

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie
Direktor: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik und Poliklinik IV
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Kombinierte Expression von *epithelial cell
adhesion molecule (EpCAM)*-spezifischem
chimärem Antigenrezeptor mit den
Chemokinrezeptoren CCR4, CCR8 und CXCR6 in
der T-Zell-basierten Immuntherapie von murinen
Tumormodellen**



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

Vorgelegt von
Klara Viktoria Dorman
aus Ulm
2021

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Sebastian Kobold

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Marion Subklewe
apl. Prof. Dr. Andreas Eigler

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Bruno Loureiro Cadilha, Ph.D.
Prof. Dr. med. Stefan Endres

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL

Tag der mündlichen
Prüfung: 25.03.2021

Meiner Mutter

Eidesstattliche Versicherung

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

Kombinierte Expression von *epithelial cell adhesion molecule* (EpCAM)-spezifischem chimärem Antigenrezeptor mit den Chemokinrezeptoren CCR4, CCR8 und CXCR6 in der T-Zell-basierten Immuntherapie von murinen Tumormodellen

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

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

München, den 07.04.2021

.....

Klara Viktoria Dorman

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Adoptive T-Zell-Therapie	2
1.2 Chimäre Antigenrezeptoren	3
1.3 Chemokine und Chemokinrezeptoren	6
1.4 Ergebnisse von Vorarbeiten der Arbeitsgruppe	8
1.5 Hypothese	9
2 Material und Methoden	10
2.1 Geräte und Reagenzien	10
2.1.1 Technische Geräte	10
2.1.2 Reagenzien, Chemikalien und Puffer	11
2.1.3 Materialien für die Zellkultur	12
2.1.4 Zelllinien	13
2.1.5 Antikörper, Zytokine und Chemokine	13
2.1.6 Software	13
2.2 Tierversuche	14
2.2.1 Mäuse	14
2.2.2 Gewinnung von Splenozyten	14
2.2.3 <i>In vivo</i> Tumormodelle	14
2.3 Molekularbiologische Methoden - Klonieren	15
2.3.1 Vektor	15
2.3.2 Primer-Design	15
2.3.3 <i>Overlap Extension PCR</i> (Polymerase-Kettenreaktion)	15
2.3.4 Ligation	16
2.3.5 Transformation	16
2.3.6 Sequenzierung	16
2.3.7 DNA Vorbereitung	16
2.3.8 Agarose-Gelelektrophorese	17
2.4 Zelluläre Methoden	17
2.4.1 Zellkultur Ablauf	17
2.4.2 Zählen von Zellen	17
2.4.3 Zellen einfrieren und auftauen	17
2.4.4 Kokultur von Tumor- und T-Zellen	18
2.4.5 Herstellung von virusproduzierenden 293Vec-Eco Zellen	18
2.4.6 Retrovirale Transduktion mit 293Vec-Eco Zellen	19
2.4.7 Durchflusszytometrie (FACS)	20

2.4.8 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	21
2.4.9 Proliferations-Assay	21
2.4.10 LDH Zytotoxizitäts-Assay	21
2.4.11 iCelligence-Assay	21
2.4.12 Migrations-Assay	22
2.5 Statistische Analyse	22
3 Ergebnisse	23
3.1 Antigen-spezifische CAR zur Erkennung von Tumorzellen.....	23
3.2 Verbindung des anti-EpCAM-CAR mit verschiedenen Chemokinrezeptoren in einem polycistronischen Vektor über die 2A-Sequenz.....	23
3.4 Die Proliferation der anti-EpCAM-CAR- und Chemokinrezeptor- transduzierten T-Zellen ist im Vergleich zu untransduzierten T-Zellen nicht beeinträchtigt.....	25
3.5 Anti-EpCAM-CAR- und Chemokinrezeptor-transduzierte T-Zellen produzieren nach Erkennung des EpCAM-Antigens IFN-γ.....	26
3.6 Anti-EpCAM-CAR- und Chemokinrezeptor-transduzierte T-Zellen sind in der Lage, EpCAM-exprimierende Tumorzellen zu töten	28
3.7 Chemokinrezeptor- und anti-EpCAM-CAR-transduzierte T-Zellen migrieren in Richtung der zugehörigen Liganden.....	31
3.8 Wirkung von anti-EpCAM-CAR- und Chemokinrezeptor-transduzierten T-Zellen auf Tumorwachstum <i>in vivo</i>	32
4 Diskussion	35
4.1 Zusammensetzung des anti-EpCAM-CAR.....	35
4.2 Migration der anti-EpCAM-CAR- und Chemokinrezeptor-transduzierten T-Zellen in Richtung der Chemokinliganden	37
4.3 Bedeutung der Chemokine CXCL16, CCL22 und CCL1 in Tumoren....	38
4.4 Andere Möglichkeiten der Einflussnahme auf T-Zell-Migration	40
4.5 Therapeutische Wirksamkeit kombiniert transduzierter T-Zellen <i>in vivo</i>	41
4.6 Epitheliales Zelladhäsionsmolekül als Zielantigen der adoptiven T-Zell-Therapie.....	43
4.7 Mögliche Ansätze zur Überwindung von Hindernissen bei der Immuntherapie solider Tumoren in der Zukunft.....	44
5 Zusammenfassung.....	47
6 Literaturverzeichnis	48
7 Abkürzungsverzeichnis	62
8 Veröffentlichungen.....	64
9 Danksagung.....	65

1 Einleitung

Aufgrund des steigenden Alters der Bevölkerung wächst die Inzidenz von Krebserkrankungen stetig (Smittenaar et al. 2016, Weir et al. 2015). So erkrankten im Jahr 2016 in Deutschland 492 090 Menschen an Krebs, während 229 827 Menschen daran verstarben (Zentrum für Krebsregisterdaten 2019). Die bisher etablierten Therapieansätze – Chirurgie, Chemotherapie, Strahlentherapie und Antikörpertherapien – führen bei vielen Patienten nicht zu vollständiger Remission. Um in Erkrankungsstadien, die aktuell mit einer infausten Prognose einhergehen, die Überlebenszeit und Lebensqualität der Patienten zu erhöhen, besteht Bedarf an der Entwicklung neuartiger Tumortherapien.

Nicht zuletzt durch die Beobachtung, dass erhöhte intratumorale T-Zell-Präsenz mit einer besseren Prognose von Krebspatienten einhergeht, wurde die entscheidende Rolle des Immunsystems bei Tumorerkrankungen immer deutlicher (Zhang et al. 2003). Es eröffnete sich ein neues, rasant wachsendes Forschungsgebiet in der Onkologie, die Immuntherapie. Diese konnte sich in den letzten Jahren bei der Behandlung einer stetig zunehmenden Anzahl von Tumorentitäten etablieren. Monoklonale Antikörper, die gegen Tumorantigene oder als sogenannte *checkpoint*-Inhibitoren gegen T-Zell-inhibitorische Rezeptoren wie *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4* (CTLA-4) oder *programmed cell death protein 1* (PD-1) gerichtet sind, fanden ihren Einzug in die Klinik (Coiffier et al. 1998, Hodi et al. 2010, Viani et al. 2007). Gleichzeitig erweiterten auch T-Zell-basierte Therapien den Rahmen der immunologischen Behandlungsmöglichkeiten. Hierbei werden den Patienten tumorspezifische T-Zellen verabreicht, welche im Körper gezielt die entarteten Zellen eliminieren sollen. Mit der Zulassung der ersten T-Zell-basierten Therapie durch die FDA (*Food and Drug Administration*) im Jahr 2017 bewegte sich dieser neuartige Therapieansatz, mit dem sich auch diese Arbeit beschäftigt, einen großen Schritt nach vorne.

1.1 Adoptive T-Zell-Therapie

Die adoptive T-Zell Therapie (AZT) ist die therapeutische Anwendung von T-Zellen, meist zur Behandlung von Tumorerkrankungen (Kalos et al. 2013). Essenziell sind dabei T-Zellen, die möglichst spezifisch für die Tumorzelle sind. Diese können entweder bereits im Patienten vorhanden sein, oder die T-Zellen werden durch Gentransfer spezifisch gemacht (Abbildung 1). Bei der Durchführung der AZT werden zunächst allogene oder autologe (Bonini et al. 2015) Zellen aus dem peripheren Blut entnommen, *in vitro* kultiviert und selektiert und schließlich dem Patienten als Krebstherapie verabreicht (Rosenberg et al. 2015). Auch aus dem Tumorgewebe selbst können Lymphozyten gewonnen werden, die selektiert und expandiert werden, bevor sie dem Patienten wieder zugeführt werden. Das bietet den Vorteil, dass T-Zellen genutzt werden, die bereits in den Tumor infiltriert sind und somit in der Lage dazu erscheinen, dies nach *in vitro* Expansion wieder zu tun. Diese T-Zellen werden als Tumor-infiltrierende Lymphozyten (TIL) bezeichnet (Restifo et al. 2012). Noch einen Schritt weiter geht man mit der genetischen Modifizierung der T-Zellen. Dabei erhalten die Zellen verschiedene Rezeptoren, zum Beispiel tumorspezifische T-Zellrezeptoren (TCR) oder chimäre Antigenrezeptoren (CAR), durch die die Spezifität der T-Zellen gelenkt und ihre Aktivierung bewirkt wird (June 2007, Rosenberg et al. 2015).

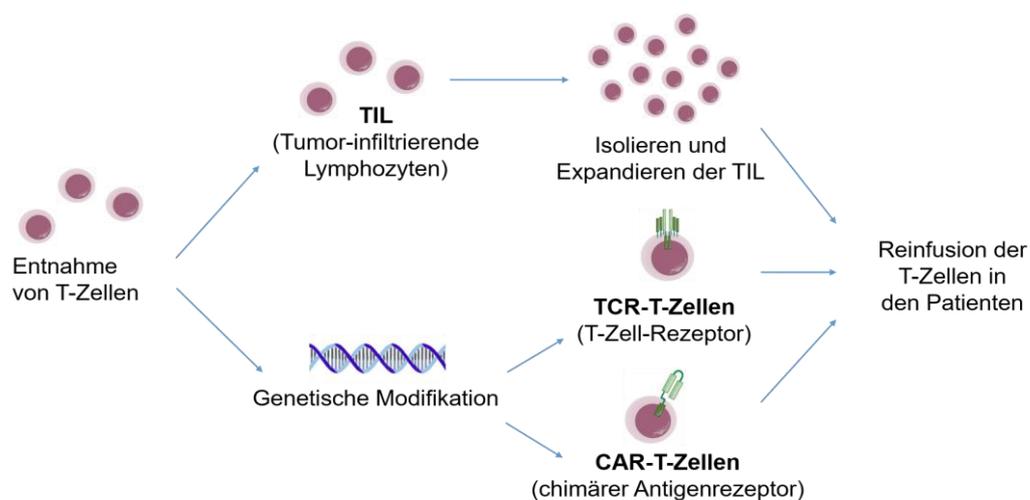


Abbildung 1: Überblick über verschiedene Arten der adoptiven T-Zell Therapie. Bei der AZT werden dem Patienten Tumor-infiltrierende Lymphozyten oder genetisch modifizierte T-Zellen verabreicht. Durch die genetische Modifikation exprimieren die Zellen zum Beispiel chimäre Antigenrezeptoren oder T-Zell-Rezeptoren, durch die die T-Zelle bestimmte Antigene erkennen kann (adaptiert nach Rosenberg et al. 2015).

Die Potenz der adoptiven T-Zell-Therapie spiegelt sich in der Stärke der möglichen Komplikationen wider. Der sogenannte Zytokinsturm, bei dem es zu Organversagen durch massive Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen kommt (Morgan et al. 2010), oder das Tumor-Lyse-Syndrom, bei dem durch die schnelle Zerstörung vieler Tumorzellen eine große Menge an Metaboliten in den Blutkreislauf gelangt und den Organismus schädigt (Howard et al. 2011), sind lebensbedrohliche Nebenwirkungen und können Therapie-limitierend sein.

1.2 Chimäre Antigenrezeptoren

Chimäre Antigenrezeptoren sind gentechnisch konstruierte Rezeptoren, die durch den extrazellulären Anteil des Rezeptors spezifisch Antigene erkennen können, und intrazelluläre T-Zell-Rezeptor Domänen zur Weiterleitung von Signalen in die Zelle besitzen (Almasbak et al. 2016). Wenn ein CAR von einer T-Zelle exprimiert wird und mit dem extrazellulären Anteil an das dazugehörige Antigen bindet, wird die Zelle über ein Clustering der CAR durch die intrazellulären Domänen aktiviert (Davenport et al. 2018). Der Vorteil gegenüber T-Zell-Rezeptoren besteht darin, dass die Antigenerkennung unabhängig vom Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) vermittelt wird, allerdings können CAR dadurch im Gegensatz zu TCR nur Oberflächenproteine erkennen (Harris et al. 2016).

Der extrazelluläre Anteil eines CAR besteht aus einem *single chain variable fragment* (scFv), welches aus einem monoklonalen Antikörper isoliert wurde und spezifisch für ein Antigen ist. Die darauffolgende Gelenkregion ist wichtig für die Flexibilität des Rezeptors und die Signalweiterleitung (Hudecek et al. 2015). Extra- und intrazellulärer Bereich werden durch eine Transmembrandomäne verbunden, die zum Beispiel der aus CD3 oder CD8 entspricht. Die intrazelluläre Domäne stellt den entscheidenden Bereich für die Signalweiterleitung und Aktivierung der T-Zelle dar. Um seine Funktion zu optimieren, wurde dieser intrazelluläre Anteil des CAR im Laufe der Zeit stark weiterentwickelt (Abbildung 2, Sadelain et al. 2013). Die erste CAR-Generation enthält eine einzelne Signaldomäne, was nur zu geringer Zytokinproduktion und Expansion führt (Shi et al. 2014). T-Zellen werden zwar anfänglich aktiviert,

jedoch *in vivo* zu schnell anerg, da das kostimulatorische Signal fehlt (Almasbak et al. 2016). Ein stärkerer Effekt kann mit CAR der zweiten Generation erzielt werden, bei denen zusätzlich eine kostimulatorische Domäne eingefügt wird, die beispielsweise aus Rezeptoren wie 4-1BB oder CD28 stammt (Sadelain et al. 2013). Chimäre Antigenrezeptoren der dritten Generation enthalten zwei verschiedene kostimulatorische Domänen, wobei es entscheidend ist, geeignete Kombinationen auszusuchen, um die CAR der jeweiligen Situation am besten anzupassen (Morello et al. 2016).

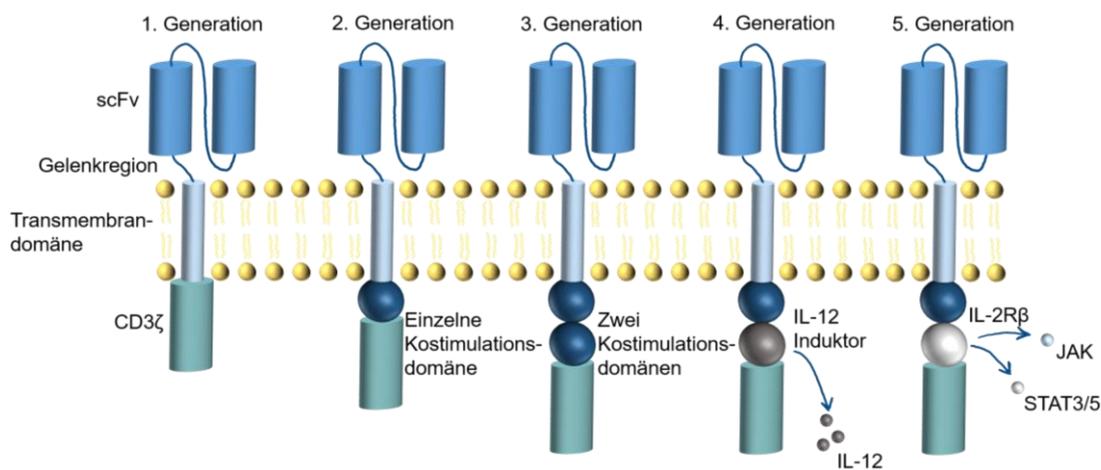


Abbildung 2: Verschiedene CAR-Generationen. CAR lassen sich durch ihre intrazellulären Domänen in fünf Generationen einteilen. Dabei besitzen die CAR höherer Generationen im Gegensatz zu CAR der ersten Generation mehr intrazelluläre Domänen und zusätzliche Funktionen (adaptiert nach Tokarew et al. 2019).

Einen Schritt weiter gehen chimäre Antigenrezeptoren der vierten Generation, sogenannte TRUCK (*T-cells redirected for universal cytokine-mediated killing*). Sie sind genetisch so modifiziert, dass sie nach Aktivierung im Tumorgewebe bestimmte Zytokine freisetzen, beispielsweise Interleukin-12 (IL-12). Dadurch sollen weitere Immunzellen angelockt werden, die dann ihre Antitumoraktivität entfalten können. Das bietet den Vorteil, auch die Tumorzellen angreifen zu können, die von den CAR-T-Zellen nicht erkannt werden (Chmielewski et al. 2014). Durch IL-12 sollen außerdem die Angiogenese gehemmt, die IFN- γ Produktion erhöht und die zytotoxischen Fähigkeiten von CD8⁺ T-Zellen verstärkt werden (Kerkar et al. 2011). Aktuell werden auch CAR fünfter Generation erforscht. Diese enthalten intrazellulär eine gekürzte IL-2-Rezeptor-Domäne mit einer Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor STAT3. Die Bindung des spezifischen Antigens an diesen CAR bewirkt somit gleichzeitig

eine Aktivierung über CD3 ζ , die kostimulatorische Domäne und über Zytokine. Dadurch werden die T-Zellen bestmöglich auf verschiedenen Bahnen stimuliert (Tokarew et al. 2019).

Im Bereich der hämatologischen Onkologie wurden in klinischen Studien bereits vielversprechende Resultate durch die adoptive T-Zell Therapie erreicht. Als Zielantigen bietet sich besonders CD19 an, da es auf allen malignen und normalen B-Zellen vorkommt, aber nicht auf anderem gesunden Gewebe (Ramos et al. 2014). Anti-CD19-CAR-T-Zellen führten bei Patienten mit refraktärem B-Zell-Lymphom (Neelapu et al. 2017, Schuster et al. 2017) und akuter lymphatischer Leukämie (Maude et al. 2018, Turtle et al. 2016) zu bisher nie erreichten Ansprechraten in dieser austherapierten Patientenpopulation. Folgerichtig wurden anti-CD19-CAR-T-Zellen in diesen Indikationen in den USA und Europa zugelassen (O'Leary et al. 2019). Diese vielversprechenden Erfolge bei hämatologischen Malignomen lassen sich bei soliden Tumoren derzeit nur bedingt beobachten (Ahmed et al. 2017, Brown et al. 2016). Dennoch konnten bei drei von 19 Patienten mit Neuroblastom in einer klinischen Studie vollständige Remissionen nach Behandlung mit anti-GD2-CAR-T-Zellen verzeichnet werden (Louis et al. 2011).

Die Gründe dafür, dass solide Tumoren trotz mancher Fortschritte immer noch begrenzter als hämatologische Neoplasien mit CAR-T-Zellen zu behandeln sind, sind vielfältig. Zum einen ist die Auswahl eines geeigneten Antigens auf dem Tumorgewebe bei CAR-T-Zellen von besonderer Wichtigkeit, da diese schon auf sehr niedrige Antigenexpression reagieren und es zu schweren Organschäden kommt, wenn die Zellen neben dem Tumor auch gesundes Gewebe angreifen (Fesnak et al. 2016).

Zum anderen wird eine effektive Immuntherapie durch die von soliden Tumoren hervorgerufene stark immunsuppressive Umgebung erschwert. Diese kann unter anderem dadurch entstehen, dass Tumorstromazellen immunsuppressive Moleküle wie *transforming growth factor β* (TGF- β) oder Interleukin-10 (IL-10) produzieren (Maus et al. 2016). Auch Oberflächenproteine wie PD-L1 (*programmed cell death-ligand 1*) führen zur Inaktivierung von T-Zellen, was die

Kombination von adoptiver T-Zell-Therapie mit *checkpoint*-Inhibitoren wie anti-PD-1 interessant macht (Beavis et al. 2016, Chong et al. 2017).

Bei der Immuntherapie solider Tumoren stellt sich zusätzlich ein logistisches Hindernis in den Weg: Um entartete Zellen zu erkennen und zu beseitigen, müssen die CAR-T-Zellen zuerst in das Tumorgewebe migrieren. Erschwert wird dieser Prozess durch Herunterregulierung von Adhäsionsmolekülen und pathologische Vaskularisation in der Tumorumgebung (Zhang et al. 2016). Manche Tumoren vermindern durch Veränderung ihres Chemokinprofils die Zahl der infiltrierenden zytotoxischen T-Zellen und entgehen so der Kontrolle des Immunsystems (Cadilha et al. 2017). Um diesem Evasionsmechanismus entgegenzutreten, macht es Sinn, sich die Interaktion von Chemokinen und Chemokinrezeptoren zu Nutze zu machen.

1.3 Chemokine und Chemokinrezeptoren

Chemokine sind Proteine, die die Chemotaxis (gezielte Wanderung) von Immunzellen hin zu entzündetem Gewebe vermitteln (Rollins 1997). Unter den Chemokinen zeigt die Tertiärstruktur – bestehend aus drei β -Faltblättern, einer carboxyterminalen Helix und einer variablen aminoterminalen Region – eine starke Homologie. Basierend auf der Position ihrer N-terminalen Cysteinreste werden Chemokine in die CC-, CXC-, CX3C- und XC-Untergruppen eingeteilt (Proudfoot 2002). Unabhängig von den strukturellen Unterschieden lassen sich die Chemokine auch hinsichtlich der Funktion unterteilen. Einerseits gibt es inflammatorische Chemokine, die bei entzündlichen Reaktionen hochreguliert werden. Andererseits gibt es Chemokine, die dauerhaft in Lymphgewebe und Organen exprimiert werden und die Homöostase und Migration von Immunzellen im Gewebe vermitteln. Manche Chemokine lassen sich beiden Gruppen zuordnen (Zlotnik et al. 2012). Die verschiedenen chemotaktischen Proteine können an G-Protein-gekoppelte Chemokinrezeptoren binden. Diese bestehen aus ungefähr 350 Aminosäuren, die sieben Transmembrandomänen und jeweils drei intra- und extrazelluläre hydrophile Schleifen bilden. C-terminal befinden sich Serin- und Threoninreste, die im Rahmen der Rezeptorregulation phosphoryliert werden können (Frick et al. 2016).

Sowohl tumorassoziierte Zellen als auch Tumorzellen selbst setzen Chemokine frei, die zu der Rekrutierung von verschiedenen Zellen in das Tumorgewebe führen. Manche dieser Zellen fördern das Tumorwachstum während andere es bremsen. Außerdem können Chemokine auch direkt das Wachstum von Tumorzellen modulieren und deren Apoptose verhindern (Chow et al. 2014). So wurde zum Beispiel festgestellt, dass Melanomzellen bestimmte Chemokine wie CXCL8 und CCL5 freisetzen, die die Tumorprogression fördern (Payne et al. 2002). Auch bei der Angiogenese in Tumoren spielen Chemokine eine entscheidende Rolle, wodurch die chemotaktischen Proteine sehr wichtig für das Wachstum und auch für die Metastasierung von Tumoren zu sein scheinen (Bernardini et al. 2003). Somit ist es nicht verwunderlich, dass bestimmte Chemokine in der Tumorumgebung hochreguliert sind. Beispielsweise konnte in Brustkrebsproben eine erhöhte Produktion von CCL18 im Vergleich zu gesundem Brustgewebe festgestellt werden (Gao et al. 2015). Für das gleiche Chemokin konnte auch in Endometriumkarzinomen eine gesteigerte Menge gemessen werden (Sakane et al. 2014). Das in Pankreaskarzinomen erhöhte CXCL16 steigerte *in vitro* die Invasivität der Tumorzellen (Wente et al. 2008).

Allerdings stellen Chemokine auch bei der Tumorkontrolle einen entscheidenden Faktor dar, da sie die Präsenz von T-Lymphozyten im Tumorgewebe erhöhen können (Gajewski 2007, Harlin et al. 2009). In *in vivo* Experimenten wurde bereits gezeigt, dass es eine Korrelation zwischen T-Zell-Chemotaxis und tumorbedingter Produktion von CCL2 gibt. Wurden Tumorzellen, die normalerweise kein CCL2 freisetzen so verändert, dass sie den Liganden produzierten, wanderten T-Zellen vermehrt zu den Tumorzellen hin (Brown et al. 2007). Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass T-Zellen, die nach genetischer Modifikation den Rezeptor CCR4 besitzen, eine bessere Migration in Tumoren aufweisen, die das dazu passende Chemokin CCL22 überexprimieren (Rapp et al. 2016). Außerdem wurde festgestellt, dass T-Zellen, die CX3CR1 exprimieren, CX3CL1 produzierende Tumoren besser infiltrieren können (Siddiqui et al. 2016) und CXCR2-exprimierende T-Zellen eine gesteigerte Migration zu Tumoren besitzen, die CXCL1 produzieren (Peng et al. 2010).

Da für T-Zellen, die nach genetischer Modifikation bestimmte Chemokinrezeptoren besitzen, eine gesteigerte Migration erreicht werden kann, ist es wichtig, dass in der Tumorumgebung ein passendes Chemokinmilieu herrscht (Siddiqui et al. 2016). Die schlechte Steuerbarkeit dieses Chemokinmilieus in Tumornähe stellt somit ein Hindernis für diese Therapieform dar. Außerdem muss bedacht werden, dass die Spezifität, die für die Tumorthherapie wichtig ist, dadurch eingeschränkt wird, dass Chemokinrezeptoren nicht spezifisch für einzelne Liganden sind, sondern an mehrere verschiedene Chemokine binden können (Zlotnik et al. 2012).

Damit CAR-T-Zell-Therapien in Zukunft auch in soliden Tumorentitäten zu vollständigen und dauerhaften Remissionen führen können, muss eine Vielzahl von Hindernissen überwunden werden. Um zu erreichen, dass T-Zellen gezielt zu Tumorzellen migrieren und diese spezifisch erkennen und bekämpfen, macht es Sinn, Chemokinrezeptoren und chimäre Antigenrezeptoren kombiniert auf den T-Zellen zu exprimieren.

1.4 Ergebnisse von Vorarbeiten der Arbeitsgruppe

Unsere Arbeitsgruppe hat bereits Ergebnisse im Bereich der Modifizierung von T-Zellen mit Chemokinrezeptoren und chimären Antigenrezeptoren einzeln gesammelt. *In vitro* konnte beobachtet werden, dass die Migration von T-Zellen mit Chemokinrezeptoren zu den entsprechenden Liganden erhöht war (Rapp et al. 2016). Außerdem konnte in Zytotoxizitätsexperimenten gezeigt werden, dass Zellen, die mit einem anti-EpCAM-CAR transduziert worden sind, eine höhere Zytotoxizität gegenüber EpCAM-positiven Tumorzellen als untransduzierte T-Zellen besitzen. Darüber hinaus war durch *in vivo* Experimente bekannt, dass die AZT mit Ovalbumin-spezifischen T-Zellen, die mit CCR8, CCR4 oder CXCR6 transduziert worden sind, im Vergleich zu den Kontrollgruppen zu erhöhter Tumorkontrolle in einem System mit Ovalbumin-Antigenrestriktion führt.

1.5 Hypothese

In verschiedenen Experimenten ist die Wirksamkeit von T-Zellen, die nach genetischer Modifizierung chimäre Antigenrezeptoren oder Chemokinrezeptoren besitzen, gezeigt worden. Dennoch bleibt unklar welcher Chemokinrezeptor, insbesondere in Kombination mit einem CAR, die größte Synergie zeigt. In der vorliegenden Arbeit soll ein chimärer Antigenrezeptor, der epitheliales Zelladhäsionsmolekül (EpCAM) erkennt, jeweils mit CCR4, CCR8 oder CXCR6 kombiniert werden. Ziel ist dabei die Beantwortung folgender Fragen (Abbildung 3):

- Produzieren CAR- und Chemokinrezeptor-transduzierte T-Zellen nach Erkennung von EpCAM IFN- γ ?
- Können die transduzierten T-Zellen EpCAM-positive Tumorzellen töten?
- Migrieren die CAR- und Chemokinrezeptor-exprimierenden T-Zellen in Richtung der zugehörigen Liganden?
- Welche Auswirkungen haben die kombiniert transduzierten T-Zellen auf das Tumorwachstum *in vivo*?
- Bestehen zwischen den verschiedenen Kombinationen Unterschiede hinsichtlich der *in vitro* und *in vivo* Wirkungen?

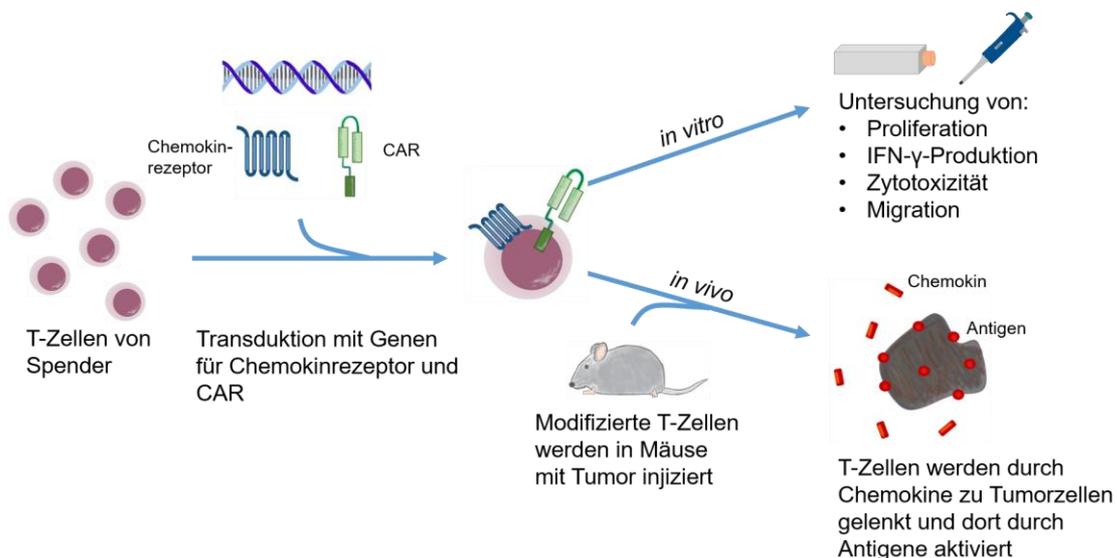


Abbildung 3: Experimenteller Aufbau des vorliegenden Promotionsprojekts.

T-Zellen werden entnommen und *in vitro* transduziert, sodass sie einen CAR und einen Chemokinrezeptor exprimieren. Anschließend werden die Proliferation, die IFN- γ -Produktion, die Zytotoxizität und die Migration der Zellen *in vitro* untersucht. Zur Untersuchung der Wirksamkeit der Zellen *in vivo* werden diese in tumortragende Mäuse injiziert. Das Ziel ist es, dass die T-Zellen *in vivo* durch Chemokine zu den Tumorzellen finden und dort nach Bindung an das Tumorantigen aktiviert werden und die Tumorzellen töten.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Reagenzien

2.1.1 Technische Geräte

Tabelle 1: Technische Geräte

Alphalmager HP	Alpha Innotech	Kasendorf, Deutschland
CO₂-Inkubator (BD6220)	Heraeus, ThermoFisherScientific	Massachusetts, USA
CO₂-Inkubator (Heracell 240i)	Heraeus, ThermoFisherScientific	Massachusetts, USA
Discovery Comfort Pipetten Set	HTL	Warschau, Polen
EasyCast Gelelektrophorese Systeme	ThermoFisher Scientific	Massachusetts, USA
FACSCanto II	BD Biosciences	New Jersey, USA
Fujifilm LAS4000	Fujifilm	Tokyo, Japan
Gefrierschränke 4 °C und -20 °C	Bosch	Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland
Gene Touch Thermocycler	Bioer	Hangzouh, China
HERAfreeze™ HFU T Series	Heraeus, ThermoFisherScientific	Massachusetts, USA
iCELLigence	ACEA Biosciences Inc.	California, USA
Innova44 Thermoshaker	New Brunswick Scientific, Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Lichtmikroskop Axiovert 40Ca	Zeiss	New York, USA
LSRFortessa	BD Biosciences	New Jersey, USA
MaxQ 4000 Thermoshaker	ThermoFisherScientific	Massachusetts, USA
Mithras Ib 940	Berthold Technologies	Bad Wildbad, Germany
Multifuge 3L-R, X3 und 4KR	Heraeus, ThermoFisherScientific	Massachusetts, USA
Nanodrop 2000c	ThermoFisherScientific	Massachusetts, USA
Nichipet EXII Pipetten Set	Nichiryo	Saitama, Japan
Pipetus	Hirschmann	Eberstadt, Deutschland
PowerPac™	Bio-Rad Laboratories	München, Deutschland
Research plus Pipetten Set	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Rollenmischer CAT RM 5	Zipperer	Deutschland
Shaker DOS-10L	NeoLAB	Heidelberg, Germany
Sprout Minizentrifuge	Biozym	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Thermomixer digital	ThermoFisherScientific	Massachusetts, USA
Tischvortexer RS VA 10	Phoenix	Garbsen, Deutschland
Tischzentrifuge Heraeus Fresco 17	ThermoFisherScientific	Massachusetts, USA
Tischzentrifuge 5418r	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
T3 Thermocycler	Biometra	Göttingen, Deutschland
Vakuumpumpe	Welch	Fürstfeldbruck, Deutschland
Zellkulturflow HeraSAFE KS	Heraeus, ThermoFisherScientific	Massachusetts, USA
Zentrifuge Rotina 420R	Hettich GmbH	Tuttlingen, Deutschland

2.1.2 Reagenzien, Chemikalien und Puffer

Tabelle 2: Reagenzien, Chemikalien und Puffer

Albumin Fraktion V (BSA)	Sigma-Aldrich	Missouri, USA
Ammoniumchlorid	Merck	Darmstadt, Deutschland
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich	Missouri, USA
CountBright Absolute Counting Beads	LifeTechnologies	Kalifornien, USA
CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay	Promega	Wisconsin, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich	Missouri, USA
Disodiumphosphat	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
DNA Gel Loading Dye 6x	ThermoFisherScientific	Massachusetts, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich	Missouri, USA
Dynabeads Mouse T-Activator CD3/CD28	Invitrogen (ThermoFisherScientific)	Massachusetts, USA
EcoRI Enzym	NEB	Massachusetts, USA
Ethanol	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
FACSFlow, FACSClean	BD Biosciences	New Jersey, USA
GeneJet Plasmid Miniprep Set	ThermoFisherScientific	Massachusetts, USA
Isofluran	CP PHARMA	Burgdorf, Deutschland
Kaliumhydrogencarbonat	Merck	Darmstadt, Deutschland
LB Agar	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
LB Medium	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
LE Agarose	Biozym	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Lipofectamin 3000	Invitrogen (ThermoFisherScientific)	Massachusetts, USA
Natriumcarbonat	Merck	Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Baxter	Illinois, USA
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
NotI Enzym	NEB	Massachusetts, USA
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich	Missouri, USA
OptEIA Mouse IFN-γ ELISA Set	BD Biosciences	New Jersey, USA
Polybren	Sigma-Aldrich	Missouri, USA
PureLink PCR Purification Kit	Invitrogen (ThermoFisherScientific)	Massachusetts, USA
PureLink PCR Quick Gel Extraction Kit	Invitrogen (ThermoFisherScientific)	Massachusetts, USA
Q5 Enzym	NEB	Massachusetts, USA
RetroNectin	TaKaRa	Kyoto, Japan
Schwefelsäure	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
SERVA DNA Stain G	SERVA	Heidelberg, Deutschland
TriDye 2-Log DNA Ladder	NEB	Massachusetts, USA
T4 Ligase Enzym	NEB	Massachusetts, USA
ZymoPURE Plasmid Maxi Prep Kit	Zymo Research	Kalifornien, USA

2.1.3 Materialien für die Zellkultur

Tabelle 3: Materialien für die Zellkultur

Blasticidin	InvivoGen	Kalifornien, USA
Dulbecco's modified Eagle medium DMEM	Lonza	Basel, Schweiz
Dulbecco's modified Eagle medium DMEM	Sigma-Aldrich	Missouri, USA
FCS (<i>fetal calf serum</i>)	Gibco Products	Massachusetts, USA
HEPES-Puffer 1 M	Sigma-Aldrich	Missouri, USA
L-Glutamin 200 mM	Sigma-Aldrich	Missouri, USA
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	Missouri, USA
Natrium-Pyruvat	Sigma-Aldrich	Missouri, USA
Opti-MEM Medium	Gibco Products	Massachusetts, USA
Penicillin/ Streptomycin	Sigma-Aldrich	Missouri, USA
Puromycin	InvivoGen	Kalifornien, USA
Roswell Park Memory Institute (RPMI) Medium	Lonza	Basel, Schweiz
Roswell Park Memory Institute (RPMI) Medium	Sigma-Aldrich	Missouri, USA
Trypsin	Lonza	Basel, Schweiz

Tabelle 4: Zellkultur Medien

Medium	Zusammensetzung	Medium	Zusammensetzung
DMEM Vollmedium	DMEM 10 % FCS 2 mM L-Glutamin 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin	RPMI T-Zell Medium	RPMI 10 % FCS 2 mM L-Glutamin 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 1 mM Natriumpyruvat 0,1 mM HEPES
DMEM 293Vec Kulturmedium	DMEM 10 % FCS 4 mM L-Glutamin 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin	Cytotox-Medium	RPMI ohne Phenolrot 1% FCS 2 mM L-Glutamin 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 1 mM Natriumpyruvat 0,1 mM HEPES
Kryo-Medium	90 % FCS 10 % DMSO	Migrationsmedium	RPMI ohne Phenolrot 0,5 % BSA

2.1.4 Zelllinien

Tabelle 5: Zelllinien

Panc02-OVA-Epcam	DMEM Vollmedium	Panc02 Pankreaskarzinom C57BL/6 Tumormodell	Klinische Pharmakologie, Klinikum der Universität München
293Vec-Eco	DMEM 293Vec Kulturmedium	Retrovirale Verpackerzelllinie	Biovec Pharma
293Vec-Galv	DMEM 293Vec Kulturmedium	Retrovirale Verpackerzelllinie	Biovec Pharma

2.1.5 Antikörper, Zytokine und Chemokine

Tabelle 6: Antikörper, Zytokine und Chemokine

Anti-c-myc-FITC	Klon SH1-26E7.1.3	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Germany
Anti-IgG1-FITC	Klon X-56	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Germany
Anti-mouse CD3ϵ	Klon 145-2C11	BD Pharmingen	New Jersey, USA
Anti-mouse CD28	Klon 37.51	BD Pharmingen	New Jersey, USA
Rekombinantes murines CCL1	Kat. # 582602	BioLegend	Kalifornien, USA
Rekombinantes murines CCL22	Kat. # 584802	BioLegend	Kalifornien, USA
Rekombinantes murines CXCL16	Kat. # 250-28	Peprotech	Hamburg, Deutschland
Rekombinantes humanes IL-2	Kat. # 200-02	Peprotech	Hamburg, Deutschland
Rekombinantes humanes IL-15	Kat. # 200-15	Peprotech	Hamburg, Deutschland

2.1.6 Software

Tabelle 7: Software

Endnote	Clarivate Analytics	Pennsylvania, USA
FACSDiva	BD Biosciences	New Jersey, USA
FlowJo	Tree Star	Oregon, USA
GraphPad Prism	GraphPad Software	La Jolla, USA
Microsoft Office	Microsoft	Redmond, USA
MikroWin	Labsis Laborsysteme GmbH	Neunkirchen-Seelscheid, Deutschland
RTCA Data Analysis	ACEA Biosciences	Kalifornien, USA
SnapGene	GSL Biotech LLC	Illinois, USA

2.2 Tierversuche

2.2.1 Mäuse

Weibliche C57Bl/6 Mäuse wurden von Charles River bezogen. Die Mäuse waren zum Zeitpunkt der Experimente 5 bis 12 Wochen alt. Die Tierversuche wurden von der zuständigen Behörde genehmigt (Regierung von Oberbayern, München, Deutschland).

2.2.2 Gewinnung von Splenozyten

Die Tötung der Mäuse erfolgte in der CO₂-Kammer oder durch Genickbruch. Nach Entnahme der Milz wurde in diese unter sterilen Bedingungen an mehreren Einstichstellen PBS injiziert und die Milz mit dem PBS anschließend durch ein 30 µm Zellsieb gegeben. Dabei wurde das Zellsieb mit RPMI T-Zell Medium nachgespült. Nach Zentrifugation und Abnahme des Überstands wurden die Erythrozyten im Zellpellet durch 2 ml Erylyse-Reagenz lysiert. Im Anschluss wurden 20 ml T-Zell Medium hinzugefügt, ein weiteres Mal zentrifugiert und die übrigen Zellen gezählt. Abschließend wurde die gewünschte Zellzahl in T-Zell Medium mit hinzugefügtem β-Mercaptoethanol, IL-2 und anti-CD3 Antikörper in einer Konzentration von 1:1.000, sowie anti-CD28 Antikörper in einer Konzentration von 1:10.000 in Kultur genommen.

2.2.3 *In vivo* Tumormodelle

Zum Setzen von Tumoren wurden Panc02-OVA-EpCAM-Zellen genutzt. Dafür wurden die adhärennten Tumorzellen mit Trypsin aus der Flasche gelöst, drei Mal mit PBS gewaschen, gezählt und 2×10^6 Zellen pro Maus subkutan in die linke Flanke injiziert. Nach Erreichen einer Tumorgöße von ungefähr 2 x 3 mm wurden die Mäuse randomisiert in Gruppen mit je fünf Versuchstieren aufgeteilt. Anschließend erhielten diese eine intravenöse Therapie in Form von transduzierten T-Zellen, als Kontrolle erhielt ein Teil der Mäuse nur PBS intravenös. Die Tumorgößen wurden drei Mal pro Woche gemessen, wobei auch der Zustand der Mäuse überprüft und dokumentiert wurde. Alle *in vivo* Versuche wurden verblindet durchgeführt.

2.3 Molekularbiologische Methoden - Klonieren

2.3.1 Vektor

Für diese Arbeit wurde der retrovirale pMP71 Vektor (Leisegang, et al. 2008) mit Ampicillinresistenz verwendet.

2.3.2 Primer-Design

Alle Primer wurden bei Metabion bestellt und nach folgenden Kriterien entworfen:

1. 15-30 Nukleotide lang;
2. GC-Gehalt 40 - 60 %;
3. Primer sollten nicht komplementär zu sich selbst oder zu anderen Primern sein;
4. Primer sollten zu nur einer einzigen Stelle in der Matrizen-DNA komplementär sein;
5. Die Differenz der *Annealing*-Temperatur der verschiedenen Primer sollte 5 °C nicht überschreiten.

2.3.3 *Overlap Extension PCR* (Polymerase-Kettenreaktion)

Diese Methode wurde angewendet, um durch das Zusammenfügen bestimmter DNA-Sequenzen gewünschte Inserts herzustellen. Dabei kommen bei zwei verschiedenen DNA-Sequenzen, die zusammengefügt werden sollen, Primer zum Einsatz, die komplementär zu den jeweiligen Enden der DNA sind, zusätzlich aber auch noch einen Überhang besitzen, der wiederum zu der Sequenz des anderen Bausteins komplementär ist. In einer weiteren PCR können die beiden Sequenzen durch den Überhang zusammengefügt werden. Die in diesem Projekt genutzte DNA-Polymerase war das Q5 Enzym von NEB.

2.3.4 Ligation

Die Inserts wurden durch eine *sticky-end*-Ligation in die Vektoren eingesetzt. Dafür besaß jedes Insert Schnittstellen für die Restriktionsenzyme NotI und EcoRI, sodass man nach der Restriktion durch geeignete Enzyme das Insert mit der T4 Ligase von NEB in den Vektor einfügen konnte.

2.3.5 Transformation

Für die Transformation wurden kompetente Bakterien von NEB benutzt. Die zu transformierende DNA wurde zu den Bakterien gegeben und das Gemisch anschließend zehn Minuten lang auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 90 Sekunden bei 42 °C und dann wiederum eine Inkubation auf Eis über zwei Minuten. Zu den Bakterien wurde Medium ohne Antibiotikum gegeben, um sie dann eine Stunde lang bei 37 °C zu kultivieren. Anschließend wurden die Bakterien für 12 bis 24 Stunden auf LB Agarplatten mit Ampicillin inkubiert, am darauffolgenden Tag wurden Kolonien gepickt und diese in LB Medium mit Ampicillin weitere 24 Stunden lang wachsen gelassen.

2.3.6 Sequenzierung

Die Plasmid-DNA, die durch die Transformation von den Bakterien produziert wurde, wurde durch ein Mini Prep Set von ThermoScientific aufbereitet und in einem Restriktionsverdau getestet, um sicherzugehen, dass das Insert richtig in den Vektor eingesetzt worden war. Wenn das der Fall war, wurde die DNA mit einem Sequenzierset von Eurofins sequenziert.

2.3.7 DNA Vorbereitung

Wenn das Konstrukt in der Sequenzierung keine Mutationen aufwies, wurden Bakterien mit dem korrekten Plasmid transformiert und eine Flüssigkultur angelegt. Aus dieser wurden für die weitere Arbeit mit einem Set von Promega oder Zymo Research größere Mengen des benötigten Plasmids gewonnen.

2.3.8 Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde mit einprozentigem Agarosegel in TE Puffer mit DNA-Farbstoff durchgeführt. Den Proben wurde *loading dye* hinzugefügt, es wurde eine *ladder* von ThermoScientific aufgetragen und das Gel lief bei 100 Volt für 30 Minuten.

2.4 Zelluläre Methoden

2.4.1 Zellkultur Ablauf

Die Zellen wurden unter sterilen Bedingungen gesplittet, wenn sie ungefähr 80 % Konfluenz erreicht hatten. Das alte Medium wurde abgenommen, die Zellflasche mit PBS gewaschen und bei adhärennten Zellen anschließend Trypsin aufgetragen, um diese vom Flaschenboden zu lösen. Wenn sich die Zellen nach kurzer Zeit gelöst hatten, wurde das Trypsin mit Medium abgestoppt. Die Zellen wurden abgenommen, in ein Falcon gegeben und zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen, während die Zellen in frischem Medium resuspendiert und ein Teil davon zurück in die Zellflasche gegeben wurden. Suspensionszellen konnten ohne die Anwendung von Trypsin sofort aus der Zellflasche entnommen werden.

2.4.2 Zählen von Zellen

Zellen wurden mit Trypanblau vermischt und in Neubauer Zählkammern gezählt. Zum Berechnen der Zellzahl wurde folgende Formel genutzt:

$$\text{Zellen / ml} = \frac{\text{Zellzahl in gezählten Kammern}}{\text{Anzahl gezählter Kammern}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

2.4.3 Zellen einfrieren und auftauen

Beim Einfrieren von Zellen wurde unter sterilen Bedingungen und so zügig wie möglich gearbeitet, um die Zellen nur möglichst kurz bei Raumtemperatur DMSO auszusetzen. Die Zellen wurden in 1 ml Kryo-Medium suspendiert und in ein beschriftetes Kryoröhrchen gegeben. Die eingefrorenen Zellen wurden bei -80 °C aufbewahrt. Beim Auftauen der Zellen wurde ebenfalls zügig

gearbeitet, dabei wurden die Zellen in frischem Medium aufgetaut und abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche gegeben. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Zellen wann immer es nötig war gesplittet.

2.4.4 Kokultur von Tumor- und T-Zellen

Um die Aktivierung und Zytotoxizität von T-Zellen in Anwesenheit von Tumorzellen zu untersuchen, wurden die Zellen in einer 96-Well-Platte gemeinsam und einzeln kultiviert. Dabei wurden T-Zellen in einer Konzentration von $2,5 \times 10^6$ / ml und Tumorzellen in einer Konzentration von 10^6 / ml in T-Zell Medium verwendet. Bei Kokulturen für ELISA-Assays wurde in Triplikaten gearbeitet und es gab eine Kontrollkondition, in der T-Zellen mit anti-CD3 (1:1.000) und anti-CD28 (1:10.000) Antikörpern stimuliert wurden. Bei Kokulturen für LDH-Assays gab es vier Wells pro Kondition, wobei auch Tumorzellen alleine plattiert wurden, an denen die maximale LDH-Freisetzung nach Zellyse gemessen wurde.

2.4.5 Herstellung von virusproduzierenden 293Vec-Eco Zellen

Tag 1: Ausplattieren von 293Vec-Galv Zellen in einer Konzentration von $0,8 - 1,0 \times 10^6$ / ml DMEM 293Vec Kulturmedium in 6-Well-Platten mit 3 ml pro Well.

Tag 2: In zwei Falcons wurden zum einen 12 µl Lipofectamin 2000 in 750 µl OptiMEM und zum anderen 3 µg der zu transfizierenden DNA in 750 µl OptiMEM vorbereitet und fünf Minuten lang bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde der Inhalt der beiden Falcons gut gemischt und das Ergebnis weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das Gemisch auf die am Vortag ausplattierten Zellen gegeben. Nach vier Stunden Inkubation der Zellen im Brutschrank wurde das Medium gewechselt.

Tag 3: 293Vec-Eco Zellen wurden in einer Konzentration von $0,8 - 1,0 \times 10^6$ / ml DMEM 293Vec Kulturmedium in 6-Wells mit 3 ml pro Well ausplattiert.

Tag 4: Der Überstand von den 293Vec-Galv Zellen wurde abgenommen und durch einen 45 µm Filter gegeben. Es wurde Polybren zum Virusüberstand gegeben, und dieser abschließend vorsichtig auf den 293Vec-Eco Zellen verteilt.

Tag 5: Die 293Vec-Eco Zellen, die kein Fluoreszenzprotein exprimierten, wurden mit einem anti-cmyc-FITC Antikörper angefärbt, da sie ein *cmyc-Tag* enthielten. Mittels FACS wurde eine Zelle pro Well in eine 96-well-Platte sortiert. Die Einzelzellklone wurden kultiviert und getestet. Die Klone, mit denen die höchsten Transduktionseffizienzen erreicht werden konnten, wurden expandiert und eingefroren.

2.4.6 Retrovirale Transduktion mit 293Vec-Eco Zellen

Tag 1: 293Vec-Eco Zellen, die stabil den gewünschten Virus produzierten, wurden mit einer Konzentration von $0,6 - 1,0 \times 10^6$ / ml DMEM 293Vec Kulturmedium in 6-Well-Platten mit 3 ml pro Well ausplattiert. Das Ziel war es, zwei Tage später eine Konfluenz von 80 - 90 % erreicht zu haben.

Tag 2: Aus einer C57Bl/6 Maus wurde die Milz entnommen und unter sterilen Bedingungen wie oben beschrieben Splenozyten gewonnen. Abschließend kamen dabei 6×10^6 Splenozyten in ein Well mit 3 ml RPMI T-Zell Medium und einer 1:1.000 Konzentration von IL-2, anti-CD3 Antikörper und β -Mercaptoethanol, und einer 1:10.000 Konzentration von anti-CD28 Antikörper. Außerdem wurden die nötigen Transduktionswells vorbereitet, indem der Boden von 24-Well-Platten durch Retronektin in PBS bedeckt wurde. Die fertigen Platten wurden mit Parafilm umwickelt und bis zum nächsten Tag im Kühlschrank gelagert.

Tag 3: Zuerst wurde das Retronektin vorsichtig und ohne den Boden der Wells zu berühren abgenommen. Mit Blockierpuffer wurden die Wells blockiert und im Brutschrank eine halbe Stunde lang inkubiert. Danach wurden die Wells mit Waschpuffer gewaschen. Der Virusüberstand der 293Vec-Eco Zellen wurde abgenommen, durch einen 45 µm Filter gegeben und schließlich auf die mit

Retronektin bedeckten und gewaschenen Wells übertragen. Die Platten wurden für 90 Minuten bei 3000 g und 4 °C zentrifugiert. Auf die 293Vec-Eco Zellen wurde frisches DMEM 293Vec Kulturmedium gegeben. Die Splenozyten, die am Vortag ausplattiert worden waren, wurden auf eine Konzentration von 10^6 / ml RPMI T-Zell Medium gebracht und in einer Konzentration von 1:1.000 wurden IL-2 und β -Mercaptoethanol hinzugefügt. Nach der Zentrifugation wurden die Überstände aus den Wells entfernt und die T-Zellen hinzugefügt. Um auch untransduzierte T-Zellen zu erhalten, wurden zusätzlich Wells genutzt, die vorher nicht mit Retronektin und Virus bedeckt worden waren. Außerdem wurden in jedes Well 10 μ l Dynabeads gegeben. Daraufhin folgte eine Zentrifugation für 30 Minuten bei 800 g und 32 °C, am Ende wurden die Platten bis zum nächsten Tag in den Inkubator gestellt. Abschließend wurde erneut die gleiche Anzahl an Retronektin-Wells wie am Vortag vorbereitet und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Tag 4: Mit den neuen Retronektin-Wells wurde erneut der Tag 3 des Transduktionsprotokolls durchgeführt, mit dem Unterschied, dass am Ende die T-Zellen, die bereits am Vortag transduziert worden waren, aus den 24-Wells abgenommen wurden und für die letzte Zentrifugation auf die neuen Transduktionsplatten gegeben wurden. Nach sechs Stunden Inkubation im Brutschrank wurde die Transduktionseffizienz der T-Zellen wie gewohnt mittels Durchflusszytometrie bestimmt und die T-Zellen in Kultur genommen.

2.4.7 Durchflusszytometrie (FACS)

Bei der Durchflusszytometrie können Zellen nach Phänotyp differenziert und gezählt werden. Dabei können die Größe und Granularität der Zellen, sowie fluoreszierende Farbstoffe, die an bestimmte Zellbestandteile binden, gemessen werden. Im Gerät passieren die Zellen einzeln einen Laserstrahl, während das von den Zellen emittierte optische Signal von dem Gerät aufgenommen wird. Für diese Arbeit sind bei der Durchflusszytometrie das FACSCanto II und das LSRFortessa zum Einsatz gekommen, zum *fluorescence-activated cell sorting* wurde das FACSARIA III genutzt. Die gesammelten Daten wurden mit FlowJo ausgewertet.

2.4.8 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Es wurden murine INF γ ELISA Kits von BD Biosciences nach Anweisung des Herstellers verwendet, um Überstände aus Kokulturen zu untersuchen. Die Proben wurden entweder 1 : 10, 1 : 200, oder 1 : 500 verdünnt, um in den Standardbereich des Herstellers zu fallen. Mitgelieferte Standards wurden nach Herstellerprotokoll genutzt, die Interpolation der unbekanntenen Werte auf der Standardkurve wurde durch die 4PL-Gleichung durchgeführt.

2.4.9 Proliferations-Assay

Um die Proliferation von T-Zellen zu untersuchen, wurden diese am letzten Tag der Transduktion ausplattiert. Für die Zeitpunkte 48 und 96 Stunden wurden jeweils drei Wells einer 96-Well-Platte mit je 20000 Zellen gefüllt. Alle 48 Stunden wurden die Zellen in den jeweiligen Wells mittels Durchflusszytometrie und *counting beads* gezählt und das Medium und die Zytokine in den verbleibenden Wells erneuert. Als Nullpunkt wurden Zellen in ein weiteres Well ausplattiert und sofort danach nach Zugabe von *counting beads* mit dem LSRFortessa gezählt.

2.4.10 LDH Zytotoxizitäts-Assay

Die Zytotoxizität von T-Zellen gegenüber Tumorzellen wurde mit dem CytoTox-Assay von Promega erfasst. Hierbei wurde das LDH in den Überständen von Kokulturen nach Protokoll des Herstellers gemessen. Zur Berechnung der prozentualen Zytotoxizität wurde folgende Formel genutzt:

$$\% \text{ Zytotoxizität} = \frac{\text{LDH Kokultur - T-Zellen spontanes LDH} - \text{Tumor spontanes LDH}}{\text{Tumor max. LDH} + \text{Tumor spontanes LDH}} \times 100$$

2.4.11 iCelligence-Assay

Mit dem RTCA iCelligence Gerät konnte die Zytotoxizität der T-Zellen noch weiter getestet werden. Dafür wurden spezielle iCelligence Platten verwendet. Am Boden dieser Wells befinden sich Gold-Mikroelektroden, zwischen denen

ein Elektronenfluss stattfindet, solange sich im Well Medium befindet und ein elektrisches Potential angeschlossen ist. Adhärenzte Zellen am Boden der Wells führen zu einer Impedanz, die von dem Gerät gemessen und in den Zellindex umgerechnet wird. Dieser kann über ein verbundenes Tablet mitverfolgt werden. Für die Experimente wurden Tumorzellen in die Platten pipettiert und inkubiert bis sie einen Zellindex von ungefähr 1 – 2 erreicht hatten. Anschließend wurden die T-Zellen auf die Tumorzellen gegeben und beobachtet, ob die T-Zellen ein Ablösen der Tumorzellen bewirken und wie sich der Zellindex daraufhin verändert. Die iCelligence Daten wurden mittels RTCA Data Analysis Software 1.0 ausgewertet.

2.4.12 Migrations-Assay

Es kamen *Boyden chamber* Platten (Corning) zum Einsatz, um die Fähigkeit von T-Zellen zur gerichteten Migration zu untersuchen. In die unteren Wells der Platten wurde Migrationsmedium mit einem Chemokin (10 ng / ml CCL1, 50 ng / ml CCL22 oder 50 ng / ml CXCL16) pipettiert. Die Konzentration des Liganden wurde nach Empfehlung des Herstellers gewählt, als Kontrolle gab es jeweils auch eine Kondition mit Migrationsmedium ohne Chemokin. In die oberen Wells der Platten wurden jeweils 5×10^5 Zellen, deren Migration untersucht werden sollte, gegeben. Nach sechs Stunden Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen, die in die unteren Wells gewandert waren, zusammen mit *counting beads* mittels Durchflusszytometrie gezählt. Für die Auswertung wurden *gates* nach Morphologie gesetzt und die Gesamtzahl der migrierten Zellen über die Anzahl der gemessenen *counting beads* berechnet.

2.5 Statistische Analyse

Die statistische Signifikanz wurde je nach Experiment mittels t-Test, one-way ANOVA, two-way ANOVA oder Log-rank Test berechnet. Signifikanz wurde angenommen bei $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**) und $P < 0,001$ (***). Die statistischen Berechnungen wurden mit GraphPad Prism durchgeführt, die Analyse und die Graphiken wurden mit Microsoft Office Excel, FlowJo und GraphPad Prism erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Antigen-spezifische CAR zur Erkennung von Tumorzellen

Unsere Arbeitsgruppe hat bereits die Möglichkeit beschrieben, durch die Überexpression des CC Chemokinrezeptors 4 (CCR4) auf T-Zellen die tumorgerichtete Migration zu erhöhen (Rapp et al. 2016). Dieses System hängt allerdings von einer spezifischen TCR Erkennung ab, sodass CCR4 allein zu keiner verbesserten Tumorkontrolle führen würde. Um diese Einschränkung zu überwinden, haben wir ein CAR Konstrukt generiert, das murines EpCAM (*Epithelial cell adhesion molecule*) erkennt. Das Konstrukt enthält eine CD8 α -Leadersequenz, ein anti-EpCAM-scFv (Hybridom G8.8), eine CD8-Gelenkregion, eine CD28-Transmembrandomäne und eine intrazelluläre CD28- und CD3 ζ -Domäne (Abbildung 4). Um den Rezeptor nach der Transduktion anfärben und im FACS nachweisen zu können, folgt auf das scFv ein c-myc Tag, das mit einem anti-c-myc-FITC Antikörper gefärbt und detektiert werden kann. Der anti-EpCAM-CD28-CD3 ζ -CAR wird der Einfachheit halber in der weiteren Arbeit als anti-EpCAM-CAR bezeichnet.

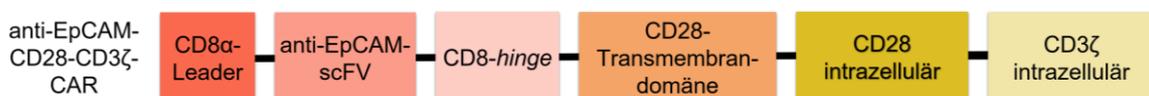


Abbildung 4: Struktur des anti-EpCAM-CD28-CD3 ζ -CAR. Der CAR enthält eine CD8 α -Leadersequenz, ein anti-EpCAM-scFV, eine CD8-Gelenkregion, eine CD28-Transmembrandomäne, sowie eine intrazelluläre CD28- und CD3 ζ -Domäne.

3.2 Verbindung des anti-EpCAM-CAR mit verschiedenen Chemokinrezeptoren in einem polycistronischen Vektor über die 2A-Sequenz

Die Chemokinrezeptoren CCR4, CCR8 und CXCR6 haben in vorherigen Arbeiten unserer Gruppe in einem Ovalbumin-abhängigen System bereits eine Verbesserung der Tumorkontrolle bei Mäusen bewirkt. Um zu untersuchen, ob die Transduktion dieser Chemokinrezeptoren in Verbindung mit dem anti-EpCAM-CAR auf T-Zellen einen synergistischen Effekt auf die Tumorkontrolle hat, wurden im nächsten Schritt polycistronische Konstrukte

generiert. Diese enthalten zum einen den anti-EpCAM-CAR, zum anderen entweder den Chemokinrezeptor CCR4, CCR8 oder CXCR6, wobei die beiden Abschnitte des Konstrukts über eine 2A-Sequenz aneinandergesetzt wurden. Verschiedene Viren nutzen 2A-Peptide, um die Spaltung von Proteinen zu vermitteln (Wang et al. 2015). Durch einen ribosomalen Sprung bildet sich zwischen den Aminosäuren Glycin und Prolin im 2A-Peptid keine Bindung aus, während die Translation der darauffolgenden Aminosäuren nicht beeinflusst wird. Im Gegensatz zu anderen Methoden, die interne ribosomale Eintrittsstellen (IRES) zur Herstellung polycistronischer Konstrukte nutzen, werden bei der Verwendung des 2A-Peptids die verbundenen Proteine in gleicher Höhe exprimiert (Szymczak et al. 2004).

Um den anti-EpCAM-CAR und die Chemokinrezeptoren auf murinen T-Zellen zu exprimieren, wurden zunächst virusproduzierende 293Vec-Eco Zelllinien hergestellt. Nach Transduktion der T-Zellen mit den Virusüberständen der generierten Zelllinien konnte im FACS eine Expression des anti-EpCAM-CAR auf 50 - 70 % der Zellen gezeigt werden (Abbildung 5A). Dafür wurden die Zellen mit einem anti-c-myc-FITC Antikörper gefärbt. Da kommerzielle Antikörper für besagte Chemokinrezeptoren nur unzuverlässige und wenig wiederholbare Färbungen ermöglichen, nutzten wir fluoreszierende Proteine als Surrogatmarker für deren Expression. Die DNA-Sequenzen, die für den anti-EpCAM-CAR und die Chemokinrezeptoren kodieren, sind durch eine 2A-Sequenz verbunden worden, sodass sie im gleichen Maß translatiert werden. Dadurch soll die Transduktionseffizienz, die durch den anti-c-myc Antikörper ermittelt wurde, annähernd auch die Höhe der Expression des Chemokinrezeptors wiedergeben.

Zur besseren Einschätzung, ob dies wirklich der Fall ist, haben wir den anti-EpCAM-CAR über das 2A-Peptid mit dem Fluoreszenzprotein mCherry verbunden, auf murine T-Zellen transduziert und überprüft, ob das Signal der Oberflächenfärbung durch den anti-c-myc Antikörper mit dem Signal des Fluoreszenzproteins im FACS übereinstimmt. Da wir sehen konnten, dass die Werte erst nach 96 Stunden einen signifikanten Unterschied zeigten und davor vergleichbar waren, gingen wir in den folgenden Experimenten von annähernd

gleicher Transduktionseffizienz der durch das 2A-Peptid verbundenen Rezeptoren aus (Abbildung 5B). Als Nächstes sollte die Funktionalität der T-Zellen und der Rezeptoren untersucht werden.

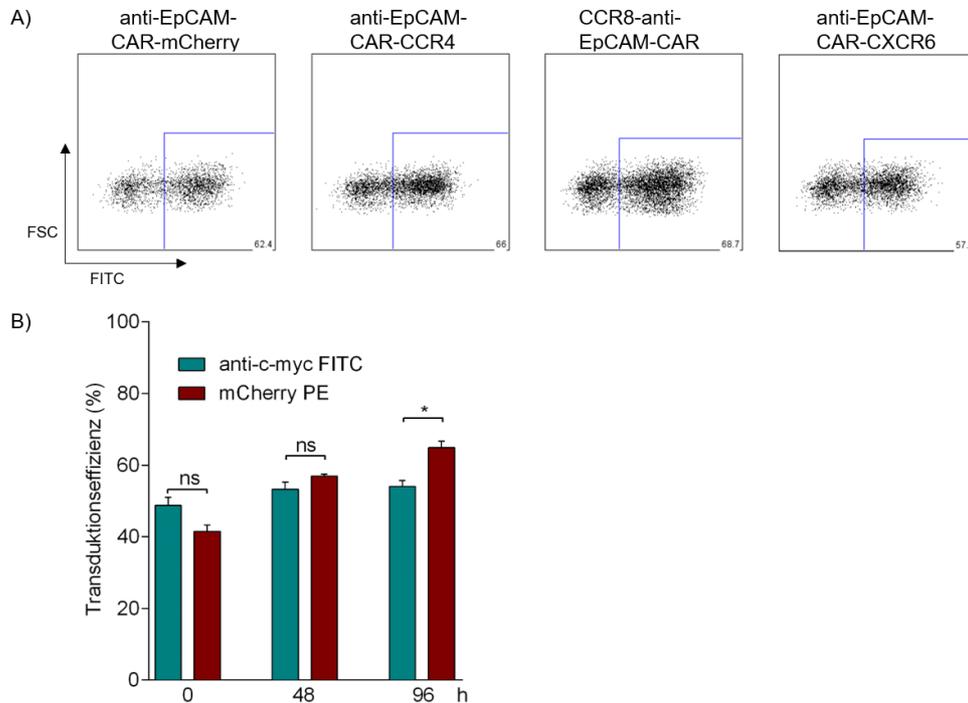


Abbildung 5: Detektion des c-myc Tags des anti-EpCAM-CAR und des Fluoreszenzproteins mCherry im FACS. A) T-Zellen, die mit anti-EpCAM-CAR-mCherry, anti-EpCAM-CAR-CCR4, CCR8-anti-EpCAM-CAR oder anti-EpCAM-CAR-CXCR6 transduziert worden waren, wurden mit einem anti-c-myc-FITC Antikörper angefärbt. Die *gates* wurden nach Populationen gesetzt. Die Daten sind repräsentativ für fünf unabhängige Experimente. **B)** Vergleich der Detektion der anti-c-myc-FITC Oberflächenfärbung und des Fluoreszenzproteins mCherry im FACS. Anti-EpCAM-CAR-mCherry-transduzierte T-Zellen wurden mit anti-c-myc-FITC Antikörper angefärbt und im FACS untersucht. Dargestellt als Anteil der *single cells* sind das Signal des mCherry Fluoreszenzproteins im PE-Kanal und das Signal des angefärbten c-myc Tags im FITC Kanal. Die Daten zeigen drei unabhängige, gepoolte Experimente.

3.4 Die Proliferation der anti-EpCAM-CAR- und Chemokinrezeptor-transduzierten T-Zellen ist im Vergleich zu untransduzierten T-Zellen nicht beeinträchtigt

Um einen Einfluss der CAR- beziehungsweise Chemokinrezeptortransduktion auf die Zellviabilität und die Fähigkeit der Zellvermehrung auszuschließen, führten wir Proliferations-Assays durch. Innerhalb des Beobachtungszeitraumes konnten wir sehen, dass die Expression des anti-EpCAM-CAR und der Chemokinrezeptoren nicht in einer Schädigung der Zellvermehrung resultiert (Abbildung 6). Während untransduzierte T-Zellen sich in 96 Stunden ungefähr

versiebenfachen, konnte bei transduzierten T-Zellen sogar eine bis zu 18-fache Zunahme der Zellzahl gemessen werden.

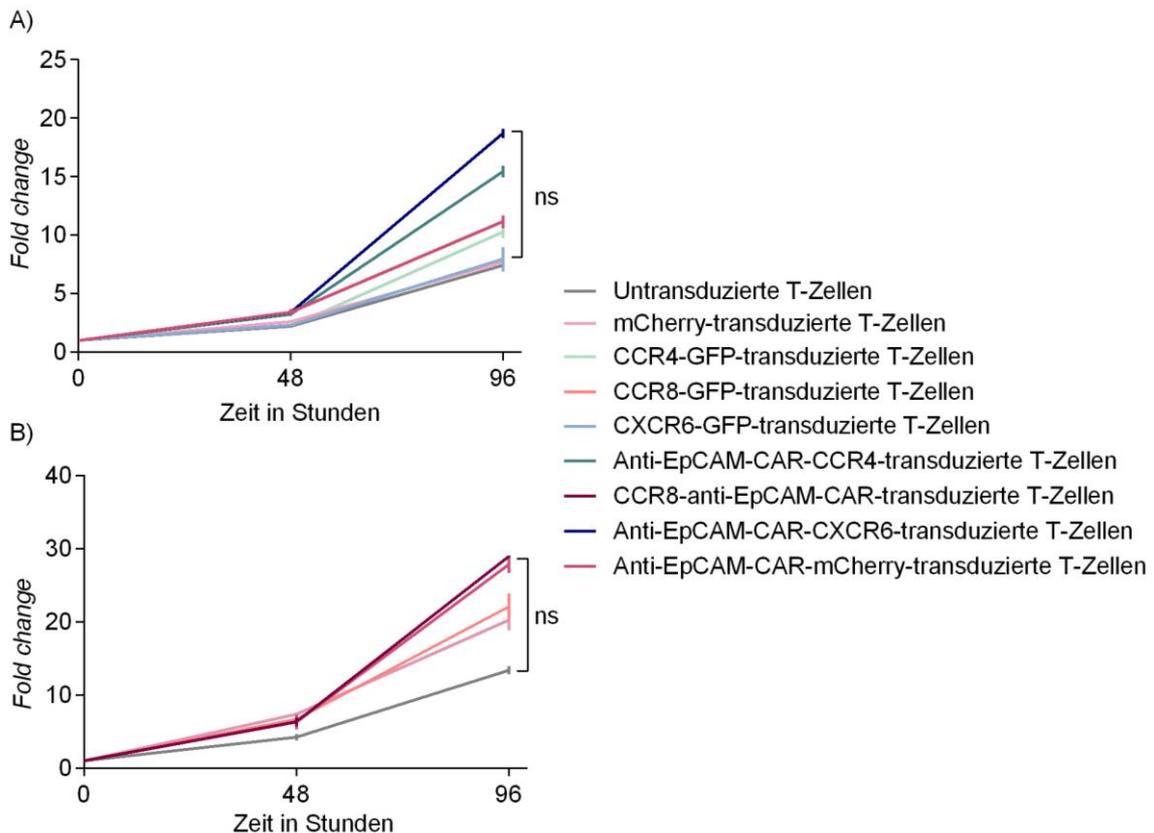


Abbildung 6: Proliferation von anti-EpCAM-CAR- und Chemokinrezeptor-transduzierten T-Zellen verglichen mit der Proliferation untransduzierter T-Zellen.

Transduzierte und untransduzierte T-Zellen wurden 0, 48 und 96 Stunden nach dem Ausplattieren zusammen mit *counting beads* mittels Durchflusszytometrie gezählt. Bei der Auswertung wurden *gates* nach Morphologie gesetzt und die Gesamtzahl der Zellen pro Probe über die Anzahl der gefassten *counting beads* berechnet. Die Ergebnisse wurden mittels One-way ANOVA auf Signifikanz geprüft. ns = nicht signifikant **A)** Gezeigt ist der *fold change* der anti-EpCAM-mCherry-, anti-EpCAM-CCR4- und anti-EpCAM-CXCR6-transduzierten T-Zellen mit Kontrollgruppen. **B)** Gezeigt ist der *fold change* der CCR8-anti-EpCAM-CAR-transduzierten T-Zellen mit Kontrollgruppen. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente mit jeweils drei Replikaten.

3.5 Anti-EpCAM-CAR- und Chemokinrezeptor-transduzierte T-Zellen produzieren nach Erkennung des EpCAM-Antigens IFN- γ

Zur Untersuchung, ob die Kotreduktion von Chemokinrezeptoren und anti-EpCAM-CAR in primäre murine T-Zellen deren Fähigkeit zur Aktivierung beeinflusst, führten wir Kokulturen aus EpCAM-positiven Tumorzellen (Panc02-OVA-EpCAM) und T-Zellen durch. Murine T-Zellen, die nach

retroviraler Transduktion sowohl einen der Chemokinrezeptoren CCR4, CCR8, und CXCR6, als auch den gegen EpCAM gerichteten CAR exprimierten, setzten *in vitro* nach Erkennung des Antigens EpCAM auf Tumorzellen IFN- γ frei. T-Zellen, die mit zwei Rezeptoren transduziert worden waren, produzierten dabei vergleichbare oder höhere Mengen IFN- γ als T-Zellen, die nur den anti-EpCAM-CAR exprimierten (Abbildung 7). Die Zellen produzierten wie erwartet auch IFN- γ , wenn sie durch anti-CD3 und anti-CD28 Antikörper stimuliert wurden, allerdings in signifikant niedrigeren Mengen im Vergleich zu der IFN- γ -Produktion nach Bindung an EpCAM. Bei Abwesenheit von aktivierenden Antikörpern und Tumorzellen blieben die transduzierten T-Zellen inaktiv und produzierten kein IFN- γ , was für die Spezifität des anti-EpCAM-CAR spricht.

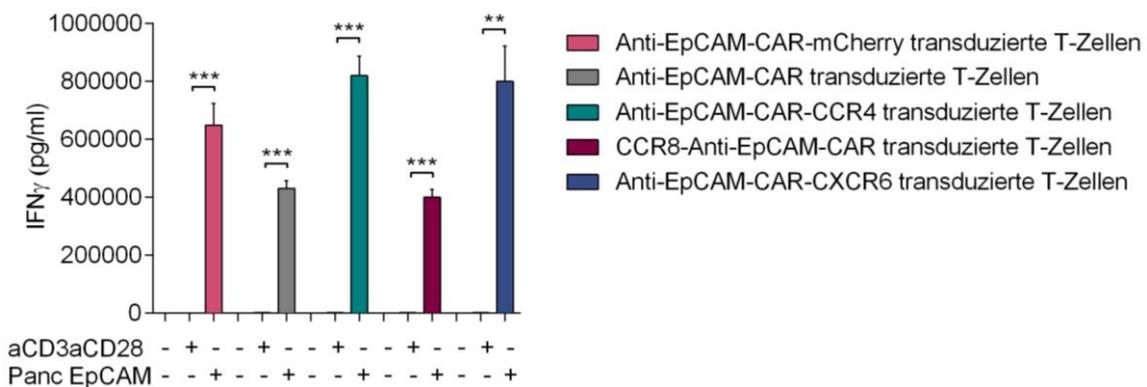


Abbildung 7: IFN- γ -Produktion von T-Zellen, die mit dem anti-EpCAM-CAR und einem Chemokinrezeptor transduziert worden sind. Murine Wildtyp T-Zellen wurden entweder mit anti-EpCAM-CAR, anti-EpCAM-CAR-mCherry, anti-EpCAM-CAR-CCR4, CCR8-anti-EpCAM-CAR oder anti-EpCAM-CAR-CXCR6 transduziert. Nach 96 Stunden Expansion mit IL-15 wurden transduzierte und untransduzierte Zellen in 96-Well-Platten mit aktivierenden Antikörpern, Panc02-OVA-EpCAM-Tumorzellen, oder nur Medium plattiert. Die Abbildung zeigt die absoluten Werte eines IFN- γ -ELISA der Kokulturüberstände. Die Ergebnisse wurden mittels t-Test auf Signifikanz überprüft. Dabei wurde das durch Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern freigesetzte IFN- γ verglichen mit der IFN- γ -Freisetzung bei Kokultur mit EpCAM-positiven Tumorzellen. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente mit jeweils drei Replikaten.

3.6 Anti-EpCAM-CAR- und Chemokinrezeptor-transduzierte T-Zellen sind in der Lage, EpCAM-exprimierende Tumorzellen zu töten

Nachdem festgestellt wurde, dass die transduzierten T-Zellen das Antigen EpCAM erkennen und nach Bindung an dieses IFN- γ produzieren, sollte im nächsten Schritt geprüft werden, ob EpCAM-exprimierende Tumorzellen von den Lymphozyten lysiert werden können. Dafür kamen zwei verschiedene Methoden zum Einsatz, die Messung der LDH-Freisetzung der Tumorzellen und die Messung der Zelladhärenz mittels iCELLigence. Im Vergleich zu den Kokulturen mit unspezifischen T-Zellen konnte eine signifikant höhere Zytotoxizität der T-Zellen, die das anti-EpCAM-CAR und einen der Chemokinrezeptoren CCR4, CCR8 oder CXCR6 exprimierten, beobachtet werden (Abbildung 8). T-Zellen, die nur mit dem chimären Antigenrezeptor transduziert worden waren, zeigten eine signifikant höhere Zytotoxizität als mCherry-transduzierte T-Zellen, während sie sich ungefähr auf dem gleichen Zytotoxizitätsniveau wie anti-EpCAM-CAR-mCherry-transduzierte T-Zellen befanden. Daraus lässt sich schließen, dass die Zytotoxizität gegenüber den Tumorzellen anti-EpCAM-CAR vermittelt ist und nicht beeinträchtigt wird, wenn außer diesem noch ein weiteres Protein auf die Zellen transduziert wird.

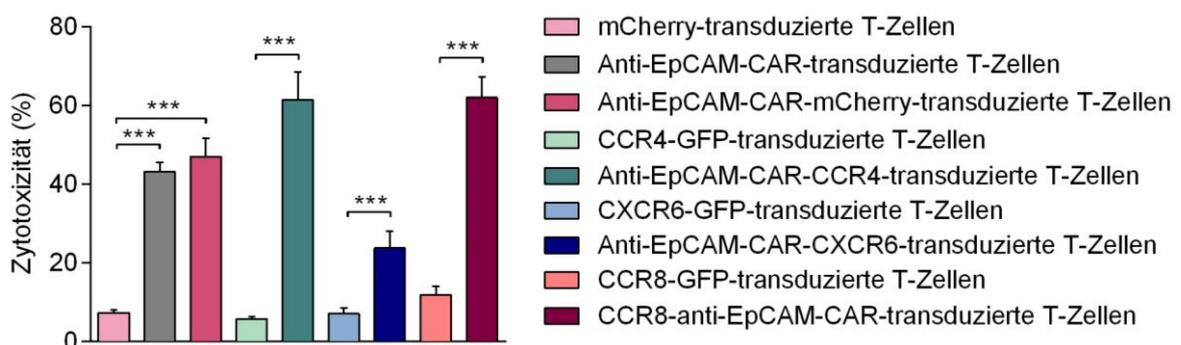


Abbildung 8: Zytotoxizität von T-Zellen, die mit dem anti-EpCAM-CAR und einem Chemokinrezeptor transduziert worden sind, gegenüber Panc02-OVA-EpCAM-Tumorzellen. Murine Wildtyp T-Zellen wurden durch retrovirale Transduktion entweder nur mit einem Chemokinrezeptor (CCR4, CCR8 oder CXCR6), nur mit dem anti-EpCAM-CAR oder sowohl mit einem Chemokinrezeptor als auch mit dem CAR versehen. Die transduzierten T-Zellen wurden 96 Stunden lang mit IL-15 expandiert und anschließend in 96-Well-Platten jeweils mit Panc02-OVA-EpCAM-Tumorzellen und als Kontrolle nur mit Medium ausplattiert. Die Abbildung zeigt die prozentuale Zytotoxizität, die durch die T-Zellen in Kokultur mit Tumorzellen beobachtet wurde. Die Ergebnisse wurden mittels t-Test auf Signifikanz überprüft. Dabei wurden die T-Zellen, die einen Chemokinrezeptor und den anti-EpCAM-CAR exprimieren, verglichen mit den T-Zellen, die den jeweiligen Chemokinrezeptor ohne den CAR exprimieren. Die

anti-EpCAM-CAR- und die anti-EpCAM-CAR-mCherry-transduzierten T-Zellen wurden mit den mCherry-transduzierten Zellen verglichen. *** $p < 0,001$. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente mit jeweils vier Replikaten.

Um die Zytotoxizität der transduzierten T-Zellen gegenüber EpCAM-exprimierenden Tumorzellen mit einer weiteren Methode zu bestätigen, wurde der iCELLigence-Assay genutzt. Vor der Zugabe der transduzierten T-Zellen konnten die Panc02-OVA-EpCAM-Tumorzellen proliferieren bis ein Zellindex zwischen 0,9 und 2,1 erreicht war. Den T-Zellen, die den gegen EpCAM gerichteten CAR exprimierten, gelang es diesen Zellindex auf unter 0,5 zu reduzieren (Abbildung 9). Dadurch, dass auch getötete und abgelöste Tumorzellen eine leichte Impedanz des Elektronenflusses bewirken, kann bei einem Zellindex von unter 0,5 davon ausgegangen werden, dass die Tumorzellen von den T-Zellen vollständig lysiert worden sind. Auch mehrere Stunden später lässt sich kein erneuter Anstieg des Zellindex, verursacht durch mögliche überlebende und proliferierende Tumorzellen, beobachten.

Letztendlich ließ sich durch die Messung der LDH Freisetzung der Tumorzellen und durch den iCELLigence-Assay zeigen, dass die transduzierten T-Zellen nach Antigenerkennung nicht nur aktiviert werden und IFN- γ produzieren, sondern auch zytotoxisch auf die EpCAM-exprimierenden Tumorzellen wirken. Da bis jetzt nur die Wirksamkeit des anti-EpCAM-CAR untersucht worden war, sollte in den nächsten Schritten nachgewiesen werden, ob auch die Chemokinrezeptoren, die zusammen mit dem CAR auf die T-Zellen transduziert wurden, funktionell sind. Dafür kamen Migrations-Assays, bei denen die T-Zellen zu bestimmten Chemokinen wandern sollten, zum Einsatz.

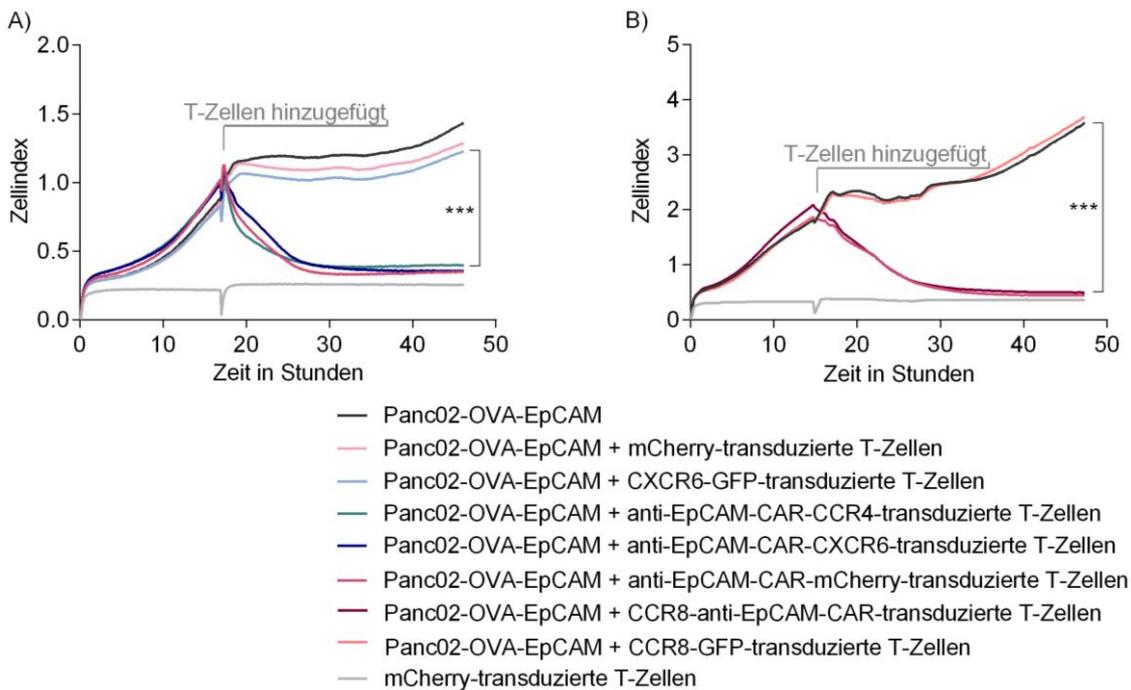


Abbildung 9: Zellindex von Panc02-OVA-EpCAM-Tumorzellen nach dem Ausplattieren und nach der Zugabe von anti-EpCAM-CAR- und Chemokinrezeptor-exprimierenden T-Zellen. Panc02-OVA-EpCAM-Tumorzellen wurden in iCELLigence-Wells ausplattiert. Nach Erreichen eines Zellindex zwischen 0,9 und 2,1 wurden retroviral transduzierte murine T-Zellen, die vorher 96 Stunden lang mit IL-15 expandiert worden waren, zu den Tumorzellen dazugegeben. Die T-Zellen besaßen auf ihrer Oberfläche verschiedene Rezeptorkombinationen. **A)** Die T-Zellen exprimierten nach der Transduktion entweder anti-EpCAM-CAR-CCR4, anti-EpCAM-CAR-CXCR6, anti-EpCAM-CAR-mCherry, CXCR6-GFP oder mCherry. Gezeigt ist der Zellindex im Verlauf von 46 Stunden nach Versuchsbeginn. Als Kontrolle wurden sowohl nur T-Zellen, als auch nur Tumorzellen, als auch Tumorzellen mit T-Zellen, die keinen CAR besitzen, ausplattiert. Die Unterschiede der Zellindexkurven wurden mittels 2way ANOVA auf Signifikanz getestet. Dabei wurden die Chemokinrezeptor- und anti-EpCAM-CAR-exprimierenden T-Zellen verglichen mit den T-Zellen, die nur den Chemokinrezeptor CXCR6 auf ihrer Oberfläche trugen. **B)** Die T-Zellen exprimierten nach der Transduktion entweder CCR8-anti-EpCAM-CAR, anti-EpCAM-CAR-mCherry, CCR8-GFP oder mCherry. Kontrollkonditionen waren transduzierte T-Zellen allein, Tumorzellen allein und Tumorzellen zusammen mit CCR8-transduzierten T-Zellen, die das CAR nicht tragen und die Tumorzellen somit nicht erkennen können. Abgebildet ist der Zellindex im Verlauf der Versuchsdauer von 47 Stunden. Die Unterschiede der Zellindexkurven wurden mittels 2way ANOVA auf Signifikanz getestet. Dabei wurden die Chemokinrezeptor- und anti-EpCAM-CAR-exprimierenden T-Zellen verglichen mit den T-Zellen, die nur den Chemokinrezeptor CCR8 auf ihrer Oberfläche trugen. *** $p < 0,001$. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente mit jeweils zwei Replikaten.

3.7 Chemokinrezeptor- und anti-EpCAM-CAR-transduzierte T-Zellen migrieren in Richtung der zugehörigen Liganden

Zellen, die den Chemokinrezeptor CCR4 exprimieren, sollten zu dem Chemokin CCL22 migrieren. Um zu überprüfen, ob T-Zellen, die sowohl den anti-EpCAM-CAR als auch CCR4 exprimieren, in der Lage sind dies zu tun, wurde ein Migrations-Assay durchgeführt. Dabei wurde eine signifikante Bewegung der kombiniert transduzierten T-Zellen zu CCL22 hin beobachtet (Abbildung 10A). Die Fähigkeit der T-Zellen zur gerichteten Migration erschien im Vergleich zu T-Zellen, die nur mit dem CCR4 transduziert worden waren, nicht eingeschränkt.

Auch T-Zellen, die den anti-EpCAM-CAR und CXCR6 auf ihrer Oberfläche besitzen, wurden mittels Migrations-Assay untersucht. Der Chemokinrezeptor CXCR6 wird durch den Liganden CXCL16 aktiviert und bewirkt eine zielgerichtete Wanderung in Richtung des Chemokins. Bei der Überprüfung der Migration der anti-EpCAM-CAR-CXCR6-transduzierten T-Zellen wanderten diese in das Well mit Medium und CXCL16 signifikant mehr ein, als in das Well, in dem sich nur Medium befand (Abbildung 10B). Daraus lässt sich schließen, dass CXCR6 auch bei kombinierter Transduktion mit dem gegen EpCAM gerichteten CAR funktionell bleibt.

Um letztlich zu überprüfen, ob anti-EpCAM-CAR- und CCR8-transduzierte T-Zellen zu CCL1 hinwandern, wurde auch hier ein Migrations-Assay durchgeführt. Wir konnten eine signifikant erhöhte Wanderung der kombiniert transduzierten T-Zellen zu CCL1 beobachten (Abbildung 10C), woraus wir schlossen, dass der Chemokinrezeptor CCR8 bei gleichzeitiger Transduktion mit dem anti-EpCAM-CAR seine Funktion beibehält.

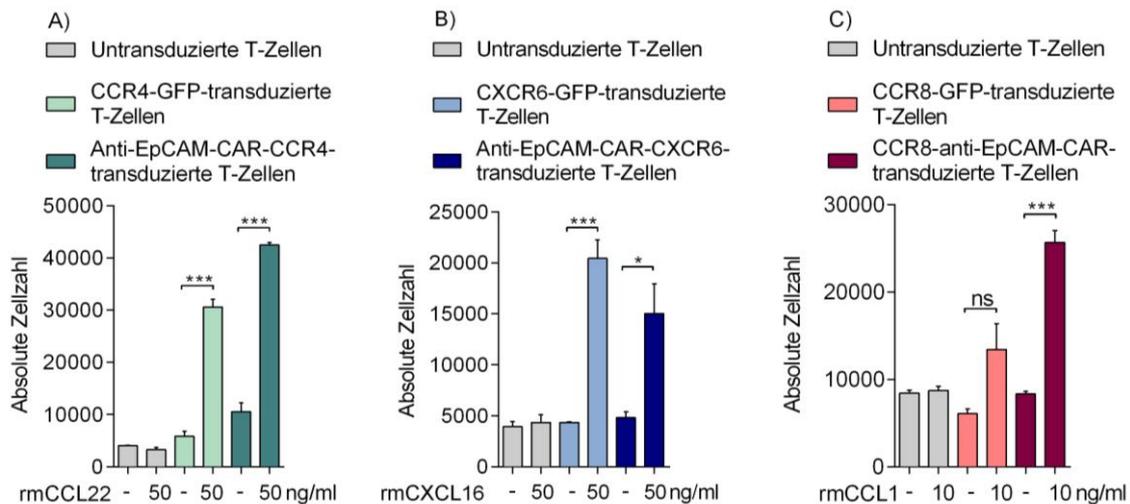


Abbildung 10: Absolute Zahl der in Richtung Chemokinligand migrierten T-Zellen. T-Zellen, die nur einen Chemokinrezeptor (CCR4/CXCR6/CCR8) oder eine Kombination aus Chemokinrezeptor und anti-EpCAM-CAR exprimierten, wurden in die oberen Wells von *Boyden chamber*-Assay Platten gegeben. In die unteren Wells wurde entweder nur Medium oder Medium mit rekombinantem Chemokinrezeptorliganden (CCL22, CXCL16 oder CCL1) pipetiert. Nach sechs Stunden Inkubationszeit wurde der Inhalt der unteren Wells mittels Durchflusszytometrie nach Zugabe von *counting beads* untersucht. In den Abbildungen gezeigt ist die Menge der Zellen, die in Richtung Medium oder Medium mit Chemokin gewandert sind. Die Ergebnisse wurden durch den t-Test auf Signifikanz überprüft, wobei jeweils die Anzahl an Zellen einer Gruppe, die zu dem Chemokin migriert sind, mit der Anzahl an Zellen der gleichen Gruppe, die zum Medium ohne Chemokin migriert sind, verglichen wurde. **A)** Migration der CCR4- und anti-EpCAM-CAR-exprimierenden T-Zellen in Richtung Medium oder Medium mit CCL22. **B)** Migration der CXCR6- und anti-EpCAM-CAR-exprimierenden T-Zellen in Richtung Medium oder Medium mit CXCL16. **C)** Migration der anti-EpCAM-CAR- und CCR8-exprimierenden T-Zellen in Richtung Medium oder Medium mit CCL1. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; ns = nicht signifikant. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente mit jeweils drei Replikaten.

3.8 Wirkung von anti-EpCAM-CAR- und Chemokinrezeptor-transduzierten T-Zellen auf Tumorwachstum *in vivo*

Bei der *in vitro* Untersuchung der doppeltransduzierten T-Zellen stellten wir fest, dass die T-Zellen, die den anti-EpCAM-CAR und zusätzlich einen der Chemokinrezeptoren CCR4, CXCR6 oder CCR8 exprimierten, bei Antigenerkennung aktiviert wurden und Tumorzellen eliminierten. Durch die Expression von CCR4, CCR8 oder CXCR6 wanderten die T-Zellen außerdem zielgerichtet zu dem entsprechenden Liganden hin. Nach dieser *in vitro* Charakterisierung sollte als Nächstes das Verhalten der Zellen in einem Mausmodell untersucht werden. Dafür wurden den Mäusen subkutan EpCAM-positive Tumorzellen gespritzt und bei Erreichen von palpablen Tumoren die intravenöse T-Zell-Therapie verabreicht.

Bei den Mäusen, die nach Entwickeln eines Tumors mit T-Zellen therapiert wurden, die den anti-EpCAM-CAR und zusätzlich entweder den Rezeptor CCR4, CCR8 oder CXCR6 exprimierten, konnte eine signifikante Verringerung des Tumorwachstums gemessen werden (Abbildungen 11 und 12). Die T-Zellen, die anti-EpCAM-CAR und CCR4 oder CXCR6 exprimierten, bewirkten durch die langsamere Größenzunahme der Tumoren auch eine signifikant längere Überlebenszeit der Mäuse. In der Gruppe, die mit anti-EpCAM-CAR- und CXCR6-exprimierenden T-Zellen therapiert wurde, konnten vier Mäuse komplett vom Tumor geheilt werden, bei den Mäusen, die mit anti-EpCAM-CAR- und CCR4-exprimierenden T-Zellen therapiert wurden, waren es zwei. T-Zellen, die CAR und mCherry exprimierten, konnten keine signifikante Verringerung des Tumorwachstums bewirken. Dadurch wird deutlich, dass in diesem Modell erst die Kombination des chimären Antigenrezeptors mit einem Chemokinrezeptor dazu führte, dass die T-Zellen zu den Tumorzellen finden und diese eliminieren konnten.

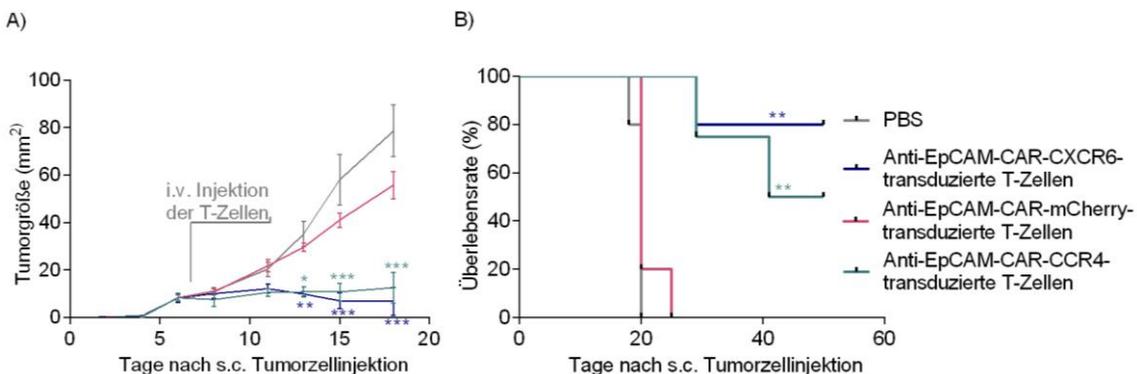


Abbildung 11: Anti-EpCAM-CAR-CXCR6-transduzierte T-Zellen und Anti-EpCAM-CAR-CCR4-transduzierte T-Zellen als Therapie von Panc02-OVA-EpCAM-Tumoren in Mäusen. 20 Mäusen wurden subkutan Panc02-OVA-EpCAM-Tumorzellen injiziert. Sieben Tage nach Injektion wurden die Versuchstiere in vier Gruppen zu je fünf Mäusen eingeteilt. Drei der Gruppen erhielten eine intravenöse Gabe von T-Zellen die sowohl den anti-EpCAM-CAR als auch entweder CCR4, CXCR6 oder mCherry exprimierten. Der vierten Gruppe wurde als Kontrolle PBS intravenös verabreicht. **A)** Gezeigt sind die gemessenen Tumormößen im Verlauf des Experiments. Die Unterschiede der Wachstumskurven wurden mittels 2way ANOVA auf Signifikanz getestet. Dabei wurden die Gruppen, die durch Chemokinrezeptor- und anti-EpCAM-CAR-exprimierende T-Zellen therapiert worden waren, mit der Gruppe, die durch T-Zellen, die anti-EpCAM-CAR und mCherry exprimierten, therapiert worden war, verglichen. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. **B)** Die Abbildung zeigt die Überlebensrate der Versuchstiere im Verlauf der Zeit. Die Unterschiede in der Überlebensdauer wurden mittels Log-rank Test auf Signifikanz überprüft. Auch hier wurden die Mäuse, die mit CAR- und Chemokinrezeptor-exprimierenden T-Zellen therapiert worden waren, mit den Mäusen, denen CAR- und mCherry-exprimierende T-Zellen gespritzt worden waren, verglichen. ** $p < 0,01$. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente mit jeweils fünf Mäusen pro Gruppe.

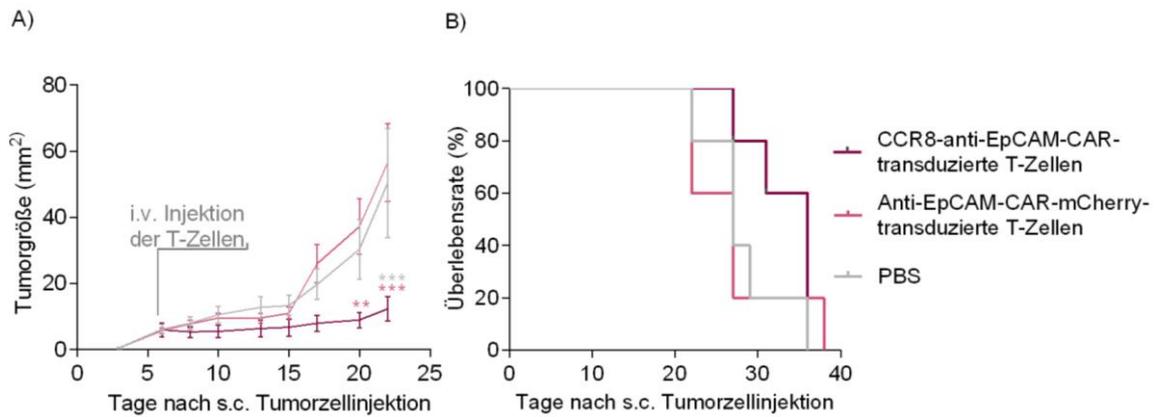


Abbildung 12: CCR8-anti-EpCAM-CAR-exprimierende T-Zellen als Therapie von Panc02-OVA-EpCAM-Tumoren in Mäusen. 15 tumortragende Mäuse wurden in drei gleich große Gruppen eingeteilt. Eine dieser Gruppen erhielt CCR8-anti-EpCAM-CAR-tragende T-Zellen als intravenöse Therapie, eine weitere anti-EpCAM-CAR-mCherry-transduzierte T-Zellen und die dritte Gruppe erhielt PBS als Kontrolle. **A)** Die Abbildung zeigt die gemessenen Tumorgößen im Verlauf des Tierversuchs. Der T-Zell Transfer fand sechs Tage nach subkutaner Tumorzellinjektion statt. Die Unterschiede der Wachstumskurven wurden durch den 2way ANOVA auf Signifikanz getestet. Dabei wurde die mit CCR8-anti-EpCAM-CAR-T-Zellen therapierte Gruppe mit der Gruppe verglichen, der T-Zellen, die den anti-EpCAM-CAR und mCherry exprimierten, verabreicht worden sind. *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$.

(B) Abgebildet ist die Überlebensrate der Versuchstiere im Verlauf des Experiments. Die Unterschiede in der Überlebensdauer wurden mittels Log-rank Test überprüft, allerdings ergab sich hierbei keine Signifikanz. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente mit jeweils fünf Mäusen pro Gruppe.

4 Diskussion

Nachdem die adoptive T-Zell-Therapie in hämatologischen Entitäten bereits zu großen Erfolgen führen konnte, soll in Zukunft auch die Therapie solider Tumoren mit CAR-T-Zellen ermöglicht werden. Neben der immunsuppressiven Tumormikroumgebung und der Gefahr der unerwünschten Nebenwirkungen, stellen auch die zielgerichtete Migration und das Erkennen der Tumorzellen große Herausforderungen dar (Beatty et al. 2016, Zhang et al. 2016). Die beiden letzteren sollten in dieser Arbeit durch die Kombination eines Chemokinrezeptors und eines chimären Antigenrezeptors auf T-Zellen angegangen werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass die kombinierte Expression von einem anti-EpCAM-CAR und einem Chemokinrezeptor auf T-Zellen möglich und sinnvoll ist. Die transduzierten T-Zellen wurden durch die Rezeptoren zu gerichteter Migration und zum Eliminieren von EpCAM-positiven Tumorzellen befähigt. Auch *in vivo* ließ sich nach intravenöser Gabe der transduzierten T-Zellen ein vermindertes Tumorwachstum im Mausmodell beobachten.

4.1 Zusammensetzung des anti-EpCAM-CAR

Ein entscheidender Faktor für die Funktionalität und Persistenz von CAR-T-Zellen *in vivo* sind die verschiedenen kostimulatorischen Domänen (Almasbak et al. 2016, Savoldo et al. 2011, Zhao et al. 2015). Von Kawalekar et al. wurde bereits untersucht, welche Auswirkungen die kostimulatorische intrazelluläre Domäne eines chimären Antigenrezeptors auf die Proliferation und Differenzierung der T-Zellen besitzt. T-Zellen, die einen CAR mit der kostimulatorischen Domäne 4-1BB auf ihrer Oberfläche trugen, zeigten ein längeres Überleben und gesteigerte Expansion verglichen mit T-Zellen, deren CAR als kostimulatorische Domäne CD28 enthielt. Letztere erwiesen sich nach weiterer Analyse vor allem als Effektor-Gedächtnis-T-Zellen, während sich die T-Zellen, die einen 4-1BB enthaltenden CAR exprimierten vor allem zu zentralen Gedächtnis-T-Zellen entwickelten (Kawalekar et al. 2014). Dass in dieser Arbeit ein chimärer Antigenrezeptor mit kostimulatorischer CD28-Domäne zum Einsatz kam, ließ erwarten, dass die transduzierten

T-Zellen sich vor allem zu Effektor-Gedächtnis-T-Zellen differenzierten. *In vitro* konnten wir sehen, dass die Proliferation der CAR-T-Zellen mit der kostimulatorischen Domäne CD28 verglichen mit den untransduzierten T-Zellen unbeeinträchtigt war. In weiterführenden Experimenten wäre es interessant zu überprüfen, ob sich durch Austausch der CD28-Domäne gegen eine 4-1BB-Domäne die Überlebenszeit und die Proliferationsrate der CAR-T-Zellen noch weiter erhöhen lässt, und ob Unterschiede in der Wirksamkeit *in vivo* bestehen.

Auch die anderen Bestandteile der chimären Antigenrezeptoren verdienen Aufmerksamkeit. Beispielsweise scheint die Länge und Zusammensetzung der extrazellulären Gelenkregion die CAR-Funktion zu beeinflussen (Hudecek et al. 2013, Watanabe et al. 2016). Es wurde gezeigt, dass CAR mit einem 229 Aminosäuren langen Volllänge IgG-*spacer* verglichen mit einem aus zwölf Aminosäuren bestehenden *spacer* keine Wirksamkeit gegen Tumorzellen *in vivo* besaßen. Der Grund dafür waren Interaktionen zwischen der Fc-Domäne des *spacers* und den Fc-Rezeptoren myeloischer Zellen, die zum AICD (*activation-induced cell death*) der T-Zellen führten (Hudecek et al. 2015). Die von uns genutzten CAR-T-Zellen besaßen einen 45 Aminosäure langen CD8-*spacer* und zeigten Wirksamkeit gegen Tumorzellen *in vivo*. Um festzustellen, ob die T-Zell-Funktion *in vivo* durch einen anderen *spacer* verbessert oder verschlechtert wird, sind weitere Untersuchungen nötig.

Desweiteren ist die Auswahl der richtigen Transmembrandomäne von Relevanz. So stellten Alabanza und Kollegen fest, dass CAR mit CD28- und CD8 α -Transmembrandomänen zwar eine ähnliche Effektivität *in vivo* zeigten, aber dass die Zytokinproduktion und AICD bei der Nutzung der CD8 α -Transmembrandomäne geringer war (Alabanza et al. 2017). In den *in vivo* Experimenten dieser Arbeit konnten wir sehen, dass der anti-EpCAM-CAR mit der hier genutzten CD8 Gelenkregion und Transmembrandomäne *in vivo* funktionell ist. In weiteren Experimenten könnte durch Modulation der beschriebenen Parameter versucht werden die Effektivität und Persistenz der CAR-T-Zellen weiter zu erhöhen.

4.2 Migration der anti-EpCAM-CAR- und Chemokinrezeptor-transduzierten T-Zellen in Richtung der Chemokinliganden

Bei der adoptiven T-Zell-Therapie hämatologischer Malignome besteht der Vorteil, dass die T-Zellen nach der intravenösen Injektion bereits unmittelbar am Wirkort angekommen sind. Im Gegensatz dazu müssen T-Zellen bei soliden Neoplasien erst den Weg zu den Tumorzellen finden und je nach Tumorlokalisierung verschiedene Hürden überwinden, beispielsweise die Blut-Hirn-Schranke (Fousek et al. 2015) oder peritumorales Bindegewebe (Salmon et al. 2012). Durch die Transduktion der T-Zellen mit passenden Chemokinrezeptoren kann man auf die Migration der T-Zellen in Richtung Tumorgewebe Einfluss nehmen (Slaney et al. 2014, Vignali et al. 2017).

In unseren Experimenten wurde deutlich, dass T-Zellen die mit den Rezeptoren CCR4, CCR8 oder CXCR6 transduziert worden waren, *in vitro* gezielt zu dem entsprechenden Liganden hinwanderten. Dies entsprach auch unseren Erwartungen, nachdem die Interaktionen zwischen Chemokinrezeptor und zugehörigem Liganden bereits beschrieben sind (Imai et al. 1998, Roos et al. 1997, Wilbanks et al. 2001). Zusätzliche Expression des anti-EpCAM-CAR auf den T-Zellen hatte keinen adversen Einfluss auf die Migration (Abbildungen 12 und 20).

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit wird ersichtlich, dass die Transduktion mit Chemokinrezeptoren eine vielversprechende Strategie ist, um CAR-T-Zellen die gezielte Migration in Tumorgewebe zu ermöglichen. Dabei ist es von großer Bedeutung, dass die Chemokinrezeptoren an das vorherrschende Chemokinmilieu des Tumors angepasst sind (Slaney et al. 2014) und dass es für das Chemokin einen ausreichenden Blut-Gewebe Gradienten gibt (Siddiqui et al. 2016). Somit ist es zunächst erforderlich zu bestimmen, welche Liganden in Tumornähe vermehrt vorkommen, um die entsprechenden Chemokinrezeptoren dann auf den T-Zellen zu exprimieren (Kershaw et al. 2002).

4.3 Bedeutung der Chemokine CXCL16, CCL22 und CCL1 in Tumoren

Das Chemokin CXCL16 ist der Ligand für CXCR6 und besitzt die Besonderheit, dass es sowohl in löslicher als auch in membrangebundener Form vorkommt (Hattermann et al. 2016, Matloubian et al. 2000). CXCR6 und CXCL16 sind in verschiedenen Tumorentitäten hochreguliert und korrelieren mit der Malignität des Tumors (Deng et al. 2010). So konnte zum Beispiel festgestellt werden, dass CXCL16 von Bronchialkarzinomzellen produziert wird und deren Invasivität und Lebensfähigkeit *in vitro* unterstützt (Hu et al. 2014). Bestätigt wurde das durch eine andere Arbeitsgruppe, die in Tumorgewebe von Bronchialkarzinompatienten vermehrt CXCL16 messen konnte und feststellte, dass erhöhtes CXCL16 im Tumorgewebe mit einer schlechteren Prognose einherging (Liang et al. 2018). Auch im duktalem Adenokarzinom des Pankreas konnte eine erhöhte CXCL16-Expression gemessen werden. CXCL16 führte hier zu einer signifikant gesteigerten Invasivität der Tumorzellen *in vitro*, was auf ein erhöhtes metastatisches Potential hindeutet (Wente et al. 2008). Die hohe Produktion von CXCL16 in bestimmten Tumoren kann man sich zu Nutze machen, indem man T-Zellen mit dem entsprechenden Chemokinrezeptor CXCR6 ausstattet und ihnen somit den Weg zu den Tumorzellen erleichtert. Diesen Effekt konnten wir auch in unseren *in vivo* Experimenten beobachten, als die T-Zellen, die den anti-EpCAM-CAR und CXCR6 auf ihrer Oberfläche trugen, eine signifikant bessere Wirkung im Vergleich zu den T-Zellen, die nur den CAR exprimierten, zeigten.

Auch CCL22 spielt eine interessante Rolle in der Tumormikroumgebung. CCL22 ist ein Ligand für CCR4, welcher auf CD4⁺ regulatorischen T-Zellen exprimiert wird. Tumorzellen, die vermehrt CCL22 bilden und dadurch regulatorische T-Zellen anlocken, können somit die Schaffung einer immunsuppressiven Tumorumgebung begünstigen (Curiel et al. 2004, Ishida et al. 2006). Dieser Mechanismus scheint beispielsweise die Entstehung und Progression von Brustkrebs zu unterstützen. Es wurde beschrieben, dass regulatorische T-Zellen durch CCL22 in Tumornähe gelenkt werden, dort expandieren, eine immunsuppressive Umgebung schaffen und somit letztendlich die Tumorprogression fördern (Gobert et al. 2009). Außerdem

wurden in Serum von Patientinnen mit Brustkrebs signifikant höhere CCL22-Werte gemessen, als im Serum gesunder Patientinnen. Die Serumspiegel korrelierten mit dem Krebsstadium, sodass bei Brustkrebspatientinnen im Stadium IV die höchsten CCL22-Spiegel gemessen wurden (Jafarzadeh et al. 2015). Auch in anderen Tumorentitäten konnten erhöhte CCL22-Spiegel und damit korrelierend vermehrtes Auftreten von regulatorischen T-Zellen nachgewiesen werden (Maruyama et al. 2010, Mizukami et al. 2008). Wiedemann et al. stellten fest, dass die CCL22-Induktion durch einen IL-1 Rezeptorantagonisten verhindert werden kann, da die Produktion von CCL22 durch tumoreigenes IL-1 angeregt wird (Wiedemann et al. 2016). Durch die Verminderung der CCL22-Produktion in Tumorumgebung lässt sich somit die Immunsuppression durch regulatorische T-Zellen abschwächen. Anstatt die CCL22-Induktion zu hemmen, lässt sich das Chemokin, das eigentlich zu einem Überlebensvorteil der Tumorzellen führt, allerdings auch als Zielpunkt der Migration von T-Zellen nutzen. Tatsächlich konnten wir beobachten, dass die kombinierte Expression von CCR4 und CAR auf T-Zellen zu effektiver Migration und Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* führt.

CCL1 ist ein Agonist für CCR8, einen Chemokinrezeptor der unter anderem auf verschiedenen T-Zell Populationen, Monozyten und NK-Zellen exprimiert wird (Zlotnik et al. 2006). Regulatorische T-Zellen produzieren CCL1, was wiederum die CCR8-Expression auf den Zellen induziert und die immunsuppressive Wirkung der regulatorischen T-Zellen stimuliert. In Hinblick auf Tumorerkrankungen könnte diese positive Rückkopplung dazu beitragen, dass das Gleichgewicht zugunsten der Immunsuppression verschoben wird und der Tumor der Kontrolle des Immunsystems entgeht (Karin 2018). In unseren *in vivo* Experimenten demonstrierten CAR-T-Zellen, die auch CCR8 exprimierten, eine Verlangsamung des Tumorwachstums, was darauf hinweist, dass CCL1 ein geeignetes Chemokin ist, um CAR-T-Zellen in Richtung des Tumors zu lenken. Unsere Beobachtungen werden gestützt durch den Fakt, dass die CCL1-Mengen in verschiedenen Tumorentitäten erhöht sind. So wurden beispielsweise in Brustkrebsproben erhöhte CCL1-Spiegel und ein

vermehrtes Auftreten von regulatorischen T-Zellen detektiert (Kuehnemuth et al. 2018). Pastor und Kollegen untersuchten durch bronchoalveoläre Lavage gewonnene Proben von Rauchern mit und ohne Lungenkarzinom mittels ELISA und Western Blot, wobei die CCL1-Spiegel in den Proben von Patienten mit Lungenkrebs signifikant höher waren als in den Proben von krebsfreien Patienten. Durch die Kombination der Messung von CCL1 und IL-11 in den Proben konnte mit einer Genauigkeit von 96% diagnostiziert werden, ob der jeweilige Patient ein Lungenkarzinom hatte oder nicht (Pastor et al. 2016). Sowohl die erhöhten CCL1-Spiegel in Tumorumgebung als auch unsere *in vivo* Daten sprechen dafür, dass CCL1 ein vielversprechendes Migrationsziel für CAR-T-Zellen ist.

Eine Schwierigkeit bei der therapeutischen Anwendung von CAR-T-Zellen, die zusätzlich einen Chemokinrezeptor exprimieren kann sein, dass nicht alle Tumoren ausreichende Mengen an Chemokinen produzieren, um die Migration von T-Zellen zu bewirken (Slaney et al. 2014). Allerdings gibt es verschiedene Möglichkeiten Chemokine im Tumorgewebe zu induzieren, beispielsweise lässt sich durch PD-1-Blockade die IFN- γ -Menge in der Tumormikroumgebung steigern und dadurch eine erhöhte Konzentration des IFN- γ -induzierbaren CXCL10 bewirken (Peng et al. 2012). Auch durch bestimmte Chemotherapien können veränderte Chemokinprofile in der Tumorumgebung hervorgerufen werden. So induzierte Temozolomid *in vitro* in verschiedenen Melanomzelllinien die Chemokine CCL5, CXCL9 und CXCL10 (Hong et al. 2011). Möglicherweise könnte es in Zukunft auch eine Option sein, T-Zellen genau mit den Chemokinrezeptoren auszustatten, die am besten zum Chemokinmilieu im Tumor eines bestimmten Patienten passen.

4.4 Andere Möglichkeiten der Einflussnahme auf T-Zell-Migration

Neben Chemokin-Chemokinrezeptor Interaktionen wirken noch andere Faktoren auf die Immunzellinfiltration in Tumoren ein. So kann *vascular endothelial growth factor* (VEGF) einerseits immunsuppressiv wirken (Gabrilovich et al. 1998, Mulligan et al. 2009, Ohm et al. 2001), andererseits auch das Tumorendothel verändern und somit eine verschlechterte

Immunzelladhäsion nach sich ziehen (Tromp et al. 2000). Folgerichtig beobachteten Shrimali et al. in einem Mausmodell, dass die Kombination der adoptiven T-Zell-Therapie mit einem anti-VEGF Antikörper zu gesteigerter Extravasation der Immunzellen in den Tumor führt (Shrimali et al. 2010). Da $\alpha_v\beta_3$ -Integrin auf dem Endothel tumorassoziierter Gefäße überexprimiert wird (Desgrosellier et al. 2010, Gasparini et al. 1998), verbanden Legler et al. $\alpha_v\beta_3$ -Liganden durch einen Glykosylphosphatidylinositolanker mit der T-Zell Oberfläche und konnten so in einem murinen Bronchialkarzinommodell gesteigerte T-Zell-Infiltration in Tumorgewebe bewirken (Legler et al. 2004). Auch die Beeinträchtigung der Immunzellinfiltration durch peritumorales Bindegewebe (Salmon et al. 2012) wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen adressiert. Hierbei kamen beispielsweise antifibrotisch wirkende Substanzen wie Pirfenidon zum Einsatz, was in murinen Brustkrebsmodellen zu einer Reduktion des Tumorwachstums führte (Polydorou et al. 2017, Takai et al. 2016). Die Kombination von adoptiver T-Zell-Therapie mit anti-VEGF Antikörpern, $\alpha_v\beta_3$ -Liganden oder antifibrotisch wirkenden Substanzen muss noch untersucht werden, könnte aber in Zukunft eine vielversprechende Möglichkeit sein, die Infiltration der Zellen in Tumorgewebe zu erhöhen.

4.5 Therapeutische Wirksamkeit kombiniert transduzierter T-Zellen *in vivo*

Um zu sehen, ob die Rezeptoren auch in einem Mausmodell eine gesteigerte Tumorkontrolle vermitteln können, führten wir *in vivo* Experimente durch. Verschiedene Arbeitsgruppen haben bereits die Kombination von T-Zell-Rezeptoren und Chemokinrezeptoren *in vivo* untersucht. Peng et al. stellten fest, dass T-Zellen, die TCR-abhängig gegen das Antigen gp100 gerichtet waren, das Tumorwachstum in Mäusen signifikant verringern konnten, wenn die T-Zellen so modifiziert wurden, dass sie den Chemokinrezeptor CXCR2 exprimierten (Peng et al. 2010). Auch Idorn et al. kombinierten CXCR2 mit einem TCR und konnten so eine gesteigerte Infiltration der T-Zellen in Tumorgewebe beobachten (Idorn et al. 2018). T-Zellen, die TCR-abhängig gegen Ovalbumin gerichtet waren und CCR4 exprimierten, infiltrierten vermehrt Tumoren, die CCL22 freisetzen und reduzierten das Tumorwachstum in einem Mausmodell (Rapp et al. 2016). Kombiniert mit dem Chemokinrezeptor CCR2

bewirkten T-Zellen TCR-abhängig eine Verlangsamung des Tumorwachstums *in vivo* (Garetto et al. 2016). Auch die Kombination eines chimären Antigenrezeptors mit einem Chemokinrezeptor wurde von anderen Arbeitsgruppen bereits untersucht. So zeigte die kombinierte Expression eines anti-GD2-CAR mit dem Chemokinrezeptor CCR2 auf T-Zellen eine stärkere Antitumoraktivität *in vivo* als der CAR allein. Durch Biolumineszenz-Bildgebung konnte die Anreicherung der CCR2-tragenden T-Zellen in Tumornähe sichtbar gemacht werden. T-Zellen, die CCR2 nicht überexprimierten zeigten hingegen keine vermehrte Migration in Richtung des Tumors (Craddock et al. 2010). Auch Di Stasi et al. stellten fest, dass T-Zellen, die CCR4 und einen anti-CD30-CAR exprimierten, verglichen mit T-Zellen, die nur einen der beiden Rezeptoren besaßen, eine signifikant gesteigerte Antitumoraktivität aufwiesen (Di Stasi et al. 2009). Eine weitere Arbeitsgruppe konnte nach Anwendung von anti-Mesothelin-CAR- und CCR2-exprimierenden T-Zellen signifikant reduziertes Tumorwachstum *in vivo* beobachten (Moon et al. 2011). Diese Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen der vorliegenden Arbeit. In unseren Experimenten zeigten die anti-EpCAM-CAR-transduzierten T-Zellen ohne Chemokinrezeptor im Gegensatz zu den kombiniert transduzierten T-Zellen keine signifikante Reduktion des Tumorwachstums. Das spricht dafür, dass diese Zellen ohne die Überexpression einer der Chemokinrezeptoren den Tumor nicht in ausreichender Zahl infiltrierte und betont die Notwendigkeit T-Zellen so zu modifizieren, dass sie leichter zu den Tumorzellen hinwandern.

Es fällt auf, dass bis jetzt vor allem die Chemokinrezeptoren CCR2, CCR4 und CXCR2 im Hinblick auf die Steigerung der Tumordinfiltration *in vivo* in Kombination mit T-Zell-Rezeptoren oder chimären Antigenrezeptoren untersucht worden sind. Da CCL2, ein Ligand für CCR2, Untersuchungen zufolge die Tumorprogression und Metastasierung fördert (Lim et al. 2016), erscheint es sinnvoll, diesen Überlebensvorteil der Tumorzellen als Zielchemokin für T-Zellen zu nutzen. Den Chemokinrezeptor CXCR2 auf T-Zellen zu transduzieren liegt ebenfalls nahe, da CXCL1, einer der zugehörigen Liganden, beispielsweise in Melanomen stark exprimiert wird, aber nicht auf T-Zellen selbst (Kershaw et al. 2002, Peng et al. 2010). Durch unsere Arbeit konnten wir zeigen, dass auch die Chemokinrezeptoren CCR8 und

CXCR6 interessante Kandidaten für die Verbesserung der adoptiven T-Zell-Therapie sind. Letztendlich müssen bei der Auswahl des geeigneten Chemokinrezeptors die Tumorentität und das Chemokinmilieu des jeweiligen Tumors beachtet werden.

4.6 Epitheliales Zelladhäsionsmolekül als Zielantigen der adoptiven T-Zell-Therapie

Epitheliales Zelladhäsionsmolekül ist ein Glykoprotein, das an der Oberfläche von verschiedenen Karzinom- und Epithelzellen getragen wird. Wie der Name bereits verdeutlicht, handelt es sich bei EpCAM um ein epithelspezifisches Adhäsionsmolekül. Immunhistochemisch kann eine EpCAM-Überexpression unter anderem in Karzinomen des Endometriums, Magens, Kolons, Ösophagus und Pankreas nachgewiesen werden (Fong et al. 2014, Spizzo et al. 2011). Daher wurde EpCAM zunächst als Tumormarker interessant (Litvinov et al. 1994). Zusätzlich wurden Anstrengungen unternommen, EpCAM als Zielantigen für T-Zell vermittelte Immuntherapien zu nutzen. Dabei wurde gezeigt, dass durch den bispezifischen EpCAMxCD3 Antikörper die Kontaktzeit zwischen Lymphozyten und Tumorzellen verlängert, die IFN- γ Produktion der T-Zellen stimuliert und das Wachstum von Pankreaskarzinomzellen in einem *in vivo* Modell signifikant verlangsamt wurde (Salnikov et al. 2009). Eine weitere Arbeitsgruppe stellte fest, dass primäre humane Mammaepithelzellen, die EpCAM überexprimierten, *in vitro* länger proliferierten und resistenter gegenüber TGF- β 1 induzierter Wachstumshemmung waren, als Zellen ohne Überexpression von EpCAM (Martowicz et al. 2013). Auch die Ansprechrate auf Chemotherapie ist bei EpCAM-überexprimierenden Mamma- und Ovarialkarzinomen erniedrigt, was mit einer schlechteren Prognose einhergeht (Ohashi et al. 2016, Tayama et al. 2017). Die Nutzung von EpCAM als Zielantigen adoptiver T-Zell-Therapien scheint dahingehend interessant, dass dabei ein Überlebensvorteil der Tumorzellen direkt angegriffen wird. Chimäre Antigenrezeptoren, die gegen EpCAM gerichtet sind, wurden bereits *in vitro und in vivo* in verschiedenen Tumormodellen, zum Beispiel Prostatakarzinom und Peritonealkarzinose, getestet (Ang et al. 2017, Deng et al. 2015). Da epitheliales Zelladhäsionsmolekül aber nicht nur auf Karzinomzellen, sondern

auch in gesunden Epithelien vorkommt, muss stets das Risiko gravierender Nebenwirkungen beachtet werden. Bei einer Phase-I-Studie des monoklonalen anti-EpCAM Antikörpers ING-1 kam es bei manchen Patienten zu Pankreatitiden (Goel et al. 2007). Die Phase-I-Studie des bispezifischen monoklonalen Antikörpers Catumaxomab, der gegen EpCAM und CD3 gerichtet ist, musste abgebrochen werden, als das Medikament bei einem Patienten durch akutes Leberversagen zum Tod führte (Mau-Sorensen et al. 2015). In dieser Arbeit nutzten wir EpCAM als Zielstruktur für den chimären Antigenrezeptor um zu zeigen, dass die Kombination eines CAR mit einem Chemokinrezeptor auf T-Zellen grundsätzlich möglich ist und um zu sehen, ob sich dadurch in einem Mausmodell die Elimination von EpCAM-positiven Tumorzellen steigert. Um in Zukunft für den Patienten besser verträgliche Immuntherapien durchführen zu können ist es wichtig, spezifischere Tumorantigene als EpCAM zu identifizieren.

4.7 Mögliche Ansätze zur Überwindung von Hindernissen bei der Immuntherapie solider Tumoren in der Zukunft

In dieser Arbeit wurde demonstriert, dass die kombinierte Expression eines chimären Antigenrezeptors und eines Chemokinrezeptors die tumorgerichtete T-Zell-Migration und Eliminierung der Tumorzellen in Mäusen steigert. Um auch der immunsuppressiven Umgebung des Tumors entgegenzusteuern, könnte man diese beiden Rezeptoren zusätzlich mit *checkpoint*-Inhibitoren (Cherkassky et al. 2016, Chong et al. 2017) oder der Expression eines *dominant-negative* TGF- β Rezeptors verbinden (Kloss et al. 2018). Das TGF- β in Tumorumgebung würde dabei an den *dominant-negative* TGF- β Rezeptor binden, aber keinen immunsuppressiven Effekt haben, da der intrazelluläre Anteil des Rezeptors verkürzt ist (Bollard et al. 2002, Foster et al. 2008). Hierzu wurden bereits Phase-1 Studien ins Leben gerufen, die die Effekte chimärer Antigenrezeptoren kombiniert mit *dominant-negative* TGF- β Rezeptor in HER2-positiven Malignomen (NCT00889954, zugegriffen am 21.08.2019) und in Prostatakarzinomen (NCT03089203, zugegriffen am 21.08.2019) untersuchen. Einen Schritt weiter geht man mit dem Versuch, immunsuppressive Signale nicht nur zu blockieren, sondern in aktivierende Signale umzuwandeln. Hierfür

kann ein chimärer Zytokinrezeptor generiert werden, der zum Beispiel aus dem extrazellulären Anteil des IL-4 Rezeptors und dem intrazellulären Anteil des IL-7 Rezeptors besteht (Leen et al. 2014). Des Weiteren führten IL-7 Rezeptoren, die so verändert wurden, dass sie die T-Zellen dauerhaft stimulieren, in Kombination mit einem CAR in einem Mausmodell zu gesteigerter Tumorkontrolle (Shum et al. 2017).

Während CD19 als Zielantigen der AZT von B-Zell-Malignomen den Vorteil bietet, dass sich dessen Expression bei gesunden Zellen auf die B-Zelllinie beschränkt (Sadelain 2015), stellt der Mangel spezifischer und sicherer Zielantigene in soliden Entitäten immer noch ein Problem dar, das durch Tumorerogenität und Antigenverlust noch weiter verschärft wird (Fousek et al. 2015, Landsberg et al. 2012). Daher sind auch in diesem Bereich neue Strategien von großer Bedeutung. Eine mögliche Lösung für diese Problematik könnten CAR sein, bei denen zwei oder mehr bestimmte Antigene auf den Tumorzellen vorhanden sein müssen, um die T-Zellen zu aktivieren (Kloss et al. 2013, Roybal et al. 2016, Wilkie et al. 2012). Außerdem könnte das Nutzen von durch tumorspezifische Mutationen entstandenen Neoantigenen als Zielstrukturen der Rezeptoren in Zukunft zur erhöhten Spezifität der CAR beitragen (Blankenstein et al. 2015).

Auch im Bereich der Sicherheit der adoptiven T-Zell-Therapie werden Verbesserungen angestrebt. Um lebensbedrohliche Nebenwirkungen wie einen Zytokinsturm oder das Tumor-Lyse-Syndrom zu vermeiden, muss die maximal tolerierte Therapiedosis ermittelt werden (Lee et al. 2015) und der Transfusionszeitplan angepasst werden (Fujiwara 2014). Um bei auftretenden Nebenwirkungen eine Möglichkeit zu haben, die T-Zellen schnell zu inaktivieren, ist es sinnvoll, einen *safety switch* einzubauen. Beispielsweise führt die induzierbare Caspase 9 nach Verabreichung des Medikaments AP1903 zu einer schnellen Induktion der Apoptose in den transduzierten T-Zellen (Di Stasi et al. 2011, Gargett et al. 2014). 4SCAR-GD2-T-Zellen, die einen gegen GD2 gerichteten CAR und eine induzierbare Caspase 9 enthalten, demonstrierten in einer Phase-II-Studie Sicherheit und Effektivität in der Neuroblastomtherapie (Yang et al. 2017). Auch die Herpes-Simplex-Virus Thymidinkinase kann als

Suizidgen eingefügt werden, sodass die Gabe von Ganciclovir zur Apoptose der T-Zellen führt (Elahi et al. 2018, Jensen et al. 2010, Jones et al. 2014).

Um letztendlich die Vielfalt der Hindernisse einer effektiven und sicheren adoptiven T-Zell-Therapie zu überwinden, macht es Sinn mehrere Verbesserungsansätze miteinander zu kombinieren (Ramello et al. 2018). Dabei könnte es besonders bedeutsam werden, die Immuntherapie in Zukunft immer mehr an den jeweiligen Patienten anzupassen und zu personalisieren (Bethune et al. 2017, Kakimi et al. 2017, Mandal et al. 2016)

5 Zusammenfassung

Die Immuntherapie mit CAR-T-Zellen stellt eine vielversprechende Behandlungsmöglichkeit für Krebserkrankungen dar. Da die Erfolge der adoptiven T-Zell-Therapie bislang im Bereich der hämatologischen Malignome gelungen sind, gilt es diese nun auch auf solide Entitäten auszuweiten. Einer der Faktoren, der die Immuntherapie von soliden Tumoren erschwert, ist die mangelnde Migration der T-Zellen in das entartete Gewebe. Um dieses Hindernis zu überwinden, transduzierten wir murine anti-EpCAM-CAR-T-Zellen zusätzlich mit einem der Chemokinrezeptoren CCR4, CCR8 oder CXCR6. Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob die T-Zellen durch diese Modifikation *in vitro* zu den entsprechenden Chemokinen hinwandern und EpCAM-positive Panc02-OVA-EpCAM-Tumorzellen infolgedessen eliminieren können. Zusätzlich war zu untersuchen, ob die *in vivo* Tumorkontrolle durch kombiniert transduzierte T-Zellen verglichen mit T-Zellen, die nur einen CAR exprimieren, verbessert ist.

Zunächst untersuchten wir die Funktion der T-Zellen *in vitro*. Die Fähigkeit der Zellen zur Proliferation war durch die Transduktion unbeeinträchtigt, außerdem produzierten die CAR-T-Zellen bei Erkennung des Antigens EpCAM IFN- γ . Bei den kombiniert transduzierten T-Zellen ließen sich sowohl Migration in Richtung des jeweiligen Liganden, als auch Zytotoxizität gegenüber EpCAM-positiven Panc02-OVA-EpCAM-Tumorzellen beobachten. *In vivo* zeigten die kombiniert transduzierten T-Zellen eine Verlangsamung oder sogar einen Rückgang des Tumorwachstums, während dieser Effekt bei CAR-T-Zellen, die keinen Chemokinrezeptor überexprimierten, nicht zu erkennen war.

Zusammenfassend beobachteten wir durch die kombinierte Expression eines CAR und eines Chemokinrezeptors auf T-Zellen positive Effekte auf die Migration und Zytotoxizität der Zellen. Durch unsere Ergebnisse wird deutlich, wie wichtig die Steigerung der zielgerichteten T-Zell-Migration ist, um *in vivo* zufriedenstellende zytotoxische Effekte adoptiver T-Zell-Therapie auf den Tumor zu erreichen.

6 Literaturverzeichnis

Ahmed N, Brawley V, Hegde M, et al. HER2-specific chimeric antigen receptor-modified virus-specific T cells for progressive glioblastoma: a phase 1 dose-escalation trial.

JAMA Oncol 2017;3:1094-101.

Alabanza L, Pegues M, Geldres C, Shi V, Wiltzius JJW, Sievers SA, Yang S, Kochenderfer JN. Function of novel anti-CD19 chimeric antigen receptors with human variable regions is affected by hinge and transmembrane domains.

Mol Ther 2017;25:2452-65.

Almasbak H, Aarvak T, Vemuri MC. CAR T cell therapy: a game changer in cancer treatment.

J Immunol Res 2016;2016:5474602.

Ang WX, Li Z, Chi Z, Du SH, Chen C, Tay JC, Toh HC, Connolly JE, Xu XH, Wang S. Intraperitoneal immunotherapy with T cells stably and transiently expressing anti-EpCAM CAR in xenograft models of peritoneal carcinomatosis.

Oncotarget 2017;8:13545-59.

Beatty GL, O'Hara M. Chimeric antigen receptor-modified T cells for the treatment of solid tumors: Defining the challenges and next steps.

Pharmacol Ther 2016;166:30-9.

Beavis PA, Slaney CY, Kershaw MH, Gyorki D, Neeson PJ, Darcy PK. Reprogramming the tumor microenvironment to enhance adoptive cellular therapy.

Semin Immunol 2016;28:64-72.

Bernardini G, Ribatti D, Spinetti G, Morbidelli L, Ziche M, Santoni A, Capogrossi MC, Napolitano M. Analysis of the role of chemokines in angiogenesis.

J Immunol Methods 2003;273:83-101.

Bethune MT, Joglekar AV. Personalized T cell-mediated cancer immunotherapy: Progress and challenges.

Curr Opin Biotechnol 2017;48:142-52.

Blankenstein T, Leisegang M, Uckert W, Schreiber H. Targeting cancer-specific mutations by T cell receptor gene therapy.

Curr Opin Immunol 2015;33:112-9.

Bollard CM, Rossig C, Calonge MJ, Huls MH, Wagner HJ, Massague J, Brenner MK, Heslop HE, Rooney CM. Adapting a transforming growth factor beta-related tumor protection strategy to enhance antitumor immunity.

Blood 2002;99:3179-87.

Bonini C, Mondino A. Adoptive T-cell therapy for cancer: The era of engineered T cells.

Eur J Immunol 2015;45:2457-69.

Brown CE, Alizadeh D, Starr R, Weng L, Wagner JR, Naranjo A, Ostberg JR, Blanchard MS, Kilpatrick J, Simpson J, Kurien A, Priceman SJ, Wang X, Harshbarger TL, D'Apuzzo M, Ressler JA, Jensen MC, Barish ME, Chen M, Portnow J, Forman SJ, Badie B. Regression of glioblastoma after chimeric antigen receptor T-cell therapy.
N Engl J Med 2016;375:2561-9.

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.
J Immunol 2007;179:3332-41.

Cadilha B, Dorman K, Rataj F, Endres S, Kobold S. Enabling T cell recruitment to tumours as a strategy for improving adoptive T cell therapy.
Europ Oncol Hematol 2017;13:66-73.

Cherkassky L, Morello A, Villena-Vargas J, Feng Y, Dimitrov DS, Jones DR, Sadelain M, Adusumilli PS. Human CAR T cells with cell-intrinsic PD-1 checkpoint blockade resist tumor-mediated inhibition.
J Clin Invest 2016;126:3130-44.

Chmielewski M, Hombach A, Abken H. Of CARs and TRUCKs: Chimeric antigen receptor (CAR) T cells engineered with an inducible cytokine to modulate the tumor stroma.
Immunol Rev 2014;257:83-90.

Chong EA, Melenhorst JJ, Lacey SF, Ambrose DE, Gonzalez V, Levine BL, June CH, Schuster SJ. PD-1 blockade modulates chimeric antigen receptor (CAR)-modified T cells: Refueling the CAR.
Blood 2017;129:1039-41.

Chow MT, Luster AD. Chemokines in cancer.
Cancer Immunol Res 2014;2:1125-31.

Coiffier B, Haioun C, Ketterer N, Engert A, Tilly H, Ma D, Johnson P, Lister A, Feuring-Buske M, Radford JA, Capdeville R, Diehl V, Reyes F. Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) for the treatment of patients with relapsing or refractory aggressive lymphoma: A multicenter phase II study.
Blood 1998;92:1927-32.

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.
J Immunother 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.
Nat Med 2004;10:942-9.

Davenport AJ, Cross RS, Watson KA, Liao Y, Shi W, Prince HM, Beavis PA, Trapani JA, Kershaw MH, Ritchie DS, Darcy PK, Neeson PJ, Jenkins MR. Chimeric antigen receptor T cells form nonclassical and potent immune synapses driving rapid cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018;115:E2068-E76.

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

Deng Z, Wu Y, Ma W, Zhang S, Zhang YQ. Adoptive T-cell therapy of prostate cancer targeting the cancer stem cell antigen EpCAM. *BMC Immunol* 2015;16:1.

Desgrosellier JS, Cheresh DA. Integrins in cancer: Biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 2010;10:9-22.

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.

Di Stasi A, Tey SK, Dotti G, Fujita Y, Kennedy-Nasser A, Martinez C, Straathof K, Liu E, Durett AG, Grilley B, Liu H, Cruz CR, Savoldo B, Gee AP, Schindler J, Krance RA, Heslop HE, Spencer DM, Rooney CM, Brenner MK. Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *N Engl J Med* 2011;365:1673-83.

Elahi R, Khosh E, Tahmasebi S, Esmaeilzadeh A. Immune cell hacking: Challenges and clinical approaches to create smarter generations of chimeric antigen receptor T cells. *Front Immunol* 2018;9:1717.

Fesnak AD, June CH, Levine BL. Engineered T cells: The promise and challenges of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2016;16:566-81.

Fong D, Seeber A, Terracciano L, Kasal A, Mazzoleni G, Lehne F, Gastl G, Spizzo G. Expression of EpCAM(MF) and EpCAM(MT) variants in human carcinomas. *J Clin Pathol* 2014;67:408-14.

Foster AE, Dotti G, Lu A, Khalil M, Brenner MK, Heslop HE, Rooney CM, Bollard CM. Antitumor activity of EBV-specific T lymphocytes transduced with a dominant negative TGF-beta receptor. *J Immunother* 2008;31:500-5.

Fousek K, Ahmed N. The evolution of T-cell therapies for solid malignancies. *Clin Cancer Res* 2015;21:3384-92.

Frick VO, Rubie C, Keilholz U, Ghadjar P. Chemokine/chemokine receptor pair CCL20/CCR6 in human colorectal malignancy: An overview.
World J Gastroenterol 2016;22:833-41.

Fujiwara H. Adoptive T-cell therapy for hematological malignancies using T cells gene-modified to express tumor antigen-specific receptors.
Int J Hematol 2014;99:123-31.

Gabrilovich D, Ishida T, Oyama T, Ran S, Kravtsov V, Nadaf S, Carbone DP. Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo.
Blood 1998;92:4150-66.

Gajewski TF. Failure at the effector phase: immune barriers at the level of the melanoma tumor microenvironment.
Clin Cancer Res 2007;13:5256-61.

Gao J, Li ZH, Tang W, Wu QN, Liu GH, Zheng WB. Chemokine C-C motif ligand 18 expression correlates with tumor malignancy in breast cancer.
Pathol Biol 2015;63:199-203.

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;7:43010-26.

Gargett T, Brown MP. The inducible caspase-9 suicide gene system as a "safety switch" to limit on-target, off-tumor toxicities of chimeric antigen receptor T cells.
Front Pharmacol 2014;5:235.

Gasparini G, Brooks PC, Biganzoli E, Vermeulen PB, Bonoldi E, Dirix LY, Ranieri G, Miceli R, Cheresch DA. Vascular integrin alpha(v)beta3: a new prognostic indicator in breast cancer.
Clin Cancer Res 1998;4:2625-34.

Gobert M, Treilleux I, Bendriss-Vermare N, Bachelot T, Goddard-Leon S, Arfi V, Biota C, Doffin AC, Durand I, Olive D, Perez S, Pasqual N, Faure C, Ray-Coquard I, Puisieux A, Caux C, Blay JY, Menetrier-Caux C. Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome.
Cancer Res 2009;69:2000-9.

Goel S, Bauer RJ, Desai K, Bulgaru A, Iqbal T, Strachan BK, Kim G, Kaubisch A, Vanhove GF, Goldberg G, Mani S. Pharmacokinetic and safety study of subcutaneously administered weekly ING-1, a human engineered monoclonal antibody targeting human EpCAM, in patients with advanced solid tumors.
Ann Oncol 2007;18:1704-7.

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 Res 2009;69:3077-85.

Harris DT, Kranz DM. Adoptive T cell therapies: A comparison of T cell receptors and chimeric antigen receptors.
Trends Pharmacol Sci 2016;37:220-30.

Hattermann K, Gebhardt H, Krossa S, Ludwig A, Lucius R, Held-Feindt J, Mentlein R. Transmembrane chemokines act as receptors in a novel mechanism termed inverse signaling.
Elife 2016;5:e10820.

Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, Akerley W, van den Eertwegh AJ, Lutzky J, Lorigan P, Vaubel JM, Linette GP, Hogg D, Ottensmeier CH, Lebbe C, Peschel C, Quirt I, Clark JI, Wolchok JD, Weber JS, Tian J, Yellin MJ, Nichol GM, Hoos A, Urba WJ. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma.
N Engl J Med 2010;363:711-23.

Hong M, Puaux AL, Huang C, Loumagne L, Tow C, Mackay C, Kato M, Prevost-Blondel A, Avril MF, Nardin A, Abastado JP. Chemotherapy induces intratumoral expression of chemokines in cutaneous melanoma, favoring T-cell infiltration and tumor control.
Cancer Res 2011;71:6997-7009.

Howard SC, Jones DP, Pui CH. The tumor lysis syndrome.
N Engl J Med 2011;364:1844-54.

Hu W, Liu Y, Zhou W, Si L, Ren L. CXCL16 and CXCR6 are coexpressed in human lung cancer in vivo and mediate the invasion of lung cancer cell lines in vitro.
PLoS One 2014;9:e99056.

Hudecek M, Lupo-Stanghellini MT, Kosasih PL, Sommermeyer D, Jensen MC, Rader C, Riddell SR. Receptor affinity and extracellular domain modifications affect tumor recognition by ROR1-specific chimeric antigen receptor T cells.
Clin Cancer Res 2013;19:3153-64.

Hudecek M, Sommermeyer D, Kosasih PL, Silva-Benedict A, Liu L, Rader C, Jensen MC, Riddell SR. The nonsignaling extracellular spacer domain of chimeric antigen receptors is decisive for in vivo antitumor activity.
Cancer Immunol Res 2015;3:125-35.

Idorn M, Skadborg SK, Kellermann L, Halldorsdottir HR, Holmen Olofsson G, Met O, Thor Straten P. Chemokine receptor engineering of T cells with CXCR2 improves homing towards subcutaneous human melanomas in xenograft mouse model.
Oncoimmunology 2018;7:e1450715.

Imai T, Chantry D, Raport CJ, Wood CL, Nishimura M, Godiska R, Yoshie O, Gray PW. Macrophage-derived chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor 4.
J Biol Chem 1998;273:1764-8.

Ishida T, Ishii T, Inagaki A, Yano H, Komatsu H, Iida S, Inagaki H, Ueda R. Specific recruitment of CC chemokine receptor 4-positive regulatory T cells in Hodgkin lymphoma fosters immune privilege.
Cancer Res 2006;66:5716-22.

Jafarzadeh A, Fooladseresht H, Minaee K, Bazrafshani MR, Khosravimashizi A, Nemati M, Mohammadizadeh M, Mohammadi MM, Ghaderi A. Higher circulating levels of chemokine CCL22 in patients with breast cancer: evaluation of the influences of tumor stage and chemokine gene polymorphism.
Tumour Biol 2015;36:1163-71.

Jensen MC, Popplewell L, Cooper LJ, DiGiusto D, Kalos M, Ostberg JR, Forman SJ. Antitransgene rejection responses contribute to attenuated persistence of adoptively transferred CD20/CD19-specific chimeric antigen receptor redirected T cells in humans.
Biol Blood Marrow Transplant 2010;16:1245-56.

Jones BS, Lamb LS, Goldman F, Di Stasi A. Improving the safety of cell therapy products by suicide gene transfer.
Front Pharmacol 2014;5:254.

June CH. Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic.
J Clin Invest 2007;117:1466-76.

Kakimi K, Karasaki T, Matsushita H, Sugie T. Advances in personalized cancer immunotherapy.
Breast Cancer 2017;24:16-24.

Kalos M, June CH. Adoptive T cell transfer for cancer immunotherapy in the era of synthetic biology.
Immunity 2013;39:49-60.

Karin N. Chemokines and cancer: new immune checkpoints for cancer therapy.
Curr Opin Immunol 2018;51:140-5.

Kawalekar OU, O'Connor R, Guedan S, Fraietta J, Posey AD, Scholler J, Milone MC, June CH. Signaling domain of chimeric antigen receptors can reprogram T cells.
Blood 2014;124:551-.

Kerkar SP, Goldszmid RS, Muranski P, Chinnasamy D, Yu Z, Reger RN, Leonardi AJ, Morgan RA, Wang E, Marincola FM, Trinchieri G, Rosenberg SA, Restifo NP. IL-12 triggers a programmatic change in dysfunctional myeloid-derived cells within mouse tumors.
J Clin Invest 2011;121:4746-57.

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. *Hum Gene Ther* 2002;13:1971-80.

Kloss CC, Condomines M, Cartellieri M, Bachmann M, Sadelain M. Combinatorial antigen recognition with balanced signaling promotes selective tumor eradication by engineered T cells. *Nat Biotechnol* 2013;31:71-5.

Kloss CC, Lee J, Zhang A, Chen F, Melenhorst JJ, Lacey SF, Maus MV, Fraietta JA, Zhao Y, June CH. Dominant-negative TGF-beta receptor enhances PSMA-targeted human CAR T cell proliferation and augments prostate cancer eradication. *Mol Ther* 2018;26:1855-66.

Kuehnemuth B, Piseddu I, Wiedemann GM, Lauseker M, Kuhn C, Hofmann S, Schmoeckel E, Endres S, Mayr D, Jeschke U, Anz D. CCL1 is a major regulatory T cell attracting factor in human breast cancer. *BMC Cancer* 2018;18:1278.

Landsberg J, Kohlmeyer J, Renn M, Bald T, Rogava M, Cron M, Fatho M, Lennerz V, Wolfel T, Holzel M, Tuting T. Melanomas resist T-cell therapy through inflammation-induced reversible dedifferentiation. *Nature* 2012;490:412-6.

Lee DW, Kochenderfer JN, Stetler-Stevenson M, Cui YK, Delbrook C, Feldman SA, Fry TJ, Orentas R, Sabatino M, Shah NN, Steinberg SM, Stroncek 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;385:517-28.

Leen AM, Sukumaran S, Watanabe N, Mohammed S, Keirnan J, Yanagisawa R, Anurathapan U, Rendon D, Heslop HE, Rooney CM, Brenner MK, Vera JF. Reversal of tumor immune inhibition using a chimeric cytokine receptor. *Mol Ther* 2014;22:1211-20.

Legler DF, Johnson-Leger C, Wiedle G, Bron C, Imhof BA. The alpha v beta 3 integrin as a tumor homing ligand for lymphocytes. *Eur J Immunol* 2004;34:1608-16.

Liang K, Liu Y, Eer D, Liu J, Yang F, Hu K. High CXC chemokine ligand 16 (CXCL16) expression promotes proliferation and metastasis of lung cancer via regulating the NF-kappaB pathway. *Med Sci Monit* 2018;24:405-11.

Lim SY, Yuzhalin AE, Gordon-Weeks AN, Muschel RJ. Targeting the CCL2-CCR2 signaling axis in cancer metastasis. *Oncotarget* 2016;7:28697-710.

Litvinov SV, Velders MP, Bakker HA, Fleuren GJ, Warnaar SO. Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol* 1994;125:437-46.

Louis C, Savoldo B, Dotti G. Antitumor activity and long-term fate of chimeric antigen receptor–positive T cells in patients with neuroblastoma. *Blood* 2011;118.

Mandal R, Chan TA. Personalized oncology meets immunology: The path toward precision immunotherapy. *Cancer Discov* 2016;6:703-13.

Martowicz A, Rainer J, Lelong J, Spizzo G, Gastl G, Untergasser G. EpCAM overexpression prolongs proliferative capacity of primary human breast epithelial cells and supports hyperplastic growth. *Mol Cancer* 2013;12:56.

Maruyama T, Kono K, Izawa S, Mizukami Y, Kawaguchi Y, Mimura K, Watanabe M, Fujii H. CCL17 and CCL22 chemokines within tumor microenvironment are related to infiltration of regulatory T cells in esophageal squamous cell carcinoma. *Dis Esophagus* 2010;23:422-9.

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

Mau-Sorensen M, Dittrich C, Dienstmann R, Lassen U, Buchler W, Martinius H, Tabernero J. A phase I trial of intravenous catumaxomab: a bispecific monoclonal antibody targeting EpCAM and the T cell coreceptor CD3. *Cancer Chemother Pharmacol* 2015;75:1065-73.

Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, et al. Tisagenlecleucel in children and young adults with B-cell lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2018;378:439-48.

Maus MV, June CH. Making better chimeric antigen receptors for adoptive T-cell therapy. *Clin Cancer Res* 2016;22:1875-84.

Mizukami Y, Kono K, Kawaguchi Y, Akaike H, Kamimura K, Sugai H, Fujii H. CCL17 and CCL22 chemokines within tumor microenvironment are related to accumulation of Foxp3+ regulatory T cells in gastric cancer. *Int J Cancer* 2008;122:2286-93.

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. *Clin Cancer Res* 2011;17:4719-30.

Morello A, Sadelain M, Adusumilli PS. Mesothelin-targeted CARs: Driving T cells to solid tumors.

Cancer Discov 2016;6:133-46.

Morgan RA, Yang JC, Kitano M, Dudley ME, Laurencot CM, Rosenberg SA. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2.

Mol Ther 2010;18:843-51.

Mulligan JK, Day TA, Gillespie MB, Rosenzweig SA, Young MR. Secretion of vascular endothelial growth factor by oral squamous cell carcinoma cells skews endothelial cells to suppress T-cell functions.

Hum Immunol 2009;70:375-82.

Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, et al. Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma.

N Engl J Med 2017;377:2531-44.

O'Leary MC, Lu X, Huang Y, Lin X, Mahmood I, Przepiorka D, Gavin D, Lee S, Liu K, George B, Bryan W, Theoret MR, Pazdur R. FDA approval summary: Tisagenlecleucel for treatment of patients with relapsed or refractory B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia.

Clin Cancer Res 2019;25:1142-6.

Ohashi R, Kawahara K, Fujii T, Takei H, Naito Z. Higher expression of EpCAM is associated with poor clinical and pathological responses in breast cancer patients undergoing neoadjuvant chemotherapy.

Pathol Int 2016;66:210-7.

Ohm JE, Carbone DP. VEGF as a mediator of tumor-associated immunodeficiency.

Immunol Res 2001;23:263-72.

Pastor MD, Nogal A, Molina-Pinelo S, Quintanal-Villalonga A, Melendez R, Ferrer I, Romero-Romero B, De Miguel MJ, Lopez-Campos JL, Corral J, Garcia-Carboner R, Carnero A, Paz-Ares L. IL-11 and CCL-1: Novel protein diagnostic biomarkers of lung adenocarcinoma in bronchoalveolar lavage fluid (BALF).

J Thorac Oncol 2016;11:2183-92.

Payne AS, Cornelius LA. The role of chemokines in melanoma tumor growth and metastasis.

J Invest Dermatol 2002;118:915-22.

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 Res 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.

Clin Cancer Res 2010;16:5458-68.

Polydorou C, Mpekris F, Papageorgis P, Voutouri C, Stylianopoulos T. Pirfenidone normalizes the tumor microenvironment to improve chemotherapy.

Oncotarget 2017;8:24506-17.

Proudfoot A. Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets.

Nature reviews Immunology 2002;2:106-15.

Ramello MC, Haura EB, Abate-Daga D. CAR-T cells and combination therapies: What's next in the immunotherapy revolution?

Pharmacol Res 2018;129:194-203.

Ramos CA, Savoldo B, Dotti G. CD19-CAR trials.

Cancer J 2014;20:112-8.

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.

Restifo NP, Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response.

Nat Rev Immunol 2012;12:269-81.

Rollins BJ. Chemokines.

Blood 1997;90:909-28.

Roos RS, Loetscher M, Legler DF, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B. Identification of CCR8, the receptor for the human CC chemokine I-309.

J Biol Chem 1997;272:17251-4.

Rosenberg S, Restifo N. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer.

Science 2015;348:62-8.

Roybal KT, Rupp LJ, Morsut L, Walker WJ, McNally KA, Park JS, Lim WA. Precision tumor recognition by T cells with combinatorial antigen-sensing circuits.

Cell 2016;164:770-9.

Sadelain M. CAR therapy: the CD19 paradigm.

J Clin Invest 2015;125:3392-400.

Sadelain M, Brentjens R, Riviere I. The basic principles of chimeric antigen receptor design.

Cancer Discov 2013;3:388-98.

Sakane R, Tsubamoto H, Sakata K, Inoue K, Ogino M, Shibahara H, Hao H, Hirota S. Expression of chemokine ligand 18 in stage IA low-grade endometrial cancer.

Anticancer Res 2014;34:5331-6.

Salmon H, Donnadiou E. Within tumors, interactions between T cells and tumor cells are impeded by the extracellular matrix.

Oncoimmunology 2012;1:992-4.

Salmon H, Franciszkiwicz K, Damotte D, Dieu-Nosjean MC, Validire P, Trautmann A, Mami-Chouaib F, Donnadiou E. Matrix architecture defines the preferential localization and migration of T cells into the stroma of human lung tumors.

J Clin Invest 2012;122:899-910.

Salnikov AV, Groth A, Apel A, Kallifatidis G, Beckermann BM, Khamidjanov A, Ryschich E, Buchler MW, Herr I, Moldenhauer G. Targeting of cancer stem cell marker EpCAM by bispecific antibody EpCAMxCD3 inhibits pancreatic carcinoma.

J Cell Mol Med 2009;13:4023-33.

Savoldo B, Ramos CA, Liu E, Mims MP, Keating MJ, Carrum G, Kamble RT, Bollard CM, Gee AP, Mei Z, Liu H, Grilley B, Rooney CM, Heslop HE, Brenner MK, Dotti G. CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells in lymphoma patients.

J Clin Invest 2011;121:1822-6.

Schuster SJ, Svoboda J, Chong EA, Nasta SD, Mato AR, Anak O, Brogdon JL, Pruteanu-Malinici I, Bhoj V, Landsburg D, Wasik M, Levine BL, Lacey SF, Melenhorst JJ, Porter DL, June CH. Chimeric antigen receptor T cells in refractory B-cell lymphomas.

N Engl J Med 2017;377:2545-54.

Shi H, Sun M, Liu L, Wang Z. Chimeric antigen receptor for adoptive immunotherapy of cancer: latest research and future prospects.

Mol Cancer 2014.

Shrimali RK, Yu Z, Theoret MR, Chinnasamy D, Restifo NP, Rosenberg SA. Antiangiogenic agents can increase lymphocyte infiltration into tumor and enhance the effectiveness of adoptive immunotherapy of cancer.

Cancer Res 2010;70:6171-80.

Shum T, Omer B, Tashiro H, Kruse RL, Wagner DL, Parikh K, Yi Z, Sauer T, Liu D, Parihar R, Castillo P, Liu H, Brenner MK, Metelitsa LS, Gottschalk S, Rooney CM. Constitutive signaling from an engineered IL7 receptor promotes durable tumor elimination by tumor-redirectioned T cells.

Cancer Discov 2017;7:1238-47.

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. *J Immunother Cancer* 2016;4:21.

Slaney CY, Kershaw MH, Darcy PK. Trafficking of T cells into tumors. *Cancer Res* 2014;74:7168-74.

Smittenaar CR, Petersen KA, Stewart K, Moitt N. Cancer incidence and mortality projections in the UK until 2035. *Br J Cancer* 2016;115:1147-55.

Spizzo G, Fong D, Wurm M, Ensinger C, Obrist P, Hofer C, Mazzoleni G, Gastl G, Went P. EpCAM expression in primary tumour tissues and metastases: an immunohistochemical analysis. *J Clin Pathol* 2011;64:415-20.

Szymczak AL, Workman CJ, Wang Y, Vignali KM, Dilioglou S, Vanin EF, Vignali DA. Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single 'self-cleaving' 2A peptide-based retroviral vector. *Nat Biotechnol* 2004;22:589-94.

Takai K, Le A, Weaver VM, Werb Z. Targeting the cancer-associated fibroblasts as a treatment in triple-negative breast cancer. *Oncotarget* 2016;7:82889-901.

Tayama S, Motohara T, Narantuya D, Li C, Fujimoto K, Sakaguchi I, Tashiro H, Saya H, Nagano O, Katabuchi H. The impact of EpCAM expression on response to chemotherapy and clinical outcomes in patients with epithelial ovarian cancer. *Oncotarget* 2017;8:44312-25.

Tokarew N, Ogonek J, Endres S, von Bergwelt-Baildon M, Kobold S. Teaching an old dog new tricks: next-generation CAR T cells. *Br J Cancer* 2019;120:26-37.

Tromp SC, oude Egbrink MG, Dings RP, van Velzen S, Slaaf DW, Hillen HF, Tangelder GJ, Reneman RS, Griffioen AW. Tumor angiogenesis factors reduce leukocyte adhesion in vivo. *Int Immunol* 2000;12:671-6.

Turtle CJ, Hanafi LA, Berger C, Gooley TA, Cherian S, Hudecek M, Sommermeyer D, Melville K, Pender B, Budiarto TM, Robinson E, Steevens NN, Chaney C, Soma L, Chen X, Yeung C, Wood B, Li D, Cao J, Heimfeld S, Jensen MC, Riddell SR, Maloney DG. CD19 CAR-T cells of defined CD4+:CD8+ composition in adult B cell ALL patients. *J Clin Invest* 2016;126:2123-38.

- Viani GA, Afonso SL, Stefano EJ, De Fendi LI, Soares FV. Adjuvant trastuzumab in the treatment of her-2-positive early breast cancer: a meta-analysis of published randomized trials. *BMC Cancer* 2007;7:153.
- Vignali D, Kallikourdis M. Improving homing in T cell therapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 2017;36:107-16.
- Wang Y, Wang F, Wang R, Zhao P, Xia Q. 2A self-cleaving peptide-based multi-gene expression system in the silkworm *Bombyx mori*. *Sci Rep* 2015;5:16273.
- Watanabe N, Bajgain P, Sukumaran S, Ansari S, Heslop HE, Rooney CM, Brenner MK, Leen AM, Vera JF. Fine-tuning the CAR spacer improves T-cell potency. *Oncoimmunology* 2016;5:e1253656.
- Weir HK, Thompson TD, Soman A, Moller B, Leadbetter S. The past, present, and future of cancer incidence in the United States: 1975 through 2020. *Cancer* 2015;121:1827-37.
- 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. *Int J Oncol* 2008;33:297-308.
- Wiedemann GM, Knott MM, Vetter VK, Rapp M, Haubner S, Fessler J, Kuhnemuth B, Layritz P, Thaler R, Kruger S, Ormanns S, Mayr D, Endres S, Anz D. Cancer cell-derived IL-1alpha induces CCL22 and the recruitment of regulatory T cells. *Oncoimmunology* 2016;5:e1175794.
- 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. *J Immunol* 2001;166:5145-54.
- Wilkie S, van Schalkwyk MC, Hobbs S, Davies DM, van der Stegen SJ, Pereira AC, Burbidge SE, Box C, Eccles SA, Maher J. Dual targeting of ErbB2 and MUC1 in breast cancer using chimeric antigen receptors engineered to provide complementary signaling. *J Clin Immunol* 2012;32:1059-70.
- Yang L, Ma X, Liu Y, Zhao W, Yu L, Qin M, Zhu G, Wang K, Shi X, Zhang Z, Wang J, Sun Y, Dong L, Tsao S, Zhang R, Chang L. Chimeric antigen receptor 4SCAR-GD2-modified T cells targeting high-risk and recurrent neuroblastoma: A phase II multi-center trial in China. *Blood* 2017;130:3335.
- Zentrum für Krebsregisterdaten. Krebs in Deutschland für 2015/2016. 2019.

Zhang H, Ye ZL, Yuan ZG, Luo ZQ, Jin HJ, Qian QJ. New strategies for the treatment of solid tumors with CAR-T cells.
Int J Biol Sci 2016;12:718-29.

Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, Makrigiannakis A, Gray H, Schlienger K, Liebman MN, Rubin SC, Coukos G. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer.
N Engl J Med 2003;348:203-13.

Zhao Z, Condomines M, van der Stegen SJC, Perna F, Kloss CC, Gunset G, Plotkin J, Sadelain M. Structural design of engineered costimulation determines tumor rejection kinetics and persistence of CAR T cells.
Cancer Cell 2015;28:415-28.

Zlotnik A, Yoshie O. The chemokine superfamily revisited.
Immunity 2012;36:705-16.

Zlotnik A, Yoshie O, Nomiya H. The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution.
Genome Biol 2006;7:243.

7 Abkürzungsverzeichnis

AICD	<i>Activation-induced cell death</i>
AZT	Adoptive T-Zell-Therapie
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CAR	Chimärer Antigenrezeptor
CCL	<i>C-C motif</i> Chemokinligand
CCR	<i>C-C motif</i> Chemokinrezeptor
CXCL	<i>C-X-C motif</i> Chemokinligand
CXCR	<i>C-X-C motif</i> Chemokinrezeptor
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EpCAM	<i>Epithelial cell adhesion molecule</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure-Puffer
HER2	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IL-2Rβ	Interleukin-2-Rezeptor- β -Domäne
IRES	Interne ribosomale Eintrittsstelle
i. v.	Intravenös

JAK	Januskinase
LDH	Laktat-Dehydrogenase
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD-L1	<i>Programmed cell death-ligand 1</i>
PD-1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memory Institute</i>
s. c.	Subkutan
scFv	<i>Single chain variable fragment</i>
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF-β	<i>Transforming growth factor β</i>
TIL	Tumor-infiltrierende Lymphozyten
TRUCK	<i>T-cells redirected for universal cytokine-mediated killing</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

8 Veröffentlichungen

Publikationen

1. Cadilha B, **Dorman K**, Rataj F, Endres S, Kobold S. Enabling T cell recruitment to tumours as a strategy for improving adoptive T cell therapy. *European Oncology & Haematology* 2017; 13(1): 66-73.
2. Lesch S, Blumenberg VH, Stoiber S, Gottschlich A, Ogonek J, Cadilha BL, Dantes Z, Rataj F, **Dorman K**, Lutz J, Karches CH, Heise C, Kurzay M, Larimer BM, Grassmann S, Rapp M, Nottebrock A, Kruger S, Tokarew N, Metzger P, Hoerth C, Benmebarek MR, Dhoqina D, Grünmeier R, Seiffert M, Oener A, Umut Ö, Joaquina S, Vimeux L, Tran T, Hank T, Baba T, Huynh D, Megens RTA, Janssen KP, Jastroch M, Lamp D, Ruehland S, Di Pilato M, Pruessmann JN, Thomas M, Marr C, Ormanns S, Reischer A, Hristov M, Tartour E, Donnadiou E, Rothenfusser S, Duewell P, König LM, Schnurr M, Subklewe M, Liss A, Halama N, Reichert M, Mempel TR, Endres S, Kobold S. Arming T cells with the C-X-C-motive receptor 6 enables adoptive T cell therapy of pancreatic cancer. Angenommen bei *Nature biomedical engineering* 2021.
3. Cadilha BL, Benmebarek MR, **Dorman K**, Oner A, Lorenzini T, Obeck H, Vanttinen M, Di Pilato M, Pruessmann JN, Stoiber S, Huynh D, Märkl F, Seifert M, Manske K, Suarez-Gosalvez J, Zhang J, Lesch S, Karches CH, Zeng Y, Heise C, Pandey D, Feuchtinger T, Subklewe M, Mempel TR, Endres S, Kobold S. Combined tumor-directed recruitment and protection from immune suppression enable CAR T cells to reject solid tumors. Angenommen bei *Science Advances* 2021.

Poster Präsentation

1. Cadilha B, **Dorman K**, Heise C, Rataj F, Endres S und Kobold S. Dominant negative tumor growth factor β enables T cell activity in a murine orthotopic pancreatic tumor model. *Immunotherapy of Cancer Conference, Prag, Tschechien, 2017.*

9 Danksagung

Ich möchte mich bei allen, die am Gelingen meiner Dissertation beteiligt waren herzlich bedanken. Zuallererst ist Professor Stefan Endres zu nennen, dem ich die Möglichkeit verdanke, meine Doktorarbeit in der Abteilung für Klinische Pharmakologie anzufertigen.

Besonders möchte ich meinem Doktorvater Professor Sebastian Kobold für die Überlassung des interessanten Themas, die engagierte Betreuung und das große persönliche Interesse am Fortschritt meiner Arbeit danken. Durch das entgegengebrachte Vertrauen und die Unterstützung konnte ich in seiner Arbeitsgruppe viel lernen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Bruno Cadilha. Ich hatte großes Glück, von ihm betreut zu werden und von ihm zu lernen. Seine Begeisterung für die Wissenschaft und seine Hilfsbereitschaft in jeglichen Situationen sind herausragend. Es freut mich, dass wir auch außerhalb des Labors weiterhin befreundet sind.

Außerdem bedanke ich mich bei sämtlichen Mitarbeitern der Abteilung für Klinische Pharmakologie für die gute Arbeitsatmosphäre und die Hilfsbereitschaft. Es hat mir großen Spaß gemacht, in dieser Abteilung arbeiten zu dürfen.

Der größte und wichtigste Dank geht an meine Mutter, die mich von Anfang an immer unterstützt und mir alles ermöglicht hat. Durch deine Stärke, Aufrichtigkeit und Zuverlässigkeit bist du mir ein großes Vorbild.

Das Beste kommt zum Schluss: Meinem Verlobten Alex möchte ich für die Liebe und das Verständnis in den letzten Jahren danken. Du warst in jeder Situation für mich da und hast auch die schwierigen Momente besser gemacht. Mit dir zusammen ist es am schönsten und ich freue mich auf alles was noch kommt.