	Peprotech, Hamburg
GM-CSF, murine (rekombinant)	Peprotech, Hamburg
IL-2, murine (rekombinant)	Peprotech, Hamburg
IL-4, murine (rekombinant)	Peprotech, Hamburg
IL-15, murine (rekombinant)	Peprotech, Hamburg
OVA <sub>257-264</sub>	Invivogen, San Diego, CA, USA
R848	Enzo Life Science, Lörrach

### 2.6. Kits und Assays

Bio-Plex Cell Lysis Kit	Bio Rad, München
CXCL16 ELISA, murine	R&D Systems, Inc., MN

Zytotoxassay	Promega Corporation, Madison, WI, USA
<i>Fluorescent Cell Linker Kit</i>	Sigma Aldrich, Steinheim
<i>Fixable Viability Kit</i>	Biolegend, San Diego, CA, USA
<i>Gel Extraction Spin Kit</i>	Genomed GmbH, Löhne
Hydrolysis Probe Assay	Roche, Mannheim
IFN- $\gamma$ ELISA, murine	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
RNA-Isolation Kit	Strattec, Birkenfeld
<i>Maxi-Prep Kit</i>	Promega Corporation, Madison, WI, USA
<i>Mini-Prep Kit</i>	Thermo Scientific, Rockford, USA
Reverse Transkription	Fermentas, Rockford, USA
Sequenzierung	Metabion, München
Q5 DNA-Polymerase	New England Bio Labs, Ipswich, MA, USA

### 2.7. Chemikalien und Puffer

$\beta$ -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Agarose	Biozym, Oldendorf
Anti-APC Microbeads	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Percoll	Biochrome, Berlin
BSA	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid	Roth, Karlsruhe
Counting Beads	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Cytoperm	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
DNAse	Sigma-Aldrich, Steinheim
DynabeadsCD3/CD28	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol 96 % - 100 % (rein)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Heparin	Ratiopharm, Ulm
Immersionsöl	Zeiss, Jena
Isopropanol	Applichem, Darmstadt
KAc	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kollagenase	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Roth, Karlsruhe

Manganchlorid (MnCl <sub>2</sub> )	Roth, Karlsruhe
Molekulargewichtsmarker DNA	Thermo Scientific, Rockford, USA
NaOH	Roth, Karlsruhe
PBS-Pulver	Roth, Karlsruhe
PMSF	Sigma-Aldrich, Steinheim
RbCl	Roth, Karlsruhe
Reagent A and B	Bio Rad, München
Retronectin	Takara, Shiga, Japan
Schwefelsäure	Apotheke Klinikum LMU München
TAE-Puffer (50x)	Apotheke Klinikum LMU München
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin	Lonza, Basel, Schweiz
Tween-20	Roth, Karlsruhe

Lysepuffer Tumore

RPMI	50 ml
Kollagenase	1 mg/ml
DNase	2 µg/ml

FACS-Puffer

PBS	500 ml
BSA	2,5 %
EDTA	2 mM

Erylysepuffer

KAc	3 ml
ddH <sub>2</sub> O	1 L
NH <sub>4</sub> Cl	8,92 g
KHCO <sub>3</sub>	0,029 g
EDTA	1 g

MACS-Puffer

PBS	500 ml
EDTA	2 mM

Transformationspuffer II

ddH <sub>2</sub> O	50 ml
--------------------	-------

Transfektionspuffer

ddH <sub>2</sub> O	100 ml
Natriumchlorid	1,6 g
Kaliumchlorid	74 mg
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	50 mg
HEPES	1 g
Einstellung des pH-Wertes auf 7,1	

Transformationspuffer I

ddH <sub>2</sub> O	100 ml
MnCl <sub>2</sub>	5 ml
RbCl	10 ml
CaCl <sub>2</sub>	1 ml
Glycerin (w/v)	15 ml
BSA	0,5 %
Einstellung des pH-Wertes auf 5,8	

Coating Puffer (Nickel-Platte)

ddH <sub>2</sub> O	50 ml
KCl	0,01 M

Waschpuffer (ELISA)

ddH <sub>2</sub> O	10 L
--------------------	------

---

Glycerin	7,5 ml	PBS	96 g
MOPS/NaOH	0,5 ml	Tween	5 ml
CaCl <sub>2</sub>	3,75 ml		
RbCl	0,5 ml		

### 2.8. Gebrauchsmaterialien und Geräte

Alpha Imager	Hp gel imager, Alpha Innotec, Kasendorf
Autoklav	Varioklav 500E, HP Medizintechnik, München
Multiwell Platten (ZKT, Migration)	Costar Corning, New York
96-flat-well Platte	Brandt, Wertheim
96-well Platte (ELISA)	Costar Corning, New York
96-well Platten (Nickel beschichtet)	Thermo Scientific, Rockford
Assayplatten Zytotox	Brandt, Wertheim
Combitips	Eppendorf, Hamburg,
Elektrophoreseapparatur	200/2.0, Bio-Rad, München
Facial Tissues	Wepa, Professional GmbH, Arnsberg
FACS-Röhrchen und -Flow	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ
FACS	Canto II, Becton Dickinson, San Jose
Falcon (5 ml, 15 ml, 50 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Filter, steril (0,2 µm pore)	Sartorius, Göttingen
Filter, Virus (0,45 µm pore)	Merck Milipore, Darmstadt
<i>Freezing container</i>	Nalgene® Mr.Frosty, Sigma Aldrich, Steinheim
Handschuhe	B. Braun Medical AG, Sempach, Schweiz
Heizblock	5436, Eppendorf, Hamburg
Inkubator (Zellkultur)	BBD 6620, Thermo Scientific, Rockford
Kanülen (20 G, 27 G, 30 G)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ
Kapillarpipetten	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
MACS-Säulen (LS)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Mikroskope	Axiovert 40C, A.1, Primo Vert, Zeiss, Jena TCS SP5, Leica, Wetzlar
Mitras Reader	LB940, Berthold, Bad Wildbad
NanoDrop	ND-1000, Nanodrop Tech., Montchanin
Neubauer Zählkammer	Brand, Berlin
Nylon-Filter (100 µm, 40 µm)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ
Parafilm	Bemis, Neenah, WI, USA
PCR Cyclor	T3 Thermocycler, Biometra, Göttingen

---

Petrischalen	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ
Pipetboy	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
pH-Meter	WTW, inoLab
Polypropylene round bottom tube	Becton Dickinson, Franklin Lakes
Reagent Reservoir	Costar Corning, New York
Schüttler	Shaker DOS-10L, NeoLab, Heidelberg
Skalpelle	B. Braun Medical AG, Sempach
Serologische Pipetten	Costar Corning, New York
Spritze (1 ml)	B. Braun Medical AG, Sempach, Schweiz Spritze
Spritze (2 ml, 5 ml, 10 ml)	Becton Dickinson, Franklin Lakes
Sterilbank	Herasafe KS, Thermo Scientific, Rockford
Thermocycler	T3, Biometra, Göttingen
Thermoschüttler	Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg Innova 44, New Brunswick Scientific, Enfield Thermoshake Gerhardt, Oberdollendorf
Transilluminator	2011 Macrovue LKB, Bromma
Tube (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Vakuumpumpe	2522Z-02, Welch, Monroe
Vortexer	Genie2, Scientific Industries, New York VF2, Janke&Kunkel IKA Labortechnik M23 basic und Lab dancer, IKA, Staufen
Waage	CPA1003S Sartorius Laboratory, Göttingen
Waschanlage	NuncImmuno Wash, Thermo Scientific, Rockford
Wasserbad	Unitherm HBuni equip, München
Zellkulturflasche	Costar Corning, New York
Zentrifugen	Sprout, Heathrow Scientific Centrifuge 541R, Eppendorf, Hamburg 3L-R Multifuge Heraeus Instruments, Hanau Rotina 420R Hettich, Ebersberg

### 2.9. Software

MikroWin 2000	Berthold, Bad Wildbad,
EndNote X7	Thomson Reuters, Carlsbad, USA
Flow Jo 7.6.1.	Tree Star, Ashland, USA

---

GraphPad PRISM® 5.01.	GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA
Lasergene	DNA star, Madison, WI, USA
LAS AF Leica Application Suite	Leica, Wetzlar

## **2.10. Zellbiologie**

### **2.10.1. Kultivierung von Zelllinien**

Unter sterilen Konditionen wurden die Zellen bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> - Luft Gemisch und 95 % Luftfeuchtigkeit aufbewahrt. Zur Ermittlung der Viabilität diente die Färbung mit Trypanblau. Zur Ermittlung der Zellzahl wurden die Zellen nach der Färbung mit Trypanblau in eine Neubauer-Zählkammer überführt.

### **2.10.2. Isolation von dendritischen Zellen aus dem Knochenmark**

Nach Knochenpräparation wurde das Knochenmark mit DC-Medium über einen Filter gespült. Nach Zentrifugation wurden mit Erylyselösung die Erythrozyten zerstört. Die Knochenmarkzellen wurden in einer Konzentration von 10<sup>6</sup> Zellen/ml mit 20 ng/μl GM-CSF für 7 Tage bei 37°C inkubiert. DC wurden mit Hilfe von Trypsin vom Flaschenboden gelöst.

### **2.10.3. Isolation von Splenozyten und CD8+T-Zellen aus der Milz**

Für alle experimentellen Untersuchungen wurden für das Modellantigen Ovalbumin (OVA)-spezifische CD8+ T-Zellen aus transgenen OT1-Mäusen isoliert. Nach Milzentnahme wurde das Gewebe mit Hilfe von T-Zellmedium, dem Stempel einer 5 ml Spritze und einem Filter zu einer Zellsuspension aufbereitet. Nach Zentrifugation wurden mit Erylyselösung die Erythrozyten zerstört. Die Splenozyten wurden nach Auszählung in einer Konzentration von 2 x 10<sup>6</sup>/ml auf einer sechs-well-Platte mit T-Zellmedium mit IL-2 (10 U/ml), Anti- CD3- (1 μg/ml) und Anti-CD28-Antikörper (0,1 μg/ml) 24 Stunden bei 37°C inkubiert.

### **2.10.4. Produktion von retroviralen Vektorüberständen**

Die Plat-E Zellen sind eine potente Virus Verpackungszelllinie, welche die viralen Strukturproteine gag-pol und env über den MuLV-LTR Promotor exprimieren, ohne ein Verpackungssignal zu besitzen. Am Vortag der wurden die Zellen mit PBS gewaschen

und zentrifugiert. Nach Resuspension in Plat-E Medium ohne Blasticidin und Puromycin wurden die Zellen gezählt und auf eine 6-*well-plate* plattiert. Für die Transfektion wurde eine Plasmidlösung vorbereitet (Volumina sind errechnet für die Transfektion von einem *well* Plat-E auf einer sechs-*well* Platte).

**Tabelle 4: Transfektionsreagenzien**

Substanz	Volumen
Plasmid (Vektor <i>backbone</i> pMP71 und Ziel-DNA)	18 µg
CaCl <sub>2</sub> (2,5 M)	15 µl
H <sub>2</sub> O (demineralisiert)	Auffüllen auf ein Gesamtvolumen von 150 µl

Die Plasmide enthalten den retroviralen Vektor mit Verpackungssignal sowie die Ziel-DNA. Diese Plasmidlösung wurde unter Vortexen zur Stabilisierung des pH-Wertes mit 150 µl Transfektionspuffer vermischt. Das Medium der Plat-E Zellen wurde unter Verzicht auf Antibiotika ausgetauscht und tropfenweise auf die Plat-E Zellen pipettiert. Nach der Transfektion produzieren die Plat-E Zellen Viruspartikel, die retrovirale RNA enthalten, in den Überstand. Nach einer Inkubationszeit von 6 Stunden bei 37 °C wurde das Medium vorsichtig von den Plat-E Zellen entfernt und durch neues Plat-E Zellmedium ohne Puromycin und Blasticidin ersetzt (3 ml/*well*).

#### 2.10.5. Transduktion von Zelllinien und primären CD8+ T-Zellen

Für die 1. Transduktion werden CD8+ T-Zellen mit dem Virus-haltigen Überstand der Plat-E Zellen infiziert, der mit einer 5 ml Spritze und einem Filter aufgereinigt und auf die 24-*well*-Platte gegeben wird (1 ml/*well*). Für die Bindung von Viruspartikeln wurde die Platte am Vorabend bei 4 °C mit Retronectin (6,25 µg/ml in 400 µl PBS/*well*) benetzt. Die Plat-E Zellen werden mit neuem T-Zellmedium (2,5 ml/*well*) versorgt. Nach Zentrifugation (3000 g, 120 min, 4 °C) wird das Medium aus dem *well* entfernt, mit T-Zellen (10<sup>6</sup> Zellen/ml) aufgefüllt und die Platte erneut zentrifugiert (800 g, 30 min, 32 °C). Am nächsten Tag wird ein neuer gefilterter Virusüberstand zu den T-Zellen gegeben (1 ml/*well*) und die Platte zentrifugiert (800 g, 90 min, 32 °C). Nach sechs Stunden wird die Transduktionseffizienz im FACS gemessen.

#### 2.10.6. Zellstimulation und Kokulturen

Tumorzellen (10<sup>4</sup> pro *well* für IFN-γ Messung und 3x 10<sup>4</sup> pro *well* für CXCL16 Messung) oder DC (10<sup>4</sup> pro *well*) wurden zusammen mit T-Zellen in entsprechenden

Verhältnissen auf 96 *well* Platten mit flachem Boden plattiert und Überstände wie angegeben geerntet. Zuvor wurden Zellreste durch Zentrifugieren (400 g für 5 min) des Überstandes auf einer 96 *well* Platte mit rundem Boden entfernt.

### 2.10.7. Migrationassay

In die untere Kammer wurden entweder rekombinantes CXCL16 (50 ng/ $\mu$ l) oder Tumorüberstände gegeben (225  $\mu$ l/*well*). Für die Tumorüberstände wurden T110299-OVA Tumorzellen mit IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  stimuliert. In die obere Kammer wurden transduzierte oder untransduzierte T-Zellen (10<sup>6</sup> Zellen/70  $\mu$ l/*well*) gegeben. Nach drei Stunden wurde der Assay durch Übertragung der Zellen der unteren Kammer in eine 96 *well* Platte und Zentrifugation der Zellen (400 g für 5 min) beendet. Die Zellpellets wurden in 100  $\mu$ l PBS mit 2,5  $\mu$ l Counting Beads/*well* resuspendiert, in FACS Röhren überführt und anschließend im FACS die Zellzahl ermittelt (s. 3.2. FACS)

### 2.10.8. Zytotoxizitätsassay

Tumorzellen (3 x 10<sup>4</sup>/100  $\mu$ l/*well*) und T-Zellen (im Verhältnis von 1:5 und 1:10 in 100  $\mu$ l) wurden in Zytotoxmedium aufbereitet und in eine 96 *well* Platte mit flachem Boden plattiert. Bei sichtbarer Lyse wurde der Assay durch Zufügen der *lysis solution* in die Maximum-Targetkontrolle beendet und der LDH-Gehalt mittels Zytotoxassay-*Kit* (s. B 9.4. *Kits* und Assays) sowie IFN- $\gamma$  mittels ELISA (s. 9.4. *Kits* und Assays) ermittelt.

### 2.10.9. Migration-Zytotoxizitätsassay

Die *wells* einer 96 *trans well* Migration-Platte Platte wurden mit Polylysin (100  $\mu$ g/ml in 100  $\mu$ l PBS/*well*) benetzt (4 °C/24 h). Nach dem Waschen mit PBS wurden die CXCL16 überexprimierenden Tumorzellen in Zytotoxmedium in der unteren Kammer (8 x 10<sup>5</sup> Zellen in 225  $\mu$ l/*well*) inkubiert (12 h für 37 °C). In die obere Kammer wurden transduzierte oder untransduzierte T-Zellen (10<sup>6</sup> Zellen/70  $\mu$ l/*well*) gegeben. Nach zwei Stunden wurde durch Entfernen des Einsatzes die Migration gestoppt. Die weitere Inkubation über ca. 1-2 h unter Sicht erfolgte bis zum Abstoppen der Maximum-Targetkontrolle mit *lysis solution*. Die Zellen der unteren Kammer wurden für CD8 angefärbt. LDH und IFN- $\gamma$  der Überstände wurde mittels Zytotoxassay-*Kit* und IFN- $\gamma$  ELISA ermittelt.

### 2.10.10. *Clustering* von T-Zellen an dendritischen Zellen

CXCR6-GFP<sup>+</sup> T-Zellen und kontrolltransduzierte T-Zellen (EGFR<sup>+</sup>) wurden mit Hilfe von Antikörpern und MACS-beads zu einer 90 -100 %-reinen Population transduzierter Zellen aufkonzentriert und in T-Zellmedium inkubiert (24 h für 37 °C). Die Membran der T-Zellen wurde mit fluoreszierenden Farbstoffen gefärbt und auf eine Konzentration von 10<sup>6</sup> Zellen/ml eingestellt. Je 100 µl der gefärbten und ungefärbten Zellsuspensionen wurden in je ein FACS Tube gegeben und mit einem Totfarbstoff gefärbt. Die Färbefeffizienz wurde im FACS quantifiziert und bei einer Effizienz von <99 % erneut gefärbt. Die genaue Zahl der viablen erfolgreich mit Zellinkern angefärbten Zellen wurde mit Hilfe von *Counting Beads* im FACS gemessen. Die zuvor eingestellten Zellsuspensionen wurden durch Verdünnung mit T-Zellmedium angepasst. Die T-Zellen wurden in eine *96 well non-tissue culture* Platte überführt (5 x 10<sup>4</sup> T-Zellen/well/100 µl) und die Negativkontrolle mit rekombinantem CXCL-16 (4 µg/ml) zur Neutralisation inkubiert (30 min für 37 °C). Nach Zentrifugation (400 g für 5 min) wurden die Überstände der T-Zellen entfernt und in 100 µl PBS resuspendiert. Die DC wurden auf eine Konzentration von 5 x 10<sup>3</sup> Zellen/ml in PBS eingestellt, mit SIINFEKL (1 µg/ml) stimuliert und in eine *96 well* Platte ohne Beschichtung überführt (100 µl/well). Die T-Zellen wurden zu den DC überführt und in Kokultur inkubiert (3 h für 37 °C). Für die Aufnahme mit dem Konfokalmikroskop wurde die Zellsuspension aus der *96 well non-tissue culture* Platte in spezielle *cell view culture dish* überführt.

## 2.11. Molekularbiologie

### 2.11.1. RNA-Isolation und reverse Transkription durch RT-PCR

Für die RNA-Isolation wurden die entsprechenden Zellen in zwei *wells* einer sechs *well* Platte übertragen, sodass am nächsten Tag eine Konfluenz von 100 % erreicht war. Die RNA wurde mit einem RNA-Isolierungs-*Kit* isoliert. Die RNA wurde mit Hilfe einer reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben.

### 2.11.2. Gelelektrophorese, Restriktionsverdau, Ligation, Sequenzierung

Die cDNA wurde auf ein 1,5 % Agarose Gel mit 15 Kammern mit *LoadingDye* (10 µl) und Marker (7 µl) mit 90 V für ca. 30 min aufgetragen. Die entsprechende Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mit einem *Kit* aus dem Gel extrahiert. Die DNA wurde entsprechend der Schnittstellen und des Zielvektors mit

Restriktionsenzymen und Puffern inkubiert (37 °C für 60 min). Aus dem Ansatz wurden mit einem *Kit* die geschnittene DNA aufgereinigt. Die geschnittene DNA wurde mit dem geschnittenen Vektorbackbone, Ligase und Puffer nach folgendem Ansatz inkubiert (30 min bei 25°C). CXCL16 in den retroviralen Vektor pmx<sub>S</sub> kloniert. Die Konstrukte wurden mit einem *Kit* sequenziert.

**Tabelle 5: Ligation**

20 µl Ansatz	
150 ng	Verdautes Insert
50 ng	Verdauter Vektor
2 µl	T4 Ligase Puffer
1 µl	T4 Ligase

### 2.11.3. (Re-)Transformation von kompetenten *E.coli* und Plasmidamplifikation

Die Bakteriensuspension (10 µl) wurde mit der Plasmidlösung (bei Transformation 10 µl des Ligationsansatzes, bei Retransformation 1 µg DNA) in drei Schritten inkubiert (1. Für 15 min auf Eis, 2. für 45 sec bei 45 °C, 3. für 30 min auf Eis). Danach wurde die Bakterien auf eine Agar-Platte mit Ampicillin ausgestrichen und inkubiert (12 – 15 h für 37 °C). Zuerst wurden Mini-Kulturen (Volumen 4 ml) in LB-Medium mit je einem Klon von Bakterien der Agarplatte angelegt und inkubiert (5 h für 37 °C). Die Bakterien wurden zentrifugiert (4000 g für 10 min) und die DNA aus den Bakterienpellets mit einem *Kit* isoliert. Im Fall einer Retransformation wurden mit 20 µl der Mini-Kulturen Maxi-Kulturen (Volumen 300 ml) in LB-Medium angelegt (12 h für 37 °C). Die Bakterien wurden zentrifugiert (4000 g für 10 min) und die DNA aus den Bakterienpellets mit einem *Kit* isoliert.

### 2.11.4. Herstellung kompetenter *E.coli*

Nach Expansion der Bakterien in 100 ml LB Medium bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte von 0,44 – 0,55 wurde das Medium auf 4 °C abgekühlt und die Bakterien über Zentrifugation (4000 g für 10 min) pelletiert. Nach Verwerfen des Überstandes und Resuspension der Bakterien in 30 ml Transfektionspuffer I wurden die Bakterien inkubiert (4 °C für 5min) und durch Zentrifugation (4000 g für 10 min) pelletiert. Nach Resuspension des Pellets in 4 ml Transfektionspuffer II wurden Aliquote (je 50-100 µl) in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

## **2.12. Durchflusszytometrie**

### **2.12.1. Extrazelluläre Färbung**

$10^6$  Zellen wurden in 96-U-*well-Platten* plattiert und mit Fc-Block inkubiert (20 min/4 °C). Anschließend wurden extrazelluläre Proteine mit Antikörpern und tote Zellen mit einem Totfarbstoff markiert (30 min für 4 °C ohne Licht). Nach Zentrifugation (400 g für 5 min) erfolgten zwei Waschschrte mit FACS-Puffer. Für die FACS-Messung wurden die Zellen in FACS-Puffer (100  $\mu$ l/*well*) resuspendiert und in FACS Röhrrchen überführt.

## **2.13. Mausmodell**

### **2.13.1. Tierhaltung**

Die Tiere wurden im Alter von 4 Wochen in die Zentrale Versuchstierhaltung der LMU München bezogen und eine Woche mit Genehmigung der Regierung von Oberbayern in Experimenten eingesetzt. Die Tierhaltung erfolgte nach gesetzlichen Hygienevorschriften und die Versorgung durch examiniertes Personal.

### **2.13.2. Tumormodell (subkutan)**

Die Injektion erfolgte heterotop in die rechte Flanke ( $2 \times 10^6$  Zellen in 100  $\mu$ l PBS). Die Tiere sowie das Tumorstwachstum wurden im Abstand von zwei Tagen mittels elektronischer Schublehre verblindet überwacht. Als Abbruchkriterien wurden Körpergewicht, Tumorfläche ( $>225 \text{ mm}^2$ ), Ulzeration des Tumors, reduzierte Körperkonstitution sowie Verhaltensauffälligkeiten definiert.

### **2.13.3. Adoptiver T-Zelltransfer (intravenös)**

Die Injektion erfolgte in die Schwanzvene ( $10^7$  Zellen in 100  $\mu$ l PBS) bei einer Tumorfläche von ca.  $25 \text{ mm}^2$  unter Lagerung der Tiere in einer Haltevorrichtung.

### **2.13.4. Organentnahme, Zell- und Proteinisolation**

Nach Tötung mittels  $\text{CO}_2$  Kammer wurden die Organe präpariert. Für die Isolation von Zellen wurden die Gewebe und Tumore mechanisch zerkleinert, mit Kollagenase und DNAase inkubiert, durch Zellstrainer gefiltert und mit Erylyse behandelt. Einzelzellsuspensionen wurden auf einen Gradienten von 44 % und 67 % Percoll

---

gelegt und zentrifugiert (800 g für 30 min). Myeloide und lymphoide Zellen wurden aus der Zwischenphase gewonnen, gewaschen und für die FACS-Messung gefärbt. Für die Gewinnung von Proteinen wurden die Gewebe in flüssigem Stickstoff schockgefroren und mittels Bradford Assay nach Herstellerangaben aufbereitet.

#### **2.14. Statistische Analyse**

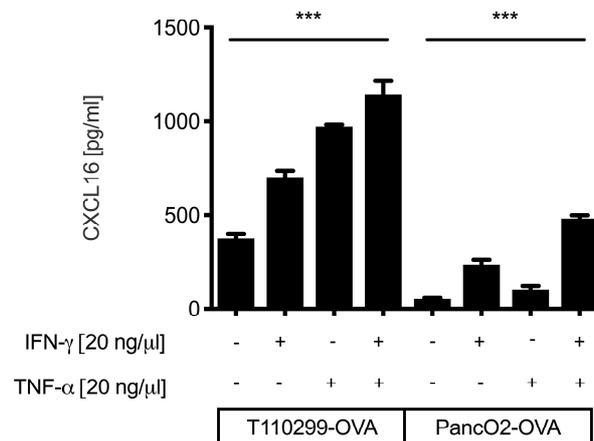
Alle Daten werden als Standardfehler des Mittelwertes (*standard error of mean*, SEM) dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mittels t-Test berechnet und angenommen für  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  und  $p < 0,001$ . Die Signifikanzen wurden mit den Markierungen \*, \*\* und \*\*\* gekennzeichnet. Unterschiede in der Tumorgroße wurden mittels der Varianzanalyse *two-way* ANOVA berechnet. Für die statistischen Auswertungen wurde das Programm GraphPad Prism verwendet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. CXCL16-Expression in Tumorzellen

##### 3.1.1. Murine Tumorzellen

Biologisch relevant für die Einflussnahme auf die Chemotaxis CXCR6 überexprimierender T-Zellen ist die tatsächliche sezernierte CXCL16 Proteinmenge von Tumorzellen. Daher wurden zum Nachweis der CXCL16-Expression auf Proteinlevel und zur Modellierung inflammatorischer Bedingungen Tumorzellen mit den Zytokinen IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  stimuliert und CXCL16 in den Überständen gemessen. CXCL16 wird von murinen Pankreaskarzinomzelllinien sekretiert. In murinen Zelllinien erhöhen IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  die CXCL16 Sekretion. Beide Zytokine zeigen in Kombination einen synergistischen Effekt auf die CXCL16-Produktion. Die Zelllinie T112099-OVA produziert dabei deutlich mehr CXCL16 als die Zelllinie PancO2-OVA.



#### Abbildung 3: murine Pankreaskarzinomzellen sekretieren CXCL16.

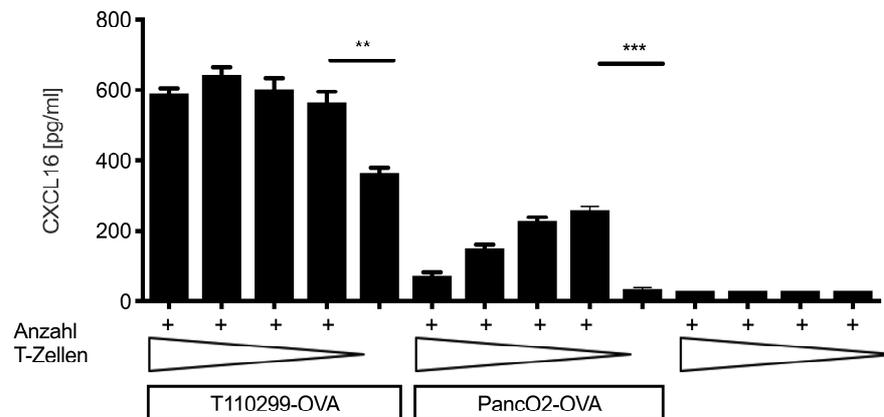
$0,01 \times 10^6$  Tumorzellen wurden im 96 well Format partiell mit 20 ng/ $\mu$ l IFN- $\gamma$  oder 20 ng/ $\mu$ l TNF- $\alpha$  oder in Kombination 48 h inkubiert. Die CXCL16 Bestimmung der Überstände erfolgte mittels ELISA. Jedes Experiment wurde mit drei experimentellen Replikaten durchgeführt. Die gezeigten Daten repräsentieren eines von drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte mittels t-Test.

##### 3.1.2. Tumorzellen nach Kokultur mit CD8+ T-Zellen

Anschließend sollte ermittelt werden, ob auch die Kokultur mit Antigen-spezifischen T-Zellen, die CXCL16-Produktion steigern kann.

In Überständen von Kokulturen ist im Vergleich zu Überständen von Tumorzellen alleine mehr CXCL16 detektierbar. Für das Modell PancO2-OVA ist die Induktion der CXCL16 Sekretion umgekehrt proportional zur Anzahl der eingesetzten T-Zellen. Im

Modell T110299-OVA korreliert die Zahl der eingesetzten T-Zellen nicht mit der CXCL16 Induktion.



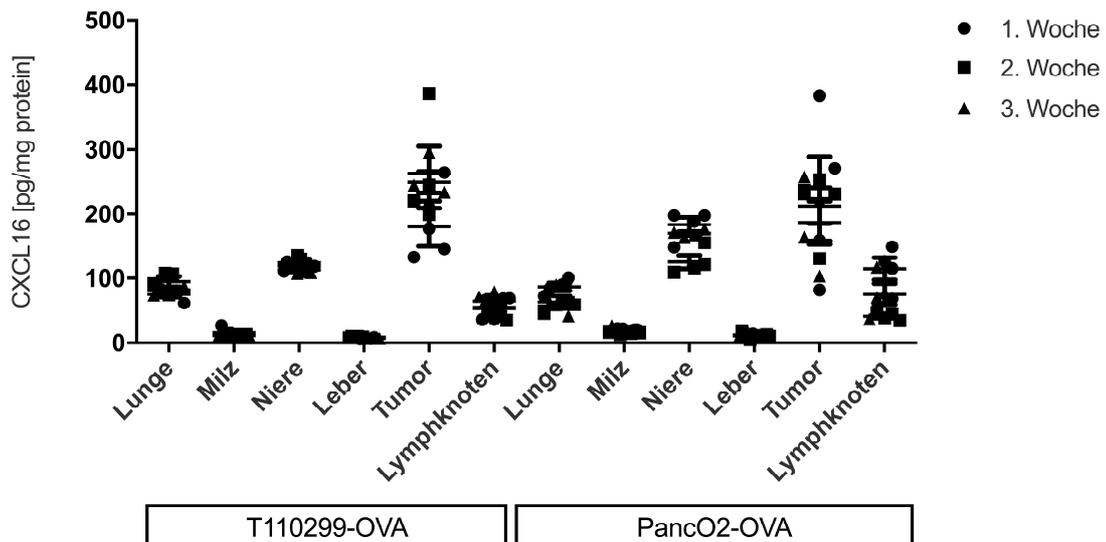
**Abbildung 4: murine Pankreaskarzinomzellen sekretieren CXCL16 nach Kokultur mit T-Zellen**

$0,03 \times 10^6$  T110299-OVA und PancO2-OVA wurden mit OT1+ CD8+ T-Zellen in den Verhältnissen 10:1, 5:1, 2:1 und 1:1 im 96 well Format 48 h inkubiert. Die CXCL16 Bestimmung der Überstände erfolgte mittels ELISA. Jedes Experiment wurde mit drei experimentellen Replikaten durchgeführt. Die gezeigten Daten repräsentieren eines von drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte mittels t-Test.

### 3.1.3. Organe und Tumore *in vivo*

Zur Untersuchung der Verteilung der CXCL16-Expression im Organismus wurde die Expression des Tumorgewebes im Vergleich zu anderen Organen gemessen. Mäusen wurden subkutan Tumorzellen injiziert und nach ein bis drei Wochen Organe und Tumore entnommen. Zur Kalibrierung wurde der Proteingehalt der Lysate im Bradford Assay bestimmt und die CXCL16 Konzentration mittels ELISA gemessen.

In beiden Tumormodellen stellt das Tumorgewebe die Hauptquelle für CXCL16 dar. Andere Organe wie Lunge, Milz, Niere oder Leber exprimieren variable Mengen an CXCL16.



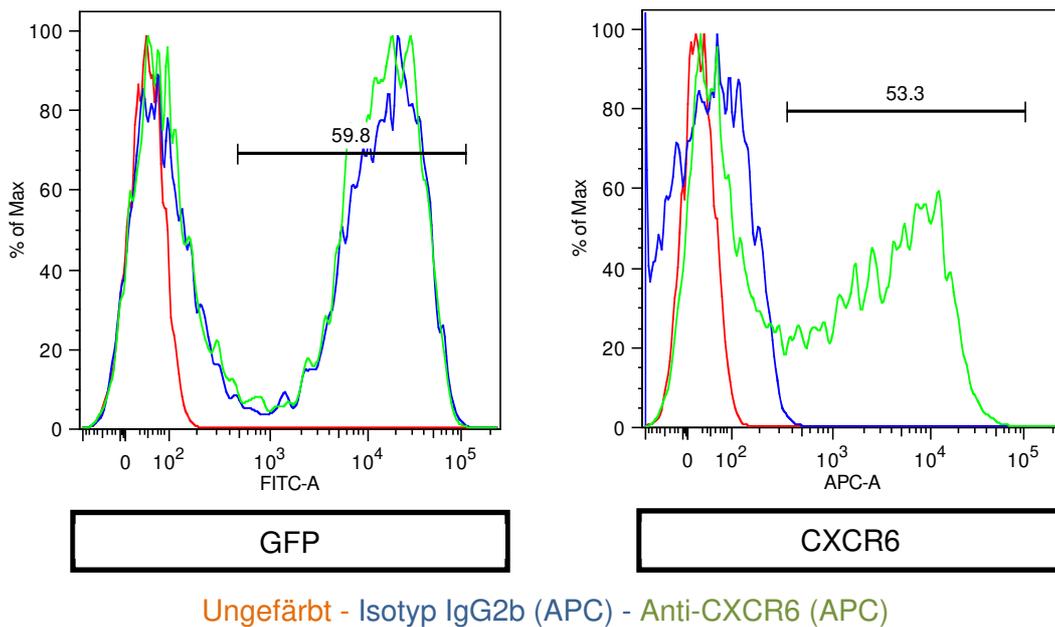
### Abbildung 5: Verteilung der CXCL16 Expression *in vivo*

Vier Mäusen wurden mit den Tumorzellen T110299-OVA und PancO2-OVA injiziert. Der Proteingehalt der Lysate von Organen und Tumoren wurden im Zeitverlauf von ein bis drei Wochen im Bradfordassay bestimmt. Nach entsprechender Verdünnung der Proben zur Normierung auf eine definierte Proteinkonzentration erfolgte die CXCL16 Bestimmung der Überstände mittels ELISA. Die gezeigten Daten repräsentieren eines von drei unabhängig durchgeführten Experimenten mit je 9 oder 12 Mäusen. Die statistische Analyse erfolgte mittels t-Test.

## 3.2. CXCR6-Expression in Leukozyten

### 3.2.1. Primäre T-Zellen

Um die CXCR6 - CXCL16 Achse zur T-Zelltherapie zu nutzen, wurden primäre murine T-Zellen zunächst mit CXCR6 retroviral transduziert. Als Transduktionskontrolle diente ein Vektor mit GFP. Der Rezeptor CXCR6 ist stabil an der Oberfläche von transduzierten primären T-Zellen über fluorchromgekoppelte Antikörper detektierbar.

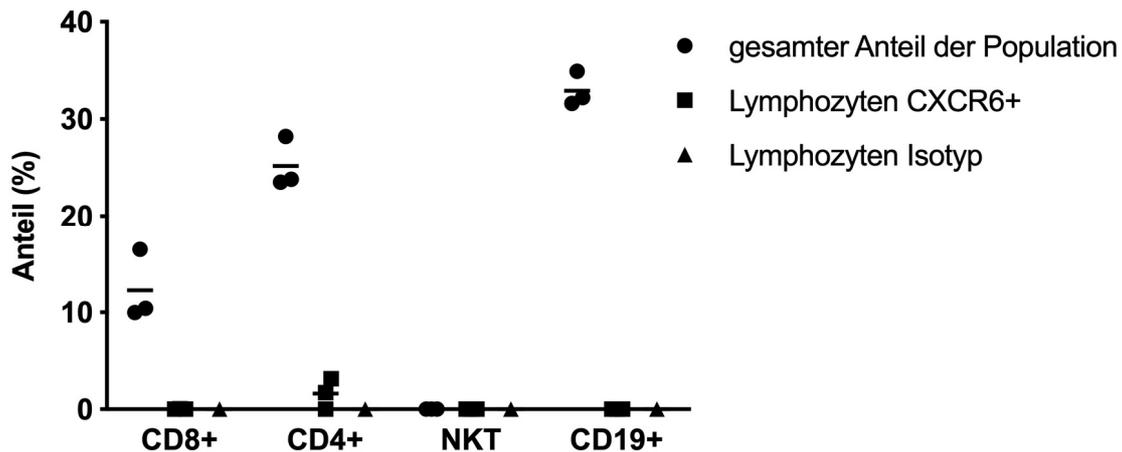


**Abbildung 6: murine T-Zellen exprimieren CXCR6 nur nach genetischer Modifikation *in vitro***

Zuvor isolierte primäre murine OT1+ CD8+ T-Zellen wurden anschließend mit dem produzierten Retrovirus infiziert. Die Auswertung auf Proteinlevel erfolgte mittels FACS, wobei der CXCR6-Antikörper APC-gekoppelt ist. Die gezeigten Daten repräsentieren eines von ca. 60 unabhängig durchgeführten Experimenten mit wiederholt stabiler Transduktionseffizienz.

**3.2.2. Leukozyten *in vivo***

Im folgenden Experiment soll überprüft werden, ob andere Leukozyten physiologisch CXCR6 exprimieren. Dieses könnte insbesondere bei einer Konkurrenz der transduzierten T-Zellen mit endogenen CXCR6+ Zellen von Bedeutung sein. Nach drei Wochen wurden Tumore und Organe zu Zellsuspensionen aufbereitet. Die Expression von CXCR6 sowie immunphänotypischer Marker wurde mittels FACS gemessen. Insgesamt konnte eine signifikante Expression für CXCR6 in tumortragenden Mäusen nur in CD4+ T-Zellen im Blut gemessen werden.

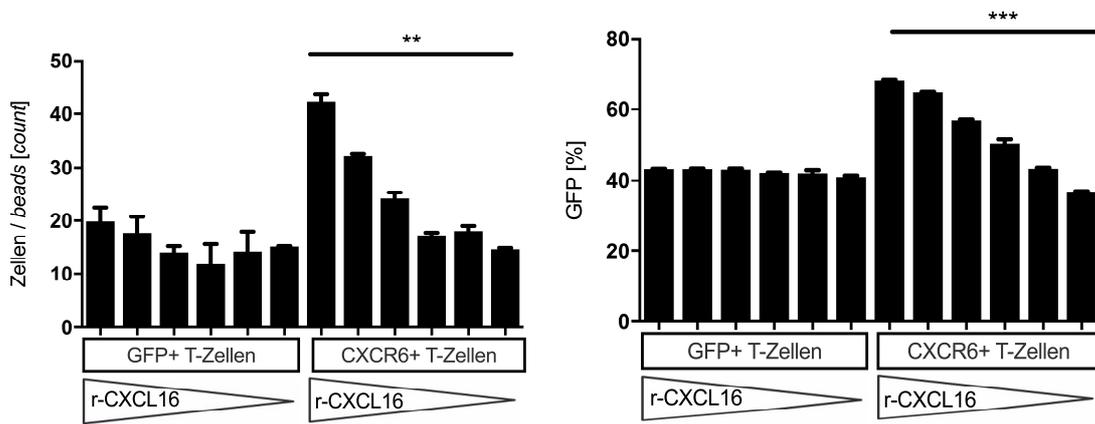


**Abbildung 7: CXCR6-Expression auf Lymphozyten von Panc02-OVA-tragenden Mäusen.**

Drei Mäuse wurden mit PancOVA Zellen injiziert. Nach 3 Wochen wurden die Gewebe entnommen, die Zellen isoliert und entsprechende Antigene für die Differenzierung lymphoider und myeloider Zellpopulationen angefärbt. Die Auswertung auf Proteinlevel erfolgte mittels FACS. Die gezeigten Daten repräsentieren eines von drei unabhängig durchgeführten Experimenten mit je drei Mäusen.

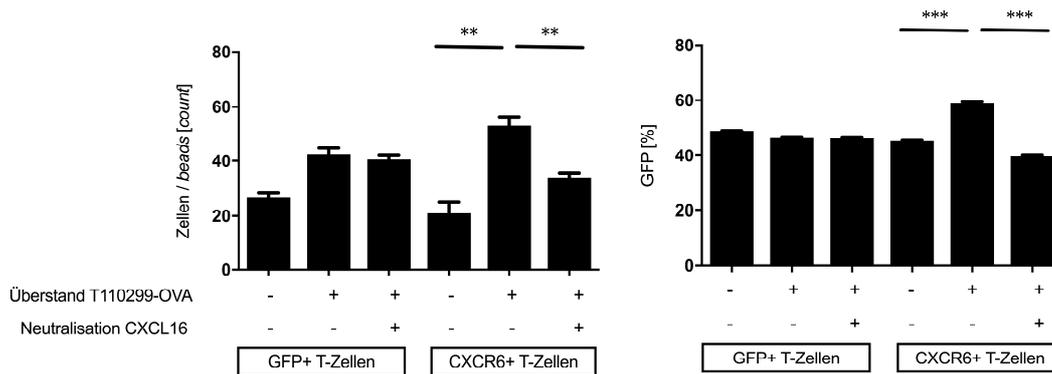
### 3.3. Migratorische Kapazität CXCR6-modifizierte CD8+ T-Zellen

Zunächst sollte analysiert werden, inwiefern die CXCR6-Expression in T-Zellen ihre migratorische Kapazität beeinflussen kann. Es wurde rekombinantes CXCL16 einerseits und CXCL16+ Tumorzellen andererseits verwendet. CXCL16 zeigt einen Konzentrations-abhängigen chemotaktischen Effekt für CXCR6+ T-Zellen im Vergleich zu GFP+ T-Zellen. Die Migration ist spezifisch, da sich insbesondere die CXCR6+ T-Zellen im Vergleich zu den GFP+ T-Zellen deutlich anreichern. Auch CXCL16-produzierende T110299-OVA Tumorzellen können, vermittelt durch CXCL16 CXCR6+T-Zellen anlocken. Die Zugabe eines CXCL16-neutralisierenden Antikörpers hebt diesen Effekt vollständig auf. CXCR6-modifizierte T-Zellen können also spezifisch in Richtung eines CXCL16 Gradienten migrieren, wobei die Konzentration von CXCL16 diesen chemotaktischen Effekt des Gradienten determiniert.



### Abbildung 8: CXCR6+ T-Zellen migrieren spezifisch auf rekombinantes CXCL16

Je  $10^6$ -T-Zellen wurden in die *wells* der oberen Kammer einer *Transwell*-Platte im 96 *well* Format gegeben. 50 ng/ $\mu$ l r-CXCL16 in absteigender 1:1 Verdünnungsreihe in die untere Kammer überführt. Die Auswertung erfolgte nach 3 h Inkubation in Bezug auf die Zellzahl sowie die GFP Fluoreszenz mittels FACS. Die gezeigten Daten repräsentieren eines von drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte mittels t-Test.



### Abbildung 9: CXCR6+ T-Zellen migrieren spezifisch auf rekombinantes und von Tumorzellen produziertes CXCL16

Je  $10^6$  Tumorzellen wurden im 6 *well* Format ausgesät und mit 20 ng/ $\mu$ l IFN- $\gamma$  sowie TNF- $\alpha$  48h stimuliert. Je  $10^6$ -T-Zellen wurden in die *wells* der oberen Kammer einer *Transwell*-Platte im 96 *well* Format gegeben. Tumorüberstände wurden in die untere Kammer überführt. Als Negativkontrolle wurde CXCL16 mit 4  $\mu$ g/ml anti-CXCL16 neutralisiert. Die Auswertung erfolgte nach 3h Inkubation in Bezug auf die Zellzahl sowie die GFP Fluoreszenz mittels FACS. Die gezeigten Daten repräsentieren eines von drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte mittels t-Test.

### 3.4. Anti-tumorales Potential CXCR6-modifizierter CD8+ T-Zellen

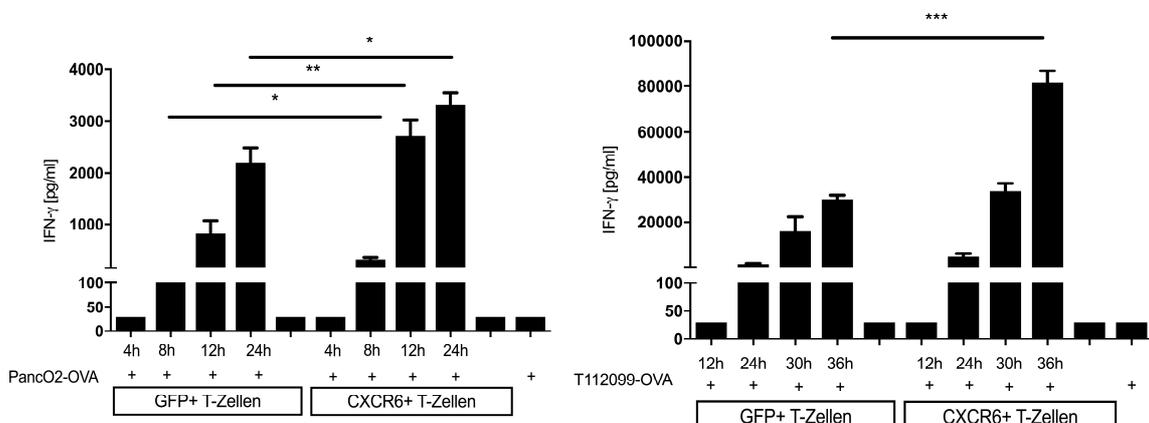
Die folgenden Experimente untersuchen, inwiefern die verbesserte Migration von CXCR6-modifizierten T-Zellen einen Vorteil für die Effektorfunktion darstellt. CXCR6-GFP+ CD8+ OT1 T-Zellen wurden im Vergleich zu GFP+ CD8+ OT1 T-Zellen in Kokultur mit OVA-transduzierten Tumorzellen analysiert.

#### 3.4.1. Aktivierung

In einer Kokultur von Tumorzellen und T-Zellen soll gezeigt werden, inwiefern die CXCR6-Expression in T-Zellen ihre Aktivierung gemessen an die IFN- $\gamma$  Sekretion beeinflusst. Dazu wurde eine Kinetik der IFN- $\gamma$  Ausschüttung erstellt.

CXCR6+ T-Zellen produzieren schneller mehr IFN- $\gamma$  als GFP+ T-Zellen. Bei PancO2-OVA (A) sind bereits nach kürzerer Zeit Unterschiede in der IFN- $\gamma$  Sekretion detektierbar, die bis 24 h bestehen bleiben. Bei T110299-OVA (B) ist die IFN- $\gamma$  Sekretion der CXCR6+ T-Zellen erst nach 36 h stärker.

CXCL16 kann neben Migration also auch die Aktivierung von CXCR6+ T-Zellen als Quelle von Effektorzytokinen induzieren.



**Abbildung 10: CXCR6+ T-Zellen sezernieren vermehrt IFN- $\gamma$  nach Kokultur mit Tumorzellen**

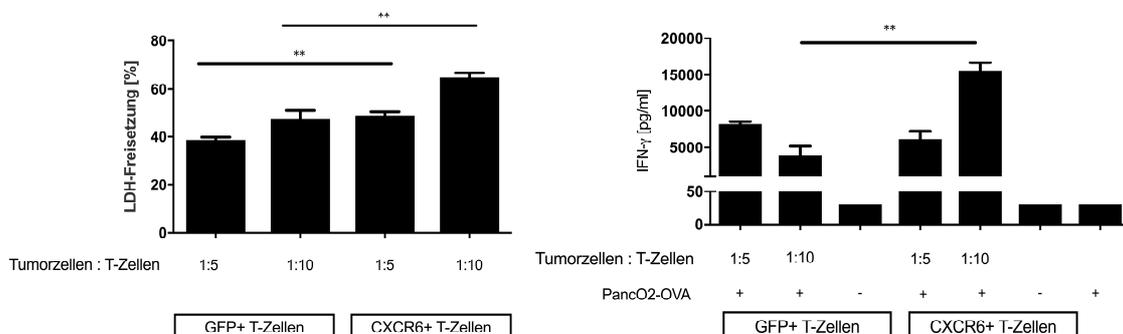
T-Zellen wurden im Verhältnis von 5:1 mit  $10^4$  Tumorzellen für vier bis 36 h im 96 well Format inkubiert. Die IFN- $\gamma$  Bestimmung der Überstände erfolgte mittels ELISA. Die gezeigten Daten repräsentieren eines von drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte mittels t-Test.

### 3.4.2. Tumorlyse

In einem Zytotoxizitätsassay soll analysiert werden, inwiefern die CXCR6-Expression in T-Zellen ihr zytotoxisches Potential beeinflusst.

Nach Kokultur von Tumorzellen und T-Zellen wurde die LDH- und IFN- $\gamma$  Konzentration quantifiziert. Die LDH-Freisetzung dient hier als Maß für die spezifische Lyse von Tumorzellen, IFN- $\gamma$  für die Aktivierung von T-Zellen.

CXCR6+ T-Zellen lysieren Tumorzellen stärker in dem evaluierten Zeitraum als GFP+ T-Zellen. Dieses korreliert teilweise mit der IFN- $\gamma$  Konzentration. CXCL16 optimiert die Interaktion von T-Zellen mit Tumorzellen also dahingehend, dass CXCR6-modifizierte T-Zellen stärkeres zytotoxisches Potential in dem Zeitfenster haben können.



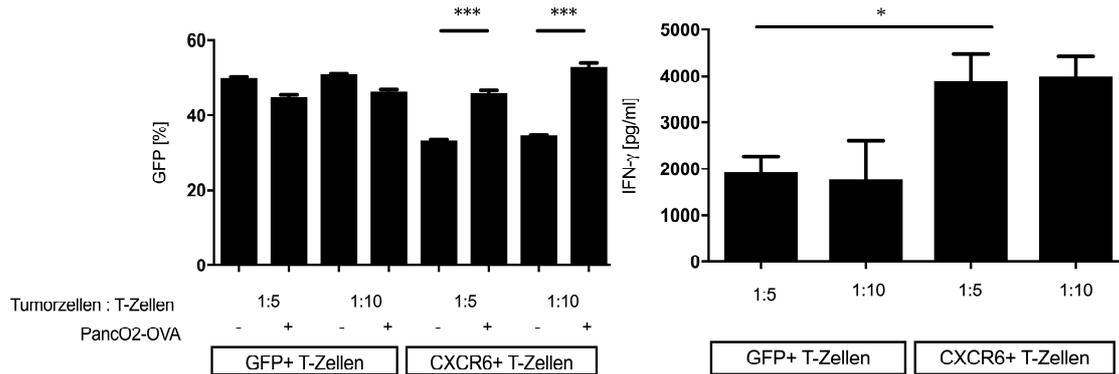
#### Abbildung 11: CXCR6+ T-Zellen zeigen eine höhere tumorale Zellyse

T-Zellen wurden im Verhältnis von 5:1 und 10:1 mit  $3 \times 10^4$  Tumorzellen 5 h inkubiert. Die LDH-Freisetzung der Überstände wurde in Korrelation zur Zellyse als chromogenes Substrat einer gekoppelten Enzymreaktion mit sichtbarer Wellenlänge gemessen. Die IFN- $\gamma$  Bestimmung der Überstände erfolgte mittels ELISA. Die gezeigten Daten repräsentieren eines von drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte mittels t-Test.

### 3.4.3. Tumorlyse nach erfolgter Migration

Die Kombination eines Migrations- und Zytotoxizitätsassay soll untersuchen, ob die Migration von T-Zellen über den CXCL16 Gradienten ihr zytotoxisches Potential beeinflusst. Dazu wurden Tumorzellen mit einem Vektor für eine CXCL16 Überexpression modifiziert.

CXCR6+ T-Zellen migrieren mehr als GFP+ T-Zellen in Richtung der Tumorzellen. Aufgrund der Anreicherung von GFP, als Surrogat für die CXCR6 Expression, ist dieser Effekt auch spezifisch. Migrierte CXCR6+ T-Zellen zeigen eine stärkere Tumorlyse und Freisetzung von IFN- $\gamma$  im Vergleich zu GFP+ T-Zellen.



### Abbildung 12: CXCR6+ T-Zellen zeigen nach spezifischer Migration zu Tumorzellen eine höhere Tumorzellyse sowie vermehrte IFN- $\gamma$ Sekretion

*Transwell* Platten wurden mit 100  $\mu\text{g/ml}$  Polylysin benetzt.  $10^5$  CXCL16+ Tumorzellen wurden in die untere Kammer gegeben. Nach Anwachzeit wurde der Assay durch das Zufügen der T-Zellen in die obere Kammer im Verhältnis zu Tumorzellen von 5:1 und 10:1 gestartet. Die Auswertung der Migration erfolgte nach drei Stunden wie beschrieben. LDH und IFN- $\gamma$  der Überstände wurde wie beschrieben gemessen. Die gezeigten Daten repräsentieren eines von drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte mittels t-Test.

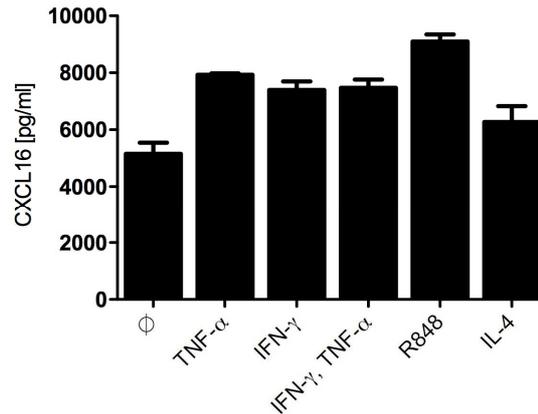
### 3.5. Interaktion CXCR6-modifizierter CD8+ T-Zellen mit dendritischen Zellen

Da auch DC bekanntermaßen CXCL16 exprimieren und produzieren können und diese Zellen auch in der Interaktion mit T-Zellen eine wichtige Rolle einnehmen, sollte im Folgenden untersucht werden, inwiefern CXCL16+ DC CXCR6+ T-Zellen beeinflussen können.

#### 3.5.1. CXCL16-Expression in dendritischen Zellen

Initial wurde überprüft, ob CXCL16 von DC exprimiert wird. DC wurden isoliert und ausgesät. Um Sekretionsbedingungen zu charakterisieren, wurden rekombinante Zytokine zur Stimulation verwendet. Die CXCL16-Konzentration der Überstände wurde gemessen.

Die CXCL16 Sekretion von DC wird am meisten durch den TLR7/8-Liganden R848 induziert. IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  induzieren ebenfalls die CXCL16 Produktion, zeigen aber keinen additiven Effekt.



### Abbildung 13: DC sekretieren CXCL16

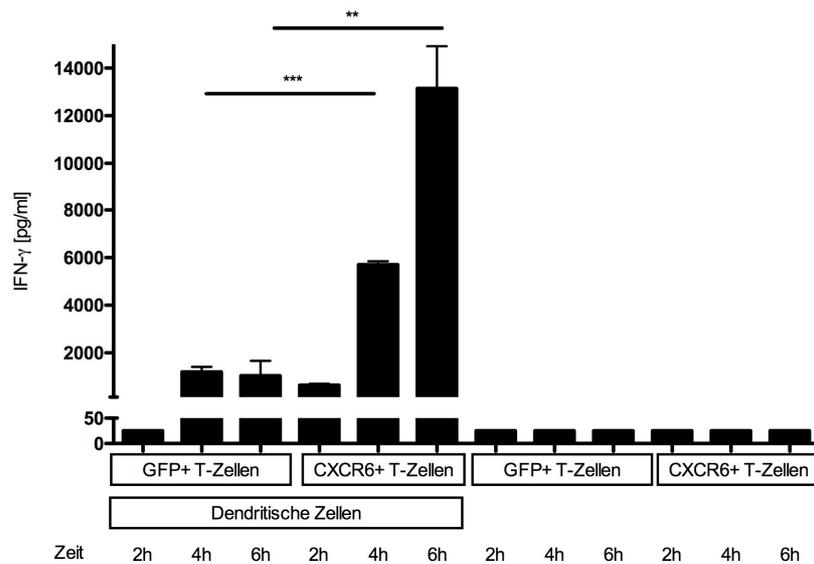
Aus Knochenmark wurde eine Zellsuspension hergestellt und sieben Tage mit 20 ng/ $\mu$ l GM-CSF zur Differenzierung von DC inkubiert. Nach Ausreifung wurden  $5 \times 10^4$  DC im 96 *well* Format ausgesät und 48h mit je 20 ng/ $\mu$ l der genannten rekombinanten Proteine stimuliert. Die CXCL16 Bestimmung der Überstände erfolgte mittels ELISA. Die gezeigten Daten repräsentieren eines von drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte mittels t-Test.

#### 3.5.2. Aggregation von CD8+ T-Zellen mit dendritischen Zellen

Um die Interaktion mit DC näher zu charakterisieren, wurden DC mit T-Zellen koinkubiert und dann mittels konfokaler Mikroskopie visualisiert. Erwartungsgemäß klustern T-Zellen um DC herum, wobei die Zahl und Größe der Cluster ein Maß für die spezifische Attraktion ist.

Transduzierte T-Zellen wurden mit zwei unterschiedlichen fluoreszierenden Zellkern markiert und mit DC kultiviert. Zur Negativkontrolle wurden T-Zellen mit CXCL16 vorinkubiert, um durch eine Liganden-induzierte Rezeptorinternalisierung den Effekt zu neutralisieren. Die Cluster wurden konfokalmikroskopisch abgebildet und hinsichtlich des Verhältnisses von CXCR6+ zu kontrolltransduzierten T-Zellen analysiert. CXCR6+ T-Zellen reichern sich vermehrt in Clustern mit DC an, welches durch die Vorkubation mit CXCL16 reduziert werden kann. Die Größe der Cluster gemessen an der Zahl der T-Zellen wird dabei nicht beeinflusst.





**Abbildung 15: CXCR6+ T-Zellen vermehrt IFN- $\gamma$  nach Kokultur mit dendritischen Zellen**

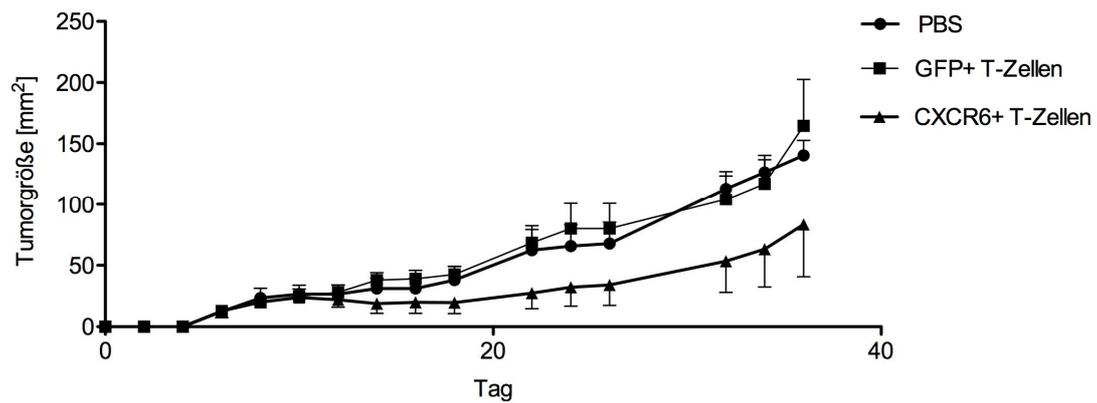
$5 \times 10^3$  dendritische Zellen wurden im 96 well Format plattiert und mit  $1 \mu\text{g/ml}$  Siinfekt stimuliert. Dendritische Zellen und T-Zellen wurden im Verhältnis von 1:10 für zwei bis sechs Stunden inkubiert. Die IFN- $\gamma$  Bestimmung der Überstände erfolgte mittels ELISA. Die gezeigten Daten repräsentieren eines von drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte mittels t-Test.

### 3.6. Therapeutische Wirksamkeit nach adoptiven Transfer *in vivo*

Im Mausmodell sollte schließlich analysiert werden, inwiefern die CXCR6-Expression in T-Zellen die therapeutische Wirksamkeit von AZT verbessern kann.

Mäusen wurden an Tag 0 +subkutan Tumorzellen injiziert. Nach sechs Tagen wurden je fünf Tiere mit CXCR6+ oder GFP+ T-Zellen oder PBS intravenös behandelt. Das anti-tumorale Potential der T-Zellen wurde durch regelmäßige Messung der Tumorgößen bestimmt.

Sechs Tage nach Zelltransfer differiert die Tumorgöße bezogen auf die Fläche und die Tumore der Versuchsgruppe wachsen langsamer als in den beiden Kontrollen. Bei zwei Tieren konnte sogar eine komplette Eradikation des Tumors erreicht werden.



**Abbildung 16: CXCR6+ verstärkt die therapeutische Wirksamkeit von OT-1-T-Zellen im Panc02-OVA-Modell**

Drei Mäusen pro Gruppe wurden subkutan  $2 \times 10^6$  Tumorzellen injiziert und nach ca. 8 Tagen in Bezug auf die Tumorgöße randomisiert. Nach ex vivo Modifikation mit CXCR6 oder GFP und Kultivierung wurden  $10^7$  T-Zellen oder PBS i. v. in den Schwanz injiziert. Auswertung alle zwei Tage durch Messung der Tumorgöße. Die gezeigten Daten repräsentieren eines von drei durchgeführten unabhängigen Experimenten.

## 4. Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass CXCL16 von Pankreaskarzinomzellen exprimiert und sezerniert wird. Die genetische Überexpression von CXCR6 in CD8+ T-Zellen ermöglicht eine spezifische Rekrutierung zu den Tumorzellen *in vitro* und dort auch eine verbesserte anti-tumorale Funktion. *In vivo* führte die CXCR6-Modifikation von OT-1-T-Zellen zu einer verbesserten anti-tumoralen Aktivität.

Darüber hinaus konnte auch gezeigt werden, dass CXCL16 ein stabil exprimiertes Chemokin in DC ist. Die Überexpression von CXCR6 in CD8+ T-Zellen bewirkt dabei ihre vermehrte Aggregation mit DC und konsekutiv eine verstärkte Stimulation dieser T-Zellen.

### 4.1. Die Expression und Bedeutung der CXCR6 - CXCL16-Achse in Tumoren

#### 4.1.1. CXCL16 wird unter inflammatorischen Bedingungen vom Tumorgewebe sezerniert

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass CXCL16 von Pankreaskarzinomzellen spontan produziert wird und, dass seine Sekretion *in vitro* durch TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  oder zytotoxische T-Zellen induziert werden kann. *In vivo* überwiegt die tumorale CXCL16 Expression im Zeitverlauf quantitativ die Expression von CXCL16 in Organen.

CXCL16 (LARC, MP3 $\alpha$ ) ist neben CX3CL1 (Fractalkine) das einzige Chemokin, welches nicht nur als lösliches Peptid exprimiert wird, sondern zunächst als *type-I-transmembrane-molecule* (TM-CXCL16) an der Zelloberfläche verankert ist. CXCL16 besteht aus einer N-terminalen Chemokindomäne, gefolgt von einem hoch O-glykosylierten Mucin-ähnlichen Stiel, einer einzelnen transmembranen  $\alpha$ -Helix und einem kurzen zytoplasmatischen Schwanz. Die lösliche Form des Chemokins ist das Produkt eines *shedding*-Prozesses. In dieser proteolytischen Kaskade katalysiert die *disintegrin-like metalloproteinase* ADAM10 die Generierung des löslichen CXCL16 (s-CXCL16) aus dem TM-CXCL16 und seine anschließende Freisetzung in Fragmenten außerhalb der Zelle (Gough et al. 2004, Hundhausen et al. 2007).

Auch Abel et al zeigten eine Stimulation der ADAM10 Aktivität und konsekutiv der Induktion der CXCL16-Expression durch die proinflammatorischen Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  (Abel et al. 2004). Dieses spricht für einen positiven Feedback-Mechanismus zwischen aktivierten T-Zellen und der CXCL16-Expression. Wente et al konnten

speziell im Pankreaskarzinom eine vermehrte Expression von CXCL16 messen (Wente et al. 2008). Andere Gruppen konnten CXCL16 als negativen prognostischen Marker und Organisator eines proinflammatorischen Tumormilieus mit proangiogenetischen oder proliferativen Effekten wie Tumorwachstum, Metastasierung und Immunevasion nachweisen (Darash-Yahana et al. 2009, Deng et al. 2010). Andere Forschungsgruppen konnten eine vermehrte CXCL16-Expression pathophysiologisch mit proinflammatorischen Krankheitsbildern korrelieren (Heydtmann et al. 2005, Nanki et al. 2005, Yamauchi et al. 2004).

Die detektierte geringe Menge von CXCL16 in Nieren und Organen in der vorliegenden Arbeit suggeriert eine mögliche *On-off-tumor*-Toxizität in diesen Organen. Aufgrund der starken proinflammatorischen Assoziation der CXCR6 - CXCL16-Achse erscheint diese jedoch für gesundes nicht entzündlich verändertes Gewebe unwahrscheinlich. Ebenfalls macht die hier unzureichende Antigenlast eine T-Zellaktivierung und eine klinisch relevante kollaterale Toxizität ebenfalls weniger wahrscheinlich. Passend zu den proinflammatorischen Sekretionsbedingungen von CXCL16 konnten zwei Forschungsgruppen nach Bestrahlung von Brustkrebszellen eine Hochregulation von CXCL16 und eine vermehrte Rekrutierung von T-Zellen ins Tumormilieu über die CXCR6 - CXCL16-Achse zeigen (Matsumura et al. 2008, Yoon et al. 2016). Diese als abkoppler Effekt bezeichnete Synergie von Bestrahlung und Immuntherapie könnte die Attraktivität von CXCL16 als Zielprotein auch für Tumorentitäten erhöhen, die durch eine immunologische Resistenz und geringe CXCL16-Expression charakterisiert sind.

#### **4.1.2. CXCR6 kann in zytotoxischen T-Zellen exprimiert werden**

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass primäre CD8+ T-Zellen nach retroviraler Transduktion CXCR6 an der Zelloberfläche exprimieren können. Zudem reproduziert die Arbeit die physiologische Expression von CXCR6 auf einem kleinen Anteil zirkulierender CD4+ T-Zellen. Auf anderen Immunzellpopulationen insbesondere CD8+ T-Zellen, Natürlichen Killerzellen (NK Zellen) oder B-Zellen konnte kein CXCR6 detektiert werden (Latta et al. 2007, Matloubian et al. 2000).

Physiologisch ist die Chemokinrezeptorexpression als Bestandteil einer molekularen Signatur an der Zelloberfläche strengt reguliert. Dabei können Zellen durch Internalisierung des Chemokinrezeptor-Liganden-Komplexes diesen oberflächlichen Kommunikationscode manipulieren, selbst Chemokingradienten generieren und damit Migrationsrichtungen beeinflussen (Dona et al. 2013, Kim, Rott, et al. 2001). Einige

Gruppen konnte zeigen, dass die Expression des G-Protein gekoppelten Rezeptors CXCR6 (oder BONZO/STRL33/TYMSTR) durch aktivierte DC sowie IL-2 und IL-15 induziert werden kann und einen Marker für die Differenzierung von T-Zellen in einen TH1 Phänotyp repräsentiert (Calzascia et al. 2005, Kim et al. 2003, Langenkamp et al. 2003, Unutmaz et al. 2000). Kim et al konnten zeigen, dass der Großteil der CXCR6+ T-Zellen dabei CD8+ T-Zellen vom zytotoxischen Effektorphänotyp umfasst, die aufgrund fehlender Koexpression von L-Selektin oder CCR7 kein spezifisches „*homing*“ Potential zu Lymphknoten besitzen, sondern sich in inflammatorisch veränderten Geweben anreichern (Kim, Kunkel, et al. 2001). Auch Calabresi et al fanden eine starke Korrelation der CXCR6-Expression mit der Konversion von T-Zellen in Effektor-Gedächtnis-Zellen (Calabresi et al. 2002). Hydes et al konnten eine erhöhte CXCR6-Expression in Leber residenten NK-Zellen sowie unter Stimulation mit IL-12 und IL-15 auch eine CXCR6 Hochregulation in Natürlichen Killerzellen im peripheren Blut zeigen. Die CXCR6-Expression korrelierte auch dabei mit der Konversion peripher zirkulierender NK Zellen in einen Homing Immunphänotyp (Hydes et al. 2018).

Die in dieser Arbeit gezeigte Expression von CXCR6 auf einem kleinen Teil zirkulierender CD4+ Lymphozyten identifiziert die CXCR6 - CXCL16 Achse als eine geeignete Zielstruktur. Dabei ist jedoch unklar, ob die in der Literatur beschriebene CXCR6-Expression auf anderen Immunzellsubpopulation möglicherweise aufgrund einer nicht ausreichenden Sensitivität der FACS Färbung nicht reproduziert werden konnte. Darüber hinaus untersucht diese Arbeit weder direkt die Stabilität der Rezeptorexpression im Verlauf vor dem Hintergrund einer möglichen transienten Herunterregulierung noch nimmt sie eine immunphänotypische Differenzierung der CXCR6+ T-Zellen vor. Die folgenden funktionalen *in vitro* Assays zur Überprüfung der migratorischen und zytotoxischen Kapazität der transduzierten T-Zellen untersuchen jedoch indirekt beide Aspekte.

## **4.2. Effekte von CXCL16 auf CXCR6-modifizierte CD8+ T-Zellen**

### **4.2.1. CXCR6-modifizierte CD8+ T-Zellen migrieren spezifisch über einen CXCL16 Gradienten *in vitro***

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass CXCR6-modifizierte T-Zellen Konzentrations-abhängig und spezifisch über einen rekombinanten CXCL16 Gradienten sowie zu Tumorüberständen *in vitro* migrieren.

Die Leukozytenmigration oder Leukodiapedese besteht aus den Phasen des Rollens,

der Leukozytenaktivierung und –bindung sowie der transendothelialen Migration. Chemokine können dabei in löslicher Form durch den Aufbau eines Konzentrationsgradienten die Migrationsrichtung von Leukozyten steuern. Diese Navigation wird auch Chemotaxis genannt. Im Unterschied dazu können Chemokinliganden als Oberflächen-gebundener Lockstoffgradient mit adhäsiver Wirkung auch die als Haptotaxis bezeichnete Lokomotion von Leukozyten organisieren (Nourshargh and Alon 2014).

Für CXCL16, welches durch seine duale Expression als TM- und s-CXCL16 prinzipiell beide Navigationsformen initiieren könnte, scheint die Leukozytenmigration vor allem auf einem chemotaktischen Effekt zu basieren. Passend zum Konzentrations-abhängigen Effekt der T-Zellmigration in der vorliegenden Arbeit konnten auch Matloubian et al. zeigen, dass für die Migration aktivierter T-Zellen der chemotaktische Gradient von CXCL16 entscheidend ist. CXCL16 im unmittelbaren Milieu der T-Zellen konnte keine Migration von T-Zellen induzieren. Zudem beobachteten sie eine Migration von aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen und weniger CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu rekombinanten CXCL16. Für naive T-Zellen, B-Zellen oder NK-Zellen konnte trotz vergleichbarer CXCR6-Expression keine Migration nachgewiesen werden (Matloubian et al. 2000). Die in der vorliegenden Arbeit fast vollständige Aufhebung der Migration CXCR6-transduzierter T-Zellen mittels eines gegen CXCL16 gerichteten neutralisierenden Antikörpers ist Indiz für die auch von anderen Gruppen beschriebene geringe Bindungspromiskuität von CXCL16 und die starke Abhängigkeit der Chemotaxis von der CXCL16 - CXCR6-Achse. Auch Sato et al. beobachteten im Mausmodell eine signifikante reduzierte Rekrutierung von transferierten CXCR6-defizienten T-Zellen in GvHD befallenes CXCL16 reiches Leberparenchym (Sato et al. 2005). Auch Wehr et al. und Xia et al. konnten im Mausmodell die reduzierte Migration von CXCR6<sup>-/-</sup> Lymphozyten in inflammatorisch verändertes Leber- und Nierenparenchym sowie in der Folge einen reduzierten fibrotischen Umbau dieser Organe zeigen (Wehr et al. 2013, Xia et al. 2014).

Auch in zahlreichen Tumorentitäten wurde die Bedeutung des CXCL16 Gradienten für die Migration von Zellen untersucht. Einige Gruppen beobachten die Anlockung CXCR6-exprimierender T-Lymphozyten durch erhöhte Expression von CXCL16 im Tumormilieu. Passend dazu konnte CXCL16 mit einer verbesserten Prognose korreliert werden (Gutwein et al. 2009, Oldham et al. 2012, Parsonage et al. 2012). Im Unterschied dazu konnten Gooden et al. und andere Gruppen CXCL16 auch mit der Migration von Tumorzellen im Sinne einer prometastatischen Aktivität assoziieren und

folglich CXCL16 als negativen prognostischen Marker in einigen Tumorentitäten nachweisen (Darash-Yahana et al. 2009, Gooden et al. 2014, Wang et al. 2008). Dabei konnten Hajo et al zeigen, dass vor allem s-CXCL16 die Migration und Metastasierung von Tumorzellen und TM-CXCL16 eher die Leukozytendiapedese und Infiltration ins TME fördert (Hojo et al. 2007). Dieses steht in Diskrepanz zu der in der vorliegenden Arbeit gezeigten chemotaktischen Wirkung von rekombinanten s-CXCL16. Eine weitere möglich mechanistische Untersuchung wäre z. B. die Koinkubation von ADAM10 Inhibitoren und Tumorzellen in Migrationassays. Dadurch könnte die Auswirkung eines verminderten Sheddings von TM-CXCL16 auf die T-Zellmigration analysiert werden.

#### **4.2.2. CXCR6-modifizierte CD8+ T-Zellen zeigen erhöhtes anti-tumorales Potential *in vitro***

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass CXCR6-modifizierte T-Zellen im Vergleich zu nicht modifizierten T-Zellen eine stärkere Tumorzellyse bewirken und mehr IFN- $\gamma$  produzieren. Die vorherige Migration zum Tumor kompromittiert dabei nicht ihre Effektorfunktion.

Die verbesserte Zytotoxizität im statischen System des *in vitro* Assays lässt neben der chemotaktischen Wirkung auch eine Relevanz der beschriebenen adhäsiven Effekte von TM-CXCL16 im Tumormilieu vermuten (Shimaoka et al. 2004). Die Menge von s-CXCL16, welches von der transmembranen Form extrahiert wird und den chemotaktisch wirksamen Gradienten synthetisiert, beeinflusst dabei das Expressionslevel des adhäsiv wirksamen TM-CXCL16 (Schulte et al. 2007). Die in dieser Arbeit nachgewiesene erhöhte Tumorzellyse und IFN- $\gamma$  Produktion von T-Zellen nach erfolgter Migration deutet auf eine tumorale Expression von CXCL16 hin, welche stabil sowohl für einen chemotaktischen als auch adhäsiven Effekt ist. Die CXCR6-Expression in T-Zellen könnte so aufgrund der dualen Funktion von CXCL16 neben der verbesserten Migration ins TME auch die Persistenz von T-Zellen im Tumormilieu und ihre Interaktion mit Tumorzellen günstig beeinflussen. Dazu müssten weitere *in vitro* Assays die Kinetik der Expression von TM-CXCL16 im Tumormilieu und seine adhäsive Wirkung auf T-Zellen untersuchen. Wir und andere konnten die therapeutische Relevanz dieser Kopplung von Tumorzellen und T-Zellen bereits mittels bispezifischer Antikörper nachweisen, die sich in klinischer Zulassung für BCP-ALL befinden (Kantarjian et al. 2017, Kobold, Steffen, et al. 2015). Diese Arbeit eruiert dabei jedoch nicht, ob die gezeigte vermehrte IFN- $\gamma$  Sekretion

CXCR6+ T-Zellen Folge ihrer verbesserten Chemotaxis ins Tumormilieu ist oder auch die CXCR6 - CXCL16-Achse antigenunabhängig T-Zellen aktivieren kann. Calabresi et al gelang es, eine Korrelation zwischen IFN- $\gamma$  Produktion und CXCR6-Expression in Effektorzellen nachzuweisen (Calabresi et al. 2002). Andere konnten auch für die Chemokinliganden CCL5 und CXCL1 die Induktion einer IFN- $\gamma$  Produktion in T-Zellen beobachten. Dabei gilt es als weniger wahrscheinlich, dass diese die Folge einer Aktivierung des T-Zellrezeptorkomplex ist, sondern, dass manche Chemokine G-Protein gekoppelt neben Chemotaxis komplexe physiologische Mechanismen in T-Zellen kontrollieren können (Bacon et al. 1995, Kershaw et al. 2002). IFN- $\gamma$  kann durch die Hochregulation von MHC-Molekülen Antigenpräsentation und Aktivierung von T-Zellen potenzieren. Darüber hinaus kann es durch Inhibition von Angiogenese und Zellproliferation zur Apoptose von Tumorzellen beitragen (Dunn et al. 2006). Konsekutiv könnte eine verstärkte IFN- $\gamma$  Produktion durch CXCR6-Expression in T-Zellen ihre Effektorfunktion potenzieren, welche neben der Migration zum Tumormilieu eine entscheidende Bedeutung für die Erzeugung einer anti-tumoralen T-Zell-Immunität hat. Im Tumormilieu ist dieses relevant, weil Tumore durch Herunterregulierung kostimulatorischer Moleküle zur Anergie von T-Zellen führen können (Hombach et al. 2001, Ochsenbein et al. 2001). In CAR-T-Zellen kann die Inkorporation unterschiedlicher kostimulatorischer Signalmoleküle ihre anti-tumorale Immunität wiederherstellen (Kawalekar et al. 2016, Lee et al. 2015). Vergleichbar könnte auch die CXCR6 - CXCL16-Achse die Bioenergetik von T-Zellen beeinflussen.

### **4.3. CXCR6-modifizierte CD8+ T-Zellen interagieren vermehrt mit dendritischen Zellen**

#### **4.3.1. CXCL16 wird von dendritischen Zellen sezerniert**

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass DC spontan und unter Stimulation mit rekombinanten Proteinen CXCL16 sezernieren.

Dieses ist kongruent mit den Ergebnissen zwei anderer Gruppen, welche die Expression von CXCL16 neben DCs auch in anderen APC wie Monozyten, Makrophagen und B-Zellen nachweise konnten (Hundhausen et al. 2007, Wilbanks et al. 2001). Generell können DC über ihr Chemokinexpressionsmuster das Migrationsverhalten und die zellulären Interaktionen von T-Zellen beeinflussen (Langenkamp et al. 2003, Tang and Cyster 1999). Darüber hinaus kann die Chemokinexpression in DC als Bestandteil einer molekularen Signatur die Differenzierung und Phänotypen von T-Zellen bestimmen (Kim et al. 2003).

Mittels Ausschüttung von CXCL16 können DC CXCR6-überexprimierende T-Zellen auch zu Orten der Antigenpräsentation rekrutieren. Darüber hinaus kann von DC sezerniertes CXCL16 naive T-Zellen in zytotoxische T-Zellen umprogrammieren. CXCR6 konnte in diesem Zusammenhang als Marker von Effektor-Gedächtnis-T-Zellen nachgewiesen werden (Tabata et al. 2005). Einige Gruppen konnten hierzu zeigen, dass DC über die Ausschüttung von IL-12 eine Hochregulation von CXCR6 auf T-Zellen induzieren können (Kim, Kunkel, et al. 2001, Luther and Cyster 2001). Die hier gezeigte CXCL16-Expression in DC eröffnet die Option, durch eine Überexpression von CXCR6 in T-Zellen auch die unumstrittene Schlüsselfunktion DC in der Regulation der T-Zell-Immunität zu manipulieren (Banchereau and Steinman 1998).

Insgesamt existieren unterschiedlich differenzierte Populationen von DC mit einer großen funktionellen Plastizität, die neben *Priming* von T-Zellen auch protumorale Effekte vermitteln können (Broz et al. 2014, Engelhardt et al. 2012). Die in dieser Arbeit verwendeten DC wurden aus dem Knochenmark nicht tumortragender Mäuse isoliert, ohne dass die Zuordnung einer bestimmten Linie erfolgte. Inwieweit dieses Modell auf tumortragende Organismen übertragbar ist, müssten weitere *in vivo* Analysen untersuchen.

#### **4.3.2. CXCR6-modifizierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen aggregieren verstärkt mit dendritischen Zellen und werden verstärkt durch dendritische Zellen aktiviert**

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass CXCR6-modifizierte T-Zellen verstärkt Cluster mit DC bilden. Eine Liganden-induzierte Rezeptorinternalisierung normalisiert diesen Effekt. Zudem produzieren CXCR6-modifizierte T-Zellen im Vergleich zu nicht modifizierten T-Zellen im Milieu von DC mehr IFN- $\gamma$ .

Andere Forschungsgruppen konnten ebenfalls zeigen, dass DC über die Sekretion von CXCL16 CXCR6<sup>+</sup> T-Zellen anlocken können (Matloubian et al. 2000). Eine andere Gruppe zeigte, dass DC über CXCL16 T-Zellen reaktivieren und zu Orten der Inflammation dirigieren können (Tabata et al. 2005). Darüber hinaus agiert TM-CXCL16 als ein Mediator der immunologischen Synapse von APC und T-Zellen (van der Voort et al. 2010). Shimaoka et al. konnten ebenfalls eine verstärkte Adhäsion von CXCR6<sup>+</sup> T-Lymphozyten an TM-CXCL16 exprimierenden DC nachweisen (Shimaoka et al. 2004).

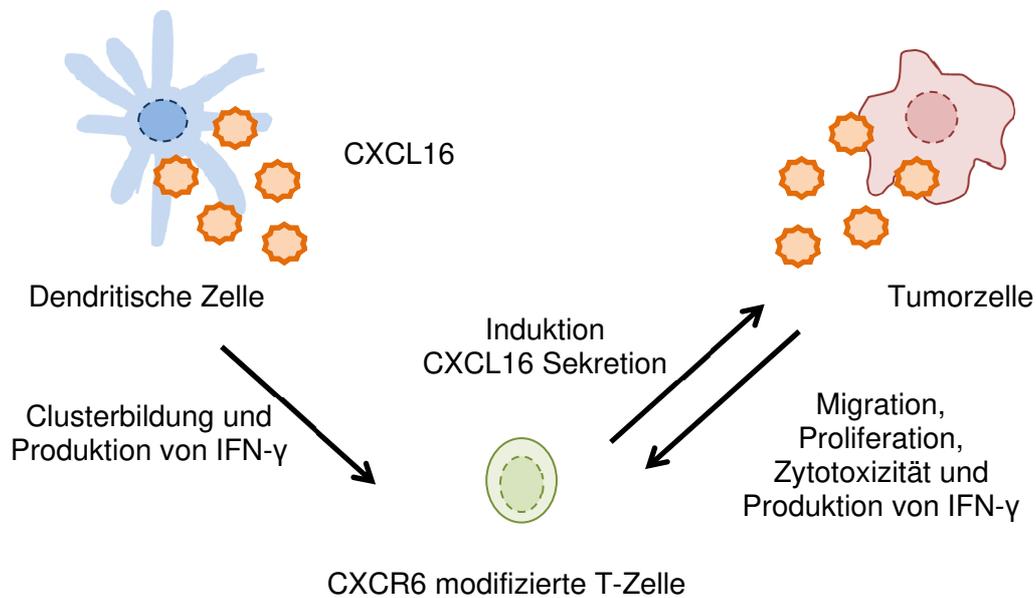
Analog zum statischen Ansatz des Zytotoxizitätsassays lassen auch die

Versuchsbedingungen der Clusterbildung eine Rolle von TM-CXCL16 vermuten. Welche Rolle jedoch auch ein Gradient von s-CXCL16 spielt oder inwieweit die CXCR6 - CXCL16-Achse weitere Faktoren, welche die Translokation von CXCR6+ T-Zellen bestimmen, beeinflussen, müssten weitere Versuche untersuchen.

Chemokinrezeptoren können z. B. das Expressionsmuster und die Konformation von Integrinen und Selektinen bestimmen, die ebenfalls Zellinteraktionen vermitteln. Rapp et al. konnten eine über die CCR4 - CCL22-Achse induzierte ICAM-1 und LFA-1 abhängige Aggregation von T-Zellen mit DC nachweisen (Rapp et al. 2016). Dieses konnte für die CXCR6 - CXCL16-Achse nicht reproduziert werden (Daten nicht gezeigt). Zudem bildet die *in vitro* Kokultur die verstärkte Aggregation von DC und T-Zellen nicht unter Einschluss anderer Zellpopulationen wie regulatorischer T-Zellen oder NK-Zellen ab, die in tumortragenden Organismen die immunologische Synapse ebenfalls beeinflussen können (Bauer et al. 2014, Iraolagoitia et al. 2016).

Die hier gemessene vermehrte IFN- $\gamma$  Produktion könnte als ein mögliches funktionelles Korrelat der konfokalmikroskopisch abgebildeten Aggregation CXCR6-modifizierter T-Zellen mit DC gelten. Die detektierte IFN- $\gamma$  Produktion kontrolltransduzierter T-Zellen spiegelt die Promiskuität der Rezeptor-Liganden Interaktionen der immunologischen Synapse wieder, innerhalb dessen eine Überexpression von CXCR6 einen relevanten Vorteil bedeutet.

Der Kontakt von T-Zellen mit APC und das konsekutiv erhöhte *Priming* von T-Zellen sind zentral für die Induktion einer langfristigen spezifischen anti-tumoralen Immunantwort, die sich selbst unterhalten kann. Die Förderung dieser sogenannten immunologischen Synapse bildet auch den zentralen Wirkmechanismus der *checkpoint*-Inhibition (Brown et al. 2003, Leach et al. 1996). Darüber hinaus existieren andere immuntherapeutische Bemühungen, deren Kernstück die verstärkte Funktion von DC ist (Ma et al. 2013, Subklewe et al. 2014). Durch die vermehrte Aktivierung transferierter T-Zellen durch DC könnte die Modifikation mit CXCR6 neben der migratorischen Kapazität auch ihre Effektorimmunität im immunsuppressiven Tumormilieu schärfen. Neben dem erhöhten migratorischen und zytotoxischen Potential repräsentiert dieses die zweite wichtige Dimension in der Wirksamkeitsoptimierung von AZT durch CXCR6-Expression. Weitere *in vitro* Analysen immunzytologischer Marker wären notwendig, um dabei den Phänotyp der CXCR6-koexprimierenden T-Zellen z. B. in Bezug auf ihre gezielte Konvertierung in Tumorspezifische T-Zellen zu detektieren.



**Abbildung 17: Effekte durch CXCR6 Expression in T-Zellen *in vitro*.** CXCL16 wird von Dendritischen Zellen und Tumorzellen exprimiert. CXCR6 modifizierte T-Zellen migrieren und lysieren verbesserte CXCL16 exprimierende Tumorzellen. Ihre dabei verstärkte IFN- $\gamma$  Produktion fördert als positive Rückkopplung die CXCL16-Produktion von Tumorzellen und konsekutive Migration CXCR6<sup>+</sup> T-Zellen. CXCR6 modifizierte T-Zellen interagieren verstärkt mit CXCL16 exprimierenden Dendritischen Zellen und produzieren verstärkt IFN- $\gamma$ .

#### 4.4. CXCR6-modifizierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen zeigen therapeutische Wirksamkeit nach adoptiven Transfer *in vivo*

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass CXCR6-modifizierte T-Zellen im Vergleich zu nicht modifizierten T-Zellen nach AZT *in vivo* eine Regredienz des Tumors bewirken können. Im Besonderen haben kontrolltransduzierte T-Zellen auch keinen vorübergehenden Vorteil gegenüber der reinen Behandlung mit PBS, obwohl sie über den gleichen Tumor-antigen-spezifischen T-Zellrezeptor wie die CXCR6-modifizierten T-Zellen verfügen.

Wenn auch zunehmend die Verwendung von Chemokinen und Integrinen für die verbesserte Anreicherung von Effektorzellen im Tumorgewebe zur Optimierung von T-Zelltherapien diskutiert wird, so ist die bisherige Erkenntnislage hierzu limitiert (Lim et al. 2017). Zuvor haben wir beobachten können, dass zwar durch genetische Modifikation von T-Zellen mit dem Chemokinrezeptor CCR4 eine verbesserte Anreicherung von T-Zellen im immunsuppressiven Stromamilieu gelingt, jedoch das therapeutische Potential dadurch nur begrenzt verbessert wird (Rapp et al. 2016).

Andere Gruppen haben ähnliche Beobachtungen für die Chemokinrezeptoren CCR2 und CX3CR1 machen können (Garetto et al. 2016, Moon et al. 2011, Siddiqui et al. 2016). Bisher einzig klinisch relevantes Beispiel ist die Transduktion von TIL mit dem Chemokinrezeptor CXCR2, deren therapeutischer Benefit aktuell in einer klinischen Studie mit Melanompatienten (NCT 01740557) untersucht wird (Kershaw et al. 2002, Peng et al. 2010).

Welche Rolle tatsächlich die verbesserte Migration CXCR6-modifizierter T-Zellen für den therapeutischen Effekt spielt, oder inwiefern zudem auch die verbesserte Persistenz und Aktivierung durch die adhäsiven Effekte von TM-CXCL16 relevant sind, müssten weitere Experimente untersuchen. Durch pharmakologische Blockade der T-Zell-Zirkulation aus den Lymphknoten ins Blut könnte die Bedeutung der verbesserten Antigen-Präsentation durch CXCR6-Expression im lymphatischen Gewebe für die T-Zell-Antwort demaskiert werden. Rapp et al. gelang es durch die Behandlung Pankreaskarzinom tragender Mäuse mit CCR4-transduzierten T-Zellen auch nach zweiter Tumorzellinjektion die initiale komplette Remission zu erhalten und eine Art immunologisches Gedächtnis zu etablieren. Auch für CCR4-modifizierte T-Zellen war dabei *in vitro* ein verbesserter Kontakt mit APC nachgewiesen worden (Rapp et al. 2016). Zudem könnte eine FACS basierte Messung nach Zelltransfer das zytotoxisches Potential der T-Zellen mit dem immunologischen Phänotyp und der tumoralen CXCL16-Expression korrelieren. Diese könnte auch über die Persistenz der T-Zellen und die unterschiedlichen Ansprechraten in den Versuchsgruppe informieren. Die ersten Langzeituntersuchungen mit CAR-T-Zellen behandelten Patienten konnten die Expansion und Persistenz von T-Zellen als relevante Biomarker für das remissionsfreie Überleben zeigen (June and Sadelain 2018).

Für die Potenzierung des zytotoxischen Potentials CXCR6-modifizierter T-Zellen ist die Koexpression von Tumor-spezifischen CAR eine naheliegende Strategie. Präklinisch konnten unterschiedliche Gruppen durch die kombinierte Expression von den Chemokinrezeptoren CCR2, CCR4, CXCR2 oder CXCR4 mit Tumor-Antigen-spezifischen CAR eine verstärkte Migration ins TME sowie verbesserte Zelllyse sowohl in Lymphomen als auch soliden Tumoren beobachten (Craddock et al. 2010, Di Stasi et al. 2009, Muller et al. 2015, Whilding et al. 2019).

Vor dem Hintergrund der Induktion der CXCR6 - CXCL16-Achse könnte auch der therapeutische Nutzen einer additiven oder sequentiellen Behandlung mit IL-12 oder DC untersucht werden (Badovinac et al. 2005, Veinotte et al. 2016). Des Weiteren wurde nach Inhibition des Checkpoints PD-1 eine vermehrte Ausschüttung von IFN- $\gamma$

im Tumormilieu nachgewiesen (Peng et al. 2012). Eine Koadministration könnte über die konsekutive Erhöhung von CXCL16 den Effekt der CXCR6-modifizierten T-Zellen potenzieren.

#### **4.5. Ausblick**

Perspektivisch ist für die Translation der CXCR6 - CXCL16-Achse in einen klinisch relevanten T-Zellbasierten Therapieansatz die Expression von CXCL16 in humanen Tumorzelllinien eine Voraussetzung. Auf Basis der Literatur ist dies zu erwarten (Wente et al. 2008). Die hier im Mausmodell gezeigte vielversprechende therapeutische Wirksamkeit von CXCR6-modifizierten T-Zellen könnte daher perspektivisch auch im Xenograft Modell überprüft werden. Dabei könnten zudem *Tracking* Versuche eruieren, inwieweit die vermehrte migratorische Kapazität und Persistenz von T-Zellen im Tumormilieu durch CXCR6-Expression ihre verbesserte Wirksamkeit bedingt. Darüber hinaus ist im Wissen der klinisch beobachteten *On-target-off-Tumor*-Toxizitäten sowie Immuntoxizitäten von CAR-T-Zellen auch eine präklinische intensive Untersuchung dieser Nebenwirkungen von Bedeutung für die Weiterentwicklung dieses Therapieansatzes.

## 5. Zusammenfassung

Mit der Zulassung von *Chimeric-antigen-receptor* (CAR)-T-Zellen steht Patienten mit refraktären und rezidierten hämatologischen Neoplasien eine neue vielversprechende Therapieoption zur Verfügung. Hingegen limitiert in soliden Tumoren vor allem die unzureichende Migration sowie die unzureichende Persistenz und Aktivierung von CAR-T-Zellen im immunsuppressiven Tumormilieu die Induktion einer klinisch signifikanten T-Zell-Antwort. Die Herausforderung für die Weiterentwicklung von T-Zelltherapie zur Behandlung solider Krebserkrankungen besteht also darin, diese Funktionen von T-Zellen durch weitere genetische Veränderungen – neben der CAR Technologie – zu verbessern.

Hierzu konnte unsere Arbeitsgruppe früher bereits die verbesserte Migration von OT1 T-Zellen durch genetische Modifikation mit dem Chemokinrezeptor CCR4 in einem murinen Pankreaskarzinommodell zeigen. Ein Chemokinarray der murinen Pankreaskarzinomzelllinien PancO2-OVA und T110299-OVA hat eine erhöhte Expression von CXCL16 im Vergleich zu diversen anderen Chemokinliganden gezeigt. Die vorliegende Arbeit sollte darauf aufbauend untersuchen, inwieweit sich die CXCR6 - CXCL16-Achse durch die genetische Überexpression von CXCR6 in T-Zellen eignet, um die Migration von T-Zellen und die Wirksamkeit von AZT in einem murinen Pankreaskarzinommodell zu verbessern.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Transduktion von T-Zellen mit dem Chemokinrezeptor CXCR6 deren migratorische und die zytotoxische Kapazität im Tumormilieu sowie den Kontakt von T-Zellen mit antigenpräsentierenden Zellen *in vitro* verstärkt. Die Überlegenheit CXCR6-modifizierter T-Zellen gegenüber nicht transduzierten T-Zellen nach Transfer in Pankreaskarzinom-tragende Mäuse belegt das Potential der CXCR6 - CXCL16-Achse zur Verbesserung der therapeutischen Wirksamkeit von adoptiv transferierten T-Zellen *in vivo*.

Die Ergebnisse dieser Arbeit repräsentieren damit eine mögliche Strategie, T-Zellen verbessert im Milieu solider Tumoren anzureichern und damit T-Zell-basierte Immuntherapien auch in soliden Tumoren zur Anwendung zu bringen. Die kombinierte Transduktion von CXCR6 und CAR könnte dabei Gegenstand zukünftiger translationaler Forschung sein, um die CAR-T-Zelltherapie auch für solide Krebserkrankungen zu etablieren.

---

**6. Literaturverzeichnis**

Abel S, Hundhausen C, Mentlein R, Schulte A, Berkhout TA, Broadway N, Hartmann D, Sedlacek R, Dietrich S, Muetze B, Schuster B, Kallen KJ, Saftig P, Rose-John S, Ludwig A. The transmembrane CXC-chemokine ligand 16 is induced by IFN-gamma and TNF-alpha and shed by the activity of the disintegrin-like metalloproteinase ADAM10.

*The Journal of Immunology* 2004; 172:6362-72.

Aleksic M, Liddy N, Molloy PE, Pumphrey N, Vuidepot A, Chang KM, Jakobsen BK. Different affinity windows for virus and cancer-specific T-cell receptors: implications for therapeutic strategies.

*European Journal of Immunology* 2012; 42: 3174-9.

Andersen R, Donia M, Ellebaek E, Borch TH, Kongsted P, Iversen TZ, Holmich LR, Hendel HW, Met O, Andersen MH, Thor Straten P, Svane IM. Long-lasting complete Responses in Patients with Metastatic Melanoma after Adoptive Cell Therapy with Tumor-Infiltrating Lymphocytes and an Attenuated IL2 Regimen.

*Clinical Cancer Research* 2016; 22:3734-45.

Bacon KB, Premack BA, Gardner P, Schall TJ. Activation of dual T cell signaling pathways by the chemokine RANTES.

*Science* 1995; 269:1727-30.

Badovinac VP, Messingham KA, Jabbari A, Haring JS, Harty JT. Accelerated CD8+ T-cell memory and prime-boost response after dendritic-cell vaccination.

*Nature Medicine* 2005; 11:748-56.

Bajenoff M, Egen JG, Qi H, Huang AY, Castellino F, Germain RN. Highways, byways and breadcrumbs: directing lymphocyte traffic in the lymph node.

*Trends in Immunology* 2007; 28:346-52.

Balkwill F. Cancer and the chemokine network.

*Nature Reviews Cancer* 2004; 4:540-550.

Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity.

*Nature* 1998; 392:245-52.

Bauer CA, Kim EY, Marangoni F, Carrizosa E, Claudio NM, Mempel TR. Dynamic Treg interactions with intratumoral APCs promote local CTL dysfunction.

*Journal of Clinical Investigation* 2014;124:2425-40.

Bayne LJ, Beatty GL, Jhala N, Clark CE, Rhim AD, Stanger BZ, Vonderheide RH.

Tumor-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor regulates myeloid inflammation and T cell immunity in pancreatic cancer.

*Cancer Cell* 2012; 21:822-35.

Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A, Schall TJ. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif.

*Nature* 1997; 385:640-4.

Beatty GL, Moon EK. Chimeric antigen receptor T cells are vulnerable to immunosuppressive mechanisms present within the tumor microenvironment.

*Oncoimmunology* 2014; 3:e970027.

- Beatty GL, O'Hara MH, Lacey SF, Torigian DA, Nazimuddin F, Chen F, Kulikovskaya IM, Soulen MC, McGarvey M, Nelson AM, Gladney WL, Levine BL, Melenhorst JJ, Plesa G, June CH. Activity of Mesothelin-Specific Chimeric Antigen Receptor T Cells Against Pancreatic Carcinoma Metastases in a Phase 1 Trial. *Gastroenterology* 2018; 155:29-32.
- Benmebarek MR, Karches CH, Cadilha BL, Lesch S, Endres S, Kobold S. Killing Mechanisms of Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cells. *International Journal of Molecular Sciences* 2019;20:
- Besser MJ, Shapira-Frommer R, Treves AJ, Zippel D, Itzhaki O, Hershkovitz L, Levy D, Kubi A, Hovav E, Chermoshniuk N, Shalmon B, Hardan I, Catane R, Markel G, Apter S, Ben-Nun A, Kuchuk I, Shimoni A, Nagler A, Schachter J. Clinical responses in a phase II study using adoptive transfer of short-term cultured tumor infiltration lymphocytes in metastatic melanoma patients. *Clinical Cancer Research* 2010; 16:2646-55.
- Boldajipour B, Mahabaleshwar H, Kardash E, Reichman-Fried M, Blaser H, Minina S, Wilson D, Xu Q, Raz E. Control of chemokine-guided cell migration by ligand sequestration. *Cell* 2008; 132:463-73.
- Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2<sup>-/-</sup> mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 1998; 394:894-7.
- Brown CE, Vishwanath RP, Aguilar B, Starr R, Najbauer J, Aboody KS, Jensen MC. Tumor-derived chemokine MCP-1/CCL2 is sufficient for mediating tumor tropism of adoptively transferred T cells. *Journal of Immunology* 2007;179:3332-41.
- Brown JA, Dorfman DM, Ma FR, Sullivan EL, Munoz O, Wood CR, Greenfield EA, Freeman GJ. Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. *The Journal of Immunology* 2003;170: 1257-66.
- Broz ML, Binnewies M, Boldajipour B, Nelson AE, Pollack JL, Erle DJ, Barczak A, Rosenblum MD, Daud A, Barber DL, Amigorena S, Van't Veer LJ, Sperling AI, Wolf DM, Krummel MF. Dissecting the Tumor Myeloid Compartment Reveals Rare Activating Antigen-Presenting Cells Critical for T Cell Immunity. *Cancer Cell* 2014; 26:938.
- Calabresi PA, Yun SH, Allie R, Whartenby KA. Chemokine receptor expression on MBP-reactive T cells: CXCR6 is a marker of IFN $\gamma$ -producing effector cells. *Journal of Neuroimmunology* 2002; 127:96-105.
- Callahan MK, Postow MA, Wolchok JD. Targeting T Cell Co-receptors for Cancer Therapy. *Immunity* 2016; 44:1069-78.
- Calzascia T, Masson F, Di Bernardino-Besson W, Contassot E, Wilmotte R, Aurrand-Lions M, Ruegg C, Dietrich PY, Walker PR. Homing phenotypes of tumor-specific CD8 T cells are predetermined at the tumor site by crosspresenting APCs. *Immunity* 2005; 22:175-84.

Carretero R, Romero JM, Ruiz-Cabello F, Maleno I, Rodriguez F, Camacho FM, Real LM, Garrido F, Cabrera T. Analysis of HLA class I expression in progressing and regressing metastatic melanoma lesions after immunotherapy. *Immunogenetics* 2008; 60:439-47.

Chang AE, Li Q, Jiang G, Sayre DM, Braun TM, Redman BG. Phase II trial of autologous tumor vaccination, anti-CD3-activated vaccine-primed lymphocytes, and interleukin-2 in stage IV renal cell cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2003; 21:884-90.

Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *New England Journal of Medicine* 2006; 354:610-21.

Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity* 2013; 39: 1-10.

Chen DS, Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature* 2017; 541:321-330.

Chinnasamy N, Wargo JA, Yu Z, Rao M, Frankel TL, Riley JP, Hong JJ, Parkhurst MR, Feldman SA, Schrumpp DS, Restifo NP, Robbins PF, Rosenberg SA, Morgan RA. A TCR targeting the HLA-A\*0201-restricted epitope of MAGE-A3 recognizes multiple epitopes of the MAGE-A antigen superfamily in several types of cancer. *The Journal of Immunology* 2011; 186:685-96.

Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* 1995; 270:1811-5.

Craddock JA, Lu A, Bear A, Pule M, Brenner MK, Rooney CM, Foster AE. Enhanced tumor trafficking of GD2 chimeric antigen receptor T cells by expression of the chemokine receptor CCR2b. *Journal of Immunotherapy* 2010; 33:780-8.

Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, Conejo-Garcia JR, Zhang L, Burow M, Zhu Y, Wei S, Kryczek I, Daniel B, Gordon A, Myers L, Lackner A, Disis ML, Knutson KL, Chen L, Zou W. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature Medicine* 2004; 10:942-9.

Darash-Yahana M, Gillespie JW, Hewitt SM, Chen YY, Maeda S, Stein I, Singh SP, Bedolla RB, Peled A, Troyer DA, Pikarsky E, Karin M, Farber JM. The chemokine CXCL16 and its receptor, CXCR6, as markers and promoters of inflammation-associated cancers. *PLoS One* 2009; 4:e6695.

Davis MM, Bjorkman PJ. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 1988; 334:395-402.

Deng L, Chen N, Li Y, Zheng H, Lei Q. CXCR6/CXCL16 functions as a regulator in metastasis and progression of cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 2010; 1806:42-9.

Di Stasi A, De Angelis B, Rooney CM, Zhang L, Mahendravada A, Foster AE, Heslop HE, Brenner MK, Dotti G, Savoldo B. T lymphocytes coexpressing CCR4 and a chimeric antigen receptor targeting CD30 have improved homing and antitumor activity in a Hodgkin tumor model.

*Blood* 2009; 113:6392-402.

Dona E, Barry JD, Valentin G, Quirin C, Khmelinskii A, Kunze A, Durdu S, Newton LR, Fernandez-Minan A, Huber W, Knop M, Gilmour D. Directional tissue migration through a self-generated chemokine gradient.

*Nature* 2013; 503:285-9.

Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nature Reviews Immunology* 2006; 6: 836-48.

Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting.

*Immunity* 2004; 21:137-48.

Engelhardt JJ, Boldajipour B, Beemiller P, Pandurangi P, Sorensen C, Werb Z, Egeblad M, Krummel MF. Marginating dendritic cells of the tumor microenvironment cross-present tumor antigens and stably engage tumor-specific T cells.

*Cancer Cell* 2012; 21:402-17.

Fan J, Heller NM, Gorospe M, Atasoy U, Stellato C. The role of post-transcriptional regulation in chemokine gene expression in inflammation and allergy.

*European Respiratory Journal* 2005; 26:933-47.

Fujita K, Ikarashi H, Takakuwa K, Kodama S, Tokunaga A, Takahashi T, Tanaka K. Prolonged disease-free period in patients with advanced epithelial ovarian cancer after adoptive transfer of tumor-infiltrating lymphocytes.

*Clinical Cancer Research* 1995; 1:501-7.

Garetto S, Sardi C, Martini E, Roselli G, Morone D, Angioni R, Cianciotti BC, Trovato AE, Franchina DG, Castino GF, Vignali D, Erreni M, Marchesi F, Rumio C, Kallikourdis M. Tailored chemokine receptor modification improves homing of adoptive therapy T cells in a spontaneous tumor model.

*Oncotarget* 2016; 7:43010-43026.

Gooden MJ, Wiersma VR, Boerma A, Leffers N, Boezen HM, ten Hoor KA, Hollema H, Walenkamp AM, Daemen T, Nijman HW, Bremer E. Elevated serum CXCL16 is an independent predictor of poor survival in ovarian cancer and may reflect pro-metastatic ADAM protease activity.

*British Journal of Cancer* 2014; 110:1535-44.

Gough PJ, Garton KJ, Wille PT, Rychlewski M, Dempsey PJ, Raines EW. A disintegrin and metalloproteinase 10-mediated cleavage and shedding regulates the cell surface expression of CXC chemokine ligand 16.

*The Journal of Immunology* 2004; 172: 3678-85.

Gubin MM, Artyomov MN, Mardis ER, Schreiber RD. Tumor neoantigens: building a framework for personalized cancer immunotherapy.

*Journal of Clinical Investigation* 2015; 125:3413-21.

Gutwein P, Schramme A, Sinke N, Abdel-Bakky MS, Voss B, Obermuller N, Doberstein K, Koziolok M, Fritzsche F, Johannsen M, Jung K, Schaidt H, Altevogt P, Ludwig A, Pfeilschifter J, Kristiansen G. Tumoural CXCL16 expression is a novel prognostic

marker of longer survival times in renal cell cancer patients.

*European Journal of Cancer* 2009; 45:478-89.

Harlin H, Meng Y, Peterson AC, Zha Y, Tretiakova M, Slingluff C, McKee M, Gajewski TF. Chemokine expression in melanoma metastases associated with CD8+ T-cell recruitment.

*Cancer Research* 2009; 69:3077-85.

Hartmann J, Schussler-Lenz M, Bondanza A, Buchholz CJ. Clinical development of CAR T cells-challenges and opportunities in translating innovative treatment concepts. *EMBO Molecular Medicine* 2017; 9:1183-1197.

Heydtmann M, Lalor PF, Eksteen JA, Hubscher SG, Briskin M, Adams DH. CXC chemokine ligand 16 promotes integrin-mediated adhesion of liver-infiltrating lymphocytes to cholangiocytes and hepatocytes within the inflamed human liver. *The Journal of Immunology* 2005; 174:1055-62.

Hojo S, Koizumi K, Tsuneyama K, Arita Y, Cui Z, Shinohara K, Minami T, Hashimoto I, Nakayama T, Sakurai H, Takano Y, Yoshie O, Tsukada K, Saiki I. High-level expression of chemokine CXCL16 by tumor cells correlates with a good prognosis and increased tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal cancer. *Cancer Research* 2007; 67:4725-31.

Hombach A, Wieczarkowicz A, Marquardt T, Heuser C, Usai L, Pohl C, Seliger B, Abken H. Tumor-specific T cell activation by recombinant immunoreceptors: CD3 zeta signaling and CD28 costimulation are simultaneously required for efficient IL-2 secretion and can be integrated into one combined CD28/CD3 zeta signaling receptor molecule.

*The Journal of Immunology* 2001; 167:6123-31.

Huang AC, Postow MA, Orlowski RJ, Mick R, Bengsch B, Manne S, Xu W, Harmon S, Giles JR, Wenz B, Adamow M, Kuk D, Panageas KS, Carrera C, Wong P, Quagliarello F, Wubbenhorst B, D'Andrea K, Pauken KE, Herati RS, Staupé RP, Schenkel JM, McGettigan S, Kothari S, George SM, Vonderheide RH, Amaravadi RK, Karakousis GC, Schuchter LM, Xu X, Nathanson KL, Wolchok JD, Gangadhar TC, Wherry EJ. T-cell invigoration to tumour burden ratio associated with anti-PD-1 response.

*Nature* 2017; 545:60-65.

Hughes MS, Yu YY, Dudley ME, Zheng Z, Robbins PF, Li Y, Wunderlich J, Hawley RG, Moayeri M, Rosenberg SA, Morgan RA. Transfer of a TCR gene derived from a patient with a marked antitumor response conveys highly active T-cell effector functions.

*Human Gene Therapy* 2005; 16:457-72.

Hundhausen C, Schulte A, Schulz B, Andrzejewski MG, Schwarz N, von Hundelshausen P, Winter U, Paliga K, Reiss K, Saftig P, Weber C, Ludwig A. Regulated shedding of transmembrane chemokines by the disintegrin and metalloproteinase 10 facilitates detachment of adherent leukocytes.

*The Journal of Immunology* 2007; 178:8064-72.

Hydes T, Noll A, Salinas-Riester G, Abuhilal M, Armstrong T, Hamady Z, Primrose J, Takhar A, Walter L, Khakoo SI. IL-12 and IL-15 induce the expression of CXCR6 and CD49a on peripheral natural killer cells.

*Immunity Inflammatory and Disease* 2018; 6:34-46.

Ibe S, Qin Z, Schuler T, Preiss S, Blankenstein T. Tumor rejection by disturbing tumor stroma cell interactions.

*Journal of Experimental Medicine* 2001; 194:1549-59.

Iraolagoitia XL, Spallanzani RG, Torres NI, Araya RE, Ziblat A, Domaica CI, Sierra JM, Nunez SY, Secchiari F, Gajewski TF, Zwirner NW, Fuertes MB. NK Cells Restrain Spontaneous Antitumor CD8+ T Cell Priming through PD-1/PD-L1 Interactions with Dendritic Cells.

*The Journal of Immunology* 2016; 197:953-61.

Johnson LA, Heemskerk B, Powell DJ, Jr., Cohen CJ, Morgan RA, Dudley ME, Robbins PF, Rosenberg SA. Gene transfer of tumor-reactive TCR confers both high avidity and tumor reactivity to nonreactive peripheral blood mononuclear cells and tumor-infiltrating lymphocytes.

*The Journal of Immunology* 2006; 177:6548-59.

Jones MC, Caswell PT, Norman JC. Endocytic recycling pathways: emerging regulators of cell migration.

*Current Opinion in Cell Biology* 2006; 18:549-57.

Joyce JA, Fearon DT. T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment.

*Science* 2015; 348:74-80.

June CH, Riddell SR, Schumacher TN. Adoptive cellular therapy: a race to the finish line.

*Science Translational Medicine* 2015; 7:280ps7.

June CH, Sadelain M. Chimeric Antigen Receptor Therapy.

*New England Journal of Medicine* 2018;379: 64-73.

June CH, Warshauer JT, Bluestone JA. Is autoimmunity the Achilles' heel of cancer immunotherapy?

*Nature Medicine* 2017; 23:540-547.

Kagoya Y, Tanaka S, Guo T, Anczurowski M, Wang CH, Saso K, Butler MO, Minden MD, Hirano N. A novel chimeric antigen receptor containing a JAK-STAT signaling domain mediates superior antitumor effects.

*Nature Medicine* 2018; 24:352-359.

Kantarjian H, Stein A, Gokbuget N, Fielding AK, Schuh AC, Ribera JM, Wei A, Dombret H, Foa R, Bassan R, Arslan O, Sanz MA, Bergeron J, Demirkan F, Lech-Maranda E, Rambaldi A, Thomas X, Horst HA, Bruggemann M, Klapper W, Wood BL, Fleishman A, Nagorsen D, Holland C, Zimmerman Z, Topp MS. Blinatumomab versus Chemotherapy for Advanced Acute Lymphoblastic Leukemia.

*New England Journal of Medicine* 2017; 376:836-847.

Karches CH, Benmeharek MR, Schmidbauer ML, Kurzay M, Klaus R, Geiger M, Rataj F, Cadilha BL, Lesch S, Heise C, Murr R, Vom Berg J, Jastroch M, Lamp D, Ding J, Duester P, Niederfellner G, Sustmann C, Endres S, Klein C, Kobold S. Bispecific Antibodies Enable Synthetic Agonistic Receptor-Transduced T Cells for Tumor Immunotherapy.

*Clinical Cancer Research* 2019; 25:5890-900.

Kawalekar OU, O'Connor RS, Fraietta JA, Guo L, McGettigan SE, Posey AD, Jr., Patel PR, Guedan S, Scholler J, Keith B, Snyder NW, Blair IA, Milone MC, June CH. Distinct

- Signaling of Coreceptors Regulates Specific Metabolism Pathways and Impacts Memory Development in CAR T Cells.  
*Immunity* 2016; 44:380-90.
- Kershaw MH, Wang G, Westwood JA, Pachynski RK, Tiffany HL, Marincola FM, Wang E, Young HA, Murphy PM, Hwu P. Redirecting migration of T cells to chemokine secreted from tumors by genetic modification with CXCR2.  
*Human Gene Therapy* 2002; 13:1971-80.
- Khong HT, Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes.  
*Nature Immunology* 2002; 3:999-1005.
- Kim CH, Kunkel EJ, Boisvert J, Johnston B, Campbell JJ, Genovese MC, Greenberg HB, Butcher EC. Bonzo/CXCR6 expression defines type 1-polarized T-cell subsets with extralymphoid tissue homing potential.  
*Journal of Clinical Investigation* 2001; 107: 595-601.
- Kim CH, Nagata K, Butcher EC. Dendritic cells support sequential reprogramming of chemoattractant receptor profiles during naive to effector T cell differentiation.  
*Journal of Immunology* 2003; 171:152-8.
- Kim CH, Nagata K, Butcher EC. Dendritic cells support sequential reprogramming of chemoattractant receptor profiles during naive to effector T cell differentiation.  
*The Journal of Immunology* 2003;171: 152-8.
- Kim CH, Rott L, Kunkel EJ, Genovese MC, Andrew DP, Wu L, Butcher EC. Rules of chemokine receptor association with T cell polarization in vivo.  
*Journal of Clinical Investigation* 2001; 108: 1331-9.
- Kobold S, Grassmann S, Chaloupka M, Lampert C, Wenk S, Kraus F, Rapp M, Duwell P, Zeng Y, Schmollinger JC, Schnurr M, Endres S, Rothenfusser S. Impact of a New Fusion Receptor on PD-1-Mediated Immunosuppression in Adoptive T Cell Therapy.  
*Journal of the National Cancer Institute* 2015;107.
- Kobold S, Isernhagen J, Hubel K, Kilic N, Bogner C, Frickhofen N, Bokemeyer C, Fiedler W. Plerixafor is effective and safe for stem cell mobilization in heavily pretreated germ cell tumor patients.  
*Bone Marrow Transplantation* 2011; 46: 053-6.
- Kobold S, Steffen J, Chaloupka M, Grassmann S, Henkel J, Castoldi R, Zeng Y, Chmielewski M, Schmollinger JC, Schnurr M, Rothenfusser S, Schendel DJ, Abken H, Sustmann C, Niederfellner G, Klein C, Bourquin C, Endres S. Selective bispecific T cell recruiting antibody and antitumor activity of adoptive T cell transfer.  
*Journal of the National Cancer Institute* 2015; 107:364.
- Koneru M, Purdon TJ, Spriggs D, Koneru S, Brentjens RJ. IL-12 secreting tumor-targeted chimeric antigen receptor T cells eradicate ovarian tumors in vivo.  
*Oncoimmunology* 2015; 4:e994446.
- Lamers CH, Sleijfer S, van Steenbergen S, van Elzaker P, van Krimpen B, Groot C, Vulto A, den Bakker M, Oosterwijk E, Debets R, Gratama JW. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with CAIX CAR-engineered T cells: clinical evaluation and management of on-target toxicity.  
*Molecular Therapy* 2013; 21:904-12.

Langenkamp A, Nagata K, Murphy K, Wu L, Lanzavecchia A, Sallusto F. Kinetics and expression patterns of chemokine receptors in human CD4+ T lymphocytes primed by myeloid or plasmacytoid dendritic cells.

*European Journal of Immunology* 2003; 33:474-82.

Latta M, Mohan K, Issekutz TB. CXCR6 is expressed on T cells in both T helper type 1 (Th1) inflammation and allergen-induced Th2 lung inflammation but is only a weak mediator of chemotaxis.

*Immunology* 2007; 121:555-64.

Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade.

*Science* 1996; 271:1734-6.

Lee DW, Kochenderfer JN, Stetler-Stevenson M, Cui YK, Delbrook C, Feldman SA, Fry TJ, Orentas R, Sabatino M, Shah NN, Steinberg SM, Stronck D, Tschernia N, Yuan C, Zhang H, Zhang L, Rosenberg SA, Wayne AS, Mackall CL. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial.

*Lancet* 2015; 385:517-528.

Lee PP, Yee C, Savage PA, Fong L, Brockstedt D, Weber JS, Johnson D, Swetter S, Thompson J, Greenberg PD, Roederer M, Davis MM. Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients.

*Nature Medicine* 1999; 5:677-85.

Li Y, Moysey R, Molloy PE, Vuidepot AL, Mahon T, Baston E, Dunn S, Liddy N, Jacob J, Jakobsen BK, Boulter JM. Directed evolution of human T-cell receptors with picomolar affinities by phage display.

*Nature Biotechnology* 2005; 23:349-54.

Lim WA, June CH. The Principles of Engineering Immune Cells to Treat Cancer.

*Cell* 2017; 168:724-740.

Locke FL, Ghobadi A, Jacobson CA, Miklos DB, Lekakis LJ, Oluwole OO, Lin Y, Braunschweig I, Hill BT, Timmerman JM, Deol A, Reagan PM, Stiff P, Flinn IW, Farooq U, Goy A, McSweeney PA, Munoz J, Siddiqi T, Chavez JC, Herrera AF, Bartlett NL, Wieszorek JS, Navale L, Xue A, Jiang Y, Bot A, Rossi JM, Kim JJ, Go WY, Neelapu SS. Long-term safety and activity of axicabtagene ciloleucel in refractory large B-cell lymphoma (ZUMA-1): a single-arm, multicentre, phase 1-2 trial.

*Lancet Oncology* 2018.

Luster AD. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation.

*New England Journal of Medicine* 1998; 338:436-45.

Luther SA, Cyster JG. Chemokines as regulators of T cell differentiation.

*Nature Immunology* 2001; 2:102-7.

Ma Y, Adjemian S, Mattarollo SR, Yamazaki T, Aymeric L, Yang H, Portela Catani JP, Hannani D, Duret H, Steegh K, Martins I, Schlemmer F, Michaud M, Kepp O, Sukkurwala AQ, Menger L, Vacchelli E, Droin N, Galluzzi L, Krzysiek R, Gordon S, Taylor PR, Van Endert P, Solary E, Smyth MJ, Zitvogel L, Kroemer G. Anticancer chemotherapy-induced intratumoral recruitment and differentiation of antigen-presenting cells.

*Immunity* 2013; 38:729-41.

Madduri D IJR, Rizvi S, Fan X, Jagannath S, Usmani S Z, Jakubowiak A, Berdeja J G, Singh I, Zudaire E, Yeh T-M, Allred A J, Banerjee A, Goldberg J D, Schecter J M, Zhuang S. Results from CARTITUDE-1: A Phase 1b/2 Study of JNJ-4528, a CAR-T Cell Therapy Directed Against B-Cell Maturation Antigen (BCMA), in Patients with Relapses and / or Refractory Multiple Myelom (R/R MM). *ASH Abstract 577* 2019.

Matloubian M, David A, Engel S, Ryan JE, Cyster JG. A transmembrane CXC chemokine is a ligand for HIV-coreceptor Bonzo. *Nature Immunology* 2000; 1:298-304.

Matsumura S, Wang B, Kawashima N, Braunstein S, Badura M, Cameron TO, Babb JS, Schneider RJ, Formenti SC, Dustin ML, Demaria S. Radiation-induced CXCL16 release by breast cancer cells attracts effector T cells. *The Journal of Immunology* 2008; 181:3099-107.

Matsushita H, Vesely MD, Koboldt DC, Rickert CG, Uppaluri R, Magrini VJ, Arthur CD, White JM, Chen YS, Shea LK, Hundal J, Wendl MC, Demeter R, Wylie T, Allison JP, Smyth MJ, Old LJ, Mardis ER, Schreiber RD. Cancer exome analysis reveals a T-cell-dependent mechanism of cancer immunoediting. *Nature* 2012; 482:400-4.

Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, Rives S, Boyer M, Bittencourt H, Bader P, Verneris MR, Stefanski HE, Myers GD, Qayed M, De Moerloose B, Hiramatsu H, Schlis K, Davis KL, Martin PL, Nemecek ER, Yanik GA, Peters C, Baruchel A, Boissel N, Mechinaud F, Balduzzi A, Krueger J, June CH, Levine BL, Wood P, Taran T, Leung M, Mueller KT, Zhang Y, Sen K, Lebowitz D, Pulsipher MA, Grupp SA. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *New England Journal of Medicine* 2018; 378:439-448.

Moon EK, Carpenito C, Sun J, Wang LC, Kapoor V, Predina J, Powell DJ, Jr., Riley JL, June CH, Albelda SM. Expression of a functional CCR2 receptor enhances tumor localization and tumor eradication by retargeted human T cells expressing a mesothelin-specific chimeric antibody receptor. *Clinical Cancer Research* 2011; 17:4719-30.

Moser B, Loetscher P. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nature Immunology* 2001; 2:123-8.

Motz GT, Coukos G. Deciphering and reversing tumor immune suppression. *Immunity* 2013; 39:61-73.

Muller N, Michen S, Tietze S, Topfer K, Schulte A, Lamszus K, Schmitz M, Schackert G, Pastan I, Temme A. Engineering NK Cells Modified With an EGFRvIII-specific Chimeric Antigen Receptor to Overexpress CXCR4 Improves Immunotherapy of CXCL12/SDF-1alpha-secreting Glioblastoma. *Journal of Immunotherapy* 2015; 38:197-210.

Nanki T, Shimaoka T, Hayashida K, Taniguchi K, Yonehara S, Miyasaka N. Pathogenic role of the CXCL16-CXCR6 pathway in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatology* 2005; 52:3004-14.

Neel NF, Schutyser E, Sai J, Fan GH, Richmond A. Chemokine receptor internalization and intracellular trafficking. *Cytokine Growth Factor Reviews* 2005; 16:637-58.

Nourshargh S, Alon R. Leukocyte migration into inflamed tissues. *Immunity* 2014; 41:694-707.

Ochsenbein AF, Sierro S, Odermatt B, Pericin M, Karrer U, Hermans J, Hemmi S, Hengartner H, Zinkernagel RM. Roles of tumour localization, second signals and cross priming in cytotoxic T-cell induction. *Nature* 2001; 411:1058-64.

Oldham KA, Parsonage G, Bhatt RI, Wallace DM, Deshmukh N, Chaudhri S, Adams DH, Lee SP. T lymphocyte recruitment into renal cell carcinoma tissue: a role for chemokine receptors CXCR3, CXCR6, CCR5, and CCR6. *European Urology* 2012; 61:385-94.

Palamidessi A, Frittoli E, Garre M, Faretta M, Mione M, Testa I, Diaspro A, Lanzetti L, Scita G, Di Fiore PP. Endocytic trafficking of Rac is required for the spatial restriction of signaling in cell migration. *Cell* 2008; 134:135-47.

Park JH, Riviere I, Gonen M, Wang X, Senechal B, Curran KJ, Sauter C, Wang Y, Santomasso B, Mead E, Roshal M, Maslak P, Davila M, Brentjens RJ, Sadelain M. Long-Term Follow-up of CD19 CAR Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia. *New England Journal of Medicine* 2018; 378:449-459.

Park JR, Digiusto DL, Slovak M, Wright C, Naranjo A, Wagner J, Meechoovet HB, Bautista C, Chang WC, Ostberg JR, Jensen MC. Adoptive transfer of chimeric antigen receptor re-directed cytolytic T lymphocyte clones in patients with neuroblastoma. *Molecular Therapy* 2007; 15:825-33.

Parsonage G, Machado LR, Hui JW, McLarnon A, Schmalzer T, Balasothy M, To KF, Vlantis AC, van Hasselt CA, Lo KW, Wong WL, Hui EP, Chan AT, Lee SP. CXCR6 and CCR5 localize T lymphocyte subsets in nasopharyngeal carcinoma. *The American Journal of Pathology* 2012; 180:1215-22.

Pegram HJ, Lee JC, Hayman EG, Imperato GH, Tedder TF, Sadelain M, Brentjens RJ. Tumor-targeted T cells modified to secrete IL-12 eradicate systemic tumors without need for prior conditioning. *Blood* 2012; 119:4133-41.

Peng D, Kryczek I, Nagarsheth N, Zhao L, Wei S, Wang W, Sun Y, Zhao E, Vatan L, Szeliga W, Kotarski J, Tarkowski R, Dou Y, Cho K, Hensley-Alford S, Munkarah A, Liu R, Zou W. Epigenetic silencing of TH1-type chemokines shapes tumour immunity and immunotherapy. *Nature* 2015; 527:249-53.

Peng W, Liu C, Xu C, Lou Y, Chen J, Yang Y, Yagita H, Overwijk WW, Lizee G, Radvanyi L, Hwu P. PD-1 blockade enhances T-cell migration to tumors by elevating IFN-gamma inducible chemokines. *Cancer Research* 2012; 72:5209-18.

Peng W, Ye Y, Rabinovich BA, Liu C, Lou Y, Zhang M, Whittington M, Yang Y, Overwijk WW, Lizee G, Hwu P. Transduction of tumor-specific T cells with CXCR2 chemokine receptor improves migration to tumor and antitumor immune responses. *Clinical Cancer Research* 2010; 16:5458-68.

Perna SK, Pagliara D, Mahendravada A, Liu H, Brenner MK, Savoldo B, Dotti G. Interleukin-7 mediates selective expansion of tumor-redirected cytotoxic T lymphocytes

(CTLs) without enhancement of regulatory T-cell inhibition.  
*Clinical Cancer Research* 2014; 20:131-9.

Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Miller DH, Phillips JT, Lublin FD, Giovannoni G, Wajgt A, Toal M, Lynn F, Panzara MA, Sandrock AW, Investigators A. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis.  
*New England Journal of Medicine* 2006; 354:899-910.

Postow MA, Sidlow R, Hellmann MD. Immune-Related Adverse Events Associated with Immune Checkpoint Blockade.  
*New England Journal of Medicine* 2018; 378:158-168.

Raje N, Berdeja J, Lin Y, Siegel D, Jagannath S, Madduri D, Liedtke M, Rosenblatt J, Maus MV, Turka A, Lam LP, Morgan RA, Friedman K, Massaro M, Wang J, Russotti G, Yang Z, Campbell T, Hege K, Petrocca F, Quigley MT, Munshi N, Kochenderfer JN. Anti-BCMA CAR T-Cell Therapy bb2121 in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma.  
*New England Journal of Medicine* 2019; 380:1726-1737.

Rapoport AP, Stadtmauer EA, Binder-Scholl GK, Goloubeva O, Vogl DT, Lacey SF, Badros AZ, Garfall A, Weiss B, Finklestein J, Kulikovskaya I, Sinha SK, Kronsberg S, Gupta M, Bond S, Melchiori L, Brewer JE, Bennett AD, Gerry AB, Pumphrey NJ, Williams D, Tayton-Martin HK, Ribeiro L, Holdich T, Yanovich S, Hardy N, Yared J, Kerr N, Philip S, Westphal S, Siegel DL, Levine BL, Jakobsen BK, Kalos M, June CH. NY-ESO-1-specific TCR-engineered T cells mediate sustained antigen-specific antitumor effects in myeloma.  
*Nature Medicine* 2015; 21:914-921.

Rapp M, Grassmann S, Chaloupka M, Layritz P, Kruger S, Ormanns S, Rataj F, Janssen KP, Endres S, Anz D, Kobold S. C-C chemokine receptor type-4 transduction of T cells enhances interaction with dendritic cells, tumor infiltration and therapeutic efficacy of adoptive T cell transfer.  
*Oncoimmunology* 2016; 5:e1105428.

Rataj F, Kraus FBT, Chaloupka M, Grassmann S, Heise C, Cadilha BL, Duewell P, Endres S, Kobold S. PD1-CD28 Fusion Protein Enables CD4+ T Cell Help for Adoptive T Cell Therapy in Models of Pancreatic Cancer and Non-hodgkin Lymphoma.  
*Frontiers in Immunology* 2018; 9:1955.

Restifo NP, Esquivel F, Kawakami Y, Yewdell JW, Mule JJ, Rosenberg SA, Bennink JR. Identification of human cancers deficient in antigen processing.  
*Journal of Experimental Medicine* 1993; 177: 265-72.

Riaz N, Havel JJ, Makarov V, Desrichard A, Urba WJ, Sims JS, Hodi FS, Martin-Algarra S, Mandal R, Sharfman WH, Bhatia S, Hwu WJ, Gajewski TF, Slingluff CL, Jr., Chowell D, Kendall SM, Chang H, Shah R, Kuo F, Morris LGT, Sidhom JW, Schneck JP, Horak CE, Weinhold N, Chan TA. Tumor and Microenvironment Evolution during Immunotherapy with Nivolumab.  
*Cell* 2017; 171:934-949 e15.

Robbins PF, Lu YC, El-Gamil M, Li YF, Gross C, Gartner J, Lin JC, Teer JK, Cliften P, Tycksen E, Samuels Y, Rosenberg SA. Mining exomic sequencing data to identify mutated antigens recognized by adoptively transferred tumor-reactive T cells.  
*Nature Medicine* 2013; 19:747-52.

Rosenberg SA, Packard BS, Aebersold PM, Solomon D, Topalian SL, Toy ST, Simon P, Lotze MT, Yang JC, Seipp CA, et al. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report.

*New England Journal of Medicine* 1988; 319:1676-80.

Rot A. Neutrophil attractant/activation protein-1 (interleukin-8) induces in vitro neutrophil migration by haptotactic mechanism.

*European Journal of Immunology* 1993; 23:303-6.

Sadelain M, Riviere I, Brentjens R. Targeting tumours with genetically enhanced T lymphocytes.

*Nature Reviews Cancer* 2003; 3:35-45.

Sato T, Thorlacius H, Johnston B, Staton TL, Xiang W, Littman DR, Butcher EC. Role for CXCR6 in recruitment of activated CD8<sup>+</sup> lymphocytes to inflamed liver.

*The Journal of Immunology* 2005; 174:277-83.

Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion.

*Science* 2011; 331:1565-70.

Schulte A, Schulz B, Andrzejewski MG, Hundhausen C, Mletzko S, Achilles J, Reiss K, Paliga K, Weber C, John SR, Ludwig A. Sequential processing of the transmembrane chemokines CX3CL1 and CXCL16 by alpha- and gamma-secretases.

*Biochimica et Biophysica Research Community* 2007; 358:233-40.

Schumacher TN, Schreiber RD. Neoantigens in cancer immunotherapy.

*Science* 2015; 348:69-74.

Schuster SJ, Bishop MR, Tam CS, Waller EK, Borchmann P, McGuirk JP, Jager U, Jaglowski S, Andreadis C, Westin JR, Fleury I, Bachanova V, Foley SR, Ho PJ, Mielke S, Magenau JM, Holte H, Pantano S, Pacaud LB, Awasthi R, Chu J, Anak O, Salles G, Maziarz RT, Investigators J. Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma.

*New England Journal of Medicine* 2019; 380:45-56.

Shimaoka T, Nakayama T, Fukumoto N, Kume N, Takahashi S, Yamaguchi J, Minami M, Hayashida K, Kita T, Ohsumi J, Yoshie O, Yonehara S. Cell surface-anchored SR-PSOX/CXC chemokine ligand 16 mediates firm adhesion of CXC chemokine receptor 6-expressing cells.

*Journal of Leukocyte Biology* 2004; 75:267-74.

Shimaoka T, Nakayama T, Fukumoto N, Kume N, Takahashi S, Yamaguchi J, Minami M, Hayashida K, Kita T, Ohsumi J, Yoshie O, Yonehara S. Cell surface-anchored SR-PSOX/CXC chemokine ligand 16 mediates firm adhesion of CXC chemokine receptor 6-expressing cells.

*Journal of Leukocyte Biology* 2004; 75:267-74.

Siddiqui I, Erreni M, van Brakel M, Debets R, Allavena P. 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* 2016; 4:21.

Spranger S, Spaapen RM, Zha Y, Williams J, Meng Y, Ha TT, Gajewski TF. Up-regulation of PD-L1, IDO, and T(regs) in the melanoma tumor microenvironment is

driven by CD8(+) T cells.

*Science Translational Medicine* 2013; 5:200ra116.

Stadtmauer E CA, Weber K, Lacey S F, Gonzalez V E, Melenhorst J J, Fraietta J A, Plesa G, Shea J, Matlaski T, Cervini A, Gamon A, Desjardins S, Lancaster E, Sals-Mckee J, Suhoski M M, Fesnak A, O'Rourke M, Lamontagne A, Siegel D L, Young R M, Chew A, Nobles C L, Bushman F D, Chang H Y, Satpathy A T, Thao Y, Mangan P, Hwang W-T, Hexner W-T, June C H. First-in-human assessment of Feasibility and Safety of Multiplexed Genetic Engineering of Autologous T Cells Expressing NY-ESO-1 TCR and CRISP/Cas9 Gene Edited to Eliminate Endogenous TCR and PD-1 (NYCE T cells) in Advanced Multiple Myeloma (MM) and Sarcoma. *ASH Abstract* 49 2019.

Stoiber S, Cadilha BL, Benmebarek MR, Lesch S, Endres S, Kobold S. Limitations in the Design of Chimeric Antigen Receptors for Cancer Therapy. *Cells* 2019; 8.

Subklewe M, Geiger C, Lichtenegger FS, Javorovic M, Kvalheim G, Schendel DJ, Bigalke I. New generation dendritic cell vaccine for immunotherapy of acute myeloid leukemia.

*Cancer Immunology, Immunotherapy* 2014; 63:1093-103.

Tabata S, Kadowaki N, Kitawaki T, Shimaoka T, Yonehara S, Yoshie O, Uchiyama T. Distribution and kinetics of SR-PSOX/CXCL16 and CXCR6 expression on human dendritic cell subsets and CD4+ T cells.

*Journal of Leukocyte Biology* 2005; 77:777-86.

Tan Q, Zhu Y, Li J, Chen Z, Han GW, Kufareva I, Li T, Ma L, Fenalti G, Li J, Zhang W, Xie X, Yang H, Jiang H, Cherezov V, Liu H, Stevens RC, Zhao Q, Wu B. Structure of the CCR5 chemokine receptor-HIV entry inhibitor maraviroc complex.

*Science* 2013; 341:1387-90.

Tang HL, Cyster JG. Chemokine Up-regulation and activated T cell attraction by maturing dendritic cells.

*Science* 1999; 284:819-22.

Thelen M, Stein JV. How chemokines invite leukocytes to dance.

*Nature Immunology* 2008; 9:953-9.

Thor Straten P, Garrido F. Targetless T cells in cancer immunotherapy.

*Journal for Immunotherapy of Cancer* 2016; 4:23.

Tokarew N, Ogonek J, Endres S, von Bergwelt-Baildon M, Kobold S. Teaching an old dog new tricks: next-generation CAR T cells.

*British Journal of Cancer* 2019; 120:26-37.

Tran E, Robbins PF, Lu YC, Prickett TD, Gartner JJ, Jia L, Pasetto A, Zheng Z, Ray S, Groh EM, Kriley IR, Rosenberg SA. T-Cell Transfer Therapy Targeting Mutant KRAS in Cancer.

*New England Journal of Medicine* 2016; 375:2255-2262.

Unutmaz D, Xiang W, Sunshine MJ, Campbell J, Butcher E, Littman DR. The primate lentiviral receptor Bonzo/STRL33 is coordinately regulated with CCR5 and its expression pattern is conserved between human and mouse.

*The Journal of Immunology* 2000; 165:3284-92.

Van den Steen PE, Proost P, Wuyts A, Van Damme J, Opdenakker G. Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact. *Blood* 2000; 96:2673-81.

van der Voort R, Verweij V, de Witte TM, Lasonder E, Adema GJ, Dolstra H. An alternatively spliced CXCL16 isoform expressed by dendritic cells is a secreted chemoattractant for CXCR6+ cells. *Journal of Leukocyte Biology* 2010; 87:1029-39.

Veinotte L, Gebremeskel S, Johnston B. CXCL16-positive dendritic cells enhance invariant natural killer T cell-dependent IFN $\gamma$  production and tumor control. *Oncoimmunology* 2016; 5:e1160979.

von Andrian UH, Mackay CR. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *New England Journal of Medicine* 2000; 343:1020-34.

Wang J, Lu Y, Wang J, Koch AE, Zhang J, Taichman RS. CXCR6 induces prostate cancer progression by the AKT/mammalian target of rapamycin signaling pathway. *Cancer Research* 2008; 68:10367-76.

Wehr A, Baeck C, Heymann F, Niemietz PM, Hammerich L, Martin C, Zimmermann HW, Pack O, Gassler N, Hittatiya K, Ludwig A, Luedde T, Trautwein C, Tacke F. Chemokine receptor CXCR6-dependent hepatic NK T Cell accumulation promotes inflammation and liver fibrosis. *The Journal of Immunology* 2013; 190:5226-36.

Wente MN, Gaida MM, Mayer C, Michalski CW, Haag N, Giese T, Felix K, Bergmann F, Giese NA, Friess H. Expression and potential function of the CXC chemokine CXCL16 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *International Journal of Oncology* 2008; 33:297-308.

Whilding LM, Halim L, Draper B, Parente-Pereira AC, Zabinski T, Davies DM, Maher J. CAR T-Cells Targeting the Integrin  $\alpha$ v $\beta$ 6 and Co-Expressing the Chemokine Receptor CXCR2 Demonstrate Enhanced Homing and Efficacy against Several Solid Malignancies. *Cancers* 2019; 11.

Wilbanks A, Zondlo SC, Murphy K, Mak S, Soler D, Langdon P, Andrew DP, Wu L, Briskin M. Expression cloning of the STRL33/BONZO/TYMSTR ligand reveals elements of CC, CXC, and CX3C chemokines. *The Journal of Immunology* 2001; 166:5145-54.

Wolchok JD, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Rutkowski P, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, Wagstaff J, Schadendorf D, Ferrucci PF, Smylie M, Dummer R, Hill A, Hogg D, Haanen J, Carlino MS, Bechter O, Maio M, Marquez-Rodas I, Guidoboni M, McArthur G, Lebbe C, Ascierto PA, Long GV, Cebon J, Sosman J, Postow MA, Callahan MK, Walker D, Rollin L, Bhore R, Hodi FS, Larkin J. Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *New England Journal of Medicine* 2017; 377:1345-1356.

Xia Y, Yan J, Jin X, Entman ML, Wang Y. The chemokine receptor CXCR6 contributes to recruitment of bone marrow-derived fibroblast precursors in renal fibrosis. *Kidney International* 2014; 86:327-37.

Yamauchi R, Tanaka M, Kume N, Minami M, Kawamoto T, Togi K, Shimaoka T, Takahashi S, Yamaguchi J, Nishina T, Kitaichi M, Komeda M, Manabe T, Yonehara S, Kita T. Upregulation of SR-PSOX/CXCL16 and recruitment of CD8+ T cells in cardiac valves during inflammatory valvular heart disease.

*Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2004; 24:282-7.

Yao X, Ahmadzadeh M, Lu YC, Liewehr DJ, Dudley ME, Liu F, Schrumpp DS, Steinberg SM, Rosenberg SA, Robbins PF. Levels of peripheral CD4(+)FoxP3(+) regulatory T cells are negatively associated with clinical response to adoptive immunotherapy of human cancer.

*Blood* 2012; 119:5688-96.

Yarchoan M, Johnson BA, 3rd, Lutz ER, Laheru DA, Jaffee EM. Targeting neoantigens to augment antitumour immunity.

*National Reviews of Cancer* 2017; 17:209-222.

Yoon MS, Pham CT, Phan MT, Shin DJ, Jang YY, Park MH, Kim SK, Kim S, Cho D. Irradiation of breast cancer cells enhances CXCL16 ligand expression and induces the migration of natural killer cells expressing the CXCR6 receptor.

*Cytotherapy* 2016; 18:1532-1542.

Zhang SQ, Parker P, Ma KY, He C, Shi Q, Cui Z, Williams CM, Wendel BS, Meriwether AI, Salazar MA, Jiang N. Direct measurement of T cell receptor affinity and sequence from naive antiviral T cells.

*Science Translational Medicine* 2016; 8:341ra77.

Zhou Q, Munger ME, Highfill SL, Tolar J, Weigel BJ, Riddle M, Sharpe AH, Vallera DA, Azuma M, Levine BL, June CH, Murphy WJ, Munn DH, Blazar BR. Program death-1 signaling and regulatory T cells collaborate to resist the function of adoptively transferred cytotoxic T lymphocytes in advanced acute myeloid leukemia.

*Blood* 2010; 116:2484-93.

## 7. Anhang

### Abkürzungen

#### A

AZT	Adoptiver Zelltransfer
ADAM	<i>A disintegrin and metalloproteinase domain</i>
APC	Allophycocyanin
APC	Antigen-präsentierende Zellen

#### B

BCP-ALL	B-Vorläuferzell-Leukämie
BSA	Bovines Serumalbumin

#### C

CAR	Chimärer Antigen-Rezeptor
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CCR, CXCR	Chemokinrezeptor
CXCL	Chemokinligand

#### D

DC	Dendritische Zellen
DLBCL	Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

#### E

E. coli	<i>Escheria coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMA	Europäischen Arzneimittelagentur
env	<i>Envelope</i>

#### F

FACS	<i>Fluorescent-activated cell sorting</i>
Fc	<i>Fragment crystallisable</i>
FKS	Fetales Kälber-Serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate

#### G

gag	<i>Group antigen</i>
-----	----------------------

---

GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage - colony stimulating factor</i>
<b>H</b>	
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
<b>I</b>	
ICAM	<i>Intracellular adhesion molecule</i>
IL	Interleukin
IFN	Interferon
i.v.	Intravenös
<b>L</b>	
LB	Luria Bertani
LDH	Lactatdehydrogenase
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität München
<b>M</b>	
MACS	<i>Magnetic-activated cell sorting</i>
MDSC	<i>Myeloid-derived suppressor cells</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MMP	Matrixmetalloproteinasen
<b>N</b>	
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
<b>O</b>	
OVA	Ovalbumin
OT-I	MHC I beschränkte Ovalbumin-spezifische CD8+ T-Zellen
<b>P</b>	
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PE	Phycoerythrin
PerCp	Peridinin Chlorophyll-Protein
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
Plat E	Platinum E
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pol	Reverse Transkriptase
<b>R</b>	
r	Rekombinant
r/r	Therapierefraktär rezidiert
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI-1640	Medium, entwickelt am Roswell Park Memorial Institute

---

RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription Polymerase Kettenreaktion
<b>S</b>	
s	<i>Soluble</i>
s.c.	Subkutan
scFv	<i>Single chain variable fragment</i>
<b>T</b>	
TAE	(Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)-Acetat Ethylendiamintetraessigsäure
TAMs	Tumor-assoziierte Makrophagen
TCR	T-Zellrezeptor
TIL	Tumor-infiltrierende Lymphozyten
TLR	Toll-like-Rezeptor
TM	Transmembran
TME	Tumormikroumgebung
TNF	Tumor-Nekrose Faktor
TRUCK	<i>T cells redirected for antigen-unrestricted cytokine-initiated killing</i>

**Danksagung**

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Stefan Endres und Prof. Dr. Sebastian Kobold für die besondere Chance, an dieser innovativen Fragestellung forschen zu dürfen und dieses Projekt durch den spannenden Einstieg zur Zeit der Hypothesenbildung beleben zu können. Als mich mein Ziel der Facharztausbildung in der Hämatologie-Onkologie für das Thema begeisterte, hat ihr Forschungsdrang einen wichtigen Teil meines Weges dorthin enorm geprägt. Im Besonderen hat mich ihre Lehre in der ausdauernden und kreativen Suche der wissenschaftlichen Wahrheit sowie einer eigenverantwortlichen und reflektierten Problemlösung ausgebildet. Ich bin sehr dankbar, durch die Aufnahme in das Labor an der durchschlagenden Entwicklung der Immuntherapie in Wissenschaft und Klinik im Kleinen zu partizipieren. Auch gilt mein Dank der Arbeitsgruppe für Immunpharmakologie und der Abteilung für Klinische Pharmakologie für die stetige Hilfe bei allen theoretischen und praktischen Hürden der experimentellen Arbeit.

Auch danke ich der Ludwig-Maximilians-Universität, der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Elitenetzwerk Bayern für die finanzielle Unterstützung und die interdisziplinäre vielfältige Förderung durch ein promotionsbegleitendes Curriculum.