

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Direktor: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik und Poliklinik IV

Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Etablierung zweier muriner Tumorzelllinien (mit  
PD-L1-knock-out bzw. Ovalbumin-Überexpression) zur  
weiteren Evaluierung des Mechanismus von  
PD-1-CD28-Fusionsrezeptor-transduzierten T-Zellen *in vitro*  
und *in vivo***

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Jennifer Heinrich

aus

Frankfurt (Oder)

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Sebastian Kobold

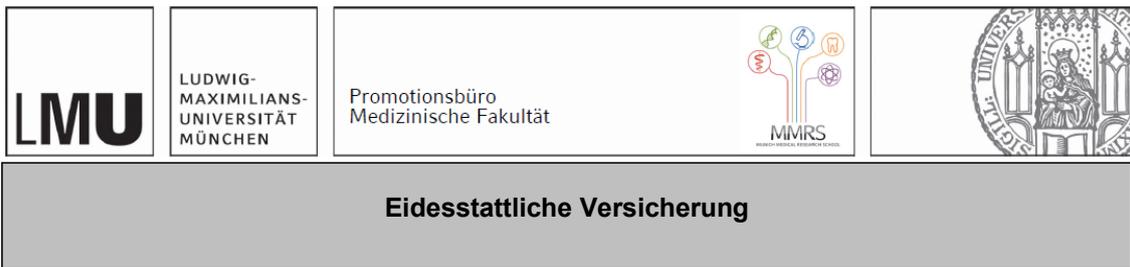
Mitberichterstatter: apl. Prof. Dr. med. Dominik Rüttinger  
Prof. Dr. med. Michael von Bergwelt-Baildon

Mitbetreuung durch die promovierten  
Mitarbeiter: Prof. Dr. med. Stefan Endres  
Dr. Felicitas Stein

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der Mündlichen Prüfung: 25.05.2022

In Dankbarkeit meiner Familie, meinem Lebenspartner und Freunden gewidmet.

**Affidavit**

Heinrich, Jennifer

---

Name, Vorname

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

**Etablierung zweier muriner Tumorzelllinien (mit PD-L1-knock-out bzw. Ovalbumin-Überexpression) zur weiteren Evaluierung des Mechanismus von PD-1-CD28-Fusionsrezeptor-transduzierten T-Zellen *in vitro* und *in vivo***

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 22.06.2022

Jennifer Heinrich

---

Ort, Datum

---

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Krebserkrankungen des Menschen</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Das menschliche Immunsystem und die Entstehung von Tumoren.....	1
1.1.1.1 Immunsuppressives Tumormilieu .....	2
1.1.1.2 PD-1-PD-L1-Achse .....	3
<b>1.2 Immuntherapie zur Behandlung von Tumorerkrankungen</b> .....	<b>5</b>
1.2.1 Checkpoint-Inhibitoren .....	5
1.2.1.1 Funktionsweise und Anwendung der Checkpoint-Inhibitoren .....	6
1.2.1.2 Problematiken der Checkpoint-Inhibitoren.....	6
1.2.2 Adoptiver Zelltransfer .....	7
1.2.2.1 Adoptive Zelltherapie mit natürlichen T-Zellen.....	8
1.2.2.2 Adoptive Zelltherapie mit genetisch veränderten T-Zellen.....	8
1.2.2.3 Problematiken in der T-Zelltherapie .....	10
1.2.2.4 Hürden der T-Zelltherapie bei soliden Tumoren .....	10
<b>1.3 Rationale und Zielsetzung der Promotionsarbeit</b> .....	<b>11</b>
<b>2. Materialien und Methoden</b> .....	<b>14</b>
<b>2.1 Geräte, Reagenzien und Zellkultur</b> .....	<b>14</b>
2.1.1 Technische Geräte.....	14
2.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Puffer .....	15
2.1.3 Kommerzielle Kits .....	16
2.1.4 Materialien für die Zellkultur .....	17
2.1.4.1 Zelllinien .....	19
2.1.5 FACS-Antikörper.....	20
2.1.6 Primer .....	20
2.1.7 Software.....	21
<b>2.2 Tierversuche</b> .....	<b>21</b>
2.2.1 Mäuse .....	21
2.2.2 Isolation von primären, murinen T-Zellen .....	22
2.2.3 <i>In-vivo</i> -Versuche .....	22
<b>2.3 Zelluläre Methoden</b> .....	<b>22</b>
2.3.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen .....	22
2.3.2 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität .....	22
2.3.3 Kultivierung von immortalisierten Zelllinien.....	23
2.3.4 Kultivierung von T-Zellen .....	23

---

2.3.5 Retrovirale Transduktion .....	23
2.3.5.1 Transduktion von Tumorzellen .....	23
2.3.5.2 Transduktion von primären, murinen T-Zellen .....	24
2.3.6 Zytotoxizitätsversuche.....	24
2.3.7 Induktion der PD-L1-Expression in Tumorzellen .....	25
<b>2.4 Immunologische Methoden.....</b>	<b>25</b>
2.4.1 Durchflusszytometrie.....	25
<b>2.5 Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>26</b>
2.5.1 Generierung eines PD-L1-Gen-knock-outs .....	26
2.5.2 Extraktion von DNS aus Tumorzelllinien .....	27
2.5.3 Sequenzierung von PCR-Produkten und Plasmiden .....	28
2.5.4 TOPO-TA-Klonierung zur Sequenzierung einzelner Allele .....	28
<b>2.6 Statistische Auswertungen .....</b>	<b>28</b>
<b>3. Ergebnisse zur Generierung eines PD-L1-Gen-knock-outs.....</b>	<b>29</b>
<b>3.1 Transfektion mit dem pCMV-Cas9-GFP-Plasmid .....</b>	<b>29</b>
<b>3.2 Identifikation möglicher PD-L1-knock-out Klone.....</b>	<b>29</b>
3.2.1 Untersuchung einer konstitutiven Expression von PD-L1 .....	29
3.2.2 Überprüfung einer induzierbaren PD-L1-Expression .....	30
<b>3.3 Darstellung des PD-L1-Gens auf DNS-Ebene in einem potenziellen knock-out Klon.....</b>	<b>31</b>
<b>3.4 Nachweis einer funktionellen Ovalbumin (OVA)-Expression .....</b>	<b>32</b>
<b>3.5 Untersuchung des Wachstumsverhaltens der Einzelzellklone <i>in vivo</i> ..</b>	<b>34</b>
3.5.1 Vergleich von <i>mock</i> Kontrolle und knock-out Klon.....	34
3.5.2 Betrachtung des therapeutischen Effekts von PTM-transduzierten T-Zellen .....	35
<b>4. Ergebnisse zur Erstellung eines OVA-exprimierenden MC38 Tumormodells .....</b>	<b>36</b>
<b>4.1 Nachweis der Expression von OVA.....</b>	<b>36</b>
4.1.1 Durchflusszytometrische Analyse .....	36
4.1.2 Funktionelle Überprüfung.....	38
<b>4.2 Betrachtung der konstitutiven und induzierbaren PD-L1-Expression ...</b>	<b>39</b>
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>41</b>
<b>5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse.....</b>	<b>41</b>

---

<b>5.2 Erueierung des PD-L1-knock-outs in Panc02-OVA Tumorzellen .....</b>	<b>41</b>
5.2.1 Anwendung des CRISPR-Cas9-Systems und Nachweis des Gen-knock-outs.....	41
5.2.2 Funktionalität des Antigen-Modells Ovalbumin nach Anwendung des CRISPR-Cas9-Systems <i>in vitro</i> .....	43
5.2.3 Subkutane Injektion von PD-L1 <sup>-</sup> Panc02-OVA Tumorzellen <i>in vivo</i> .....	44
5.2.4 Behandlung von PD-L1 <sup>-</sup> Panc02-OVA Tumorzellen mit PTM-transduzierten OT-I T-Zellen <i>in vivo</i> .....	45
<b>5.3 Evaluation der generierten MC38-OVA-exprimierenden Tumorzellen....</b>	<b>46</b>
5.3.1 Funktionalität des integrierten Ovalbumin-Antigen-Modells und Expression von PD-L1 durch die MC38-GFP-OVA-iRFP .....	46
<b>5.4 PD-L1 als Zielstruktur mit Optimierungspotenzial der adoptiven T-Zelltherapie .....</b>	<b>47</b>
<b>5.5 Kombination von Checkpoint-Inhibitoren und adoptiven T-Zelltransfer .....</b>	<b>49</b>
<b>5.6 Ausblick .....</b>	<b>52</b>
<b>6. Zusammenfassung .....</b>	<b>54</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>56</b>
<b>8. Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme .....</b>	<b>65</b>
<b>9. Danksagung .....</b>	<b>67</b>

## 1. Einleitung

### 1.1 Krebserkrankungen des Menschen

Im Jahr 2018 verstarben weltweit 9,6 Millionen Menschen aufgrund eines Krebsleidens, damit zählen Neoplasien als zweithäufigste Todesursache (World Health Organisation 2018). Deutschland stellt dabei keine Ausnahme dar. Nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind bösartige Neubildungen im Jahr 2017 mit 24 % aller Todesfälle hierzulande zweithäufigste Todesursache (Statistisches Bundesamt (Destatis) 2019). Mittlerweile erkrankt ungefähr jeder Zweite im Laufe seines Lebens an einer bösartigen Neubildung. Die steigende Erkrankungszahl steht im Zusammenhang mit der demografischen Entwicklung der Bevölkerung, der intensiveren Diagnostik und Veränderungen des Lebensstils (Barnes et al. 2016; Heikenwälder et al. 2019).

#### 1.1.1 Das menschliche Immunsystem und die Entstehung von Tumoren

Bereits im letzten Jahrhundert postulierten Lewis Thomas und Frank MacFarlane Burnet in ihrer Hypothese der *Immune surveillance*, das Immunsystem würde Tumorzellen detektieren und zerstören können. Diese Hypothese wurde weiterentwickelt und die Tumorentstehung in drei Phasen geteilt. In der ersten Phase werden potenzielle Tumorzellen von dem Immunsystem erkannt und zerstört, sie wird als Eliminierungsphase bezeichnet. Werden während der ersten Phase nicht alle Tumorzellen beseitigt, folgt die Equilibrium-Phase. In dieser zweiten Phase eliminiert das Immunsystem weiterhin Tumorzellen, zeitgleich entkommen jedoch entartete Zellen dem Immunsystem, dazu tragen von ihnen durchlaufene Veränderungen und Mutationen bei. Die letzte Phase entspricht der *Escape-Phase*, in der genügend Tumorzellen in der Lage sind, dem Immunsystem zu entgehen und ungehindert bis zu klinisch nachweisbaren Tumoren zu proliferieren (Murphy 2012; Wang et al. 2016). Untersuchungen zeigten einen starken Anstieg an malignen Erkrankungen in immungeschwächten Menschen und Mäusen und lassen das enorme Leistungsvermögen unseres Immunsystems erahnen (Heikenwälder et al. 2019).

*Cluster of differentiation* (CD) 8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen nehmen, als Teil des adaptiven Immunsystems, bei der Erkennung von entarteten Zellen einen besonderen Stellenwert ein. Der *Major histocompatibility complex-I* (MHC-I) präsentiert CD8<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen Peptide, die direkt aus der proteasomalen Prozessierung und damit aus dem Zytosol stammen. Nahezu jede kernhaltige Körperzelle exprimiert MHC-I Komplexe.

Effektor-T-Zellen erkennen fremdartige Peptide in den MHC-I über ihren T-Zell-Rezeptor (TZR), worunter auch veränderte Proteine im Rahmen von Mutationen bei der Entstehung von Tumoren zählen. Ist der TZR einer T-Zelle für ein präsentiertes Peptid spezifisch, kann die T-Zelle über Apoptose oder zytotoxischen Granulen die Lyse der Zielzellen bewirken (Murphy 2012). Die Abkürzung für TZR wird im Folgenden stellvertretend für den gesamten TZR-Komplex samt CD3-Untereinheiten verwendet. Naive CD8<sup>+</sup> T-Zellen differenzieren sich nach ihrer Aktivierung zu zytotoxischen T-Zellen. Naive CD8<sup>+</sup> T-Zellen benötigen im Gegensatz zu den Effektorzellen zusätzlich zu der TZR-MHC-Interaktion eine Bindung mit kostimulatorischen Liganden derselben Zelle, um aktiviert zu werden. Der am besten erforschte kostimulatorische Rezeptor ist CD28 (Murphy 2012).

Trotz der vielfältigen Abwehrmechanismen unseres Immunsystems entstehen Tumoren. Menschliche Immunzellen können sich beispielsweise gegenseitig hemmen, T-Zellen können eine aktiv herabgesetzte Signaltransduktion ihres TZR aufweisen oder nach ihrer Aktivierung über bestimmte Rezeptoren in Apoptose oder Inaktivität übergehen. Tumorzellen wiederum können durch Selektionsdruck des Immunsystems die Expression tumorassoziierter Antigene oder die Dichte ihrer exprimierten MHC-I Moleküle herabsetzen. Zudem können entartete Zellen ein immunsuppressives Milieu schaffen. (Murphy 2012; Rosenberg 2001). Die Eigenschaften der Tumorzellen, dem Immunsystem aktiv zu entkommen, werden als *Escape*-Strategien zusammengefasst und sind eines der Kennzeichen für maligne Neoplasien (Hanahan et al. 2011).

#### 1.1.1.1 Immunsuppressives Tumormilieu

Maligne Tumoren sind mehr als sich einfach vermehrende Zellhaufen. Gerade solide Tumoren bilden komplexe Gebilde mit unterschiedlichen Subpopulationen an Tumorzellen, aber auch nicht entarteten Zellen, die alle miteinander interagieren (Hanahan et al. 2011; Tabassum et al. 2015). Diese komplexen Strukturen werden als Tumormikroumgebung bezeichnet. Sie spielt eine entscheidende Rolle bei der Tumorentstehung, -entwicklung und Metastasierung und beeinflusst die Wirksamkeit von Therapien (Wu et al. 2017). Sie besteht, neben den Tumorzellen selbst, aus Blutgefäßen, Stromazellen wie Fibroblasten, Extrazellulärmatrix, Immunzellen und verschiedensten Signalmolekülen (Hui et al. 2015; Wu et al. 2017). Diese krebsassoziierten Zellen übernehmen andere Funktionen als im gesunden Gewebe, die zugunsten der Tumorzellen verübt werden. Es kann zwischen einem kalten oder heißen Tumormilieu unterschieden werden. Sind zahlreiche tumorinfiltrierende

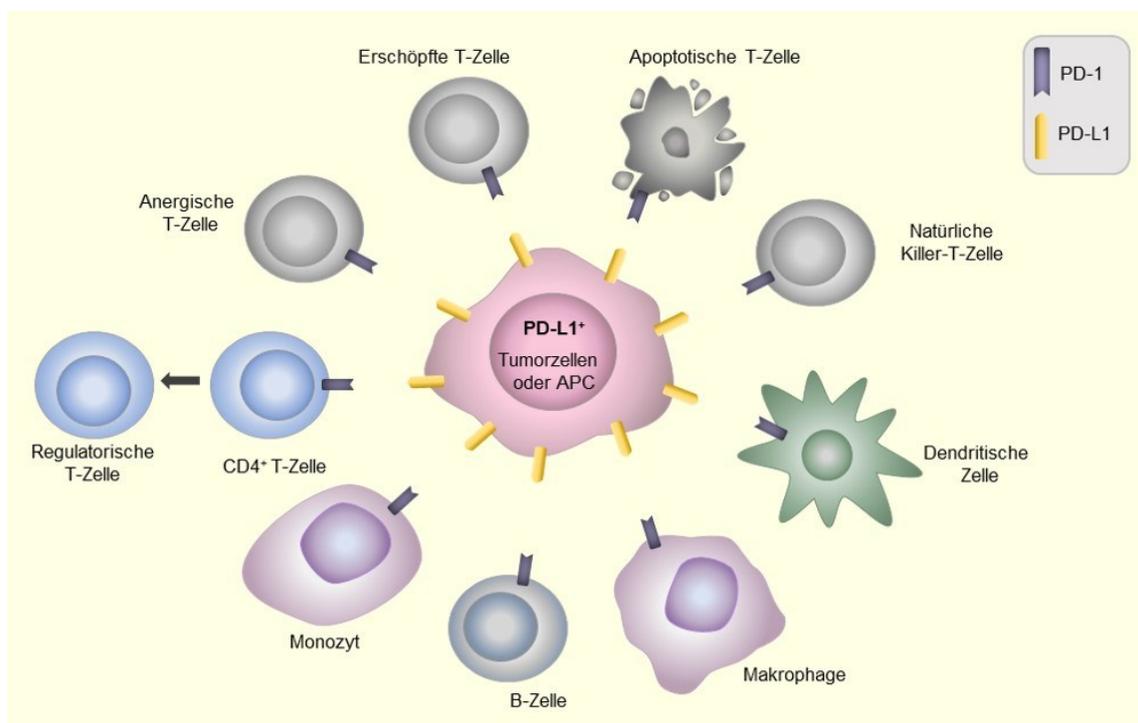
Lymphozyten (TIL) und Entzündungsmediatoren vorhanden, handelt es um einen heißen Tumor (inflammatorischer Tumor). Ist dies nicht der Fall und immunsupprimierende Zellen und Zytokine sind vorrangig nachweisbar, wird dies als kalter Tumor bezeichnet (Wu et al. 2019).

Ein immunsuppressives Tumormilieu wird durch folgende Faktoren begünstigt: Krebszellen können immunsuppressive Zytokine wie *Transforming growth factor-β* (TGF-β) oder auch Enzyme wie die Indolamin-2,3-Dioxygenase sezernieren (Murphy 2012; Rosenberg 2001). Zudem locken sie Entzündungszellen des Immunsystems wie regulatorische T-Zellen oder *Myeloid-derived suppressor cells* (MDSC) an, welche zytotoxische T-Zellen hemmen (Hanahan et al. 2011; Rosenberg 2001). Tumoren können weiterhin physikalische Barrieren aus Kollagen erschaffen und somit schlechter für Immunzellen zugänglich sein. Eine weitere *Escape*-Strategie von Tumorzellen stellt die Expression von Proteinen an ihrer Zelloberfläche dar, die direkt inhibierend auf Immunzellen wirken können (Murphy 2012).

#### 1.1.1.2 PD-1-PD-L1-Achse

Ein Vertreter dieser immunsuppressiven Oberflächenproteine auf Tumorzellen ist der *Programmed death-ligand 1* (PD-L1). Dieser Ligand wird von fast allen Geweben im menschlichen Körper konstitutiv exprimiert und durch Entzündungssignale induziert (Murphy 2012; Sharpe et al. 2018). Unter anderem kommt der Ligand auf aktivierten Immunzellen wie T-Zellen, B-Zellen, dendritischen Zellen, natürlichen Killerzellen, Makrophagen und Monozyten vor (Zou et al. 2008). PD-L1 teilt sich mit *Programmed death-ligand 2* (PD-L2) den gemeinsamen Rezeptor *Programmed death-1* (PD-1), wobei beide ein koinhibitorisches intrazelluläres Signal auslösen. Die Expression von PD-L2 ist jedoch kaum konstitutiv, sondern erfolgt induziert bei Entzündungsreaktionen. Der Rezeptor PD-1 wird vor allem von aktivierten T-Zellen, B-Zellen und myeloiden Zellen exprimiert. Die PD-1-PD-L1-Interaktion spielt physiologisch eine wesentliche Rolle bei der Limitation einer Immunantwort und ermöglicht in gesundem Gewebe periphere Immuntoleranz (Murphy 2012; Wu et al. 2019). Konkret unterdrückt die Interaktion von PD-1 mit einem seiner beiden Liganden das aktivierende Signal des TZR und damit die Aktivierung von T-Zellen (Kobold et al. 2015). Zusätzlich führt die Aktivierung des PD-1-Rezeptors direkt über Hemmung weiterer Signalwege zu einer verringerten Proliferation und Überlebenszeit der T-Zellen und damit zu einer verminderten Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine (Dermani et al. 2019).

Tumorzellen bedienen sich der PD-1-PD-L1-Achse als *Escape*-Strategie. Da die meisten Gewebe in der Lage sind PD-L1 zu exprimieren, sind theoretisch auch die daraus entarteten Zellen dazu fähig. Für zahlreiche menschliche Tumoren, wie beispielsweise Mamma-, Pankreas-, Kolon- und Lungenkarzinom, wurde bereits die Expression von PD-L1 nachgewiesen. Interessanterweise findet sich das PD-L1 in soliden Tumoren nicht nur auf den Tumorzellen, sondern auf verschiedenen Zellen im gesamten Tumormilieu. Dazu zählen unter anderem tumorassoziierte Fibroblasten, MDSC und regulatorische T-Zellen (Zou et al. 2008). Tumoren, die die PD-1-PD-L1-Achse für sich nutzen, zeigen nachweislich ein invasiveres und schnelleres Wachstum (Wu et al. 2019). Die Wirkung von PD-L1<sup>+</sup> Tumoren auf T-Zellen ist vielfältig und führt zu Apoptose, Anergie und Erschöpfung. Zudem verursacht es die Entwicklung von regulatorischen T-Zellen, die wiederum Effektor T-Zellen hemmen (Zou et al. 2008) (Abbildung 1). Tumorzellen erhöhen ihre PD-L1-Expression, sobald aktivierte T-Zellen immunstimulatorische Substanzen wie Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) freisetzen (Grosser et al. 2019). Letztendlich führt PD-L1 im Tumormilieu zu einer Unterdrückung der Immunantwort, die die entarteten Zellen beseitigen könnte (Zou et al. 2008).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Wirkung von PD-L1 auf Lymphozyten modifiziert nach Ostrand-Rosenberg et al. 2014.** Binden PD-1-Rezeptoren von T-Zellen an PD-L1 von Tumorzellen oder Antigen-präsentierenden Zellen (APC) werden zytotoxische T-Zellen anergisch, erschöpft oder apoptotisch, CD4<sup>+</sup> T-Zellen können zu regulatorischen

T-Zellen differenzieren. Aktivierte Monozyten, B-Zellen, Makrophagen, Dendritische Zellen und Natürliche Killer-T-Zellen werden durch PD-L1 gehemmt (eigene Abbildung).

## 1.2 Immuntherapie zur Behandlung von Tumorerkrankungen

Bei der Behandlung von Krebserkrankungen werden lokale von systemischen Therapieansätzen unterschieden. Operationen, Strahlentherapie und ablativ Verfahren sind lokale Therapien. Die konventionelle und zielgerichtete Chemotherapie sowie biologische Behandlungen zählen zu den systemischen Ansätzen (Pelzer et al. 2016). Die meisten dieser Therapieansätze wirken direkt auf die Krebszellen, um diese zu zerstören. Im Gegensatz dazu versucht die Immuntherapie, über die Aktivierung des körpereigenen Abwehrsystems, eine selektive Immunantwort auszulösen und damit die entarteten Zellen gezielt zu beseitigen (Murphy 2012). Ihre Etablierung als Teil der systemischen Krebstherapie stellte einen Paradigmenwechsel in der Behandlung von Tumorerkrankungen dar.

Bereits in den 1980er Jahren begann sich die Wissenschaft intensiv mit der Tumorummunologie und den dazugehörigen zell- und molekularbiologischen Zusammenhängen auseinanderzusetzen (Buchtele et al. 2019). Mit Gewinnung neuer Erkenntnisse entstand das Gebiet der onkologischen Immuntherapie. Nach einigen Rückschlägen wurde 1997, der gegen CD20 gerichtete monoklonale Antikörper, Rituximab als erste Immuntherapie zur Behandlung von B-Zelllymphomen zugelassen. Es folgten weitere monoklonale, Tumor-gerichtete Antikörper, die das Immunsystem indirekt aktivierten (Kobold et al. 2015). 2011 wurde das erste Therapeutikum zugelassen, das direkt über die Aktivierung des Immunsystems seine anti-tumorale Wirkung entfaltete. Es handelte sich um Ipilimumab, ein gegen *Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4* (CTLA-4) gerichteter Antikörper. Ipilimumab ist mittlerweile für die Behandlung von malignen Melanomen, kolorektalen Karzinomen und Nierenzellkarzinomen zugelassen.

### 1.2.1 Checkpoint-Inhibitoren

Checkpoints des Immunsystems sind wichtige Kontrollpunkte, die das Immunsystem aktivieren oder hemmen können und somit für die immunologische Homöostase entscheidend sind. Tumoren bedienen sich dieser inhibierenden Checkpoints als *Escape*-Strategie. Zu den inhibitorischen Kontrollpunkten des Immunsystems gehören unter anderem das CTLA-4 und die oben besprochene PD-1-PD-L1-Achse. Ersteres kommt auf CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten vor und teilt sich kompetitiv seine Liganden

mit dem kostimulatorischen Rezeptor CD28, worauf hier aber nicht näher eingegangen werden soll (Hargadon et al. 2018).

#### 1.2.1.1 Funktionsweise und Anwendung der Checkpoint-Inhibitoren

Als Immun-Checkpoint-Blocker (ICB) werden monoklonale Antikörper bezeichnet, die inhibitorischen Kontrollpunkte des Immunsystems blockieren. Durch die Blockade an den Liganden oder Rezeptoren dieser Checkpoints, kann ein normalerweise hemmendes Signal auf die Immunzellen unterbunden werden (Murphy 2012). Durch den Einsatz von ICB können tumorspezifische T-Lymphozyten, die durch das immunsuppressive Tumormilieu inaktiv wurden, reaktiviert werden und bereits stimulierte T-Lymphozyten funktional bleiben (Hargadon et al. 2018). ICB gelten derzeit als die erfolgreichste Form der Immuntherapie bei malignen Erkrankungen (Grosser et al. 2019). Die bisherigen zugelassen Checkpoint-Inhibitoren beschränken sich auf die Blockade von CTLA-4, PD-1 oder PD-L1. Weitere Ansätze werden in laufenden klinischen Studien erprobt (Pitt et al. 2016).

Nach der Zulassung von Ipilimumab erhielten auch die PD-1- und die PD-L1-Blocker Einzug in die Standardtherapien von verschiedenen Krebserkrankungen. Die *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) ließ 2014 und die *European Medicines Agency* (EMA) 2015 die ersten PD-1-Inhibitoren Pembrolizumab und Nivolumab zu. Bis 2018 sind die PD-L1-Inhibitoren Atezolizumab, Durvalumab und Avelumab hinzugekommen. Diese Antikörper sind unter anderem für die Therapie von nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen, Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereichs, Hodgkin-Lymphomen, Urothelkarzinomen und kolorektalen Karzinomen zugelassen (Buchtele et al. 2019; Gong et al. 2018). PD-1- und PD-L1-Inhibitoren zeigen ein besseres Ansprechen bei gleichzeitig geringerem Auftreten von Nebenwirkungen im Vergleich zu CTLA-4-Inhibitoren (Hargadon et al. 2018; Pitt et al. 2016).

#### 1.2.1.2 Problematiken der Checkpoint-Inhibitoren

Der anfängliche Enthusiasmus für den Einsatz von Checkpoint-Blockern war groß, da selbst bei einigen Patienten, die als austherapiert galten, sehr gute Ergebnisse und lange Regressionsphasen erzielt wurden. Allerdings profitierten nur 40 % der Patienten von dieser Therapie (Grosser et al. 2019). Womöglich trägt das Immunsystem der Patienten entscheidend zum Ansprechverhalten bei. Haben bereits Vorbehandlungen wie Bestrahlungen oder Chemotherapien stattgefunden, ist das eigene Immunsystem

geschwächt. Einige Patienten weisen aber auch ohne Vorbehandlungen ein kaltes Tumormilieu mit einer geringen Anzahl an TIL auf. In diesen Fällen sind vermutlich nicht ausreichend Immunzellen vorhanden, die mithilfe einer ICB-Therapie aktiviert werden und anti-tumoral wirken können (Hargadon et al. 2018; Wu et al. 2019).

ICB greifen in die physiologische Homöostase des Immunsystems ein, wodurch dessen Balance aus dem Gleichgewicht geraten kann. Während der systemischen Anwendung des CTLA-4-Inhibitors Ipilimumab wurden in bis zu 90 % und bei PD-1- oder PD-L1-Blockern in bis zu 70 % der Patienten autoimmune Nebenwirkungen beobachtet, die als *Immune-related adverse events* (irAE) bezeichnet werden (Buchtele et al. 2019; Michot et al. 2016). Solche Nebenwirkungen können in zwei bis drei Prozent der Fälle zu lebensbedrohlichen Verläufen führen (Buchtele et al. 2019). Insgesamt werden schwere bis lebensbedrohliche irAE bei 20 bis 30 % bei Ipilimumab, bei 10 bis 15 % bei PD-1-Blockern und am häufigsten während einer Kombinationstherapie beider Medikamente in 55 % der behandelten Patienten beschrieben (Darnell et al. 2020). IrAE können sich in nahezu allen Organen manifestieren und verlaufen in der Regel mild, wobei überwiegend Hautveränderungen auftreten (Buchtele et al. 2019; Darnell et al. 2020). Schwere Verläufe können gut mittels Glukokortikoiden kontrolliert werden. Wird diese Therapie jedoch nicht frühzeitig eingesetzt, kann es in seltenen Fällen zu lebensbedrohlichen Zuständen kommen (Michot et al. 2016). Insgesamt ist die Therapie mit PD-L1- und PD-1-Inhibitoren jedoch verträglicher als eine vergleichbare Chemotherapie (Wu et al. 2019).

Die vielversprechende Wirkung von Checkpoint-Inhibitoren ist auf eine unspezifische Aktivierung von T-Zellen zurückzuführen. Daher kann auch die Verabreichung von Immunzellen selbst eine Therapiestrategie darstellen (Kobold et al. 2015).

### 1.2.2 Adoptiver Zelltransfer

Bei dem adoptiven Zelltransfer (AZT) werden Tumorkranken eigene Immunzellen entnommen, *ex vivo* manipuliert und expandiert, um diese anschließend in denselben Patienten zurückzuführen (Rosenberg et al. 2015) (Abbildung 2). Für die AZT können verschiedene Immunzellen, beispielsweise T-Zellen oder Natürliche Killerzellen, verwendet werden (Gorabi et al. 2019). Aufgrund ihrer physiologischen Eigenschaften sind T-Zellen besonders für die AZT geeignet. Sie gelten als potenteste anti-tumorale Effektorzellen des Immunsystems. Ihre hohe Teilungsrate erleichtert die Virusintegration für genetische Manipulationen. Außerdem besitzen sie die Fähigkeit

eines immunologischen Gedächtnisses (Grosser et al. 2019). Klinisch getestet wurden bislang natürliche und gentechnisch-veränderte T-Zellen (Gorabi et al. 2019).

#### 1.2.2.1 Adoptive Zelltherapie mit natürlichen T-Zellen

Seit vielen Jahren wird die AZT als Behandlungsmöglichkeit für Tumorerkrankungen erprobt. Die ersten Versuche erfolgten mit unspezifischen, *ex vivo* vermehrten peripheren Immunzellen, die nach Reinfusion in den Patienten nur eine sehr geringe anti-tumorale Aktivität aufwiesen (Li et al. 2019). Durch Verwendung von tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL), die direkt aus den Metastasen oder Primarien der Patienten gewonnen wurden, wurden die Therapieversuche spezifischer. In einer Phase II Studie konnten bei Melanom-Patienten mit vorangegangener Lymphodepletion und in Kombination mit Interleukin-2 (IL-2) objektive Ansprechraten von 56 % erzielt werden, davon 40 % mit kompletter Remission (Rosenberg et al. 2011). TIL enthalten heterogene Populationen an Lymphozyten, hauptsächlich sind dies T-Zellen und Natürliche Killerzellen (Met et al. 2019). Die anti-tumoralen Effekte von TIL werden vor allem den T-Zellen zugeschrieben (June et al. 2015).

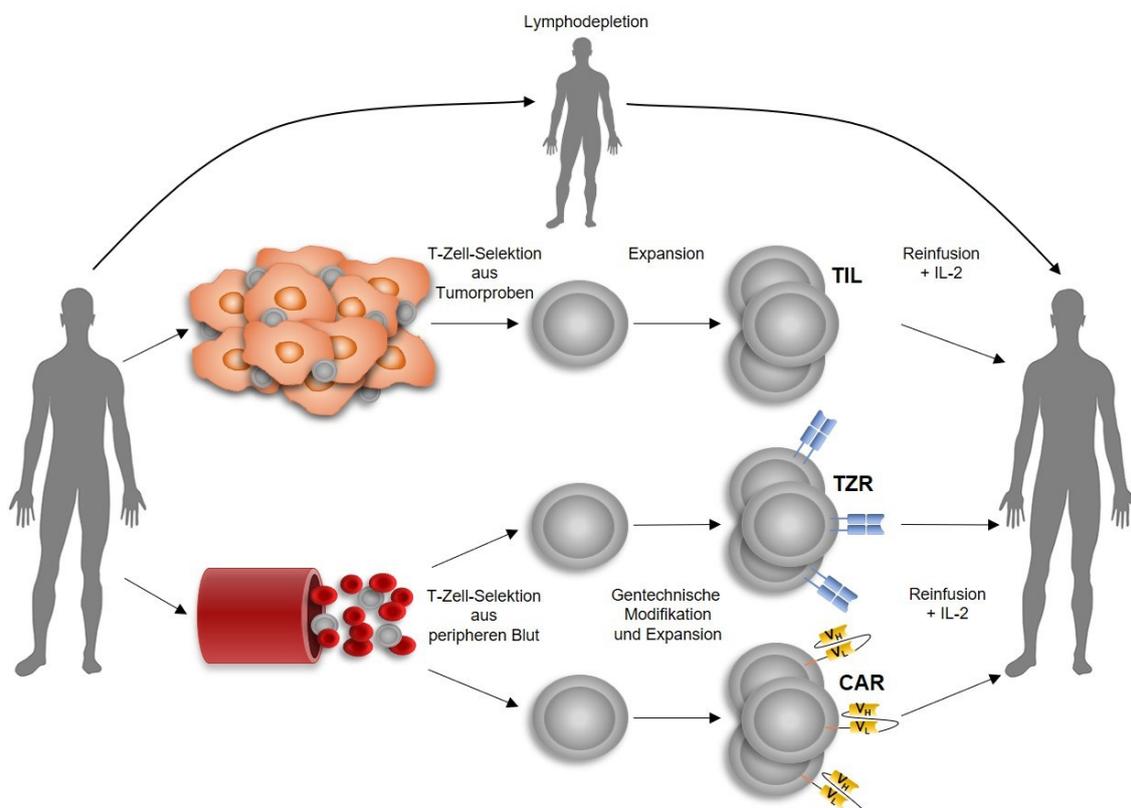
#### 1.2.2.2 Adoptive Zelltherapie mit genetisch veränderten T-Zellen

Die Erfolge bei Melanom-Patienten in klinischen Studien enthüllten das Potenzial der AZT und ebneten den Weg zur Ausweitung ihrer Forschung auf andere epitheliale Neoplasien. Dazu war es notwendig die TIL besser zu selektieren oder genetisch zu verändern (Rosenberg 2001). Dies führte zur Entwicklung von T-Zellen mit tumorspezifischen Rezeptoren, die aus einfachen peripheren Lymphozyten generiert werden konnten und auf weitere Tumorentitäten anwendbar sein sollten (Rosenberg et al. 2015). Die gentechnische Expression dieser Rezeptoren wird in der Regel durch viralen Gentransfer ermöglicht.

Die ersten genetisch veränderten T-Zellen exprimierten TZR, die spezifisch für bestimmte Tumorantigene konfiguriert waren. In der ersten Pilotstudie hierzu wurden autologe periphere Blutlymphozyten verwendet, die mit einem anti-MART-1 spezifischen TZR transduziert und bei Melanom-Patienten angewandt wurden. Die Ansprechrate war jedoch mit 13 % erheblich geringer als bei der Infusion von autologen TIL (Morgan et al. 2006). In weiteren klinischen Studien waren T-Zellen mit transferierten TZR gegen Keimbhantigene am erfolgversprechendsten. Bei

Patienten mit multiplen Myelomen oder Melanomen wurden hohe Ansprechraten von 23 % bis 80 % erzielt (Wolf et al. 2019).

Darauffin entwickelten Wissenschaftler die ersten chimären Antigenrezeptoren (CAR). Diese bestehen aus einem antigenbindenden Teil eines Antikörpers, aus dem T-Zell-stimulierenden Teil des TZR und enthalten zusätzlich gegebenenfalls kostimulatorische Motive, wodurch sie unabhängig von MHC-Peptiden die T-Zelle aktivieren (Grosser et al. 2019; Sadelain 2015). Die CAR T-Zelltherapie konnte in den letzten Jahren bei B-Zellmalignomen beeindruckende Ergebnisse erzielen. Vor allem der Anti-CD19-CAR erzielte, bei Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie der B-Zellreihe (B-ALL), in verschiedenen Studien komplette Remissionsraten von 70 % bis 94 % (Wang et al. 2017). Im Jahr 2018 erhielten Anti-CD19-CAR T-Zellen von der EMA die Zulassung zur Behandlung von B-ALL und großzelligen B-Zelllymphomen (Buchtele et al. 2019). Damit etablierten sich die Anti-CD19-CAR T-Zelltherapie als erste und bisher einzige zugelassene AZT.



**Abbildung 2: Gegenüberstellung der verschiedenen Möglichkeiten des adoptiven T-Zelltransfers modifiziert nach Wolf et al. 2019, Minutolo et al. 2019, Hartmann et al. 2017.** Die Isolation von T-Zellen erfolgt aus Tumor- oder Blutproben. Natürliche TIL werden *ex vivo* selektiert und expandiert. T-Zellen, die gentechnisch verändert werden, können direkt aus peripherem Blut gewonnen werden. Bisher sind nur die gentechnischen CAR T-Zellen zur

klinischen Anwendung zugelassen. Nach Entnahme der Proben werden die Patienten lymphodepletiert, anschließend werden die expandierten und gegebenenfalls veränderten T-Zellen zusammen mit hohen Dosen an IL-2 rückinfundiert.

### 1.2.2.3 Problematiken in der T-Zelltherapie

Aufgrund der ungenügenden Wirksamkeit der TIL-Therapie in randomisierten kontrollierten Studien gegenüber Standardtherapien, wurde diese bislang weder von der FDA noch von der EMA zugelassen (Rohaam et al. 2018). In einer klinischen Studie konnten beispielsweise nur 45 % der metastasierten Melanom-Patienten eine Therapie mit TIL erhalten, weil entweder keine resektablen Tumoren vorhanden waren oder nicht genügend TIL gewonnen werden konnten. (Rosenberg et al. 2011). Zudem konnten die Ergebnisse der TIL bei anderen Tumorentitäten bisher nicht reproduziert werden, da nur aus malignen Melanomen genügend dieser Zellen gewonnen werden konnten (Rosenberg et al. 2015). Zur Verbesserung des Therapieansatzes mit TIL werden weitere klinische Studien durchgeführt, wobei Kombinationstherapien ebenfalls betrachtet werden (Nguyen et al. 2019; Rohaan et al. 2018).

Ein Problem bei der Applikation von zugelassenen nicht-modularen CAR T-Zellen ist das Auftreten von akuten Nebenwirkungen aufgrund ihrer massiven Aktivierung. Dazu zählen das Zytokin-Freisetzungssyndrom, das Tumorlyse-Syndrom und die CAR T-Zell-assoziierte Enzephalopathie, die bei nicht rechtzeitiger adäquater Therapie letal enden können (D'Ippolito et al. 2019; Feldmann et al. 2019). Ein weiterer Nachteil ist, dass die Therapieerfolge der TIL, dem Anti-CD19-CAR und weiterer AZT nur mit vorangegangener Lymphodepletion erreicht werden können (Rosenberg et al. 2011; Sadelain 2015).

Obwohl die AZT außerordentliche Resultate in der Hämatonkologie hervorbrachte, konnten bislang nur mäßige Erfolge bei soliden Tumoren erzielt werden (Li et al. 2019).

### 1.2.2.4 Hürden der T-Zelltherapie bei soliden Tumoren

Die geringe Wirksamkeit der AZT in soliden Tumoren scheint multifaktoriell begründet zu sein. Anders als bei den Neoplasien des Blutes oder der Lymphbahnen bestehen solide Tumoren aus einer kompakten Masse an verschiedensten Zellen mit extrazellulärer Matrix und Gefäßen, die überall im Gewebe des menschlichen Körpers entstehen können. T-Zellen, die in die Blutbahn des Patienten appliziert werden, müssen zuerst die Blutgefäße verlassen und in den Tumor einwandern, um zu ihren

Zielzellen zu gelangen. Daraus resultiert häufig eine ungenügende Infiltration von Effektorzellen in den Tumor und eine zu kurze Persistenz der therapeutischen T-Zellen (Chen et al. 2019; Li et al. 2019). Eine weitere Herausforderung besteht in der enormen Heterogenität der soliden Tumoren innerhalb eines einzigen Tumors. Die Heterogenität erschwert die Entwicklung optimaler Zielstrukturen und führt bei eindimensionalen Therapien zu Antigenverlust und Rezidiven der Erkrankung (Chen et al. 2019; Yamamoto et al. 2019).

Erschwerend kommen Tumor-*Escape*-Strategien hinzu, insbesondere das immunsuppressive Tumormilieu begrenzt die anti-tumorale Wirkung der adoptiven T-Zelltherapie (D'Ippolito et al. 2019). Die PD-1-PD-L1-Achse scheint dabei eine Schlüsselrolle zu spielen und ein gutes Ziel zur Verbesserung der AZT zu sein (Li et al. 2019). Die injizierten T-Zellen erkennen die Tumorzellen und werden durch diese aktiviert. Allerdings regulieren die T-Zellen anschließend inhibitorische Rezeptoren wie PD-1 und die Tumorzellen PD-L1 hoch, was zu hypofunktionalen T-Zellen führt und damit zur Limitation der Länge und Stärke der therapeutischen Immunantwort (John et al. 2013; Moon et al. 2016).

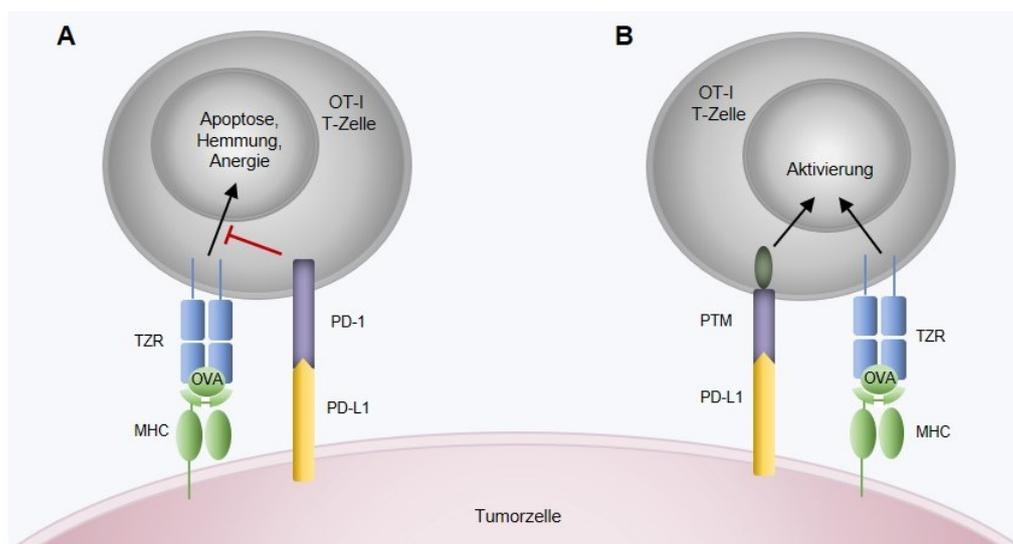
Die Eigenschaften von soliden Tumoren mindern zwar noch den Erfolg der gegenwärtigen Immuntherapien, zeigen aber ebenso die Notwendigkeit einer individualisierten Therapie. Ungefähr 90 % aller Todesfälle durch Tumoren sind auf häufige epitheliale Tumoren zurückzuführen, was die Bedeutung für die Entwicklung neuer Therapieformen hervorhebt (Rosenberg et al. 2015).

### **1.3 Rationale und Zielsetzung der Promotionsarbeit**

Zur Optimierung der Immuntherapie kann ein vielversprechender Ansatz die Kombination von adoptiver Zelltherapie (AZT) und Immun-Checkpoint-Blockade (ICB) sein (Li et al. 2019). Hierdurch würden zwei entscheidende Faktoren für eine induzierte, starke Immunantwort miteinander verbunden werden: Eine ausreichende Anzahl an tumorspezifischen Immunzellen und die Aufrechterhaltung ihrer Funktion (Grosser et al. 2019). Unsere Arbeitsgruppe etablierte erfolgreich einen murinen PD-1-CD28-Fusionsrezeptor (PTM), der die Therapieansätze der AZT und ICB miteinander kombiniert (Abbildung 3). Da PD-1 der B7-CD28-Familie angehört, sind die beiden fusionierten Rezeptoranteile miteinander funktionell kompatibel und das normalerweise koinhibitorische Signal der PD-1-PD-L1-Interaktion, löst ein kostimulatorisches Signal aus. In früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe wurden

durch Transduktion des Rezeptors PTM in murinen CD8<sup>+</sup> T-Zellen eine bessere zytotoxische Wirksamkeit *in vitro* und *in vivo* an dem murinen Pankreaskarzinommodell Panc02-OVA erreicht (Kobold et al. 2015).

Die Arbeiten von Kobold et al. stellen die Grundlage für die vorliegende Promotionsarbeit dar. In der vorliegenden Arbeit wurde das Modell-Antigen Ovalbumin (OVA) verwendet. Hierfür wurden murine Tumormodelle durch retrovirale Transduktion zur Expression des OVA-Antigens befähigt. Ovalbumin ist ein Hühnereiweißprotein, das an der Position 257-264 die Aminosäuresequenz SIINFEKL enthält, welches ein immunogenes Epitop darstellt und durch MHC-I Molekülen präsentiert wird (Rotzschke et al. 1991). Aus transgenen OT-I Mäusen können primäre CD8<sup>+</sup> OT-I T-Zellen isoliert werden, die TZR spezifisch für das SIINFEKL-Epitop des Ovalbumins besitzen (Abbildung 3). Binden die OT-I T-Zellen daran, werden sie aktiviert (Hogquist et al. 1994).



**Abbildung 3: Prinzip des OVA-Modells und Wirkweise des Rezeptors PTM, modifiziert nach Kobold et al. 2015, Chen et al. 2017, Sanchez-Trincado et al. 2017.** Transduzierte Tumorzellen präsentieren auf MHC-I OVA-Epitope, die von TZR der OT-I T-Zellen erkannt werden. Binden T-Zellen mit PD-1 an PD-L1 der Tumorzellen, kann das Signal des TZR inhibiert werden und zu Anergie, Apoptose und Hemmung führen (**A**). Die extrazelluläre und transmembranäre Domänen von PTM entstammen dem koinhibitorischen Rezeptor PD-1, der intrazelluläre Anteil (dunkelgrün) dem kostimulatorischen Rezeptor CD28. Mit PTM transduzierte OT-I T-Zellen, können durch die Interaktion mit PD-L1, in Abhängigkeit vom TZR-Signal, aktiviert werden (**B**).

Nachdem ein therapeutischer Effekt des Fusionsrezeptors modellhaft belegt wurde, entstand die Intention den Wirkmechanismus genauer zu untersuchen. Dafür war es jedoch notwendig vorerst weiteren Fragen nachzugehen. Ziel dieser Promotionsarbeit war es, folgende Fragestellungen (a bis d sowie a und b) zu beantworten:

1. Beruht die Wirksamkeit von PTM-transduzierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf der PD-L1-Expression der Panc02-OVA Tumorzellen?
  - a.) Ist mithilfe der CRISPR-Cas9-Methode ein knock-out des PD-L1-kodierenden Gens in Panc02-OVA möglich?
  - b.) Werden OT-I T-Zellen nach Anwendung von CRISPR-Cas9 von Panc02-OVA Klonen aktiviert?
  - c.) Zeigen der Panc02-OVA PD-L1-knock-out Klon und seine *mock* Kontrolle das gleiche Wachstumsverhalten *in vivo*?
  - d.) Kann PTM auf OT-I T-Zellen einen therapeutischen Effekt bei Panc02-OVA PD-L1-knock-out Tumorzellen erzielen?
2. Kann das Therapiekonzept auf das murine Kolonkarzinommodell MC38-OVA als eine weitere Tumorentität ausgeweitet werden?
  - a.) Kann Ovalbumin von MC38 exprimiert werden und wirken OT-I T-Zellen dadurch zytotoxisch auf diese?
  - b.) Können die generierten MC38-OVA Tumorzellen PD-L1 exprimieren?

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1 Geräte, Reagenzien und Zellkultur

#### 2.1.1 Technische Geräte

**Tabelle 1: Geräte**

Technische Geräte	Hersteller
Abzugsschrank 2-453-JAND	Köttermann Systemlabor (Hänigsen, Deutschland)
Alpha Imager HP gel imager	Alpha Innotech (Kasendorf, Deutschland)
Assay Platte, stark bindend	Corning (Corning, USA)
CO <sub>2</sub> -Inkubator (BD6220)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Dampfsterilisator Varioklav	HP Medizintechnik GmbH (Oberschleißheim, Deutschland)
FACSCanto II	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
FACSAria III	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
Fujifilm LAS400	Fujifilm (Tokyo, Japan)
Gefrierschrank (-80 °C)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Inkubationsschüttler Innova44	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Kühl- und Gefrierschränke (4 °C, -20 °C)	Bosch (Gerlingen, Deutschland)
Lamin Air HeraSAFE KS	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Lichtmikroskop Axiovert 40C	Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
LSRFortessa	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
Magnetrührer RH BASIC 2	IKA (Staufen, Deutschland)
Mikrowelle	Siemens (München, Deutschland)
Minizentrifuge Sprout	Biozym (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
Mithras LB940 Mikroplattenleser	Berthold Technologies (Bad Wildbad, Deutschland)
Multifugen 3L-R, X3 and 4KR	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Nanodrop 2000c	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Neubauer Zählkammer	MTG (Sulzbach, Deutschland)
pH-Meter	WTW (Weilheim, Deutschland)
Pipettenset Research plus	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Pipetus	Hirschmann (Eberstadt, Deutschland)
PowerPac™ Universal Spannungsgerät	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)

Schüttelwasserbad 1083	GFL (Burgwedel, Deutschland)
Thermocycler T3	Biometra (Göttingen, Deutschland)
Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Tisch-Schüttler DOS-10L	ELMI (Calabasas, USA)
Transilluminator Macrovue	LKB Bromma (Stockholm, Schweden)
Vakuum-Pumpe	Promega (Fitchburg, USA)
Vortexer RS VA 10	Phoenix Instrument (Garbsen, Deutschland)
Waage ENTRIS224-1S	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Zentrifuge 5418r	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge Rotina 420R	Hettich (Tuttlingen, Deutschland)

### 2.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Puffer

**Tabelle 2: Chemikalien und Reagenzien**

<b>Chemikalien und Reagenzien</b>	<b>Hersteller</b>
Viapack Natriumchlorid 0,9 %	Baxter (Unterschleißheim, Deutschland)
Albumin Fraktion V (BSA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
BD Pharm Lyse Lysing Buffer (10 x)	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
Cut Smart Buffer	NEB (Ipswich, USA)
Deoxynucleotide Solution Mix	NEB (Ipswich, USA)
Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
DNS Ligase Puffer T4	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
DNS Ligase T4	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
DNS-Färbung Clear G	SERVA Electrophoresis (Heidelberg, Deutschland)
DNS-Polymerase Q5	NEB (Ipswich, USA)
DNS-Polymerase Taq	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAA (Pasching, Österreich)
EcoRI High-Fidelity	NEB (Ipswich, USA)
Ethanol 100 %	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
FACSFlow, FACSSafe	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
Isofluran	Abbott (Zug, Schweiz)

Isopropanol (70 %, 100 %)	Apotheke Innenstadt LMU (München, Deutschland)
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Kanamycin A	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Kalziumchlorid	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
LB Agar	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
LB Medium	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
LE Agarose	Biozym (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
Loading Dye (6 x)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
NotI High-Fidelity	NEB (Ipswich, USA)
O'GeneRuler DNS Standard Mix	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Opti-MEM I Reduced Serum Medium	Gibco, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
QuickExtract™ DNA Extraction Solution	Epicentre, Lucigen (Middleton, USA)
Q5 GC Enhancer	NEB (Ipswich, USA)
Q5 Reaction Buffer	NEB (Ipswich, USA)
Rekombinantes murines IFN- $\gamma$	Peprotech (Rocky Hill, USA)
RetroNectin	Takara Bio (Kusatsu, Japan)
TAE Puffer Rotiphorese (50 x)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
<i>TransitX2</i> Dynamic Delivery System	Mirus (Madison, USA)
Trypanblau	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

### 2.1.3 Kommerzielle Kits

**Tabelle 3: Kommerzielle Kits**

<b>Kits</b>	<b>Hersteller</b>
CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay	Promega (Fitchburg, USA)
DNA Purification Kit, JetQuick	GenoMed (Stuttgart, Deutschland)
Maxiprep System, PureYield Plasmid	Promega (Fitchburg, USA)
Miniprep Kit, GeneJet Plasmid	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
MycoAlert Kit	Lonza (Basel, Schweiz)
TOPO TA-Cloning Kit for Sequencing	Invitrogen (Carlsbad, USA)

**Tabelle 4: Puffer**

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>	
Erylyse-Puffer	10 ml	BD PharmLyse (10 x)
	90 ml	PBS
<i>Flourescence-activated-cell-sorting</i> -Puffer (FACS)	PBS	
	2 %	FBS
RetroNectin <i>Blocking</i> -Puffer	PBS	
	2 %	BSA
RetroNectin Wasch-Puffer	PBS	
	1 M	HEPES
<i>Sorting</i> -Puffer	PBS	
	2 mM	EDTA
	2 %	FBS
TAE-Puffer	ddH <sub>2</sub> O	
	2 %	TAE Puffer Rotiphorese (50 x)
Transfektions-Puffer	100 ml	ddH <sub>2</sub> O
	1,6 g	NaCl
	74 mg	KCl
	50 mg	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1,0 g	HEPES
	pH 6,76	

## 2.1.4 Materialien für die Zellkultur

**Tabelle 5: Materialien für die Zellkultur**

<b>Materialien</b>	<b>Hersteller</b>
Blasticidin	InvivoGen (San Diego, USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	PAA (Pasching, Österreich)
<i>Fetal bovine serum</i> (FBS)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
HEPES-Puffer 1 M	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
L-Glutamin 200 mM	PAA (Pasching, Österreich)
MEM Non-Essential Amino Acids (NEAA, 100 x)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

Natrium-Pyruvat	PAA (Pasching, Österreich)
Penicillin, Streptomycin (100 x)	PAA (Pasching, Österreich)
Puromycin	InvivoGen (San Diego, USA)
Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640	PAA (Pasching, Österreich)
RPMI ohne Phenolrot	PAA (Pasching, Österreich)
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Trypsin (10 x)	PAA (Pasching, Österreich)
Well-Platten	Greiner bio-one (Kremsmünster, Österreich)
Zellkulturflaschen	Corning (Corning, USA)

Die verwendeten Einmalmaterialien für die Zellkultur wurden von den Firmen Sartorius (Göttingen, Deutschland), Sarstedt (Nürnbrecht, Deutschland), BD Falcon (Franklin Lakes, USA), Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland), Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Millipore (Billerica, USA) erworben.

**Tabelle 6: Medien für die Zellkultur**

Medien für die Zellkultur	Zusammensetzung
DMEM-Medium für Platinum-E	DMEM-Vollmedium 10 $\mu$ g/ml Puromycin 1 $\mu$ g/ml Blastocidin
DMEM-Vollmedium	DMEM 10 % FBS 2 mM L-Glutamin 100 U/ml Penicillin 100 U/ml Streptomycin
RPMI T-Zellmedium	RPMI 10 % FBS 2 mM L-Glutamin 100 U/ml Penicillin 100 U/ml Streptomycin 1 mM Natrium-Pyruvat 1 $\mu$ M MEM NEAA 50 $\mu$ M $\beta$ -Mercaptoethanol 1 mM HEPES

Zytotox-Medium	RPMI ohne Phenolrot
	1 % FBS
	2 mM L-Glutamin
	100 U/ml Penicillin
	100 U/ml Streptomycin
	1 mM Natrium-Pyruvat
	1 $\mu$ M MEM NEAA
	50 $\mu$ M $\beta$ -Mercaptoethanol
	1 mM HEPES

Tabelle 7: Zytokine und Wachstumsfaktoren

Zytokine und Wachstumsfaktoren	Eingesetzte Konzentration	Hersteller
Anti-Mouse-CD3e (Klon: 145-2C11), Functional Grade	1 $\mu$ g/ml	eBiosciences Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Anti-Mouse anti-CD28 (Klon: 37.51), Functional Grade	0,1 $\mu$ g/ml	eBiosciences Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Dynabeads Mouse T-Activator anti-CD3-anti-CD28	4 x 10 <sup>5</sup> /ml	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Rekombinantes humanes IL-2	10 IU/ml	Chiron, Novartis (Basel, Schweiz)
Rekombinantes humanes IL-15	50 ng/ml	Peptotech (Rocky Hill, USA)

## 2.1.4.1 Zelllinien

Tabelle 8: Zelllinien

Zelllinie	Zellart	Medium	Herkunft
5-alpha	Competent <i>E. coli</i>	LB Medium	New England Biolabs, (Ipswich, USA)
MC38-GFP	Murines Kolonkarzinommodell	DMEM-Vollmedium	Prof. Dr. med. Mathias Heikenwalder (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, Deutschland)
Panc02-OVA	Murines Pankreaskarzinommodell	DMEM-Vollmedium	Prof. Dr. med. C. Bruns (LMU Munchen, Deutschland)

Platinum-E	Retrovirale Verpackungszelllinie	DMEM-Medium für Platinum-E	Cell Biolabs, Inc. (San Diego, USA)
------------	-------------------------------------	-------------------------------	--

## 2.1.5 FACS-Antikörper

**Tabelle 9: FACS-Antikörper**

Konjugierte Primärantikörper	Klon	Eingesetzte Konzentration	Hersteller
APC anti-mouse CD274 (PD-L1, B7-H1)	10F.9G2	20 µg/ml	BioLegend (San Diego, USA)
APC Rat IgG2b, κ Isotype Ctrl	RTK4530	20 µg/ml	BioLegend (San Diego, USA)
PE-Cy7 anti-mouse CD274 (PD-L1, B7-H1)	10F.9G2	20 µg/ml	BioLegend (San Diego, USA)
PE-Cy7 Rat IgG2b, κ Isotype Ctrl	RTK4530	20 µg/ml	BioLegend (San Diego, USA)

## 2.1.6 Primer

**Tabelle 10: Primer**

Adressiertes Gen oder Vektor	Sequenz	Eingesetzte Konzentra- tion	Verwendungs- zweck
Murines PD-L1	F: 5'-AGG TGC AAT CCC AAC ACC AG-3' R: 5'-CGT CTG TGA TCT GAA GGG CA-3'	1 µM	Sequenzierung, PCR
OVA	F: 5'-ATT AGC GGC CGC GCC ACC ATG GGC TCC ATC G-3'	0,5 µM	OE-PCR
P2A	F: 5'-GTG AAA CAG ACT TTG AAT T-3' R: 5'-CCT CAG GTT GGG TCC GGG C-3'	0,5 µM	OE-PCR
OVA-P2A	R: 5'-GTC TAC ACA AAG GGG ACA CTT TGT CTG A-3'	0,5 µM	OE-PCR

P2A-iRFP	F: 5'-CAA CCC AGG CCCG GCG CGT AAG GTC GAT CTC A-3'	0,5 µM	OE-PCR
iRFP	R: 5'-GTG GTG GTT GCG ATT CTT AAG TAA T-3'	0,5 µM	OE-PCR
pMP71- Vektor	F: 5'-TTG CTT TCG GTT TTA CGC CG-3' R: 5'-CGT AGA ATG GCG GTA AAT AAG GG-3'	0,5 µM	Sequenzierung

F: *forward* Primer

R: *reverse* Primer

Die Primer wurden mithilfe der Softwares Primer-BLAST und SnapGene erstellt und von Metabion International AG (München, Deutschland) synthetisiert.

### 2.1.7 Software

**Tabelle 11: Software**

Software	Hersteller
Emboss Needle (Pairwise Sequence Alignment)	EMBL-EBI ( <a href="http://www.ebi.ac.uk">www.ebi.ac.uk</a> ) (Hinxton, UK)
Endnote	Thompson Reuter (Carlsbad, USA)
FACS Diva	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
FlowJo	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
GraphPad Prism	GraphPad Software (La Jolla, USA)
Microsoft Office	Microsoft (Redmond, USA)
Primer-BLAST NCBI NIH	NCBI ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a> ) (Rockville Pike, USA)
SnapGene	GSL Biotech LLC (Chicago, USA)

## 2.2 Tierversuche

### 2.2.1 Mäuse

Transgene OT-I Mäuse wurden vom Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA) gekauft und in unserem Tierstall unter SPF-Bedingungen gezüchtet. Für die Tierversuche wurden weibliche C57BL/6 Mäuse vom Wildtyp der Firma Janvier (St. Berthevin, Frankreich) bezogen. Mit Beginn der Experimente waren die Tiere 6 bis 8 Wochen alt. Die zuständige Behörde (Regierung von Oberbayern, München, Deutschland) genehmigte die Tierversuche. Die Mäuse wurden mit Genickbruch unter Isofluran-Narkose oder mit CO<sub>2</sub>-Begasung getötet.

### 2.2.2 Isolation von primären, murinen T-Zellen

Zur Gewinnung von murinen, primären OT-I T-Zellen wurde die Milz aus getöteten transgenen Mäusen entfernt. Das Organ wurde unter sterilen Bedingungen durch ein 40 µm Zellsieb gedrückt, 30 ml T-Zellmedium gespült und in einem 50 ml Falcon aufgefangen. Danach wurden die Splenozyten für 5 min bei 400 x g zentrifugiert und die Erythrozyten im Zellpellet osmolytisch mit 2 ml Erylyse-Puffer für 2 bis 2,5 min lysiert. Nach Abstoppen der Reaktion, erneuter Zentrifugation und Lösung des Zellpellets in frischem T-Zellmedium, wurden die Zellen auf  $2 \times 10^6$  pro ml eingestellt. Die Splenozyten kultivierten in einer 6-Well-Platte für 24 h bei 37 °C im CO<sub>2</sub>-Inkubator. Die CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten wurden mit 10 IU/ml Interleukin-2, 1 µg/ml anti-CD3 und 0,1 µg/ml anti-CD28 im T-Zellmedium selektiert.

### 2.2.3 *In-vivo*-Versuche

In den Tierexperimenten wurden C57BL/6 Mäusen  $2 \times 10^6$  Panc02-OVA Tumorzellen, gelöst in 100 µl PBS, subkutan in die Flanke injiziert. Die Tumorzellen wurden zuvor dreimal mit PBS gewaschen und durch ein 30 µm Zellsieb gefiltert. Die Tiere wurden bezüglich ihrer Tumorgroße in gleichmäßigen Gruppen (n= 2 - 5) randomisiert. Bei Therapievorsuchen wurden nach 6 Tagen  $10^6$  untransduzierte oder mit PTM-transduzierte OT-I T-Zellen intravenös appliziert. Während der Versuche sichteten wir alle zwei Tage die Tiere und dokumentierten verblindet die Tumorgroße. Mäuse deren Tumoren eine Größe von 225 mm<sup>2</sup> erreichten oder ulzerierten wurden getötet.

## 2.3 Zelluläre Methoden

### 2.3.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Alle Arbeiten mit Zellen wurden unter sterilen Bedingungen in einer *Laminar Air Flow* durchgeführt. Die Zellen kultivierten in CO<sub>2</sub>-Inkubatoren bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt und 95 % Luftfeuchtigkeit.

### 2.3.2 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Die Zellzahl und Zellviabilität wurde mit dem Trypanblau-Ausschlusstest ermittelt. Lebende Zellen mit intakter Zellmembran nehmen den Farbstoff nicht auf, Zellen mit

perforierter Zellmembran werden blau gefärbt. Die Erfassung der Zellmenge erfolgte durch eine Neubauer-Zählkammer und wurde folgendermaßen berechnet:

Zellmenge pro ml = Zellzahl in einer Kammer x Verdünnungsfaktor x  $10^4$

### 2.3.3 Kultivierung von immortalisierten Zelllinien

Die verwendeten immortalisierten Zelllinien wurden in adäquaten Zellkulturflaschen oder Well-Platten in DMEM-Vollmedium oder DMEM-Medium kultiviert und regelmäßig mikroskopisch auf mikrobielle Kontamination und Anzeichen von Zelltod kontrolliert. Regelmäßig fand eine Testung auf Infektion mit Mykoplasmen statt. Abhängig von der Konfluenz wurde mehrfach wöchentlich passagiert, wobei adhärente Tumorzellen mit Trypsin gelöst und ein Teil der Zellen in frischem Medium weiterkultiviert wurde.

### 2.3.4 Kultivierung von T-Zellen

Nach erfolgreicher Transduktion und alle 48 h wurden die isolierten T-Zellen kultiviert. Die Zellen wurden aus der entsprechenden Well-Platte entnommen und bei  $400 \times g$  für 5 min zentrifugiert, der Flüssigkeitsüberstand verworfen und das Pellet in T-Zellmedium gelöst. Die T-Zellen wurden in einer Konzentration von  $10^6$  Zellen pro ml Medium mit 50 ng/ml Interleukin-15 (IL-15) eingestellt. Nach sieben Tagen wurden die T-Zellen verworfen.

### 2.3.5 Retrovirale Transduktion

#### 2.3.5.1 Transduktion von Tumorzellen

Zur Expression von Ovalbumin wurde das murine Kolonkarzinommodell MC38 mit einem retroviralen pMP71-Vektor transduziert, der die Desoxyribonukleinsäure-Sequenz (DNS) für *OVA-Near-infrared-fluorescence-protein* (iRFP) enthielt. Die Sequenz für das OVA-iRFP generierten wir durch *Overlap extension polymerase chain reaction* (OE-PCR). Das verwendete Protokoll wurde folgendermaßen durchgeführt (modifiziert nach Leisegang et al. 2008, Kobold et al. 2015).

In einer 6-Well-Platte wurden pro Well  $10^6$  bis  $1,2 \times 10^6$  Platinum-E Zellen in 3 ml DMEM-Vollmedium gleichmäßig ausplattiert und im  $CO_2$ -Inkubator kultiviert. Platinum-E Zellen wurden als immortalisierte Verpackungszelllinie verwendet, die bei Hinzukommen eines Verpackungssignals ökotrope Virionen mit retroviralen

Strukturproteinen erzeugt (Morita et al. 2000). Nach 20 bis 24 h und Erreichen einer 60- bis 70-prozentigen Konfluenz, wurden die Platinum-E Zellen transfiziert. Pro Well wurden 150 µl an 2,5 M Kalziumchlorid, 18 µg der zu transfizierenden DNS und ddH<sub>2</sub>O mit 150 µl Transfektions-Puffer tröpfchenweise vermischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die nun präzipitierte Transfektions-Lösung auf die Platinum-E Zellen getropft. Die transfizierten Verpackungszellen wurden für 48 h in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator gegeben, wobei das Medium nach den ersten 6 h erneuert wurde.

Das Virionen-haltige Medium der Platinum-E Zellen wurde abgenommen und durch einen, für Viren durchlässigen, 0,45 µm Filter gegeben. Die Verpackungszellen wurden mit 3 ml DMEM-Vollmedium versorgt. Auf eine RetroNektin-beschichtete 24-Well-Platte wurde je Well 1 ml des Virusüberstandes gegeben und mit 3000 x g bei 4 °C für 2 h zentrifugiert. Anschließend wurde der Virusüberstand aus der 24-Well-Platte entfernt, je Well 10<sup>5</sup> MC38-*Green-fluorescent-protein* (GFP) Tumorzellen überführt und für 30 min mit 800 x g bei 32 °C zentrifugiert. Über Nacht lagerte die 24-Well-Platte bei 37 °C. Nach 24 h erfolgte eine zweite Transduktion, wobei für 90 min mit 800 x g bei 32 °C zentrifugiert wurde. Nach weiterer Inkubation bei 37 °C für mindestens 6 h konnte die Transduktionseffizienz mittels Durchflusszytometrie überprüft werden.

#### 2.3.5.2 Transduktion von primären, murinen T-Zellen

Für die Transduktion von murinen T-Zellen wurde ein PD-1-CD28-Fusionsrezeptor, kloniert in einem retroviralen pMP71-Vektor, verwendet. Den Virusüberstand generierten wir wie oben beschrieben. Die Platinum-E Zellen wurden mit 3 ml T-Zellmedium versorgt. Die kultivierten Splenozyten wurden auf 10<sup>6</sup> Zellen pro ml und pro 24-Well, unter Hinzugabe von 10 IU/ml IL-2 und 4 x 10<sup>5</sup> Anti-CD3-anti-CD28-Dynabeads pro ml, eingestellt. Im Anschluss wurde, wie bei der Transduktion von Tumorzellen verfahren.

#### 2.3.6 Zytotoxizitätsversuche

Die Zytotoxizitätsversuche wurden für die MC38-GFP-OVA-iRFP und Panc02-OVA identisch durchgeführt. Für die Kokultur wurden in einer 96-Well-Platte je Well 2 x 10<sup>4</sup> Tumorzellen pro 100 µl Zytotox-Medium plattiert und entsprechend OT-I T-Zellen hinzugefügt. Als Effektor- zu Zielzellverhältnis wählten wir 10:1 oder 5:1, alle Konditionen wurden in Quadruplikaten durchgeführt. Die Versuche wurden bei 37 °C

im CO<sub>2</sub>-Inkubator nach 6 bis 10 h nach mikroskopischer Sichtung beendet. Die Auswertung der Versuche wurde nach dem Protokoll der Firma Promega für das *CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay Kit* durchgeführt. Lysierte Zellen setzen unter anderem das zytosolische Enzym Laktatdehydrogenase (LDH) frei, welches mithilfe eines enzymatischen Farbumschlags quantifiziert wurde. Dessen Intensität war proportional zur LDH-Konzentration und somit zur Menge der lysierten Zellen. Das Absorptionssignal wurde bei einer Wellenlänge von 490 nm mit einem Plattenleser von Mithras bestimmt. In dieser Arbeit wurde die Zytotoxizität entweder in Prozent (siehe Formel) oder als Absorptionssignal (Zähler der Formel) ermittelt.

$$\text{Zytotoxizität [\%]} = \frac{(\text{Kokultur} - \text{Effektorzellen spontan} - \text{Zielzellen spontan} - \text{Medium})}{(\text{Zielzellen maximal} - \text{Zielzellen spontan} - \text{Medium})} \times 100$$

### 2.3.7 Induktion der PD-L1-Expression in Tumorzellen

Viele Tumorentitäten erhöhen als *Escape*-Strategie nach Kontakt mit Zytokinen, wie beispielsweise IFN- $\gamma$ , ihre PD-L1-Expression (Duan et al. 2018; Pitt et al. 2016; Sharpe et al. 2018). *In vitro* kann dieses Phänomen durch Inkubation der Tumorzellen mit IFN- $\gamma$  modellhaft nachgestellt werden. In einer 96-Well-Platte wurden pro Well  $2 \times 10^4$  Tumorzellen in 100  $\mu$ l DMEM-Vollmedium mit 2 ng, 20 ng oder 100 ng murinem IFN- $\gamma$  für 48 h im CO<sub>2</sub>-Inkubator kultiviert. Anschließend wurde die PD-L1-Expression durchflusszytometrisch ermittelt.

## 2.4 Immunologische Methoden

### 2.4.1 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wurde verwendet, um Transduktionseffizienzen oder die Expression von Oberflächenproteinen zu untersuchen und um Tumorzellen zu sortieren. Für die Transduktionsraten wurden  $5 \times 10^5$  Zellen in 50  $\mu$ l *Flourescence-activated cell sorting* (FACS)-Puffer gewaschen und folgend am FACSCanto II von BD Biosciences untersucht. Oberflächenproteine wurden mit 1  $\mu$ g fluoreszierenden Primärantikörper markiert und bei Dunkelheit für 30 min bei 4 °C inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen gewaschen, in 1 ml FACS-Puffer resuspendiert und die Expression der Proteine mit den Gräten FACSCanto II oder LSRFortessa von BD Biosciences quantifiziert.

Das Sortieren der OVA-iRFP<sup>+</sup> MC38-GFP und transfizierten GFP<sup>+</sup> Panc02-OVA Tumorzellen erfolgte mit den FACSAria III. Dies konnte mit freundlicher Hilfe von der

Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Klein, Direktor der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital, und der Arbeitsgruppe von PD Dr. Hristov vom Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten der Ludwig-Maximilians-Universität durchgeführt werden. Die Tumorzellen wurden zuvor filtriert, in *Sorting*-Puffer gewaschen und gelöst.

## 2.5 Molekularbiologische Methoden

### 2.5.1 Generierung eines PD-L1-Gen-knock-outs

Zur Erzeugung eines PD-L1-Gen-knock-outs wurde das *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR) und das *CRISPR-associated system* (Cas) angewandt. Dieses System stammt ursprünglich aus Bakterien zur Abwehr von eindringenden Viren und Plasmiden (Ishino et al. 2018). In dieser Arbeit wurde das synthetisierte CRISPR-Cas9-System der Firma Sigma Aldrich verwendet. Dieses System stammt aus dem Bakterium *Streptococcus pyogenes* und wurde angepasst, um in Eukaryonten zur Anwendung kommen zu können. Das System funktioniert mit zwei entscheidenden Komponenten: der Cas9-Endonuklease und einer *Guide ribonucleic acid* (gRNA).

Die Endonuklease erzeugt als Enzym einen Doppelstrangbruch in der DNS der Zielzelle. Die Cas9-Endonuklease kann mithilfe der gRNA gezielt an einen bestimmten DNS-Abschnitt geführt werden. Die Zelle versucht daraufhin den Doppelstrangbruch in ihrer DNS entweder durch homologe Rekombination oder nicht-homologe Endverknüpfung zu reparieren. Mithilfe homologer Rekombination kann ein Defekt anhand eines komplementären DNS-Strangs fehlerfrei repariert werden. Oft ist jedoch kein komplementärer DNS-Strang vorhanden, wobei die Enden der Doppelstrangbrüche als nicht-homologe Endverknüpfung enzymatisch miteinander verbunden werden, was eine hohe Fehleranfälligkeit aufweist. Häufig entsteht dadurch eine Deletion oder Insertion von Basenpaaren, die einen *frameshift* oder frühzeitige Stoppcodons im Leseraster erzeugen können, welche den offenen Leserahmen des betroffenen Gens unterbrechen und die richtige Aminosäuresequenz für das Protein nicht mehr abgelesen werden kann (Ran et al. 2013).

In dieser Arbeit sollte ein PD-L1-Gen-knock-out in Panc02-OVA Zellen erzeugt werden. Die hierfür synthetisierte gRNA wurde für das Exon 3 des PD-L1-Gens gewählt. Die Cas9-Endonuklease des *Streptococcus pyogenes* erzeugt einen Doppelstrangbruch, der sich drei Basenpaare in Richtung 5'-Ende vor dem *Protospacer adjacent motif*

(PAM) am komplementären DNS-Strang befindet (Jinek et al. 2012). Das CRISPR-Cas9-System der Firma Sigma Aldrich bestand aus einem Plasmid, das unter anderem das GFP, zwei Antibiotikaresistenzen, die Endonuklease Cas9 kodierte und die adäquate gRNA enthielt.

Zuerst wurden  $0,6$  bis  $0,8 \times 10^6$  Panc02-OVA pro Well in DMEM-Vollmedium in einer 6-Well-Platte ausgebracht und bei  $37^\circ\text{C}$  kultiviert. Ziel war eine Konfluenz von 70 bis 80 % nach 18 h. 30 min vor der Transfektion wurden die Zellen mit frischem  $37^\circ\text{C}$  warmen Medium versorgt. Die Transfektion wurde mittels Lipofektion durchgeführt, dafür wurden  $20\ \mu\text{l}$  TransIT-X2<sup>®</sup>,  $5\ \mu\text{g}$  Plasmid und  $250\ \mu\text{l}$  Opti-MEM<sup>™</sup> bei Raumtemperatur für 30 min miteinander inkubiert. Danach wurde der TransIT-X2<sup>®</sup>-DNS-Komplex tropfenweise auf die plattierten Panc02-OVA Zellen gegeben und diese für weitere 24 bis 48 h kultiviert.

Die Tumorzellen wurden den Wells entnommen, mit PBS gewaschen, durch einen  $30\ \mu\text{m}$  Filter gegeben und in *Sorting*-Puffer aufgenommen. Zellen mit einem mittleren Level an GFP-Expression wurden mit der FACSaria III entweder als Einzelzellklone in eine 96-Well-Platte oder in einem 15 ml Falcon sortiert. Die Panc02-OVA Zellen aus dem 15 ml Flacon wurden für 2 Tage in einer 24-Well-Platte kultiviert, anschließend auf 0,2 bis 0,8 Zellen pro Well verdünnt und ebenfalls in eine 96-Well-Platte pipettiert. Die 96-Well-Platten wurden mit  $200\ \mu\text{l}$  konditioniertem Medium versorgt, welches den Wildtyp Panc02-OVA Zellen nach 48 h Inkubationszeit entnommen und steril durch ein  $0,2\ \mu\text{m}$  Sieb filtriert wurde. Nach 4 bis 5 Tagen wurden die 96-Well-Platten mikroskopisch auf einzelne Kolonien inspiziert. Befanden sich mehrere Kolonien in einem Well, wurde dieses verworfen. Sobald genügend Zellen vorhanden waren, wurden die Klone in einem ersten Screening mittels Durchflusszytometrie auf die Expression von PD-L1 geprüft. Potenzielle Zellklone wurden mit murinem IFN- $\gamma$  inkubiert und erneut auf den Liganden PD-L1 untersucht. Zur Bestätigung eines Gen-knock-outs wurde die DNS-Sequenz des entsprechenden Gens untersucht.

#### 2.5.2 Extraktion von DNS aus Tumorzelllinien

Die DNS von Tumorzellen wurde nach Herstellerprotokoll mit dem QuickExtract<sup>™</sup> DNA Extraction Solution von Epicentre<sup>®</sup>, Lucigen<sup>®</sup> isoliert. Die DNS-Konzentration wurde mittels NanoDrop<sup>®</sup> bei einer Wellenlänge von  $260\ \text{nm}$  quantifiziert. Zur Sequenzierung bestimmter Gene wurde der benötigte DNS-Abschnitt mittels PCR amplifiziert und isoliert.

### 2.5.3 Sequenzierung von PCR-Produkten und Plasmiden

Die Sequenzierung von PCR-Produkten und Plasmiden führte das Unternehmen Eurofins Genomics durch. Primer für Sequenzierungen und PCR wurden mit den Softwares SnapGene und Primer-BLAST designt und von der Firma Metabion synthetisiert. Die Ergebnisse der Sequenzierungen wurden mit den DNS-Sequenzen der Wildtypen über ein Tool von EMBL-EBI im Internet verglichen.

### 2.5.4 TOPO-TA-Klonierung zur Sequenzierung einzelner Allele

Die TOPO-TA-Klonierung ermöglichte es, die Allele eines Zellklons einzeln zu sequenzieren. Die DNS wurde aus Panc02-OVA Einzelzellklonen extrahiert und ein Teil des PD-L1-Gens durch PCR amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde nach dem Herstellerprotokoll mit der DNS-Polymerase Taq inkubiert, um an dem 3'-Ende des PCR-Produkts ein einzelnes Desoxyadenosin zu hängen. Anschließend wurde der Ansatz mit dem JetQuick™ *DNA Purification* Kit aufgereinigt. Daraufhin konnte mit einem TOPO® TA *Cloning* Kit der linearisierte TOPO®-Vektor mit dem PCR-Produkt ligiert werden. Die entstandenen Plasmide wurden in *E.coli* Bakterien des Stammes 5-alpha transformiert, diese wurden auf Kanamycin-haltigen Agarplatten ausgestrichen. Nach 24 bis 48 h wurden einzelne Bakterienkolonien gepickt. Aus den Kolonien wurde die ringförmige DNS mittels GenJET Plasmid Miniprep Kit isoliert und sequenziert.

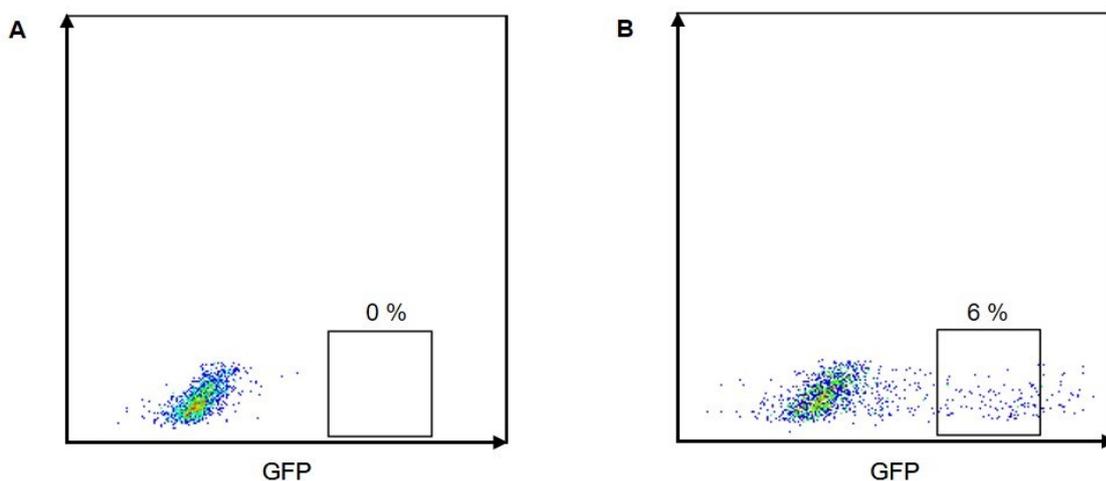
## 2.6 Statistische Auswertungen

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden als arithmetisches Mittel von Replikaten angegeben, ihre Fehlerbalken stellen die Standardfehler dieser Mittelwerte dar (*Standard error of the mean*, SEM). Die statistische Signifikanz von ungepaarten Stichproben wurde mit dem zweiseitigen Student t-Test und für multiples Testen mit dem zweifaktoriellen ANOVA mit Bonferroni-Korrektur berechnet. Dies wurde mit der Software GraphPad Prism Version 5.0 bewerkstelligt. Unter einen p-Wert von 0,05 wurden die Ergebnisse als statistisch signifikant angenommen.

### 3. Ergebnisse zur Generierung eines PD-L1-Gen-knock-outs

#### 3.1 Transfektion mit dem pCMV-Cas9-GFP-Plasmid

Zur Erzeugung eines PD-L1-Gen-knock-outs im Panc02-OVA Tumormodell musste ein Plasmid in die Zellen eingeschleust werden, welches die spezifische gRNA für den ausgewählten Genabschnitt und die Komponenten für das CRISPR-Cas9-System enthielt. Die Tumorzellen wurden mithilfe von Lipofektion mit dem passenden pCMV-Cas9-GFP-Plasmid transfiziert, wodurch erfolgreich transfizierte Zellen durchflusszytometrisch über die Expression von GFP detektiert wurden (Abbildung 4). Nicht transfizierte Panc02-OVA Zellen exprimierten kein GFP (Abbildung 4 A), bei etwa 6 % aller transfizierten Zellen konnte eine mittlere Expression an GFP gemessen werden. (Abbildung 4 B). Jene transfizierten Zellen wurden sortiert und als Einzelzellklone kultiviert und expandiert.



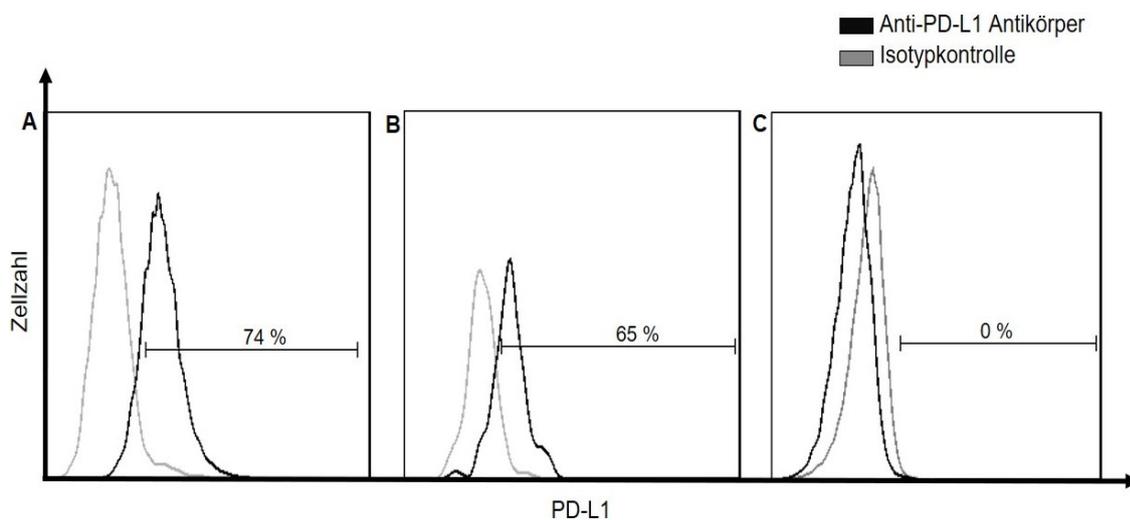
**Abbildung 4: Durchflusszytometrische Messung nach Lipofektion von Panc02-OVA Tumorzellen mit dem synthetisierten pCMV-Cas9-GFP-Plasmid.** Nachweis von GFP bei untransfizierten (A) und transfizierten Tumorzellen (B) und Einstellungen eines mittleren Levels der GFP-Expression für das anschließende Sortieren der Zellen.

#### 3.2 Identifikation möglicher PD-L1-knock-out Klone

##### 3.2.1 Untersuchung einer konstitutiven Expression von PD-L1

Da wir bereits aus vorangegangenen Experimenten von einer konstitutiven PD-L1-Expression durch die Panc02-OVA Tumorzellen Kenntnis hatten, untersuchten wir die herangewachsenen Einzelzellklone in einem ersten Screening durchflusszytometrisch darauf. Die Ergebnisse dieses Screenings sind beispielhaft für die beiden Klone 10 und 51 in Abbildung 5 dargestellt. Der Ligand wurde mit einem fluoreszierenden anti-PD-L1 Antikörper

(Abbildung 5, schwarze Linie) auf den Tumorzellen markiert und mit dem entsprechenden Isotyp-Kontrollantikörper (Abbildung 5, graue Linie) verglichen. Den Panc02-OVA Wildtypzellen konnte in dieser Analyse eine konstitutive Expression an PD-L1 von 74 % nachgewiesen werden (Abbildung 5 A). Unter den Einzelzellklonen wurde der Klon 10 mit einer PD-L1-Dichte ähnlich den Ausgangszellen identifiziert (Abbildung 5 B). Auf der Zelloberfläche des Klons 51 konnte kein PD-L1 gemessen werden (Abbildung 5 C).



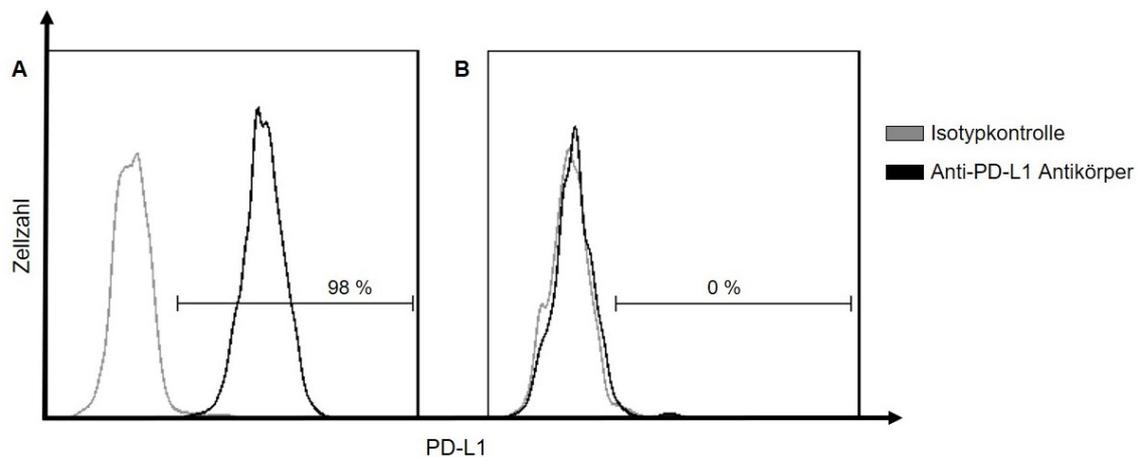
#### Abbildung 5: Untersuchung einer konstitutiven PD-L1-Expression mittels

**Durchflusszytometrie.** Analyse von Wildtyp Panc02-OVA Tumorzellen (A) und der beiden Einzelzellklone Klon 10 (B) und Klon 51 (C), nach Anwendung des CRISPR-Cas9-Systems. Zur Detektion von PD-L1 diente ein, an APC gekoppelter, 10F.9G2 anti-Maus CD274 Antikörper. Die Isotypkontrolle erfolgte durch einen RTK4530 IgG2b Rattenantikörper. Es ist ein repräsentatives Ergebnis von zwei unabhängigen Versuchen für den Klon 51 und dem Wildtypen gezeigt, für Klon 10 wurde ein Versuch durchgeführt.

#### 3.2.2 Überprüfung einer induzierbaren PD-L1-Expression

Einzelzellklone, die während des ersten Screenings konstitutiv keine nachweislichen PD-L1-Liganden zeigten, wurden auf eine induzierbare Expression dieses Proteins untersucht. Hierdurch sollte eine bisher nicht detektierbare, basale Proteinbiosynthese des Liganden aufgedeckt werden. Unsere Arbeitsgruppe konnte in vorherigen Arbeiten eine Induktion von PD-L1 auf Panc02-OVA Zellen durch Inkubation mit murinem IFN- $\gamma$  erzeugen (Kobold et al. 2015). Somit wurden die Panc02-OVA Wildtyp Tumorzellen und Einzelzellklone murinem IFN- $\gamma$  ausgesetzt und mithilfe der Durchflusszytometrie erneut analysiert (Abbildung 6). In der Wildtyp Tumorzelllinie konnte mit dieser Methode eine Erhöhung der PD-L1-Expression auf bis zu 98 % erreicht werden (Abbildung 6 A). Der Klon

51, der bereits in Abbildung 5 C konstitutiv kein PD-L1 aufwies, erreichte auch nach dieser Stimulation keine messbare Dichte des Liganden auf der Zelloberfläche (Abbildung 6 B).



**Abbildung 6: Durchflusszytometrische Analyse einer induzierbaren PD-L1-Expression.**

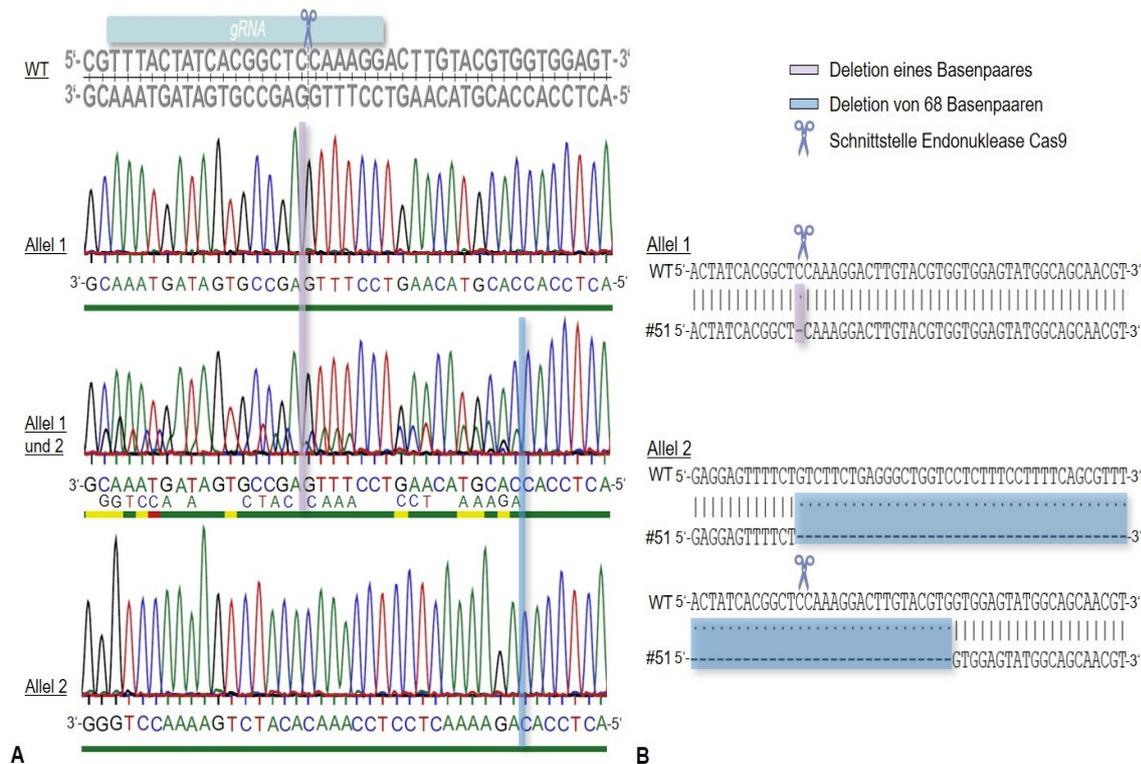
Inkubation von  $2 \times 10^4$  Panc02-OVA Tumorzellen über 48 h mit einer Konzentration von 100 ng pro 100  $\mu$ l murinem IFN- $\gamma$ . Darstellung von Wildtyp Panc02-OVA Tumorzellen (A) und des Klon 51 (B), zur Detektion von PD-L1 wurde ein, an APC gekoppelter, 10F.9G2 anti-Maus CD274 Antikörper verwendet. Die Isotypkontrolle entsprach einem RTK4530 IgG2b Rattenantikörper. Dieser Versuch wurde einmal durchgeführt.

### 3.3 Darstellung des PD-L1-Gens auf DNS-Ebene in einem potenziellen knock-out Klon

Zur endgültigen Identifizierung eines PD-L1-knock-outs wurden Einzelzellklone, denen in beiden durchflusszytometrischen Analysen auf der Zelloberfläche keine PD-L1-Liganden nachgewiesen werden konnten, auf ihre DNS-Sequenz im PD-L1-Gen untersucht. Hierfür wurden Primer verwendet, die spezifisch 200 bis 400 Basenpaare entfernt von der Schnittstelle der Endonuklease banden. Der benötigte Genabschnitt wurde mittels PCR amplifiziert und mit denselben Primern sequenziert. Zusätzlich zu den potenziellen knock-out Klone wurden nach dem gleichen Verfahren die DNS-Sequenz der Wildtypzellen und des Klon 10 als *mock* Kontrolle entschlüsselt.

Die Sequenzierung der Einzelzellklone erfolgte durch *reverse* Primer, diese erzielten im Chromatogramm höhere Signalstärken als unsere *forward* Primer. Bei der Entschlüsselung der DNS-Sequenz aus dem PCR-Produkt des Klon 51 ergaben sich an einigen Positionen mehrere überlappenden Basensignale (Abbildung 7 A „Allel 1 und 2“). Ursächlich für die sich überschneidenden Signale in Klon 51 waren zwei unterschiedliche Deletionen in beiden Allelen, die mithilfe einer TOPO-TA Klonierung identifiziert wurden (Abbildung 7 A in „Allel 1“ beziehungsweise „Allel 2“). In einem Allel fehlte genau an der Schnittstelle der Endonuklease

ein Basenpaar (Abbildung 7 B „Allel 1“). In dem anderen Allel wurden 68 Basenpaare komplett entfernt (Abbildung 7 B „Allel 2“). Die DNS-Sequenz des Einzelzellklons 10 entsprach der Basenabfolge der Wildtyp Panc02-OVA Tumorzellen und wurde folgend als *mock* Kontrolle eingesetzt (hier nicht gezeigt).



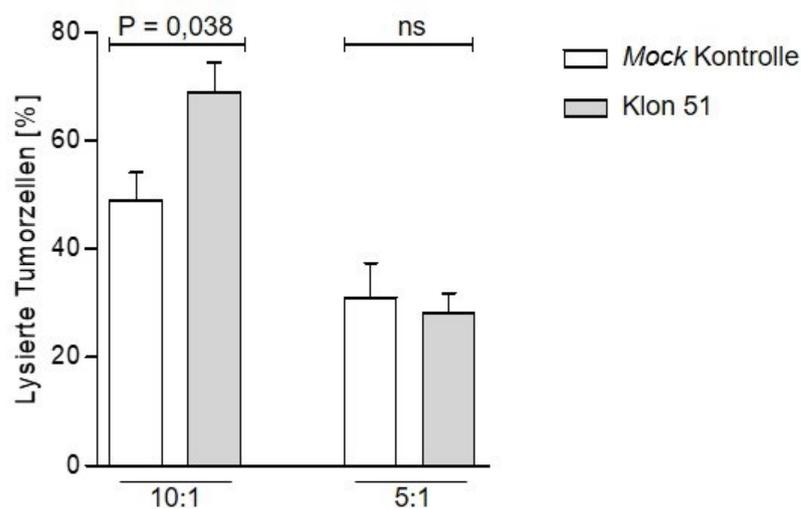
**Abbildung 7: Sequenzierung des PD-L1-Gens in Klon 51 nach Anwendung der CRISPR-Cas9-Methode.** Schematische Basenabfolge eines Ausschnitts des PD-L1-Gens der Wildtyp (WT) Panc02-OVA Tumorzellen (A, oben) zusammen mit Bindung der gRNA und Schnittstelle der Endonuklease. A Chromatogramm der sich überlappenden Signale beider Allele von Einzelzellklon 51 (A, „Allel 1 und 2“) und Aufschlüsselung dieser Signale nach TOPO-TA Klonierung in zwei heterogen veränderten Allelen (A, „Allel 1“ und „Allel 2“). Die Qualität der Signale wird durch einen Balken unter den Basen verbildlicht. Grün spricht für ein gutes, gelb und rot für ein nicht eindeutig zu einer Base zuordenbares Signal (A, „Allele 1 und 2“). B stellt direkt die Wildtyp-Sequenz (B, WT) gegen beide Allele von Klon 51 (B, #51) nach TOPO-TA-Klonierung gegenüber. In „Allel 1“ fehlt ein Basenpaar, in „Allel 2“ sind 68 Basenpaare im Vergleich zum Wildtyp deletiert (farbliche Markierungen).

### 3.4 Nachweis einer funktionellen Ovalbumin (OVA)-Expression

Zur *In-vitro*-Charakterisierung des generierten Panc02-OVA PD-L1-knock-out Klons und seiner *mock* Kontrolle war eine weiterhin funktionelle Expression von OVA, nach Anwendung der CRISPR-Cas9-Methode, essenziell. Die beiden Einzelzellklone wurden mit OT-I T-Zellen über mehrere Stunden in Zytotoxizitätsversuchen kokultiviert (Abbildung 8). Die Menge der

lysierten Tumorzellen korrelierte hierbei mit der Freisetzung von LDH, sie stellt einen Marker für Zytotoxizität dar. In den folgenden Experimenten ermöglichte die Messung der Absorption die Quantifizierung der LDH-Konzentration.

Die OT-I T-Zellen konnten in allen durchlaufenen Experimenten über OVA-Erkennung beide Einzelzellklone erfolgreich lysieren (Abbildung 8). In drei unabhängigen Versuchen wurde der Klon 51 stärker im Effektor- zu Zielverhältnis 10:1 lysiert als seine *mock* Kontrolle. In zwei von drei unabhängigen Versuchen wurden im Effektor- zu Zielzellenverhältnis 5:1 die beiden Panc02-OVA Klone gleichermaßen von den OT-I T-Zellen lysiert. In einem Versuch wurde der Kon 51 auch in der 5:1 Kondition stärker lysiert als seine *mock* Kontrolle (hier nicht dargestellt). Um eine endgültige Aussage zu einem möglichen Unterschied zwischen dem Lyse-Vermögen von OT-I T-Zellen auf PD-L1<sup>+</sup> und PD-L1<sup>-</sup> Panc02-OVA Tumorzellen treffen zu können, sollten weitere Versuche erfolgen.



**Abbildung 8: Aktivierung von OT-I T-Zellen durch PD-L1<sup>-</sup> Panc02-OVA Tumorzellen und deren *mock* Kontrolle *in vitro*.** Kokultur von Effektor- zu Zielzellen in einem Verhältnis von 10:1 und 5:1 für 9 bis 13 h. Klon 51 enthielt den PD-L1-knock-out. Die Tumorzell-Lyse wurde durch die Intensität eines Farbumschlags, ausgelöst durch freigesetztes LDH, in den Wells gemessen. Die Daten entstammen einem repräsentativen Versuch von drei unabhängigen Versuchen für die Kondition 10:1 und sind repräsentativ für zwei unabhängige Versuche in der Kondition 5:1. Jede Kondition wurde in Quadruplikaten durchgeführt. Die Ergebnisse sind als arithmetisches Mittel mit ihren Fehlerbalken als +/- SEM gezeigt. Die statistische Signifikanz der ungepaarten Stichproben wurde mit dem zweiseitigen Student t-Test berechnet.

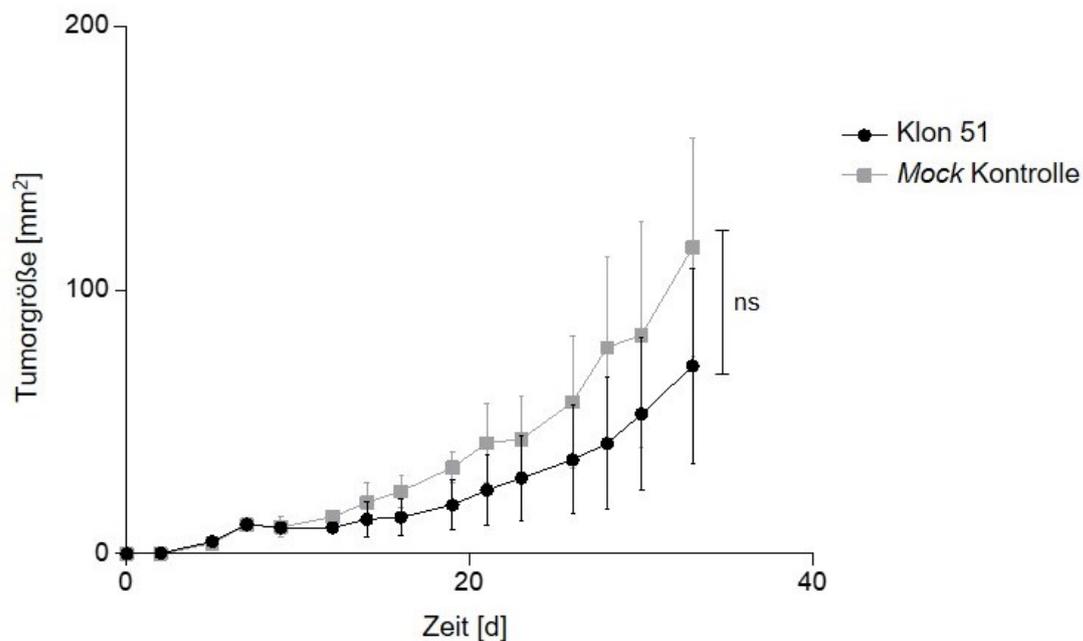
### 3.5 Untersuchung des Wachstumsverhaltens der Einzelzellklone *in vivo*

Die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe sollten *in vivo* mit PD-L1-knock-out Panc02-OVA Tumorzellen reevaluiert werden, um eventuelle Rückschlüsse auf den therapeutischen Wirkmechanismus des PD-1-CD28-Fusionsrezeptors ziehen zu können (Kobold et al. 2015).

#### 3.5.1 Vergleich von *mock* Kontrolle und knock-out Klon

Zunächst wurde überprüft, ob nach Einsatz der molekularbiologischen CRISPR-Cas9-Methode in den Panc02-OVA Einzelzellklonen ein Wachstum nicht nur *in vitro*, sondern auch in C57BL/6 Mäusen weiterhin möglich war. Zu diesem Zweck wurden der PD-L1<sup>-</sup> Klon 51 und der PD-L1<sup>+</sup> *mock* Klon 10 subkutan in drei beziehungsweise zwei Mäusen injiziert (Abbildung 9).

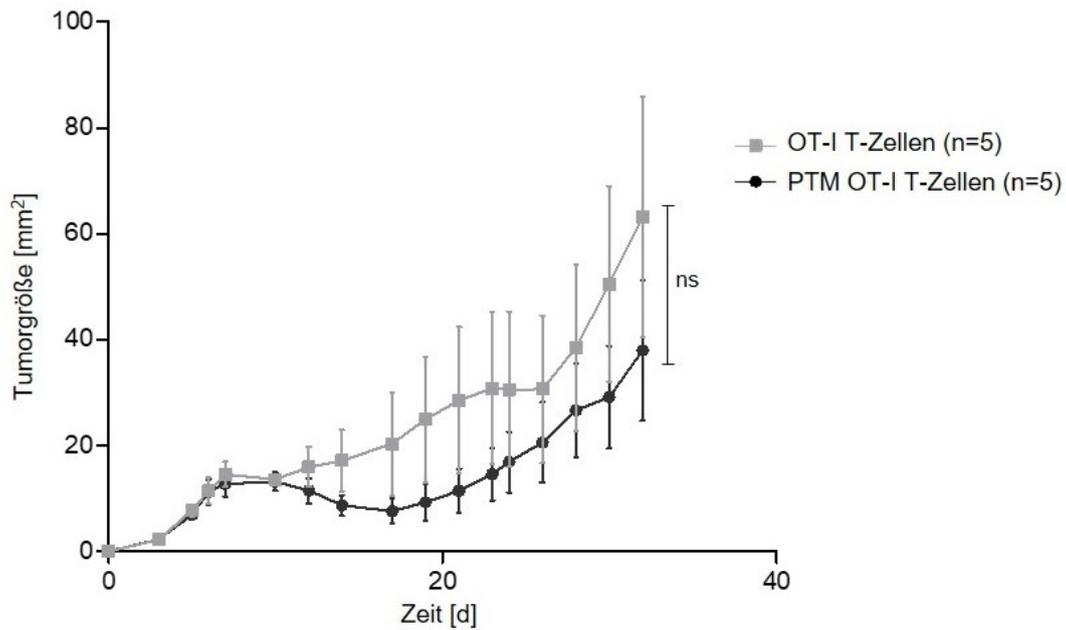
Beide Einzelzellklone waren in der Lage subkutane Tumoren in den Mäusen zu bilden. Sie präsentierten eine für weitere Experimente geeignete Anwachsrate und Wachstumsgeschwindigkeit. Der Klon 51 (Abbildung 9, schwarze Kurve) zeigte ein etwas verlangsamtes Wachstumsverhalten gegenüber der *mock* Kontrolle (Abbildung 9, graue Kurve), dies war jedoch nicht signifikant. Die genaue Betrachtung der Tumorgrößen der einzelnen Mäuse ergab, dass bei zwei von drei Tieren, die den Klon 51 erhielten, die Wachstumsgeschwindigkeiten der Tumoren denen des *mock* Klons ähnlich waren. Ein Tier aus der Gruppe des Klons 51 verlor nach 21 Tagen seinen Tumor. Aufgrund der geringen Anzahl verwendeter Tiere bei nur einem einzigen Experiment, sollten weitere Versuche durchgeführt werden, da eine Reproduktion der Daten überprüft werden muss.



**Abbildung 9: Vergleich des Wachstumsverhaltens der PD-L1-knock-out und *mock* Klone *in vivo*.** Je Maus wurden  $2 \times 10^6$  Panc02-OVA Einzelzellklone nach Anwendung des CRISPR-Cas9-Systems subkutan injiziert. Die graue Wachstumskurve entspricht der *mock* Kontrolle ( $n = 2$ ), die schwarze Kurve dem PD-L1-Klon 51 ( $n = 3$ ). Dargestellt sind die Mittelwerte der Flächen der Tumorgößen mit ihren Fehlerbalken als  $\pm$  SEM, bei einem durchgeführten Versuch. Die statistische Analyse erfolgte mit dem *two-way* ANOVA Test mit Bonferroni-Korrektur für multiples Testen.

### 3.5.2 Betrachtung des therapeutischen Effekts von PTM-transduzierten T-Zellen

In einem ersten Versuch wurde untersucht, ob die Wirkung des PTM-Rezeptors auf OT-I T-Zellen auf der Expression von PD-L1 der Tumorzellen beruht (Kobold et al. 2015). Hierfür wurden PD-L1<sup>+</sup> Panc02-OVA Zellen C57BL/6 Mäusen subkutan injiziert und nach sechs Tagen die T-Zellen intravenös appliziert. Es wurden PTM-transduzierte und als Kontrollgruppe untransduzierte OT-I T-Zellen verabreicht. Die Tumorzellen, die mit PTM-transduzierten OT-I T-Zellen therapiert wurden, wuchsen tendenziell langsamer als die untransduzierten OT-I T-Zellen, jedoch war dies zu keinem Zeitpunkt statistisch unterschiedlich (Abbildung 10). In der PTM-Gruppe war an Tag 17 und in der Kontrollgruppe an Tag 26 bei jeweils einem Versuchstier kein Tumor mehr palpabel. Ob diese Resultate reproduzierbar sind, muss in weiterführenden Versuchen, dann auch mit PBS und *mock* Versuchsgruppen als zusätzliche Kontrollen, geklärt werden.



**Abbildung 10: Einfluss von untransduzierten und mit PTM-transduzierten OT-I T-Zellen auf PD-L1<sup>-</sup> Panc02-OVA Tumorzellen *in vivo*.** Insgesamt erhielten zehn Tiere je  $2 \times 10^6$  Tumorzellen des PD-L1-knock-out Klons 51 subkutan. Sechs Tage später wurden jeweils fünf Mäuse mit je  $10^6$  untransduzierten beziehungsweise mit PTM-transduzierten OT-I T-Zellen intravenös versorgt. Das arithmetische Mittel aus den Tumorgößen für den jeweiligen Messtag der fünf Mäuse ist pro Gruppe mit seinen +/- SEM für einen Versuch dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mit dem *two-way* ANOVA Test mit Bonferroni-Korrektur für multiples Testen.

## 4. Ergebnisse zur Erstellung eines OVA-exprimierenden MC38 Tumormodells

### 4.1 Nachweis der Expression von OVA

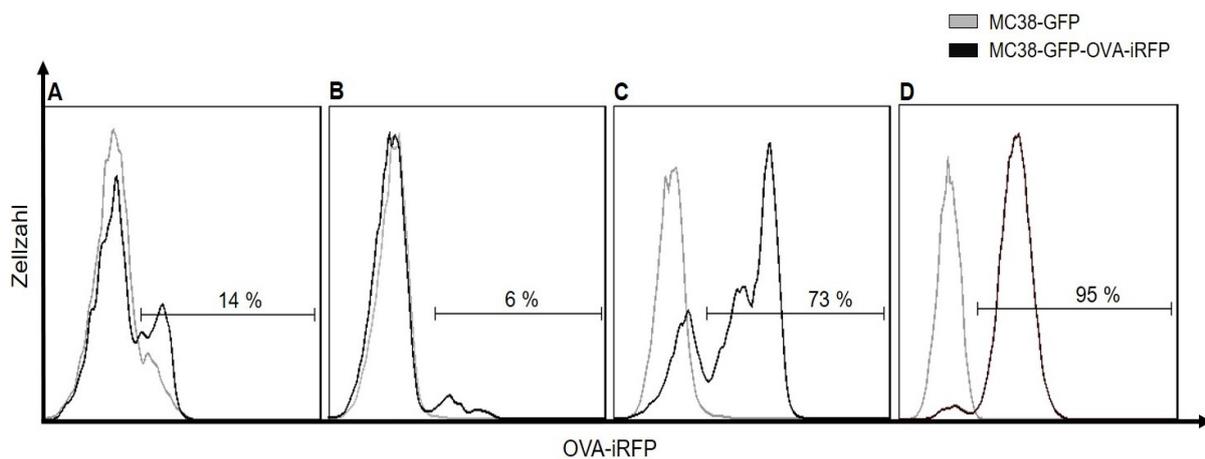
In der vorliegenden Arbeit sollte das murine Kolonkarzinommodell MC38 als eine weitere solide Tumorzelllinie für mögliche T-Zelltherapien etabliert werden. Hierfür sollten die Tumorzellen ebenfalls OVA als Antigen durch den MHC-I Komplex präsentieren und dadurch zur Aktivierung von OT-I T-Zellen führen.

#### 4.1.1 Durchflusszytometrische Analyse

Die mittels OE-PCR synthetisierte OVA-P2A-iRFP DNS-Sequenz wurde in einem pMP71-Vektor kloniert und retroviral in MC38-GFP Tumorzellen transduziert. Die verwendeten Tumorzellen waren bereits zuvor mit GFP markiert worden, was jedoch unabhängig von dieser Arbeit zu betrachten ist. Die Proteinbiosynthese von OVA wurde über einem 2A-Peptid an iRFP gekoppelt. Mit einem 2A-Peptid kann während der Translation von rekombinanten Proteinen eine nicht-enzymatische Spaltung zwischen zwei Peptiden

eingeleitet werden (Lewis et al. 2015). Somit wurde in dieser Promotionsarbeit die Expression von OVA und iRFP in einem gleichen Verhältnis zueinander gewährleistet, wodurch die Menge an OVA indirekt über die Messung von iRFP quantifiziert werden konnte (Abbildung 11).

Durch retrovirale Transduktion konnten bei 14 % der Zellen eine Expression von OVA-iRFP erzeugt werden (Abbildung 11 A). Aufgrund der niedrigen Effizienz, die im Verlauf weiterhin abfiel, wurden iRFP<sup>+</sup> Tumorzellen mit dem Gerät FACS Aria III sortiert und anschließend expandiert (Abbildung 11 B). Die selektierten MC38-GFP-OVA-iRFP verloren nach weiterer Kultivierung erneut an Transduktionseffizienz, weshalb diese wiederholt sortiert werden mussten (beispielhaft in Abbildung 11 C und D). Durch das Sortieren der Tumorzellen mittels Durchflusszytometer konnten Transduktionseffizienzen zwischen 60 % und 95 % erreicht werden. Bei der Ermittlung der Effizienzen fungierten zur Referenz die Ausgangszellen MC38-GFP.



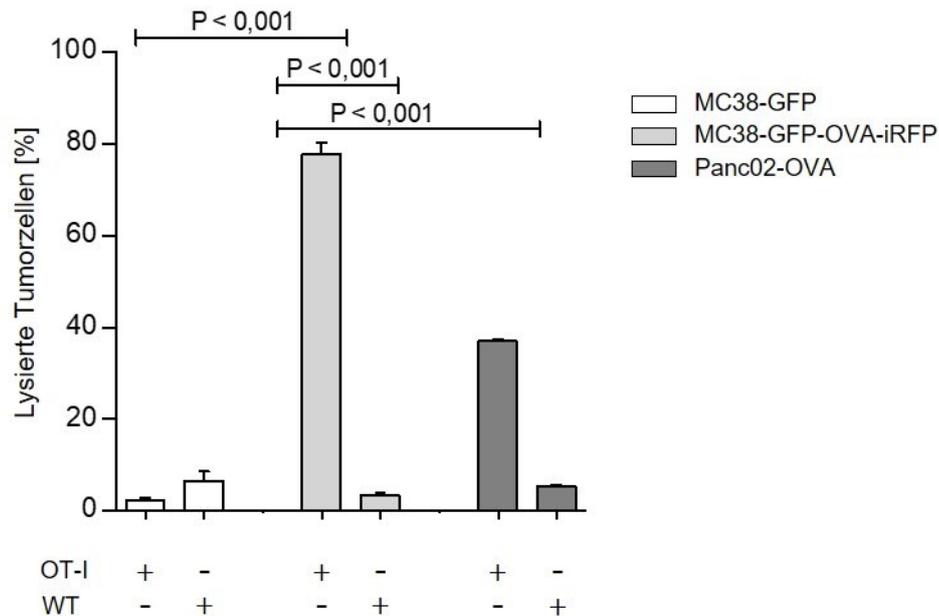
**Abbildung 11: Durchflusszytometrische Betrachtung der Transduktionseffizienz von OVA-iRFP in MC38-GFP.** Transduktionseffizienz von 14 % OVA-iRFP der MC38-GFP-OVA-iRFP Tumorzellen direkt nach retroviralem Gentransfer (A). B quantifiziert die Menge an OVA-iRFP 15 Tage nach dem ersten Sortieren und anschließender Expansion der Zellen. Steigerung der Transduktionseffizienz auf 73 % acht Tage nach der zweiten Zell-Sortierung (C). Nach erneutem Abfall der Effizienz von OVA-iRFP konnte vier Tage nach dem vierten Sortieren der Zellen eine Transduktionseffizienz von 95 % erreicht werden (D). Das an OVA gekoppelte iRFP wurde in diesen Diagrammen über den APC-Kanal des Gerätes FACSCanto II detektiert, iRFP<sup>+</sup> Zellen wurden mit dem FACS Aria III sortiert. Als Kontrolle dienten die eingangs verwendeten MC38-GFP.

#### 4.1.2 Funktionelle Überprüfung

Nachdem die MC38-GFP-OVA-iRFP Tumorzellen erfolgreich generiert worden waren, musste weiterführend festgestellt werden, ob OVA auf den MHC-I Komplexen präsentiert und dieses von OT-I T-Zellen erkannt wird. Somit wurden in folgenden Experimenten T-Zellen und Tumorzellen miteinander kultiviert und die OVA-Präsentation funktionell überprüft (Abbildung 12).

Die OVA-spezifischen T-Zellen konnten eine Tumorzell-Lyse von 78 % der MC38-GFP-OVA-iRFP und 2 % der MC38-GFP erzielen ( $P < 0,001$ ). Innerhalb der MC38-GFP-OVA-iRFP Konditionen lysierten die Wildtyp T-Zellen 3 % der Tumorzellen, im Gegensatz dazu erreichten die OT-I Lymphozyten eine Zytotoxizität von 78 % ( $P < 0,001$ ). Zusammenfassend bewirkten die Wildtyp T-Zellen, ohne spezifischen TZR für das Modell-Antigen OVA, bei keiner der Tumorgruppen eine bedeutsame Zell-Lyse. Die OT-I T-Zellen hingegen erkannten OVA auf dem etablierten Panc02-OVA Modell und den neu erstellten MC38-GFP-OVA-iRFP Tumorzellen und lysierten diese erfolgreich. Die Transduktionseffizienzen der MC38-GFP-OVA-iRFP vor den Kokulturen betragen zwischen 50 % und 95 %. Vor diesem Hintergrund ergab sich jedoch keine gesteigerte Anzahl der lysierten Tumorzellen bei höherer Transduktionseffizienz an OVA-iRFP (hier nicht dargestellt).

In diesen Versuchen konnte die Tumorzell-Lyse durch OT-I CD8<sup>+</sup> Lymphozyten des bereits etablierten Panc02-OVA Tumormodells und der MC38-GFP-OVA-iRFP miteinander verglichen werden. Das neue Tumormodell wurde in allen Experimenten stärker lysiert (repräsentativ Abbildung 12,  $37,0 \% \pm 0,5 \%$  gegenüber  $77,8 \% \pm 2,4 \%$ ,  $P < 0,001$ ).

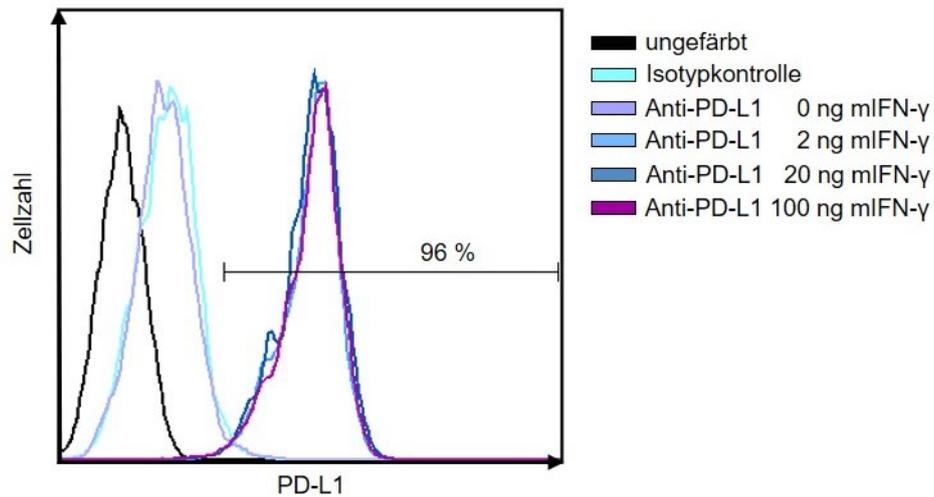


**Abbildung 12: Überprüfung der Aktivierung von OT-I T-Zellen durch MC38-GFP-OVA-iRFP Tumorzellen.** Kokultur von Effektor- und Zielzellen in einem Verhältnis von 10:1 für 6 bis 9 h. Die Tumorzellen wurden entweder mit OT-I T-Zellen (OT-I, drei unabhängige Versuche) oder als Negativkontrolle mit Wildtyp T-Zellen (WT, zwei unabhängige Versuche) kultiviert. Die Tumorzellen MC38-GFP und Panc02-OVA fungierten für die MC38-GFP-OVA-iRFP als weitere Vergleichsgruppen. Es ist ein repräsentatives Experiment von zwei bis drei unabhängigen Versuchen dargestellt. Die Lyse der Tumorzellen wurde über einen, durch freigesetztes LDH, induzierten Farbumschlag ermittelt. Es ist der prozentuale Anteil der erreichten Lyse einer maximalen möglichen Lyse der Tumorzellen gegenübergestellt. Jede Kondition wurde in Quadruplikaten durchgeführt und ist als arithmetisches Mittel mit seinen Fehlerbalken als  $\pm$  SEM veranschaulicht. Die statistische Signifikanz wurde mit dem zweiseitigen Student t-Test für ungepaarte Stichproben ermittelt.

#### 4.2 Betrachtung der konstitutiven und induzierbaren PD-L1-Expression

Zur weiteren Charakterisierung des verwendeten MC38 Tumormodells untersuchten wir auch diese Tumorzellen durchflusszytometrisch auf die Expression von PD-L1 (Abbildung 13).

Eine konstitutive Expression von PD-L1 konnte nicht nachgewiesen werden (Abbildung 13, 0 ng mIFN- $\gamma$ ). Die MC38-GFP-OVA-iRFP Zellen wurden außerdem mit verschiedenen Konzentrationen an murinem IFN- $\gamma$  für 48 h inkubiert, um eine mögliche PD-L1-Expression zu induzieren (Abbildung 13). Ab einer murinen IFN- $\gamma$ -Konzentration von 2 ng pro 100  $\mu$ l wurde bereits eine so hohe Induktion an PD-L1 auf der Zelloberfläche (96 % der Zellen) bewirkt, dass diese auch mit größeren Mengen an murinem IFN- $\gamma$  nicht mehr gesteigert werden konnte.



**Abbildung 13: Untersuchung der PD-L1-Expression in dem MC38-GFP-OVA-iRFP Tumormodell.**

Inkubation von  $2 \times 10^4$  Tumorzellen mit 0 ng, 2 ng, 20 ng oder 100 ng pro 100  $\mu$ l murinen IFN- $\gamma$  für 48 h und anschließender durchflusszytometrischer Analyse. Es ist eines von drei repräsentativen Experimenten abgebildet. Das PD-L1 auf der Zelloberfläche der MC38-GFP-OVA-iRFP wurde mit einem PE-Cy7-fluoreszierenden 10F.9G2 anti-Maus CD274 Antikörper markiert, als Isotypkontrolle diente ein RTK4530 IgG2b Rattenantikörper.

## 5. Diskussion

### 5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser Promotionsarbeit wurde eine PD-L1-knock-out Panc02-OVA Tumorzelllinie erzeugt. Das Modell-Antigen Ovalbumin war nach der gentechnischen Veränderung im knock-out Klon und der *mock* Kontrolle weiterhin funktionell. *In vivo* ergab sich in Abhängigkeit von der PD-L1-Expression ein ähnliches Wachstumsverhalten der subkutan injizierten Tumorzellklone. Jedoch verloren im Tiermodell mit dem PD-1-CD28-Fusionsrezeptor transduzierte gegenüber untransduzierten OT-I T-Zellen ihren Vorteil gegen PD-L1-knock-out Tumoren.

Des Weiteren wurde Ovalbumin als Antigen in die murine Kolonkarzinomzelllinie MC38 transduziert. OT-I T-Zellen erkannten und lysierten erfolgreich die neue MC38-GFP-OVA-iRFP Zelllinie. Eine konstitutive Expression von PD-L1 konnte durchflusszytometrisch nicht nachgewiesen werden, jedoch war dessen Expression mit dem Zytokin murines IFN- $\gamma$  induzierbar.

### 5.2 Eruierung des PD-L1-knock-outs in Panc02-OVA Tumorzellen

#### 5.2.1 Anwendung des CRISPR-Cas9-Systems und Nachweis des Gen-knock-outs

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit konnte ein PD-L1-knock-out in Panc02-OVA Tumorzellen mithilfe der CRISPR-Cas9-Methode generiert werden. Dieses gentechnische Verfahren etablierte sich in den letzten Jahren erfolgreich sowohl in der Grundlagenforschung als auch in der präklinischen Forschung (Campenhout et al. 2019). Dabei spielt die Erstellung von Tumorzelllinien mit speziellen Knock-outs oder Knock-ins eine wichtige Rolle um die Einflüsse einzelner Gene, Moleküle und Proteine in der Tumorgenese zu ergründen (Jacinto et al. 2020; Liu et al. 2017). Dieses Verfahren wurde in dieser Arbeit aufgrund seiner Vielseitigkeit in der Zielstruktur und dem schnellen und einfachen Einsatz gewählt (Jacinto et al. 2020).

Bei der Methode bestand jedoch das Risiko auch an unerwünschten Stellen des Genoms der Panc02-OVA Zellen Mutationen zu erzeugen. Dies kann zu einer gestörten Genfunktion, Genominstabilität und epigenetischen Mutationen der Zelllinie führen (Liu et al. 2017). Der Hersteller unseres CRISPR-Cas9-Systems wählte die gRNA für das murine PD-L1-Gen mithilfe von internen genomischen Datenbanken und bioinformatischen Programmen aus. Derartige Datenbanken können zu einer erheblichen Reduktion unspezifischer Bindungen beitragen (Ran et al. 2013). Dennoch

können allein damit unerwünschte Mutationen nicht vollständig ausgeschlossen werden. Um *Off-target*-Effekte des CRISPR-Cas9-Systems aufzudecken wäre die kombinierte Anwendung von neuen, aufwändigen und kostenintensiven Methoden notwendig gewesen, die wir nicht durchgeführt haben (Campenhout et al. 2019). Daher können in unserer generierten PD-L1-knock-out Panc02-OVA Zelllinie solche Mutationen nicht ausgeschlossen und deren Einfluss auf durchgeführte Experimente nicht beurteilt werden, was bei der Validität der Ergebnisse berücksichtigt werden muss.

Nach der Gewinnung von Einzelzellklonen untersuchten wir diese auf die Expression des Zielproteins PD-L1. Da es sich bei PD-L1 um ein Oberflächenprotein handelt, prüften wir aus Gründen der Praktikabilität die Einzelzellklone mittels Durchflusszytometrie. Für den Nachweis der Expression von Proteinen, auch nach Anwendung des CRISPR-Cas9-Systems, stellt der Western Blot die gängigere Methode dar (Lentsch et al. 2019). Allerdings wandten Dang et al. ebenfalls erfolgreich diese einfache Methode der Durchflusszytometrie zum Screening von Einzelzellklonen an (Dang et al. 2015). Die Durchflusszytometrie kann jedoch nur die gegenwärtigen Oberflächenproteine analysieren, weshalb dieses Verfahren nur eine Momentaufnahme der jeweiligen Zellen zeigt. Die in der Literatur beschriebene variable Expression von PD-L1 auf Tumorzellen stellte daher ein Problem bei unserer Nachweismethode dar (Duan et al. 2018). Das Zytokin Interferon- $\gamma$  gilt als potentester Induktor des Liganden PD-L1 (Sharpe et al. 2018; Zou et al. 2008). Unter diesen Aspekten inkubierten wir Einzelzellklone, denen zuvor durchflusszytometrisch kein konstitutives PD-L1 nachgewiesen werden konnte, mit murinem IFN- $\gamma$  und untersuchten sie anschließend erneut auf PD-L1. Somit konnten Einzelzellklone mit zuvor herabregulierter PD-L1-Expression identifiziert und aussortiert werden. Andere Arbeitsgruppen gingen gleichermaßen zum Nachweis eines PD-L1-knock-outs vor (Juneja et al. 2017; Tang et al. 2018; Umezu et al. 2019).

Zur Bestätigung des PD-L1-Gen-knock-outs wurde, wie in zahlreichen anderen Arbeiten, die dafür anerkannte Sequenzierung nach Sanger verwendet, wodurch zwei unterschiedliche Deletionen in beiden Allelen entschlüsselt werden konnten (Dang et al. 2015; Lentsch et al. 2019; Shalem et al. 2014). Die Sanger-Sequenzierung gilt als Goldstandard zur Detektion von Insertionen und Deletionen und sollte damit eine verlässliche Aussagekraft über die Basenabfolge unserer Einzelzellklone liefern (Campenhout et al. 2019). Bei der Sequenzierung unseres erzeugten knock-out Klons fehlte in einem Allel an der Schnittstelle der Endonuklease ein einzelnes Basenpaar. In

dem zweiten Allel wurden 68 Basenpaare vollständig entfernt. In beiden Allelen entspricht die deletierte Anzahl der Basenpaare keinem Vielfachen von drei und verursacht einen *frameshift* mit Verschiebung des Leserasters. Das Ribosom translatiert dadurch eine Aminosäuresequenz, die keinen Sinn ergibt oder es entstehen frühzeitige Stoppcodons (Schmidt 2017). Ein Knock-out des PD-L1-Gens konnten wir sowohl durch ein Fehlen des selbigen Proteins als auch durch eine Leserasterverschiebung in der DNS bestätigen.

### 5.2.2 Funktionalität des Antigen-Modells Ovalbumin nach Anwendung des CRISPR-Cas9-Systems *in vitro*

Nach Verwendung des CRISPR-Cas9-Systems bei Panc02-OVA Tumorzellen, analysierten wir nicht das gesamte Genom der Einzelzellklone auf mögliche *Off-target*-Effekte und konnten diese daher nicht ausschließen (Campenhout et al. 2019; Liu et al. 2017). Das Modell-Antigen Ovalbumin des PD-L1-knock-out Klons und seiner *mock* Kontrolle aktivierte in *In-vitro*-Experimenten weiterhin OT-I T-Zellen. Somit stellten wir funktionell sicher, dass keine Mutation die Präsentation von Ovalbumin auf MHC-I Komplexen beeinträchtigte. Daher konnte das Antigen-Modell für weitere Versuche verwendet werden. Auf DNS-Ebene konnte eine Mutation im Ovalbumin-Gen dennoch nicht vollständig ausgeschlossen werden.

In Zytotoxizitätsversuchen wurde in der Effektor- zu Zielzellkondition 10:1 der PD-L1-knock-out Klon stärker lysiert. Allerdings bleibt fraglich, warum diese Ergebnisse nur in einem von drei Experimenten in der 5:1 Kondition zu sehen waren. Juneja et al. beschrieben ebenfalls eine höhere Zytotoxizität tumorspezifischer T-Zellen gegenüber PD-L1<sup>-</sup> MC38-Tumorzellen *in vitro*. Sie verwendeten eine Effektor- zu Zielzellkondition von 1:1, bei der sie jedoch, anders als in unserem Versuchsaufbau, die Tumorzellen im Vorfeld mit IFN- $\gamma$  inkubierten (Juneja et al. 2017). Aufgrund dessen ist die Notwendigkeit einer höheren Konzentration an OT-I T-Zellen bei der Durchführung unserer Experimente durchaus denkbar, um eine ausreichende Konzentration von IFN- $\gamma$ , freigesetzt durch aktivierte T-Zellen, zu erreichen. Das IFN- $\gamma$  führte dann auf dem *mock* Klon, im Gegensatz zu dem knock-out Klon, zu einer höheren Dichte an PD-L1 (Duan et al. 2018). PD-L1<sup>+</sup> Tumorzellen können zu Apoptose, geringerer Zytotoxizität und verminderter Zytokinfreisetzung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen führen, weswegen der PD-L1<sup>+</sup> *mock* Klon die T-Zellen in unserem Experiment vermutlich inhibierte und schwächer lysiert wurde (Dong et al. 2002; Juneja et al. 2017).

Eine derartige Anpassung der Tumorzellen, als Reaktion auf freigesetzte Zytokine von T-Zellen, gehört zu den *Escape*-Strategien von Tumorzellen und wird in der Literatur als adaptive Resistenz bezeichnet (Pardoll 2012; Sharpe et al. 2018). Nicht alle Tumorentitäten verfügen über die Fähigkeit der adaptiven Resistenz, jedoch zeigten sowohl diese Promotionsarbeit als auch Kobold et al. die Induktion von PD-L1 auf Panc02 Tumorzellen während IFN- $\gamma$ -Exposition (Kobold et al. 2015). Unsere Beobachtungen decken sich zwar mit denen in der Literatur über MC38 Tumorzellen, dennoch sollte für ein endgültiges Fazit bei den Panc02-OVA Tumorzellen, begründet in den abweichenden Ergebnissen einzelner Versuche, weitere Experimente durchgeführt werden.

### 5.2.3 Subkutane Injektion von PD-L1<sup>-</sup> Panc02-OVA Tumorzellen *in vivo*

Der PD-L1<sup>-</sup> Tumorzellklon und seine PD-L1<sup>+</sup> *mock* Kontrolle bildeten *in vivo* subkutane Tumoren. Die Wachstumsgeschwindigkeiten waren zu keinem Zeitpunkt statistisch unterschiedlich. Einer der PD-L1<sup>-</sup> Tumoren bildete sich nach 21 Tagen in einem Tier vollständig zurück, was vermutlich auf eine immunologische Eliminierung zurückzuführen ist.

Mehrere Forschungsarbeiten zeigen ein verlangsamtes Wachstumsverhalten des murinen MC38 Kolonkarzinommodells *in vivo*, sobald PD-L1 auf den Tumorzellen deletiert wurde (Juneja et al. 2017; Kleinovink et al. 2017; Lau et al. 2017). Juneja et al. interpretierten, PD-L1 auf MC38 Tumorzellen dominiere die Inhibition von zytotoxischen T-Zellen. Andere Arbeitsgruppen zeigten in weiteren Tumorentitäten ähnliche Ergebnisse (Noguchi et al. 2017). In einem weiteren murinem Kolonkarzinommodell CT26 verlangsamte sich zwar die Wachstumsrate PD-L1<sup>-</sup> Tumoren, der Unterschied war jedoch im Vergleich zu dem MC38-Tumormodell weniger stark ausgeprägt (Kleinovink et al. 2017). In dem murinen Melanommodell BRAF.PTEN hatte ein PD-L1-knock-out keinen Einfluss auf das Wachstum der Tumoren (Juneja et al. 2017). Es scheint somit von dem jeweiligen Tumormodell und der injizierten Anzahl an Tumorzellen abhängig zu sein, wie sehr sich PD-L1<sup>+</sup> Tumorzellen auf die Immunantwort auswirken (Noguchi et al. 2017; Tang et al. 2018). Das Pankreaskarzinom zählt zu den Neoplasien mit kaltem und stark immunsuppressiven Tumormilieu, was möglicherweise dazu führt, dass die Deletion von PD-L1 auf den Tumorzellen nicht ausreichend ist, um einen immunogenes Tumormilieu zu erzeugen (Lutz et al. 2014). Letztendlich bedarf es weiterer Experimente, um eine genaue Aussage zu unserem Modell treffen zu können.

#### 5.2.4 Behandlung von PD-L1<sup>-</sup> Panc02-OVA Tumorzellen mit PTM-transduzierten OT-I T-Zellen *in vivo*

Kobold et al. wiesen eine therapeutische Wirkung von PTM-exprimierenden OT-I T-Zellen bei Panc02-OVA Tumorzellen *in vivo* nach (Kobold et al. 2015). In dieser Promotionsarbeit wurde in einem ersten Versuch getestet, ob die Wirkweise von PTM abhängig von der PD-L1-Expression der Tumorzellen ist. Es zeichneten sich bei der Behandlung mit PTM-transduzierten und untransduzierten OT-I T-Zellen ähnliche Wachstumsgeschwindigkeiten der Tumoren ab. In dem murinen Mastozytommodell P815 konnten TZR-spezifische T-Zellen PD-L1<sup>-</sup> Tumorzellen besser lysieren als PD-L1<sup>+</sup> Tumorzellen (Dong et al. 2002). Daher wäre es denkbar, dass die OT-I T-Zellen die PD-L1<sup>-</sup> Tumorzellen besser lysieren als PD-L1<sup>+</sup> Tumorzellen und die Wirkung der PTM-transduzierten T-Zellen überlagerten. Um dies festzustellen, bedarf es Experimente mit PD-L1<sup>+</sup> Tumorzellen und PBS als Kontrollgruppen. Unsere Daten könnten aber auch auf einen von PD-L1 abhängigen Wirkmechanismus des PTM-Fusionsrezeptors hindeuten, der bei den PD-L1<sup>-</sup> Tumoren nicht mehr zum Tragen kommt.

In unseren Versuchsbedingungen wurde PD-L1 auf den Tumorzellen deletiert, ebenso könnte aber auch PD-L1 nicht-tumoraler Zellen des Wirts und der injizierten T-Zellen die Wirkung des Fusionsrezeptors PTM mitbedingen und die Daten beeinflussen. Diese Vermutung wird durch mehrere Veröffentlichungen unterstützt, die bei verschiedenen PD-L1-deletierten Tumorentitäten ein verlangsamtes Tumorstadium nach Applikation von PD-L1-Antikörpern beschrieben (Kleinovink et al. 2017; Lau et al. 2017; Noguchi et al. 2017). Zudem wurde eine immunsuppressive Beteiligung von nicht-tumoralen Zellen bereits nachgewiesen (Berry et al. 2015; Zou et al. 2008). Die konstitutive oder dynamische PD-L1-Expression zahlreicher Zellen im Tumormilieu bestärkt diese Überlegungen. Allerdings erschwert dieser Aspekt auch die Identifikation der maßgebenden immuninhibierenden Zellen, was die Optimierung unserer Versuchsbedingungen erschwert (Tang et al. 2018). Mehrere Studien wiesen eine entscheidende Beteiligung von MDSC bei der nicht-tumoralen, PD-1-PD-L1-vermittelten Immuninhibition nach (Antonios et al. 2017; Grosser et al. 2019; Li et al. 2019; Lin et al. 2018; Tang et al. 2018). Um den Einfluss weiterer PD-L1<sup>+</sup> Zellen in unseren *In-vivo*-Versuchen restlos auszuschließen, müssten PD-L1-knock-out Tiere und PD-L1<sup>-</sup> T-Zellen für die Behandlung verwendet werden.

Basierend auf der Grundlage dieses einzigen durchgeführten *In-vivo*-Versuchs, kann keine valide Aussage zum Wirkmechanismus des PTM-Fusionsrezeptors getroffen und ein Einfluss anderer PD-L1-tragender Zellen nicht ausgeschlossen werden.

### **5.3 Evaluation der generierten MC38-OVA-exprimierenden Tumorzellen**

#### **5.3.1 Funktionalität des integrierten Ovalbumin-Antigen-Modells und Expression von PD-L1 durch die MC38-GFP-OVA-iRFP**

OT-I T-Zellen lysierten, nach retroviraler Integration des Ovalbumins, erfolgreich die MC38-GFP-OVA-iRFP. Zusätzlich wurden die MC38-GFP-OVA-iRFP in allen durchgeführten Versuchen stärker lysiert als die etablierten Panc02-OVA Zellen. Allerdings konnte die OVA-Expression vor den Experimenten nur für die MC38-GFP-OVA-iRFP, jedoch nicht für die Panc02-OVA, ermittelt werden. Die stärkere zytotoxische Wirkung auf die MC38-GFP-OVA-iRFP könnte somit auf eine höhere Dichte von OVA auf diesen Zellen gegenüber der Panc02-OVA Tumorzellen beruhen.

Ein weiterer wichtiger Aspekt, der bei der Betrachtung dieser Ergebnisse einbezogen werden sollte, ist die unterschiedliche Expression von PD-L1 unserer beiden Tumorzelllinien. Durchflusszytometrisch stellten wir *in vitro* eine höhere konstitutive PD-L1-Expression der Panc02-OVA Zelllinie im Vergleich zu den MC38-GFP-OVA-iRFP fest. Eine häufige Überexpression von PD-L1 auf Pankreastumoren wurde bereits in verschiedenen Veröffentlichungen sowohl in Zelllinien als auch in analysierten Patientenproben identifiziert (Karamitopoulou 2019; Martinez-Bosch et al. 2018; Song et al. 2014). Eine konstitutive PD-L1-Expression war bei unseren MC38-GFP-OVA-iRFP *in vitro* durchflusszytometrisch nicht zu detektieren. In verschiedenen Quellen ist auf MC38 Zellen der Ligand jedoch als konstitutiv vorkommend beschrieben (Efremova et al. 2018; Juneja et al. 2017; Lau et al. 2017; Tang et al. 2018). Womöglich ist eine konstitutive Expression aufgrund der Transduktion und anschließender Selektion der Zellen nicht mehr nachweisbar. Die OT-I T-Zellen wurden in unseren Experimenten über OVA aktiviert und exprimierten daraufhin vermehrt den Rezeptor PD-1, welcher an das PD-L1 der Tumorzellen und T-Zellen bindet (Giannini et al. 2019; Sharpe et al. 2018). Die T-Zellen werden durch die Interaktion mit dem Liganden inhibiert, daher könnte aufgrund der höheren PD-L1-Dichte auf der Zelloberfläche der Panc02-OVA in diesen Konditionen die Hemmung ausgeprägter ausgefallen sein als bei den MC38-GFP-OVA-iRFP (Juneja et al. 2017; Wu et al. 2019). Jedoch wurde bei dieser Annahme noch nicht die

induzierbare PD-L1-Expression der beiden Tumorzelllinien, durch ausgeschüttete Zytokine der aktivierten T-Zellen, berücksichtigt. In dieser Promotionsarbeit und in der Literatur konnte insbesondere bei den MC38 eine intensive, induzierbare Expression des Liganden mittels mIFN- $\gamma$  erreicht werden (Efremova et al. 2018; Juneja et al. 2017; Lau et al. 2017; Tang et al. 2018). Ob der konstitutiven oder der induzierbaren PD-L1-Expression in diesem Experiment die bedeutsamere Rolle zukommt ist abschließend nicht zu klären.

Das unterschiedliche Lyse-Vermögen könnte auch im Zusammenhang mit den Tumorzelllinien an sich stehen. In der Literatur findet sich ein Konsens über die immunsuppressiven und wenig immunogenen Eigenschaften von Pankreastumoren (Karamitopoulou 2019; Martinez-Bosch et al. 2018). So sind sie beispielsweise in der Lage immunsupprimierende Zytokine wie TGF- $\beta$  zu produzieren (Karamitopoulou 2019). Die MC38 Tumorzelllinie gilt hingegen eher als immunogen (Efremova et al. 2018).

*In-vivo*-Versuche könnten für das Tumormodell MC38-GFP-OVA-iRFP auch ohne einer konstitutiven PD-L1-Expression interessant sein, denn im Tumormilieu befinden sich weitere immuninhibierende PD-L1<sup>+</sup> Zellen (Juneja et al. 2017; Kleinovink et al. 2017; Lau et al. 2017; Tang et al. 2018; Umezu et al. 2019). Zudem zeigen viele Tumoren und auch die MC38 *in vivo* eine stärkere Expression von PD-L1 als *in vitro* (Dong et al. 2002; Efremova et al. 2018; Zou et al. 2008). Solide Tumoren zeigen häufig eine heterogene Verteilung von PD-L1 und erhöhen dieses nur dort, wo eine Immunantwort stattfindet (Kleinovink et al. 2017; Pardoll 2012; Rosenbaum et al. 2016). Letztendlich kann eine therapeutische Anwendung von PTM-transduzierten OT-I T-Zellen in Erwägung gezogen werden, da PD-L1 durch Zytokine der aktivierten T-Zellen induziert werden kann und sich *in vivo* weitere PD-L1<sup>+</sup> Zellen im Tumormilieu befinden. Fraglich ist allerdings, ob die Induktion von PD-L1 auf den Tumorzellen ausreichen wird, um einen Therapieeffekt mit dem PTM-Fusionsrezeptor zu erzielen.

#### **5.4 PD-L1 als Zielstruktur mit Optimierungspotenzial der adoptiven T-Zelltherapie**

Der Ligand PD-L1 wird von zahlreichen humanen Tumorentitäten exprimiert (Zou et al. 2008). Fast alle der bislang zugelassenen Checkpoint-Inhibitoren wirken direkt auf die PD-1-PD-L1-Achse und gelten als entscheidender Durchbruch der Immuntherapie (Dermani et al. 2019). PD-L1 scheint sich somit für die Tumorthherapie als eine vielversprechende Zielstruktur zu eignen.

Würde PD-L1 als Zielprotein für zukünftige Therapiestrategien eingesetzt werden, könnte vor allem die richtige Wahl passender Patienten eine bedeutsame Hürde darstellen. PD-L1 wird bereits bei der Anwendung von immunologischen Checkpoint-Blockern als Biomarker diskutiert, leider ist die Datenlage hierzu kontrovers. Einige Studien deuten auf eine Korrelation zwischen dem Vorhandensein von PD-L1 und dem Ansprechen auf ICB hin, andere wiederum konnten dies nicht bestätigen (Borghaei et al. 2015; Fehrenbacher et al. 2016; Garon et al. 2015; Robert et al. 2015; Rosenberg et al. 2016). Zudem zeigen einige Patienten ein objektives Ansprechen auf diese Therapie, obwohl sie als PD-L1<sup>-</sup> kategorisiert wurden (Borghaei et al. 2015; Garon et al. 2015). Ein großes Problem bei diesen Studien sind die uneinheitlichen Messmethoden des Liganden, dazu gehören verschiedene Antikörper, Grenzwerte ab wann ein Tumor als PD-L1<sup>+</sup> gilt, ob membranständiges oder zytoplasmatisches PD-L1 betrachtet wird und ob alle Zellen oder nur Tumorzellen im Tumormilieu betrachtet werden (Wang et al. 2016). Der Ligand wird zwar von vielen Tumorentitäten exprimiert, jedoch ist seine Expression innerhalb eines einzigen Tumors sehr dynamisch und heterogen, weshalb Vorbehandlungen, Zeitpunkt und Ort der Biopsie entscheidend für den Immunstatus eines Tumors sind (Duan et al. 2018; Gong et al. 2018; Tang et al. 2018). Aufgrund dieser Voraussetzungen sind zusätzliche Biomarker für eine gute Auswahl der Patienten unabdingbar, um unnötige Therapien zu vermeiden und die bestmöglichen Ansprechraten zu erzielen.

Bei vielen Tumorentitäten korreliert die Expression von PD-L1 mit einer schlechteren Prognose der Patienten (Wang et al. 2016). PD-L1 hemmt im Tumormilieu die Tumorummunität, schützt die Tumorzellen vor Apoptose und begünstigt die Karzinogenese (Shi et al. 2013; Song et al. 2014). Das, mit der PD-L1-Expression korrelierende, schlechtere Outcome der Patienten spricht für die große Relevanz von PD-L1 bei malignen Erkrankungen und die Verwendung dieses Liganden für weitere Therapieansätze.

Die PD-1-PD-L1-Interaktion hemmt insbesondere die anti-tumoral wirksamen T-Zellen des menschlichen Immunsystems (Dermani et al. 2019; Wang et al. 2016). Aus diesem Grund werden auch die während einer AZT infundierten T-Zellen nach ihrer Aktivierung an den Tumorzellen über den Liganden PD-L1 gehemmt. Dadurch wird der Erfolg der AZT deutlich geschmälert (Chen et al. 2019; Cherkassky et al. 2016). Die Hemmung der infundierten T-Zellen wird noch einmal, durch freigesetzte Zytokine der aktivierten T-Zellen und einer damit einhergehenden Erhöhung von PD-L1 im Tumormilieu, verstärkt (Tanoue et al. 2017). Die AZT mit T-Zellen könnte daher von der

Unterbindung oder Veränderung der physiologischen PD-1-PD-L1-Interaktion maßgeblich profitieren.

### 5.5 Kombination von Checkpoint-Inhibitoren und adoptiven T-Zelltransfer

Die Kombination von ICB und einer AZT könnte beide Therapien voneinander profitieren lassen. Die AZT liefert die, für die ICB unabdingbaren, tumorspezifischen T-Zellen. Somit könnten Patienten mit kaltem Tumormilieu oder bereits vorbehandelten Patienten mit geschwächtem Immunsystem ein besseres Ansprechen auf die Therapie ermöglicht werden (Cherkassky et al. 2016; Grosser et al. 2019). Weiterhin könnten transferierte T-Zellen der AZT durch ICB ihre anti-tumoralen Funktionen auch im immunsuppressiven Tumormilieu aufrechterhalten und gleichzeitig länger persistieren (Cherkassky et al. 2016; Moon et al. 2016). Durch diese Effekte kann die Kombination von AZT und ICB besonders interessant für solide Tumoren und ihrem ausgeprägten immunsupprimierenden Milieu sein (Chen et al. 2017; Grosser et al. 2019; Suarez et al. 2016; Tanoue et al. 2017). Präklinische Studien stützen diese Überlegungen bereits (John et al. 2013).

Ein Nachteil von extrinsisch applizierten Checkpoint-Antikörpern ist die Notwendigkeit von systemischen und repetitiven Gaben, welche durch ihre unspezifische Wirkung auf alle Immunzellen die Gefahr von *Immune-related adverse events* birgt (Cherkassky et al. 2016). Die Kombination von AZT und systemischen Checkpoint-Antikörpern könnte folglich nicht nur die Wirksamkeit, sondern ebenfalls die Nebenwirkungen potenzieren. Daher sind Forschungsansätze, in denen transferierte T-Zellen selbst und somit intrinsisch die Immun-Checkpoints kontrollieren, wie es bei dem PTM-Rezeptor der Fall ist, attraktive Überlegungen. So könnten im Allgemeinen die unerwünschten systemischen Wirkungen von ICB verringert und mit den Vorteilen der AZT kombiniert werden (Chen et al. 2017; Cherkassky et al. 2016; Suarez et al. 2016; Tanoue et al. 2017). Durch die intrinsische ICB der applizierten T-Zellen würden die Patienten weniger Infusionen benötigen und es wäre eine konstante Blockade der Checkpoints direkt am Wirkort der T-Zellen möglich (Chen et al. 2017).

Posser et al. veröffentlichten im Jahr 2012 als erste Arbeitsgruppe die Idee eines PD-1-CD28-Fusionsrezeptors, der extrazellulär PD-L1 binden und intrazellulär ein ursprüngliches negatives in ein positives kostimulatorisches Signal umwandeln konnte (Posser et al. 2012). Ein Jahr später evaluierten Ancri et al. weitere PD-1-CD28-Fusionsrezeptoren und bestätigten deren Funktionalität (Ancri et al. 2013).

Allerdings zeigten beide Veröffentlichungen insbesondere *in vitro* nicht die gleiche Steigerung an Zytokinausschüttung oder Proliferation der T-Zellen, wie Kobold et al. mit ihrem Chimärrezeptor (Kobold et al. 2015). Konkret erreichten Kobold et al. eine bis zu 300-fach höhere Sekretion von IFN- $\gamma$  und IL-2, im Vergleich dazu erreichten Posser et al. eine 2- bis 3-fache und Ankri et al. eine bis zu 6-fache Steigerung, durch die mit ihrem jeweiligen Rezeptor transduzierten gegenüber untransduzierten T-Zellen. Mit dem Rezeptor aus der zuletzt genannten Veröffentlichung erreichten Liu et al. ebenfalls nur eine maximal 30-fache Zunahme an IL-2 *in vitro* (Liu et al. 2016). Das zytotoxische Potenzial fiel *in vitro* bei den anderen Fusionsrezeptoren gering aus oder war gar nicht messbar (Ankri et al. 2013; Prosser et al. 2012). Allerdings verwendeten Kobold et al. im Vergleich zu den anderen Arbeitsgruppen murine und nicht humane T-Zellen, welche sich durchaus unterschiedlich in ihrer Aktivierung und Inhibition verhalten (Liu et al. 2016). Zudem verwendeten alle Arbeitsgruppen verschiedene Antigenmodelle oder zusätzlich CAR zur Aktivierung der T-Zellen sowie andere Tumormodelle, was einen direkten Vergleich erschwert.

Ein weiterer Grund dieser unterschiedlichen Ergebnisse, könnte ebenso die mögliche Konsequenz des unterschiedlichen Aufbaus der Rezeptoren sein (Kobold et al. 2015). Kobold et al. erstellten daher zu dem PTM-Rezeptor zwei weitere PD-1-CD28-Konstrukte, die denen von Posser et al. und Ankri et al. ähnelten (Ankri et al. 2013; Prosser et al. 2012). Dies ermöglichte ihnen alle drei Rezeptoren unter den gleichen Versuchsbedingungen einander gegenüberzustellen. *In vitro* war die PTM-Variante den anderen beiden sowohl in der Aktivierung der T-Zellen als auch in ihrer induzierten Proliferation überlegen und erreichte höhere Transduktionseffizienzen. Aus diesen und weiteren Experimenten schlossen Kobold et al. auf eine stärkere Funktionalität des PTM-Fusionsrezeptors aufgrund einer stärkeren Bindung seines Liganden PD-L1 gegenüber den anderen Konstrukten (Kobold et al. 2015). Jedoch wurden diese Resultate bisher nur im murinen Modell erzielt, somit steht die Translation in humanen Tumormodellen und mit humanen T-Zellen noch aus.

Eine weitere Möglichkeit der intrinsischen Checkpoint-Blockade während einer AZT ist, die injizierten T-Zellen durch viralen Gentransfer zur Sekretion von PD-L1-Antikörpern zu befähigen. Tanoue et al. und Suarez et al. erprobten hierzu zum Beispiel in Mausmodellen CAR T-Zellen, die PD-L1-blockierende Antikörper selbst produzierten. Durch die lokale Wirkung des Antikörpers waren die CAR T-Zellen besser anti-tumoral wirksam als bei der kombinierten Gabe mit systemischen ICB beziehungsweise von CAR T-Zellen allein (Suarez et al. 2016; Tanoue et al. 2017). Der Vorteil einer lokalen

Sekretion von PD-L1-Antikörpern der transferierten Zellen gegenüber des PTM-Fusionsrezeptors besteht in einer zusätzlichen Aktivierung von CD8<sup>+</sup> TIL und anderen, sich im Tumormilieu befindlichen, Immunzellen. Hierdurch kann eine polyklonale Immunantwort, wie sie ebenfalls durch extrinsische ICB hervorgerufen wird, ausgelöst werden und womöglich besser anti-tumoral wirken (Grosser et al. 2019; Suarez et al. 2016). Allerdings werden die PD-L1-Antikörper permanent durch die CAR T-Zellen produziert, was wiederum irAE begünstigen könnte. Im Gegensatz dazu wirkt der PD-1-CD28-Fusionsrezeptor nur aktivierend auf die damit transduzierten T-Zellen, wenn der TZR an das passende Antigen bindet und aktiviert wird (Kobold et al. 2015). Dies könnte zu einem günstigeren Nebenwirkungsprofil des Fusionsrezeptors führen.

Ein anderes Konzept intrinsischer Manipulation von immunologischen Checkpoints ist die Entwicklung von CAR T-Zellen, die zusätzlich dominant-negative PD-1-Rezeptoren exprimieren. Diese weisen keine intrazellulären Signaldomänen auf, sodass der Rezeptor bei Bindung des Liganden kein koinhibitorisches Signal an die CAR T-Zellen weitergeben kann. Die veränderten PD-1-Rezeptoren binden PD-L1 im Tumormilieu und verringern dadurch kompetitiv die Bindungswahrscheinlichkeit an physiologischen PD-1-Rezeptoren (Chen et al. 2017; Cherkassky et al. 2016). Die anti-tumorale Effizienz von CAR T-Zellen kann ebenso durch das Fehlen von PD-1-Rezeptoren mittels CRISPR-Cas9-Verfahren gesteigert werden (Rupp et al. 2017). Somit können, wie bei dem PD-1-CD28-Fusionsrezeptor, die transferierten T-Zellen selbst einer Inhibition durch PD-L1 entgehen. Jedoch werden bei dem PTM-Fusionsrezeptor zusätzlich die T-Zellen über die Signaldomäne von CD28 aktiviert, was konsekutiv ihre Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen steigert (Kobold et al. 2015). Ein vollständiges Fehlen von PD-1-Rezeptoren auf den applizierten CAR T-Zellen birgt, im Vergleich zum PTM-Fusionsrezeptor und den dominant-negativen PD-1-Rezeptoren, durch die ausbleibende physiologische Hemmung der Zellen, ein erhöhtes Risiko für autoimmune Reaktionen (Chen et al. 2017).

Weiterhin ist zu bedenken, dass mit dem PD-1-CD28-Rezeptor nur die Wirkung des inhibitorischen Liganden PD-L1 abgefangen wird, wobei es jedoch noch viele weitere hemmende Liganden gibt, die ebenfalls die AZT beeinflussen. Eine Kombination von verschiedenen ICB könnte hierfür eine Lösung darstellen (Cherkassky et al. 2016; Sadelain 2015). Die Anwendung der retroviralen Transduktion birgt ebenfalls Risiken. Zellen, die mittels retroviraler Transduktion gentechnisch verändert wurden, können durch unspezifische Integration der DNS in das Genom der Zielzelle zu unerwünschten

Mutationen bis hin zur Entstehung von Onkogenen führen (Chen et al. 2019; Yi et al. 2005).

Letztendlich sehen mehrere Publikationen die Kombination von AZT und ICB als einen entscheidenden Schritt an, der die Immuntherapie verbessern könnte (Duan et al. 2018; Gorabi et al. 2019; Grosser et al. 2019; Li et al. 2019; Tanoue et al. 2017). Die Kombination könnte ein proinflammatorisches Tumormilieu schaffen, in denen tumorspezifische T-Zellen langanhaltend funktionsfähig bleiben, wodurch wichtige Voraussetzungen für eine starke Immunantwort geschaffen werden würden (Grosser et al. 2019; Tanoue et al. 2017).

## 5.6 Ausblick

In dieser Promotionsarbeit konnten erfolgreich zwei neue murine Tumorzelllinien etabliert werden. Für endgültige Aussagen bezüglich der *In-vivo*-Versuche der PD-L1<sup>-</sup> Panc02-OVA Tumorzelllinie müssen weitere Wachstums- und Therapieversuche mit PTM-transduzierten OT-I T-Zellen durchgeführt werden. Eine weitere Möglichkeit wären Versuche mit PD-L1-knock-out Mäusen, injizierten PD-L1<sup>-</sup> OT-I T-Zellen und PD-L1<sup>-</sup> Panc02-OVA Tumorzellen, um eine Wirkung des Liganden auf PTM-transduzierte T-Zellen gänzlich auszuschließen. Allerdings bestünde dann ein erhöhtes Risiko für eine immunologische Beseitigung der Tumoren bereits ohne Anwendung der AZT. Nach Lau et al. ergab sich eine spontane komplette Regression bei 80 % der PD-L1<sup>-</sup> MC38 Tumore in PD-L1-knock-out Mäusen ohne zusätzliche Therapie (Lau et al. 2017).

Die nächsten Versuche der MC38-GFP-OVA-iRFP betreffen den möglichen therapeutischen Einsatz von PTM-exprimierenden OT-I T-Zellen *in vitro* und *in vivo*. Erste Anwachsversuche, die hier nicht dargestellt wurden, konnten bereits eine erfolgreiche subkutane Tumorentwicklung der MC38-GFP-OVA-iRFP nachweisen. Ob OT-I T-Zellen mit dem Fusionsrezeptor eine bessere Lyse der Tumorzellen gegenüber untransduzierten OT-I T-Zellen bewirken können bleibt fraglich, da die hier verwendeten MC38-GFP-OVA-iRFP keine konstitutive, aber eine induzierbare PD-L1-Expression zeigten. Dies wird unter anderem davon abhängig sein, ob der Wirkmechanismus des PTM-Rezeptors im Pankreastumormodell auf der PD-L1-Expression der Tumorzellen beruht.

Aufgrund seiner immunstimulatorischen Eigenschaften und seiner Abhängigkeit der TZR-Aktivierung gäbe es für den Fusionsrezeptor PTM viele verschiedene klinische Anwendungsmöglichkeiten (Kobold et al. 2015). Insbesondere für die autologe AZT bei Tumorerkrankungen könnte der Fusionsrezeptor PTM transduziert werden, um die Effektivität von infundierten TIL, T-Zellen mit gentechnischen TZR oder autologen T-Zellen, die tumorale Neoantigene erkennen können, zu erhöhen (Berry et al. 2015; Kobold et al. 2015; Yamamoto et al. 2019). Eine weitere Einsatzmöglichkeit wäre die Transduktion von Spenderlymphozyten mit dem Rezeptor PTM bei therapierefraktären hämatologischen Erkrankungen (Kobold et al. 2015). Außerdem wäre ein Einsatz des PTM-Fusionsrezeptors in der viralen Therapie denkbar, in der immunologische Checkpoints ebenfalls relevant sind und die AZT bereits vielversprechende klinische Ergebnisse zeigen konnte (Feuchtinger et al. 2006; Sharpe et al. 2018). Allerdings müssten diese Anwendungsbereiche in diesen Kombinationen vorerst getestet und deren klinische Translation überprüft werden (Kobold et al. 2015).

Für die Immuntherapie gilt es weiterhin zahlreiche Herausforderungen zu überwinden, insbesondere in Bezug auf die heterogenen Ansprechraten und potenziellen Nebenwirkungen, wobei für letzteres bereits einige Ansätze existieren (Cherkassky et al. 2016). Vor allem geeignete Biomarker könnten erfolgreich dazu beitragen. Bei kolorektalen Karzinomen führte beispielsweise der Nachweis des Biomarkers *Mismatch repair deficiency* / hohe Mikrosatelliteninstabilität (dMMR / MSI-H) dazu, dass ICB von der FDA als Zweitlinientherapie bei diesen Tumoren zugelassen wurden (Lichtenstern et al. 2020). Um die AZT weiterhin zu verbessern, könnte die Kombination mit anderen inhibitorischen Rezeptoren interessant oder sogar unabdingbar sein (Cherkassky et al. 2016).

## 6. Zusammenfassung

Der adoptive T-Zelltransfer (AZT) und die Gabe von Immun-Checkpoint-Inhibitoren (ICB) sind jeweils für sich vielversprechende Therapien in der Onkologie. Der AZT ist bereits für bestimmte hämatologische Neoplasien, die ICB mittlerweile als Therapie bei zahlreichen verschiedenen Tumorentitäten zugelassen. Die Wirksamkeit der AZT ist bei soliden Tumoren unter anderem durch inhibitorische Liganden im Tumormilieu, die die transferierten T-Zellen hypofunktional werden lassen, herabgesetzt. Die ICB-Therapie hingegen aktiviert patienteneigene tumorspezifische Tumorzellen, was jedoch deren Vorkommen voraussetzt, um ein Ansprechen zu ermöglichen. Unsere Arbeitsgruppe kombinierte mit der Entwicklung eines PD-1-CD28-Fusionsrezeptors, für zu verabreichende T-Zellen, beide Therapiekonzepte. In einem murinen Pankreaskarzinommodell wurden T-Zellen mit dem Fusionsrezeptor stärker aktiviert und führten zu verzögertem Tumorstadium, längerem Überleben bis hin zum Verlust der Tumoren im Vergleich zu nicht-transduzierten T-Zellen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Etablierung zweier muriner Tumorzelllinien: In einer Pankreastumorzelllinie wurde mittels CRISPR-Cas9-System erfolgreich ein PD-L1-knock-out erzeugt. Die Pankreastumorzellen exprimierten trotz gentechnischer Veränderung weiterhin Ovalbumin und wurden von OT-I T-Zellen *in vitro* lysiert. Die neue Tumorzelllinie war in der Lage, subkutane Tumoren in Mäusen zu erzeugen. Dabei zeigte sich kein Unterschied im Wachstumsverhalten gegenüber PD-L1<sup>+</sup> Pankreastumorzellen. Ein erster therapeutischer *In-vivo*-Versuch mit PD-1-CD28-Fusionsrezeptor-transduzierten OT-I T-Zellen, führte nicht mehr zu einem verlängerten Überleben der Versuchstiere bei Verwendung der PD-L1-knock-out Tumorzellen, im Vergleich zu den Daten unserer Arbeitsgruppe bei PD-L1<sup>+</sup> Pankreastumorzellen. Ob der Wirkmechanismus des Fusionsrezeptors auf tumorseitigem PD-L1 beruht, kann hier aufgrund der begrenzten Anzahl der Versuche noch nicht geklärt werden.

Als zweite Tumorzelllinie wurde eine kolorektale Tumorzelllinie mittels retroviraler Transduktion generiert, die Ovalbumin auf MHC-I Komplexen präsentiert. OT-I T-Zellen konnten daraufhin das Ovalbumin-Peptid erkennen und die Tumorzellen gegenüber nicht-transduzierten Tumorzellen *in vitro* besser lysieren. Erste *In-vivo*-Versuche zeigen die Fähigkeit der neuen kolorektalen Tumorzelllinie, subkutane Tumoren zu bilden. In weiterführenden Versuchen soll eine zusätzliche anti-tumorale Wirkung der OT-I T-Zellen auf die kolorektale Tumorzelllinie untersucht werden, wenn sie mit dem

PD-1-CD28-Fusionsrezeptor transduziert sind. Somit kann die Wirksamkeit des Fusionsrezeptors in anderen soliden Tumorentitäten getestet werden. Allerdings konnte, im Gegensatz zu den Pankreastumorzellen, nur eine induzierbare PD-L1-Expression und keine konstitutive PD-L1-Expression in der generierten kolorektalen Tumorzelllinie nachgewiesen werden. Ob dies einen Einfluss auf die Wirkweise des PD-1-CD28-Fusionsrezeptors hat, müssen weiterführende Experimente zeigen.

## 7. Literaturverzeichnis

Ankri C, Shamalov K, Horovitz-Fried M, Mauer S, Cohen CJ. Human T cells engineered to express a programmed death 1/28 costimulatory retargeting molecule display enhanced antitumor activity.

*Journal of Immunology* 2013; 191:4121-9.

Antonios JP, Soto H, Everson RG, Moughon D, Orpilla JR, Shin NP, Sedighim S, Treger J, Odesa S, Tucker A, Yong WH, Li G, Cloughesy TF, Liau LM, Prins RM. Immunosuppressive tumor-infiltrating myeloid cells mediate adaptive immune resistance via a PD-1/PD-L1 mechanism in glioblastoma.

*Neuro-Oncology* 2017; 19:796-807.

Barnes B, Bertz J, Buttman-Schweiger N, Fiebig J, Jordan S, Kraywinkel K, Niemann H, Nowossadeck E, Poethko-Müller C, Prütz F, Rattay P, Schönfeld I, Starker A, Wienecke A, Wolf U, Castell S, Deleré Y, Grabow D, Kaatsch P, Multmeier J, Spix C, Tenckhoff B. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland. Berlin: Zentrum für Krebsregistrierdaten. Robert Koch-Institut.

2016. S. 24; 10.17886/rkipubl-2016-014.

Berry S, Taube JM. Innate vs. Adaptive: PD-L1-mediated immune resistance by melanoma.

*Oncoimmunology* 2015; 4:e1029704.

Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE, Chow LQ, Vokes EE, Felip E, Holgado E, Barlesi F, Kohlhäufel M, Arrieta O, Burgio MA, Fayette J, Lena H, Poddubskaya E, Gerber DE, Gettinger SN, Rudin CM, Rizvi N, Crinò L, Blumenschein GR, Jr., Antonia SJ, Dorange C, Harbison CT, Graf Finckenstein F, Brahmer JR.

Nivolumab versus docetaxel in advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer.

*The New England Journal of Medicine* 2015; 373:1627-39.

Buchtele N, Schellongowski P. Nebenwirkungen nach Immuntherapie in der Hämatologie und Onkologie.

*Wiener Klinische Wochenschrift Education* 2019; 14:S. 49-63.

Campenhout CV, Cabochette P, Veillard AC, Laczik M, Zelisko-Schmidt A, Sabatel C, Dhainaut M, Vanhollebeke B, Gueydan C, Kruys V. Guidelines for optimized gene knockout using CRISPR-Cas9.

*Biotechniques* 2019; 66:295-302.

Chen L, Qiao D, Wang J, Tian G, Wang M. Cancer immunotherapy with lymphocytes genetically engineered with T cell receptors for solid cancers.

*Immunology Letters* 2019; 216:51-62.

Chen N, Morello A, Tano Z, Adusumilli PS. CAR T-cell intrinsic PD-1 checkpoint blockade: A two-in-one approach for solid tumor immunotherapy.

*Oncoimmunology* 2017; 6:e1273302.

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.

*The Journal of Clinical Investigation* 2016; 126:3130-44.

D'Ippolito E, Schober K, Nauwerth M, Busch DH. T cell engineering for adoptive T cell therapy: safety and receptor avidity.

*Cancer Immunology, Immunotherapy* 2019; 68:1701-12.

Dang Y, Jia G, Choi J, Ma H, Anaya E, Ye C, Shankar P, Wu H. Optimizing sgRNA structure to improve CRISPR-Cas9 knockout efficiency.

*Genome Biology* 2015; 16:280.

Darnell EP, Mooradian MJ, Baruch EN, Yilmaz M, Reynolds KL. Immune-related Adverse Events (irAEs): diagnosis, management, and clinical pearls.

*Current Oncology Reports* 2020; 22:39.

Dermani FK, Samadi P, Rahmani G, Kohlan AK, Najafi R. PD-1/PD-L1 immune checkpoint: Potential target for cancer therapy.

*Journal of Cellular Physiology* 2019; 234:1313-25.

Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, Roche PC, Lu J, Zhu G, Tamada K, Lennon VA, Celis E, Chen L. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion.

*Nature Medicine* 2002; 8:793-800.

Duan J, Wang Y, Jiao S. Checkpoint blockade-based immunotherapy in the context of tumor microenvironment: Opportunities and challenges.

*Cancer Medicine* 2018; 7:4517-29.

Efremova M, Rieder D, Klepsch V, Charoentong P, Finotello F, Hackl H, Hermann-Kleiter N, Löwer M, Baier G, Krogsdam A, Trajanoski Z. Targeting immune checkpoints potentiates immunoediting and changes the dynamics of tumor evolution.

*Nature Communications* 2018; 9:32.

Fehrenbacher L, Spira A, Ballinger M, Kowanz M, Vansteenkiste J, Mazieres J, Park K, Smith D, Artal-Cortes A, Lewanski C, Braiteh F, Waterkamp D, He P, Zou W, Chen DS, Yi J, Sandler A, Rittmeyer A. Atezolizumab versus docetaxel for patients with previously treated non-small-cell lung cancer (POPLAR): a multicentre, open-label, phase 2 randomised controlled trial.

*Lancet* 2016; 387:1837-46.

Feldmann A, Arndt C, Koristka S, Berndt N, Bergmann R, Bachmann MP. Conventional CARs versus modular CARs.

*Cancer Immunology, Immunotherapy* 2019; 68:1713-9.

Feuchtinger T, Matthes-Martin S, Richard C, Lion T, Fuhrer M, Hamprecht K, Handgretinger R, Peters C, Schuster FR, Beck R, Schumm M, Lotfi R, Jahn G, Lang P. Safe adoptive transfer of virus-specific T-cell immunity for the treatment of systemic adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation.

*British Journal of Haematology* 2006; 134:64-76.

Garon EB, Rizvi NA, Hui R, Leigh N, Balmanoukian AS, Eder JP, Patnaik A, Aggarwal C, Gubens M, Horn L, Carcereny E, Ahn MJ, Felip E, Lee JS, Hellmann MD, Hamid O,

Goldman JW, Soria JC, Dolled-Filhart M, Rutledge RZ, Zhang J, Luceford JK, Rangwala R, Lubiniecki GM, Roach C, Emancipator K, Gandhi L. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer.

*The New England Journal of Medicine* 2015; 372:2018-28.

Giannini EG, Aglitti A, Borzio M, Gambato M, Guarino M, Iavarone M, Lai Q, Levi Sandri GB, Melandro F, Morisco F, Ponziani FR, Rendina M, Russo FP, Sacco R, Viganò M, Vitale A, Trevisani F. Overview of immune checkpoint inhibitors therapy for hepatocellular carcinoma, and the ITA.LI.CA cohort derived estimate of amenability rate to immune checkpoint inhibitors in clinical practice.

*Cancers (Basel)* 2019; 11.

Gong J, Chehrazi-Raffle A, Reddi S, Salgia R. Development of PD-1 and PD-L1 inhibitors as a form of cancer immunotherapy: A comprehensive review of registration trials and future considerations.

*Journal of Immunotherapy of Cancer* 2018; 6:8.

Gorabi AM, Hajighasemi S, Sathyapalan T, Sahebkar A. Cell transfer-based immunotherapies in cancer: A review.

*International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life* 2019.

Grosser R, Cherkassky L, Chintala N, Adusumilli PS. Combination immunotherapy with CAR T cells and checkpoint blockade for the treatment of solid tumors.

*Cancer Cell* 2019; 36:471-82.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation.

*Cell* 2011; 144:646-74.

Hargadon KM, Johnson CE, Williams CJ. Immune checkpoint blockade therapy for cancer: An overview of FDA-approved immune checkpoint inhibitors.

*International Immunopharmacology* 2018; 62:29-39.

Hartmann J, Schussler-Lenz M, Bondanza A, Buchholz CJ. Clinical development of CAR T cells-challenges and opportunities in translating innovative treatment concepts.

*EMBO Molecular Medicine* 2017; 9:1183-97.

Heikenwälder H, Heikenwälder M. Krebs - Lifestyle und Umweltfaktoren als Risiko.

Berlin: Springer-Verlag GmbH Deutschland, ein Teil von Springer Nature;

2019. S. 1-18.

Hogquist KA, Jameson SC, Heath WR, Howard JL, Bevan MJ, Carbone FR. T cell receptor antagonist peptides induce positive selection.

*Cell* 1994; 76:17-27.

Hui L, Chen Y. Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil.

*Cancer Letters* 2015; 368:7-13.

Ishino Y, Krupovic M, Forterre P. History of CRISPR-Cas from encounter with a mysterious repeated sequence to genome editing technology.

*Journal of Bacteriology* 2018; 200.

Jacinto FV, Link W, Ferreira BI. CRISPR-Cas9-mediated genome editing: From basic research to translational medicine.

*Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2020; 24:3766-78.

Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity.

*Science* 2012; 337:816-21.

John LB, Devaud C, Duong CP, Yong CS, Beavis PA, Haynes NM, Chow MT, Smyth MJ, Kershaw MH, Darcy PK. Anti-PD-1 antibody therapy potently enhances the eradication of established tumors by gene-modified T cells.

*Clinical Cancer Research* 2013; 19:5636-46.

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

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

Juneja VR, McGuire KA, Manguso RT, LaFleur MW, Collins N, Haining WN, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-L1 on tumor cells is sufficient for immune evasion in immunogenic tumors and inhibits CD8 T cell cytotoxicity.

*Journal of Experimental Medicine* 2017; 214:895-904.

Karamitopoulou E. Tumour microenvironment of pancreatic cancer: immune landscape is dictated by molecular and histopathological features.

*British Journal of Cancer* 2019; 121:5-14.

Kleinovink JW, Marijt KA, Schoonderwoerd MJA, van Hall T, Ossendorp F, Fransen MF. PD-L1 expression on malignant cells is no prerequisite for checkpoint therapy.

*Oncoimmunology* 2017; 6:e1294299.

Kobold S, Duedell P, Schnurr M, Subklewe M, Rothenfusser S, Endres S. Immuntherapie von Tumoren.

*Deutsches Ärzteblatt International* 2015; 112:809-15.

Kobold S, Grassmann S, Chaloupka M, Lampert C, Wenk S, Kraus F, Rapp M, Duwell P, Zeng Y, Schmollinger JC, Schnurr M, Endres S, Rothenfusser S. Impact of a new fusion receptor on PD-1-mediated immunosuppression in adoptive T cell therapy.

*Journal of The National Cancer Institute* 2015; 107.

Lau J, Cheung J, Navarro A, Lianoglou S, Haley B, Totpal K, Sanders L, Koeppen H, Caplazi P, McBride J, Chiu H, Hong R, Grogan J, Javinal V, Yauch R, Irving B, Belvin M, Mellman I, Kim JM, Schmidt M. Tumour and host cell PD-L1 is required to mediate suppression of anti-tumour immunity in mice.

*Nature Communications* 2017; 8:14572.

Leisegang M, Engels B, Meyerhuber P, Kieback E, Sommermeyer D, Xue SA, Reuss S, Stauss H, Uckert W. Enhanced functionality of T cell receptor-redirectioned T cells is defined by the transgene cassette.

*Journal of Molecular Medicine* 2008; 86:573-83.

Lentsch E, Li L, Pfeffer S, Ekici AB, Taher L, Pilarsky C, Grutzmann R. CRISPR-Cas9-mediated knock-out of kras (G12D) mutated pancreatic cancer cell lines. *International Journal of Molecular Sciences* 2019; 20.

Lewis JE, Brameld JM, Hill P, Barrett P, Ebling FJ, Jethwa PH. The use of a viral 2A sequence for the simultaneous over-expression of both the vgf gene and enhanced green fluorescent protein (eGFP) in vitro and in vivo. *Journal of Neuroscience Methods* 2015; 256:22-9.

Li D, Li X, Zhou WL, Huang Y, Liang X, Jiang L, Yang X, Sun J, Li Z, Han WD, Wang W. Genetically engineered T cells for cancer immunotherapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2019; 4:35.

Lichtenstern CR, Ngu RK, Shalpour S, Karin M. Immunotherapy, Inflammation and Colorectal Cancer. *Cells* 2020; 9.

Lin H, Wei S, Hurt EM, Green MD, Zhao L, Vatan L, Szeliga W, Herbst R, Harms PW, Fecher LA, Vats P, Chinnaiyan AM, Lao CD, Lawrence TS, Wicha M, Hamanishi J, Mandai M, Kryczek I, Zou W. Host expression of PD-L1 determines efficacy of PD-L1 pathway blockade-mediated tumor regression. *The Journal of Clinical Investigation* 2018; 128:805-15.

Liu C, Zhang L, Liu H, Cheng K. Delivery strategies of the CRISPR-Cas9 gene-editing system for therapeutic applications. *Journal of Controlled Release* 2017; 266:17-26.

Liu X, Ranganathan R, Jiang S, Fang C, Sun J, Kim S, Newick K, Lo A, June CH, Zhao Y, Moon EK. A chimeric switch-receptor targeting PD-1 augments the efficacy of second-generation CAR T cells in advanced solid tumors. *Cancer Research* 2016; 76:1578-90.

Lutz ER, Wu AA, Bigelow E, Sharma R, Mo G, Soares K, Solt S, Dorman A, Wamwea A, Yager A, Laheru D, Wolfgang CL, Wang J, Hruban RH, Anders RA, Jaffee EM, Zheng L. Immunotherapy converts nonimmunogenic pancreatic tumors into immunogenic foci of immune regulation. *Cancer Immunology Research* 2014; 2:616-31.

Martinez-Bosch N, Vinaixa J, Navarro P. Immune evasion in pancreatic cancer: From mechanisms to therapy. *Cancers (Basel)* 2018; 10.

Met Ö, Jensen KM, Chamberlain CA, Donia M, Svane IM. Principles of adoptive T cell therapy in cancer. *Seminars in Immunopathology* 2019; 41:49-58.

Michot JM, Bigenwald C, Champiat S, Collins M, Carbonnel F, Postel-Vinay S, Berdelou A, Varga A, Bahleda R, Hollebecque A, Massard C, Fuerea A, Ribrag V, Gazzah A, Armand JP, Amellal N, Angevin E, Noel N, Boutros C, Mateus C, Robert C, Soria JC, Marabelle A, Lambotte O. Immune-related adverse events with immune checkpoint blockade: a comprehensive review. *European Journal of Cancer* 2016; 54:139-48.

Minutolo NG, Hollander EE, Powell DJ, Jr. The Emergence of Universal Immune Receptor T Cell Therapy for Cancer. *Frontiers in Oncology* 2019; 9:176.

Moon EK, Ranganathan R, Eruslanov E, Kim S, Newick K, O'Brien S, Lo A, Liu X, Zhao Y, Albelda SM. Blockade of programmed death 1 augments the ability of human T cells engineered to target NY-ESO-1 to control tumor growth after adoptive transfer. *Clinical Cancer Research* 2016; 22:436-47.

Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, Hughes MS, Yang JC, Sherry RM, Royal RE, Topalian SL, Kammula US, Restifo NP, Zheng Z, Nahvi A, de Vries CR, Rogers-Freezer LJ, Mavroukakis SA, Rosenberg SA. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* 2006; 314:126-9.

Morita S, Kojima T, Kitamura T. Plat-E: An efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Therapy* 2000; 7:1063-6.

Murphy K. Janeway's Immunobiology. 8. Auflage. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group; 2012. S. 152, 205, 257 f., 263, 358, 373 f., 682-687, 695.

Nguyen LT, Saibil SD, Sotov V, Le MX, Khoja L, Ghazarian D, Bonilla L, Majeed H, Hogg D, Joshua AM, Crump M, Franke N, Spreafico A, Hansen A, Al-Habeeb A, Leong W, Easson A, Reedijk M, Goldstein DP, McCready D, Yasufuku K, Waddell T, Cypel M, Pierre A, Zhang B, Boross-Harmer S, Cipollone J, Nelles M, Scheid E, Fyrsta M, Lo CS, Nie J, Yam JY, Yen PH, Gray D, Motta V, Elford AR, DeLuca S, Wang L, Effendi S, Ellenchery R, Hirano N, Ohashi PS, Butler MO. Phase II clinical trial of adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and low-dose interleukin-2. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 2019; 68:773-85.

Noguchi T, Ward JP, Gubin MM, Arthur CD, Lee SH, Hundal J, Selby MJ, Graziano RF, Mardis ER, Korman AJ, Schreiber RD. Temporally distinct PD-L1 expression by tumor and host cells contributes to immune escape. *Cancer Immunology Research* 2017; 5:106-17.

Ostrand-Rosenberg S, Horn LA, Haile ST. The programmed death-1 immune-suppressive pathway: Barrier to antitumor immunity. *The Journal of Immunology* 2014; 193:3835-41.

Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer* 2012; 12:252-64.

Pelzer U, Jühling A, Sausville EA, Longo DL. 103e Grundlagen der Krebstherapie. Teil 7 Onkologie und Hämatologie. In Suttorp N, Möckel M, Siegmund B, Dietel M. *Harrisons Innere Medizin*. 19. Auflage. ABW Wissenschaftsverlag; 2016.

Pitt JM, Vetizou M, Daillere R, Roberti MP, Yamazaki T, Routy B, Lepage P, Boneca IG, Chamaillard M, Kroemer G, Zitvogel L. Resistance Mechanisms to Immune-Checkpoint Blockade in Cancer: Tumor-Intrinsic and -Extrinsic Factors. *Immunity* 2016; 44:1255-69.

Prosser ME, Brown CE, Shami AF, Forman SJ, Jensen MC. Tumor PD-L1 co-stimulates primary human CD8(+) cytotoxic T cells modified to express a PD1:CD28 chimeric receptor. *Molecular Immunology* 2012; 51:263-72.

Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols* 2013; 8:2281-308.

Robert C, Long GV, Brady B, Dutriaux C, Maio M, Mortier L, Hassel JC, Rutkowski P, McNeil C, Kalinka-Warzocha E, Savage KJ, Hernberg MM, Lebbé C, Charles J, Mihalciou C, Chiarion-Sileni V, Mauch C, Cognetti F, Arance A, Schmidt H, Schadendorf D, Gogas H, Lundgren-Eriksson L, Horak C, Sharkey B, Waxman IM, Atkinson V, Ascierto PA. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *The New England Journal of Medicine* 2015; 372:320-30.

Rohaan MW, van den Berg JH, Kvistborg P, Haanen J. Adoptive transfer of tumor-infiltrating lymphocytes in melanoma: A viable treatment option. *Journal for Immunotherapy of Cancer* 2018; 6:102.

Rosenbaum MW, Bledsoe JR, Morales-Oyarvide V, Huynh TG, Mino-Kenudson M. PD-L1 expression in colorectal cancer is associated with microsatellite instability, BRAF mutation, medullary morphology and cytotoxic tumor-infiltrating lymphocytes. *Modern Pathology* 2016; 29:1104-12.

Rosenberg JE, Hoffman-Censits J, Powles T, van der Heijden MS, Balar AV, Necchi A, Dawson N, O'Donnell PH, Balmanoukian A, Loriot Y, Srinivas S, Retz MM, Grivas P, Joseph RW, Galsky MD, Fleming MT, Petrylak DP, Perez-Gracia JL, Burris HA, Castellano D, Canil C, Bellmunt J, Bajorin D, Nickles D, Bourgon R, Frampton GM, Cui N, Mariathasan S, Abidoye O, Fine GD, Dreicer R. Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: A single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet* 2016; 387:1909-20.

Rosenberg SA. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature* 2001; 411:380-4.

Rosenberg SA, Restifo NP. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science* 2015; 348:62-8.

Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM, Kammula US, Hughes MS, Phan GQ, Citrin DE, Restifo NP, Robbins PF, Wunderlich JR, Morton KE, Laurencot CM, Steinberg SM, White DE, Dudley ME. Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clinical Cancer Research* 2011; 17:4550-7.

- Rotzschke O, Falk K, Stevanovic S, Jung G, Walden P, Rammensee HG. Exact prediction of a natural T cell epitope.  
*European Journal of Immunology* 1991; 21:2891-4.
- Rupp LJ, Schumann K, Roybal KT, Gate RE, Ye CJ, Lim WA, Marson A. CRISPR-Cas9-mediated PD-1 disruption enhances anti-tumor efficacy of human chimeric antigen receptor T cells.  
*Scientific Reports* 2017; 7:737.
- Sadelain M. CAR therapy: The CD19 paradigm.  
*The Journal of Clinical Investigation* 2015; 125:3392-400.
- Sanchez-Trincado JL, Gomez-Perosanz M, Reche PA. Fundamentals and methods for T- and B-cell epitope prediction.  
*Journal of Immunology Research* 2017; 2017:2680160.
- Schmidt O. Mutationen und DNA-Reparatur, Kapitel 11. Fritsche O. Kompaktwissen Biologie, Genetik und Molekularbiologie.  
Springer Spektrum, Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2017. S. 195.
- Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, Shi X, Scott DA, Mikkelsen T, Heckl D, Ebert BL, Root DE, Doench JG, Zhang F. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells.  
*Science* 2014; 343:84-7.
- Sharpe AH, Pauken KE. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway.  
*Nature Reviews Immunology* 2018; 18:153-67.
- Shi SJ, Wang LJ, Wang GD, Guo ZY, Wei M, Meng YL, Yang AG, Wen WH. B7-H1 expression is associated with poor prognosis in colorectal carcinoma and regulates the proliferation and invasion of HCT116 colorectal cancer cells.  
*PLOS ONE* 2013; 8:e76012.
- Song X, Liu J, Lu Y, Jin H, Huang D. Overexpression of B7-H1 correlates with malignant cell proliferation in pancreatic cancer.  
*Oncology Reports* 2014; 31:1191-8.
- Statistisches Bundesamt (Destatis). Todesursachen nach Krankheitsarten 2017. 2019. Aufruf am 05. Februar 2020, Verfügbar unter [https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/\\_inhalt.html](https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/_inhalt.html).
- Suarez ER, Chang de K, Sun J, Sui J, Freeman GJ, Signoretti S, Zhu Q, Marasco WA. Chimeric antigen receptor T cells secreting anti-PD-L1 antibodies more effectively regress renal cell carcinoma in a humanized mouse model.  
*Oncotarget* 2016; 7:34341-55.
- Tabassum DP, Polyak K. Tumorigenesis: It takes a village.  
*Nature Reviews Cancer* 2015; 15:473-83.

Tang F, Zheng P. Tumor cells versus host immune cells: Whose PD-L1 contributes to PD-1/PD-L1 blockade mediated cancer immunotherapy?  
*Cell & Bioscience* 2018; 8:34.

Tang H, Liang Y, Anders RA, Taube JM, Qiu X, Mulgaonkar A, Liu X, Harrington SM, Guo J, Xin Y, Xiong Y, Nham K, Silvers W, Hao G, Sun X, Chen M, Hannan R, Qiao J, Dong H, Peng H, Fu YX. PD-L1 on host cells is essential for PD-L1 blockade-mediated tumor regression.  
*The Journal of Clinical Investigation* 2018; 128:580-8.

Tanoue K, Rosewell Shaw A, Watanabe N, Porter C, Rana B, Gottschalk S, Brenner M, Suzuki M. Armed oncolytic adenovirus-expressing PD-L1 mini-body enhances antitumor effects of chimeric antigen receptor T cells in solid tumors.  
*Cancer Research* 2017; 77:2040-51.

Umezue D, Okada N, Sakoda Y, Adachi K, Ojima T, Yamaue H, Eto M, Tamada K. Inhibitory functions of PD-L1 and PD-L2 in the regulation of anti-tumor immunity in murine tumor microenvironment.  
*Cancer Immunology, Immunotherapy* 2019; 68:201-11.

Wang X, Teng F, Kong L, Yu J. PD-L1 expression in human cancers and its association with clinical outcomes.  
*Onco Targets and Therapy* 2016; 9:5023-39.

Wang Z, Wu Z, Liu Y, Han W. New development in CAR-T cell therapy.  
*Journal of Hematology and Oncology* 2017; 10:53.

Wolf B, Zimmermann S, Arber C, Irving M, Trueb L, Coukos G. Safety and tolerability of adoptive cell therapy in cancer.  
*Drug Safety* 2019; 42:315-34.

World Health Organisation. Cancer.  
2018. Aufruf am 01. März 2020, Verfügbar unter <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.

Wu T, Dai Y. Tumor microenvironment and therapeutic response.  
*Cancer Letters* 2017; 387:61-8.

Wu X, Gu Z, Chen Y, Chen B, Chen W, Weng L, Liu X. Application of PD-1 blockade in cancer immunotherapy.  
*Computational and Structural Biotechnology Journal* 2019; 17:661-74.

Yamamoto TN, Kishton RJ, Restifo NP. Developing neoantigen-targeted T cell-based treatments for solid tumors.  
*Nature Medicine* 2019; 25:1488-99.

Yi Y, Hahm SH, Lee KH. Retroviral gene therapy: Safety issues and possible solutions.  
*Current Gene Therapy* 2005; 5:25-35.

Zou W, Chen L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment.  
*Nature Reviews Immunology* 2008; 8:467-77.

**8. Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme**

AZT	Adoptiver Zelltransfer
BSA	Bovines Serumalbumin
B-ALL	Akute lymphatische B-Zell Leukämie
CAR	<i>Chimeric antigen receptor</i> ; Chimärer Antigenrezeptor
Cas	<i>CRISPR-associated system</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CRISPR	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4</i>
ddH <sub>2</sub> O	Doppelt destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
FACS	<i>Flourescence-activated cell sorting</i> ; Durchflusszytometrie
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> ; Fetales Kälberserum
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> ; Grün fluoreszierendes Protein
gRNA	<i>Guide ribonucleic acid</i> ; Leit-Ribonukleinsäure
ICB	Immun-Checkpoint-Blocker
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL-2	Interleukin-2
IL-15	Interleukin-15
irAE	<i>Immune-related adverse events</i>
iRFP	<i>Near-infrared fluorescence protein</i> ; Nah-Infrarot fluoreszierendes Protein
LDH	Lakatadehydrogenase
MHC-I	<i>Major histocompatibility complex-I</i> ; Haupthistokompatibilitätskomplex-I
MDSC	<i>Myeloid-derived suppressor cells</i> ; Myeloide Suppressorzellen
OE-PCR	<i>Overlap extension polymerase chain reaction</i>
OVA	Ovalbumin
PAM	<i>Protospacer adjacent motif</i>

---

PBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> ; Polymerase-Kettenreaktion
PD-1	<i>Programmed cell death-1</i>
PD-L1	<i>Programmed death-ligand 1</i>
PD-L2	<i>Programmed death-ligand 2</i>
PTM	PD-1-CD28-Fusionsrezeptor
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SEM	<i>Standard error of mean</i> ; Standardfehler des Mittelwertes
TIL	Tumorinfiltrierende Lymphozyten
TZR	T-Zell-Rezeptor
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor-<math>\beta</math></i> ; Transformierender Wachstumsfaktor $\beta$
WT	Wildtyp

## 9. Danksagung

Als erstes gilt mein Dank meinem Doktorvater Prof. Dr. Sebastian Kobold für die Aufnahme in die Abteilung für Klinische Pharmakologie und in seiner Arbeitsgruppe Immunpharmakologie. Ich bedanke mich für mein interessantes Promotionsthema, dem fundierten Einblick in die Wissenschaft, dem ehrlichen Feedback und der steten Unterstützung mit seinen außerordentlichen Kenntnissen das Projekt zu fördern. Sein Engagement und seine Begeisterung für die Wissenschaft waren mir ein Vorbild. Herrn Prof. Dr. Stefan Endres, dem Direktor der Abteilung für Klinische Pharmakologie, bin ich für seine herausragende Freundlichkeit mit einer stets offenen Tür bei Fragen oder Problemen und seinem Einsatz einer gezielten persönlichen Förderung und Unterstützung der Doktoranden überaus dankbar. Sein Vermögen klinisches und wissenschaftliche Wissen zu vermitteln haben mich beeindruckt. Meiner Betreuerin Dr. Felicitas Stein möchte ich für die freundschaftliche Atmosphäre, ihrer Geduld mir Sachverhalte und labortechnische Methoden beizubringen und die zahlreichen anregenden Konversationen danken.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Raffaele Conca von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Klein des Instituts der Immunologie und Dr. habil. Michael Hristov vom Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten der Ludwig-Maximilians-Universität für ihre Unterstützung bei der Durchflusszytometrie. Ich danke für die Möglichkeit einer strukturierten Promotion und Förderung durch das Internationale Doktorandenkolleg *i-Target: Immunotargeting of cancer* des Elitenetzwerk Bayern.

Darüber hinaus bedanke ich mich herzlich bei der gesamten Abteilung insbesondere für die familiäre Arbeitsatmosphäre, die enorme Hilfsbereitschaft und fachliche sowie moralische Unterstützung. Im Besonderen möchte ich an dieser Stelle an die Doktoranden meines Jahrgangs und bei Florian Asang, Bruno Cadilha, Susanne Wenk, Constanze Heise, Patrick Layritz und Monika Fahrenkamp bedanken.

Schließlich bedanke ich mich herzlich bei meiner Familie, insbesondere bei meinen Eltern, die mich durch mein gesamtes Studium emotional und finanziell unterstützt haben und mir dieses ermöglichten. Meinem Lebenspartner danke ich für sein Verständnis und seine unzähligen motivierenden Worte und ebenso meinen Freunden für ihre Unterstützung.