

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

der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

Charakterisierung von CXCR6-modifizierten Mesothelin-spezifischen CAR T-Zellen im Pankreaskarzinommodell



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

vorgelegt von
Stefan Stoiber
aus Linz, Österreich
2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. S. Kobold

Mitberichtersteller: PD Dr. med. Christian Wichmann

Prof. Dr. med. Marion Subklewe

Prof. Dr. med. Julia Mayerle

Mitbetreuung durch die

promovierten Mitarbeiter:

Felicitas Stein, PhD

Prof. Dr. med. Stefan Endres

Dekan:

Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung:

08.12.2022

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Stefan Stoiber, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Charakterisierung von CXCR6-modifizierten Mesothelin-spezifischen CAR T-Zellen im Pankreaskarzinommodell

selbstständig 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 08.12.2022

Stefan Stoiber

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Das Pankreaskarzinom	1
1.2 Immuntherapie von Tumoren	2
1.3 Grundlagen der CAR T-Zelltherapie	3
1.4 Mesothelin als Zielantigen für CAR T-Zellen	3
1.5 Limitationen der CAR T-Zelltherapie in soliden Tumoren	4
1.5.1 Wahl des Zielantigens	4
1.5.2 Tumorinfiltration der CAR T-Zellen	5
1.5.3 Immunsuppressive Tumorumgebung	5
1.6 Chemokine und Chemokinrezeptoren	6
1.7 Chemokinrezeptoren in der CAR T-Zelltherapie solider Tumore.....	7
1.8 Die CXCL16-CXCR6-Achse	8
1.9 Vorarbeiten der Arbeitsgruppe	9
1.10 Zielsetzung der Arbeit.....	10
2 Material und Methoden	11
2.1 Geräte und Reagenzien.....	11
2.2 Molekularbiologische Methoden	15
2.2.1 Retrovirale Vektoren	15
2.2.2 <i>Overlap extension</i> PCR und Primer Design	16
2.2.3 Restriktion und Ligation	17
2.2.4 Plasmid-Amplifikation	17
2.2.5 DNA-Sequenzierung.....	17
2.2.6 Agarose-Gel-Elektrophorese	18
2.2.7 RNA-Extraktion aus primären humanen T-Zellen.....	18
2.2.8 Reverse Transkription	18
2.3 Zellkulturmethoden	18
2.3.1 Allgemeine Zellkulturmethoden	18
2.3.2 Generation neuer Zelllinien	19
2.3.3 Virusproduktion mittels Platinum A oder 293Vec-RD114	21
2.3.4 Transduktion primärer humaner T-Zellen	21
2.3.5 Durchflusszytometrie	23
2.4 Zellbasierte Assays	23
2.4.1 Migrations-Assay	23
2.4.2 Zytotoxizitäts-Assay.....	23
2.4.3 T-Zell-Stimulations-Assay.....	24
2.4.4 CXCL16-Assay	24
2.5 Tierversuche	25
2.5.1 Voraussetzungen zur Durchführung der Tierversuche.....	25
2.5.2 Subkutanes Xenograft Pankreaskarzinommodell.....	25
2.6 Statistische Auswertung.....	25
3 Ergebnisse	26

3.1 Modifikation der Pankreaskarzinomzelllinie SUIT-2.....	26
3.2 Generation und Struktur der Rezeptoren für die T-Zellmodifikation	26
3.3 Expression der Rezeptorkonstrukte in primären humanen T-Zellen	28
3.4 Endogene CXCR6-Expression primärer humaner T-Zellen	29
3.5 Funktionalität der Rezeptoren in primären humanen T-Zellen	31
3.6 Funktionalität von CAR und CAR-CXCR6 T-Zellen im Vergleich	33
3.7 <i>In vivo</i> Funktionalität der modifizierten T-Zellen	35
4 Diskussion.....	38
4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse	38
4.2 Struktur der Rezeptorkonstrukte für die T-Zellmodifikation	38
4.2.1 Aufbau des CAR-Konstrukts.....	38
4.2.2 Struktur von CXCR6	39
4.2.3 Einfluss der 2A-Sequenz im CAR-CXCR6-Konstrukt.....	40
4.3 Funktionalität der Rezeptorkonstrukte.....	40
4.4 Translation des Therapieansatzes in die Klinik.....	42
4.5 Adoptive T-Zelltherapie mit CXCR6-modifizierten CAR T-Zellen	43
4.6 Translation des Therapieansatzes in anderen Tumorentitäten	45
4.7 Multimodale Therapie mit CXCR6-transduzierten CAR T-Zellen	46
4.8 Strategien zur Überwindung weiterer Limitationen	47
5 Zusammenfassung und Ausblick	49
6 Literaturverzeichnis.....	50
7 Abkürzungsverzeichnis	60
8 Publikationen	62
9 Danksagung	64

1 Einleitung

1.1 Das Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom ist eine bösartige Erkrankung der Bauchspeicheldrüse und ist mit einem geschlechtsabhängigen mittleren Erkrankungsalter von 72 und 76 Jahren eine Erkrankung des alternden Menschen (Krebs in Deutschland für 2017/2018). Aufgrund der fehlenden Möglichkeiten zur Früherkennung, wird die Krankheit oft erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert (S3-Leitlinie zum exokrinen Pankreaskarzinom, 2021). Folglich ist die Prognose mit einer relativen 5-Jahres Überlebensrate von ungefähr zehn Prozent äußerst ungünstig (Krebs in Deutschland für 2017/2018, S3-Leitlinie zum exokrinen Pankreaskarzinom, 2021). Für das Jahr 2030 wird prognostiziert, dass das Pankreaskarzinom nach dem Lungenkarzinom die zweithäufigste Krebstodesursache in Deutschland darstellen wird (Quante et al. 2016).

Die derzeit einzige potenziell kurative Therapieoption für Pankreaskarzinompatienten ist die vollständige chirurgische Resektion des Tumors (S3-Leitlinie zum exokrinen Pankreaskarzinom, 2021). Der kurativ intendierten Resektion folgt in der Regel eine adjuvante oder additive Chemotherapie, um das Langzeitüberleben der Patienten zu verbessern (S3-Leitlinie zum exokrinen Pankreaskarzinom, 2021). Die chirurgische Resektion des Tumors verbietet sich allerdings beim Vorliegen von Fernmetastasen und stellt damit für viele Patienten keine Option dar (S3-Leitlinie zum exokrinen Pankreaskarzinom, 2021). Beim irresektablen oder fernmetastasierten Pankreaskarzinom kommen deswegen je nach Allgemeinzustand, Komorbidität und Präferenz des Patienten verschiedene Chemotherapie-Schemata in palliativer Intention zum Einsatz (S3-Leitlinie zum exokrinen Pankreaskarzinom, 2021).

Obwohl es im Hinblick auf die für das Pankreaskarzinom etablierten Chemotherapie-Regime beachtliche Fortschritte gegeben hat (Conroy et al. 2011, von Hoff et al. 2013), sind die Aussichten auf eine dauerhafte Heilung der Erkrankung selbst bei kurativ intendierter Behandlung weiterhin gering (Conroy et al. 2018). Außerdem sind die besser wirksamen Chemotherapie-Regime vergleichsweise toxisch und nur für Patienten mit gutem Allgemeinzustand und geringer Komorbidität geeignet (Conroy et al. 2011, Conroy et al. 2018, von Hoff et al. 2013). Deshalb ist es dringend

notwendig, neue und erfolgreiche Therapiestrategien für Pankreaskarzinompatienten zu entwickeln.

1.2 Immuntherapie von Tumoren

Eine vielversprechende Strategie zur Bekämpfung verschiedener Krebserkrankungen ist die therapeutische Nutzung des körpereigenen Immunsystems (Waldman et al. 2020). Beispielsweise hat die Enthemmung der antitumoralen Immunantwort durch Checkpoint-Inhibitoren herausragende Wirkung in der Therapie des malignen Melanoms gezeigt (Robert et al. 2020). Derzeit fehlen jedoch ähnlich effektive immuntherapeutische Ansätze für das Pankreaskarzinom. Checkpoint-Inhibitoren kommen hierbei nur in Ausnahmefällen zum Einsatz (S3-Leitlinie zum exokrinen Pankreaskarzinom, 2021).

Eine besondere Form der immunologischen Krebsbekämpfung stellt die Therapie mit Tumor-spezifischen T-Zellen dar (Waldman et al. 2020). Diese Therapieform macht sich zunutze, dass T-Zellen grundsätzlich in der Lage sind, Tumorzellen zu erkennen und zu zerstören (Waldman et al. 2020). Dafür ist es allerdings notwendig, dass die T-Zellen den passenden T-Zellrezeptor besitzen, um *major histocompatibility complex* (MHC)-präsentierte Antigene der Tumorzellen zu erkennen (Waldman et al. 2020). Tumor-infiltrierende Lymphozyten (TIL) erfüllen diese Voraussetzung vergleichsweise häufig und können daher im Rahmen der TIL-Therapie genutzt werden (Rosenberg et al. 1988). Dabei werden Tumor-spezifische T-Zellen aus Tumorproben isoliert, *in vitro* expandiert und dem Patienten im Anschluss an eine lymphodepletierende Chemotherapie zurückinfundiert (Rosenberg et al. 2015).

Alternativ können T-Zellen aus peripherem Blut gewonnen und mit einem Tumor-gerichteten T-Zellrezeptor ausgestattet werden (Morgan et al. 2006). Dadurch erübrigt sich die aufwändige Isolation der T-Zellen aus Tumorproben (Dudley et al. 2003). Allerdings ist diese Strategie weiterhin durch die MHC-Restriktion der T-Zellen limitiert (Waldman et al. 2020). Ein eleganter und vergleichsweise einfacher Ansatz zur Generierung Tumor-spezifischer T-Zellen ist die Modifikation der T-Zellen mit einem chimären Antigenrezeptor (CAR) (Eshhar et al. 1993). Dabei können T-Zellen mit beliebiger T-Zellrezeptorspezifität für die MHC-unabhängige Tumorzellerkennung gewappnet werden (Eshhar et al. 1993).

1.3 Grundlagen der CAR T-Zelltherapie

Chimäre Antigenrezeptoren sind artifiziell hergestellte und aus verschiedenen funktionellen Domänen zusammengesetzte Rezeptormoleküle (June et al. 2018). Sie beinhalten als Tumor-gerichtete Antigen-Erkennungsdomäne in der Regel ein *single-chain variable fragment* (scFv) (June et al. 2018). Dieses scFv besteht aus den variablen Domänen der leichten (VL) und der schweren Kette (VH) eines monoklonalen Antikörpers, welche durch eine kurze Peptidkette (Linker) fusioniert wurden (Bird et al. 1988, Huston et al. 1988). In der Regel zeigt das scFv die gleiche Spezifität wie der Antikörper, von dem es abgeleitet wurde (Bird et al. 1988, Huston et al. 1988). Das scFv wird über eine Spacer- und Transmembran-Domäne an intrazelluläre T-Zell-stimulatorische Moleküle gekoppelt (June et al. 2018). Die Erkennung des Zielantigens durch den CAR löst folglich verschiedene antitumorale Effektorfunktionen der T-Zellen aus (Benmebarek et al. 2019). Die T-Zell-stimulatorische Domäne des chimären Rezeptors wird derzeit meist von der *cluster of differentiation* (CD) 3 ζ -Kette abgeleitet (Eshhar et al. 1993). Zur Verbesserung der Aktivierung (Maher et al. 2002) sowie der Expansion und Persistenz (Savoldo et al. 2011) von CAR T-Zellen wird zusätzlich eine kostimulatorische Domäne in den Rezeptor integriert, man spricht dann von Rezeptoren der zweiten Generation (June et al. 2018). Die stabile Expression des Rezeptors in den T-Zellen wird derzeit überwiegend durch den Einsatz von retroviralen Vektoren realisiert.

1.4 Mesothelin als Zielantigen für CAR T-Zellen

Für die CAR T-Zelltherapie ist die Auswahl des geeigneten Zielantigens von herausragender Bedeutung (Morello et al. 2016). Ein prominentes Zielantigen in der CAR T-Zelltherapie des Pankreaskarzinoms und anderer Tumorentitäten ist Mesothelin (MSLN) (Morello et al. 2016). Basierend auf den Daten verschiedener Studien wurde geschätzt, dass 80 bis 85 % der Pankreaskarzinome Mesothelin exprimieren (Morello et al. 2016). Während Mesothelin in einer frühen Studie in ausnahmslos allen untersuchten Pankreaskarzinomproben nachgewiesen wurde, variierte der prozentuale Anteil der immunhistochemisch Mesothelin-positiven Tumorzellen in den einzelnen Proben erheblich (Argani et al. 2001). Umliegendes gesundes Pankreasgewebe zeigte sich dagegen kaum Mesothelin-positiv (Argani et al. 2001). Mesothelin wird physiologischerweise auch im Mesothel der Pleura, des Perikards und des

Peritoneums exprimiert (Chang et al. 1992a, Chang et al. 1992b). Dennoch erwies sich die klinische Anwendung Mesothelin-gerichteter CAR T-Zellen bisher als vergleichsweise sicher (Adusumilli et al. 2021, Beatty et al. 2014, Beatty et al. 2018, Haas et al. 2019). Mesothelin stellt daher ein attraktives Zielantigen für die CAR T-Zelltherapie verschiedener Tumore dar.

1.5 Limitationen der CAR T-Zelltherapie in soliden Tumoren

Während CAR T-Zellen in der Behandlung hämatologischer Krebserkrankungen herausragende Wirkung gezeigt haben, war ihre klinische Wirksamkeit in soliden Tumoren bisher größtenteils enttäuschend (Wagner et al. 2020). Auch in der Therapie des Pankreaskarzinoms war die Anwendung von CAR T-Zellen unterschiedlicher Spezifität bisher nur wenig erfolgreich (Beatty et al. 2014, Beatty et al. 2018, Feng et al. 2018, Haas et al. 2019, Liu et al. 2020b). Im Folgenden sollen daher die derzeit als wesentlich geltenden Limitationen der CAR T-Zelltherapie in soliden Tumoren näher erläutert werden.

1.5.1 Wahl des Zielantigens

Zurzeit sind CAR T-Zellen mehrheitlich gegen ein einziges Tumorantigen gerichtet. Tumore können jedoch Antigene unter dem Selektionsdruck des Immunsystems verlieren (Sharma et al. 2017). Die Selektion präexistenter CD19-negativer Tumorzellen als Folge der CD19-gerichteten CAR T-Zelltherapie wurde erst kürzlich experimentell nachgewiesen (Rabilloud et al. 2021). Wahrscheinlich wird das Hervortreten Antigen-negativer Tumorzellen als Folge einer zielgerichteten Therapie in soliden Tumoren durch die vergleichsweise heterogene Antigenexpression zusätzlich begünstigt (Wagner et al. 2020). Außerdem kann die fehlgeleitete CAR T-Zellaktivierung durch die Expression des Zielantigens in gesundem Gewebe zu dosislimitierenden (Lamers et al. 2013), seltener auch tödlichen (Morgan et al. 2010) Nebenwirkungen führen.

Die Wahl des geeigneten Zielantigens ist somit ein wesentliches Kriterium für die Effektivität und Sicherheit der CAR T-Zelltherapie (Morello et al. 2016, Wagner et al. 2020). Mutmaßlich kann der herausragende Erfolg der CD19-gerichteten CAR T-Zelltherapie daher zumindest partiell auf das bisher unvergleichlich günstige Expressionsprofil von CD19 zurückgeführt werden (Morello et al. 2016).

Dementsprechend wird die Suche nach ähnlich gut geeigneten Zielantigenen für die CAR T-Zelltherapie solider Tumore mit großem Aufwand betrieben (Martinez et al. 2019).

1.5.2 Tumorinfiltration der CAR T-Zellen

Weiterhin müssen CAR T-Zellen zur effektiven Therapie solider Tumore erst aus dem Gefäßsystem in die Tumorkläsion einwandern (Slaney et al. 2014). Einige Studien legen jedoch nahe, dass transferierte Tumor-spezifische T-Zellen dazu häufig nicht in der Lage sind (Bernhard et al. 2008, Kershaw et al. 2006, Srivastava et al. 2021). Folglich erwies sich die lokale Applikation von CAR T-Zellen im Vergleich zur systemischen Verabreichung in manchen präklinischen Tumormodellen als wirksamer (Brown et al. 2018, Katz et al. 2016). Die kombinierte intrakavitäre und intraventrikuläre Applikation von CAR T-Zellen zeigte zudem in der Therapie eines Glioblastompatienten eine für diese Indikation uncharakteristisch hohe Wirksamkeit (Brown et al. 2016).

Mutmaßlich ist die effektive Rekrutierung intravenös applizierter CAR T-Zellen in solide Tumore sowohl durch die potenziell inadäquate Chemokinrezeptorausstattung der CAR T-Zellen als auch durch das pathologisch veränderte Gefäßsystem mancher Tumore limitiert (Joyce et al. 2015, Slaney et al. 2014). Ein wesentliches Merkmal des Pankreaskarzinoms ist die als Desmoplasie bezeichnete Ablagerung dichter extrazellulärer Matrix in primären und metastatischen Tumorkläsionen (Whatcott et al. 2015). In humanen Lungentumoren wurde gezeigt, dass T-Zellen zwar das umliegende Tumorstroma infiltrieren, ihr Zugang zu den Tumorzellnestern jedoch durch die extrazelluläre Matrix limitiert wurde (Salmon et al. 2012). Das dichte Stroma mancher Tumore könnte demnach ein zusätzliches Hindernis für die adäquate Tumorinfiltration von T-Zellen darstellen (Salmon et al. 2012).

1.5.3 Immunsuppressive Tumorumgebung

Um immunvermittelte Schädigungen des Organismus durch langanhaltende inflammatorische Reaktionen zu verhindern, existieren zahlreiche physiologische Mechanismen, welche die Effektorfunktionen von T-Zellen dämpfen (Speiser et al. 2016). Tumorzellen bedienen sich dieser Mechanismen, um der Elimination durch das Immunsystem zu entgehen (Speiser et al. 2016). Die immunsuppressive Tumorumgebung wird sowohl von den Tumorzellen selbst als auch von anderen

Zelltypen im Tumorstroma geschaffen und aufrechterhalten (Joyce et al. 2015, Speiser et al. 2016). Beispielsweise führt die Expression von membranständigen und löslichen inhibitorischen Liganden durch unterschiedliche Zellpopulationen im Tumor zur Unterdrückung der antitumoralen Immunität (Speiser et al. 2016). Weiterhin müssen T-Zellen im Tumormilieu um essenzielle Nährstoffe konkurrieren (DePeaux et al. 2021, Speiser et al. 2016). Der negative Effekt des Nährstoffmangels auf die T-Zellfunktion wird durch ein unzureichendes Sauerstoffangebot und die Akkumulation immunsuppressiver Metabolite im Tumor weiter verschärft (DePeaux et al. 2021, Speiser et al. 2016). CAR T-Zellen müssen in der Lage sein unter diesen widrigen Umständen zu persistieren, zu proliferieren und ungeachtet der vielfältigen immunsuppressiven Einflüsse ihre Effektorfunktion auszuüben.

Für die erfolgreiche Anwendung der CAR T-Zelltherapie in soliden Tumoren ist es notwendig, sämtliche dieser Hindernisse in angemessener Weise zu adressieren. Im Folgenden soll aber, aufgrund der besonderen Relevanz für diese Arbeit, vor allem die Funktion von Chemokinen und deren Rolle in der Rekrutierung von CAR T-Zellen in solide Tumore thematisiert werden.

1.6 Chemokine und Chemokinrezeptoren

Chemokine sind eine Familie kleiner, größtenteils sezernierter Proteine, welche vorrangig für ihre Fähigkeit bekannt sind, die gerichtete Migration von Zellen entlang eines Konzentrationsgradienten zu vermitteln (Zlotnik et al. 2000). Dies geschieht durch die spezifische Interaktion mit ihren jeweiligen Chemokinrezeptoren (Zlotnik et al. 2000). Sie spielen in der Organdistribution von Immunzellen sowohl im homöostatischen als auch im inflammatorischen Kontext (Zlotnik et al. 2012), sowie in der Immunzellinfiltration von Tumoren (Chow et al. 2014, Nagarsheth et al. 2017) eine entscheidende Rolle.

Chemokine werden anhand der Anordnung konservierter Cystein-Reste an ihrem aminoterminalen Ende in C-, CC-, CXC- und CX₃C-Subfamilien unterteilt (Zlotnik et al. 2012). Analog dazu sind die G-Protein-gekoppelten Chemokinrezeptoren anhand der Subfamilienzugehörigkeit ihrer Liganden benannt (Zlotnik et al. 2012). Während viele Chemokine an mehrere Rezeptoren binden können, gibt es auch Rezeptoren, die mehrere Chemokine binden (Mantovani et al. 1999). Es wurde postuliert, dass diese

Promiskuität der Ligand-Rezeptor-Interaktion dem Chemokinsystem funktionelle Robustheit verleiht (Mantovani et al. 1999). Dennoch bedeutet das Vorhandensein mehrerer mit einem Rezeptor interagierender Chemokine nicht notwendigerweise deren funktionelle Redundanz (Zlotnik et al. 2012). Außerdem gibt es auch exklusive Ligand-Rezeptor-Paare, beispielsweise C-X-C-Motiv-Chemokinligand 16 (CXCL16) und C-X-C-Motiv-Chemokinrezeptor 6 (CXCR6).

Aufgrund ihrer Relevanz für die Immunzellmigration sind Chemokine und deren Rezeptoren zunehmend in den Fokus der Tumorummunologie gerückt (Chow et al. 2014, Nagarsheth et al. 2017). Zudem modulieren viele Chemokine in komplexer Weise das Verhalten der Tumorzellen und des Tumorstromas und können dabei sowohl protumorale als auch antitumorale Wirkung zeigen (Chow et al. 2014, Nagarsheth et al. 2017).

1.7 Chemokinrezeptoren in der CAR T-Zelltherapie solider Tumore

Die prognostische Relevanz der Immunzellinfiltration von Tumoren ist seit längerem bekannt (Clemente et al. 1996, Galon et al. 2006, Naito et al. 1998, Zhang et al. 2003). Damit CAR T-Zellen ihre Funktion ausüben können, müssen sie größtenteils in direktem Kontakt zu den Antigen-tragenden Tumorzellen stehen (Benmebarek et al. 2019). Daher scheint ein wesentliches Erfolgskriterium der CAR T-Zelltherapie in soliden Tumoren die ausreichende Infiltration der Tumore durch die CAR T-Zellen zu sein. Diese exprimieren aber häufig nicht die geeigneten Chemokinrezeptoren, um die Migration zu den im Tumormilieu vorhandenen Chemokinen zu vermitteln (Craddock et al. 2010, Di Stasi et al. 2009, Moon et al. 2011). Vor diesem Hintergrund wurden CAR T-Zellen in präklinischen Studien mit unterschiedlichen Chemokinrezeptoren (CCR2b, CCR4, CCR6, CCR8, CXCR1, CXCR2 und CXCR5) ausgestattet, um deren Tumordinfiltration und antitumorale Wirkung zu verbessern (Cadilha et al. 2021, Craddock et al. 2010, Di Stasi et al. 2009, Jin et al. 2021, Jin et al. 2019, Li et al. 2021, Liu et al. 2020a, Moon et al. 2011, Wang et al. 2021, Whilding et al. 2019).

Diese Arbeiten zeigen eindrucksvoll, welche herausragende Relevanz der Tumor-gerichteten Migrationsfähigkeit der CAR T-Zellen für die erfolgreiche Therapie solider Tumore zukommt. Allerdings wurde die Effektivität Chemokinrezeptor-tragender CAR T-Zellen bisher noch nicht in klinischen Studien untersucht. Die gezielte

Modifikation von CAR T-Zellen mit dem geeigneten Chemokinrezeptor setzt die genaue Kenntnis der im Tumormilieu vorhandenen Chemokine sowie deren jeweilige Bedeutung für die Immunzellinfiltration voraus und könnte zukünftig den Therapieerfolg von CAR T-Zellen in soliden Tumoren maßgeblich mitbestimmen.

1.8 Die CXCL16-CXCR6-Achse

CXCR6 wurde erstmals 1997 als Korezeptor für das Humane Immundefizienz-Virus beschrieben (Deng et al. 1997, Liao et al. 1997, Loetscher et al. 1997) und ist derzeit der einzige bekannte Chemokinrezeptor für CXCL16. CXCL16 ist neben dem strukturell ähnlichen CX₃CL1 das einzige Chemokin, welches sowohl in löslicher als auch in membrangebundener Form vorkommt (Matloubian et al. 2000, Wilbanks et al. 2001). Membrangebundenes CXCL16 wird an der Zelloberfläche durch *a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10* (ADAM10) gespalten und somit in lösliches CXCL16 überführt (Abel et al. 2004, Gough et al. 2004). Während lösliches CXCL16 durch die Interaktion mit CXCR6 zur G-Protein-vermittelten Chemotaxis der Rezeptor-tragenden Zellen führt (Matloubian et al. 2000), vermittelt transmembranes CXCL16 unabhängig von intrazellulären Signalwegen die Adhäsion CXCR6-tragender Zellen (Shimaoka et al. 2004).

CXCL16 und CXCR6 können unter verschiedenen Bedingungen sowohl von Immunzellen als auch von anderen Zelltypen exprimiert werden. CXCR6 wurde beispielsweise in *ex vivo* aktivierten T-Zellen (Liao et al. 1997, Loetscher et al. 1997, Matloubian et al. 2000) und in Tumor-infiltrierenden T-Zellen nachgewiesen (Di Pilato et al. 2021, Liao et al. 1997). CXCL16 wurde unter physiologischen Bedingungen in verschiedenen Organen (vor allem in Milz, Lymphknoten, Dünndarm, Niere, und Lunge) nachgewiesen (Matloubian et al. 2000). Es wurde postuliert, dass dieses Expressionsmuster vorrangig die Gewebsverteilung von CXCL16-positiven dendritischen Zellen, Monozyten und Makrophagen reflektiert (van der Voort et al. 2010). Tatsächlich bestätigte die Analyse von Einzelzell-Ribonukleinsäure (RNA)-Sequenzierdaten durch die Arbeitsgruppe die starke CXCL16-Expression dieser Zelltypen in humanen Geweben wie Lunge, Niere und Lymphknoten (Lesch et al. 2021).

Weiterhin konnte CXCL16 in einer Reihe verschiedener Tumorentitäten nachgewiesen werden (Darash-Yahana et al. 2009, Gooden et al. 2014, Hojo et al. 2007, Hu et al. 2014, Wente et al. 2008). Dabei exprimieren Tumorzellen neben CXCL16 häufig auch CXCR6 (Darash-Yahana et al. 2009, Hu et al. 2014, Wente et al. 2008). Demnach scheint die CXCL16-CXCR6-Achse in der Pathophysiologie vieler Krebserkrankungen eine Rolle zu spielen. Insgesamt ist die Funktion der CXCL16-CXCR6-Achse in der Tumorbiologie jedoch komplex und nicht zuletzt aufgrund unterschiedlicher Beobachtungen in verschiedenen Tumorentitäten nicht endgültig verstanden.

In humanen Pankreaskarzinomproben wurde sowohl CXCL16 als auch CXCR6 im Vergleich zu gesundem Pankreasgewebe verstärkt nachgewiesen (Wente et al. 2008). Dabei zeigten sich sowohl die Tumorzellen als auch das peritumorale, inflammatorisch veränderte Stroma immunhistochemisch positiv für CXCL16 und CXCR6 (Wente et al. 2008). *In vitro* führte die Stimulation von Pankreaskarzinomzelllinien mit CXCL16 zur gesteigerten Invasivität der Tumorzellen (Wente et al. 2008). Vor diesem Hintergrund scheint es möglich die CXCL16-CXCR6-Achse im Rahmen der CAR T-Zelltherapie des Pankreaskarzinoms therapeutisch zu nutzen.

1.9 Vorarbeiten der Arbeitsgruppe

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe unter anderem durch Stefanie Lesch und Viktoria Blumenberg wurde die *messenger RNA* (mRNA)-Expression der C-X-C Chemokine in zwei murinen Pankreaskarzinommodellen analysiert. Dabei wurde CXCL16 als vergleichsweise stark exprimiertes Chemokin in beiden Tumormodellen identifiziert. Weiterhin wurde die CXCL16-Expression auf Proteinebenen in verschiedenen Geweben von tumortragenden Mäusen bestimmt. Dabei zeigte das Tumorgewebe im Vergleich zu gesundem Gewebe die stärkste CXCL16-Expression. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden murine Tumor-spezifische T-Zellen mit dem Rezeptor CXCR6 ausgestattet und deren antitumorale Funktion untersucht. Die CXCR6-Überexpression in Tumor-spezifischen T-Zellen des OT-1 Mausmodells führte *in vitro* zur verbesserten Aktivierung und Zytotoxizität der T-Zellen gegenüber Antigen-tragenden Tumorzellen. Außerdem war die CXCL16-gerichtete Migrationsfähigkeit der CXCR6-überexprimierenden T-Zellen gesteigert. Im murinen Pankreaskarzinommodell führte die Überexpression von CXCR6 in Tumor-spezifischen

T-Zellen zu deren Akkumulation im Tumorgewebe und folglich zur verbesserten Tumorkontrolle.

1.10 Zielsetzung der Arbeit

Basierend auf dem *proof-of-concept* im syngenesis Mausmodell, sollte nun die funktionelle Relevanz der CXCR6-Überexpression in humanen T-Zellen evaluiert werden. Um die Tumorspezifität der T-Zellen zu gewährleisten, sollte zudem ein CAR gegen das bekannte Zielantigen Mesothelin etabliert werden. Dementsprechend wurden im Rahmen dieser Arbeit insbesondere folgende Aufgabenstellungen bearbeitet:

1. Etablierung eines humanen anti-Mesothelin CAR und funktionelle Charakterisierung der CAR T-Zellen *in vitro*
2. Einfluss der CXCR6-Überexpression auf die *in vitro* Funktionalität der CAR T-Zellen
3. Einfluss der CXCR6-Überexpression auf die *in vivo* Funktionalität der CAR T-Zellen im xenogenen Pankreaskarzinommodell

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Reagenzien

Tabelle 1: Technische Geräte

Gerätetyp	Gerätename	Hersteller	Hauptsitz
Desoxyribonukleinsäure (DNA) Gel Imager	Alpha Imager HP	Alpha Innotech	Kasendorf, DE
Durchflusszytometer	FACS Canto II	BD Biosciences	Franklin Lakes, US
Durchflusszytometer	FACS LSRFortessa	BD Biosciences	Franklin Lakes, US
Echtzeit-Zellanalyse	RTCA iCelligence	ACEA Biosciences	San Diego, US
Elektrophorese Stromquelle	EC 300 XL	Thermo Fisher Scientific	Waltham, US
Gel Transilluminator	LKB 2011 Macrovue Transilluminator	LKB Instruments	Mount Waverly, AU
Gelelektrophorese Kammer	Owl EasyCast B1	Thermo Fisher Scientific	Waltham, US
Gradientenkühlbehälter	Mr. Frosty	Nalgene	Rochester, US
Lichtmikroskop	Axiovert 40C	Zeiss	Jena, DE
Mikroplatten-Reader	Mithras LB 940	Berthold Technologies	Bad Wildbad, DE
Mikrozentrifuge	Fresco 17 Zentrifuge	Heraeus	Hanau, DE
Pipetboy	Pipetus	Hirschmann Laborgeräte	Eberstadt, DE
Pipette 1-Kanal (0,1-2,5 µl, 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)	Research plus	Eppendorf	Hamburg, DE
Pipette 8-Kanal (0,5-10 µl, 10-100 µl)	Research plus	Eppendorf	Hamburg, DE
Präzisionswaage	Kern EMB 2000-2	KERN & SOHN	Balingen-Frommern, DE
Schüttler	Shaker DOS 10L	Neolab Migge	Heidelberg, DE
Spektralphotometer	Nanodrop 2000c	Thermo Fisher Scientific	Waltham, US
Thermoshaker	Digitales Trockenbad zum Kühlen und Erwärmen	Thermo Fisher Scientific	Waltham, US
Thermoshaker	Innova 44	New Brunswick Scientific	Edison, US
Thermostyler	Gene Pro	Bioer Technology	Hangzhou, CN
Thermostyler	Gene Touch	Bioer Technology	Hangzhou, CN
Tischzentrifuge	Sprout	Heathrow Scientific	Vernon Hills, US
Vakuum Pumpe	Welch Vacuum Pump	Garden Denver	Monroe, US
Vortex Mixer	Vortex Genie 2	Scientific Industries	Bohemia, US
Zählkammer	Neubauer	Paul Marienfeld	Lauda-Königshofen, DE
Zellkultur Inkubator	BBD 6220	Heraeus	Hanau, DE
Zellkultur Inkubator	HERAcell 240i	Heraeus	Hanau, DE
Zellkultur Werkbank	HERAsafe	Heraeus	Hanau, DE
Zellkultur Werkbank	HERAsafe KS	Heraeus	Hanau, DE

Zellseparator	QuadroMACS	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, DE
Zentrifuge	Multifuge 3 L-R	Heraeus	Hanau, DE
Zentrifuge	Multifuge 4 KR	Heraeus	Hanau, DE
Zentrifuge	Multifuge X3R	Heraeus	Hanau, DE
Zentrifuge	Rotina 420R	Hettich	Tuttlingen, DE

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller	Hauptsitz
Costar Assay Platte (96-Well)	Corning	New York, US
Durchflusszytometrie Röhrchen (5 ml)	Falcon, Corning	New York, US
Eppendorf Reaktionsgefäß (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt	Nümbrecht, DE
iCELLigence L8 E-Platten (8-Well)	ACEA Biosciences	San Diego, US
Kryoröhrchen (2 ml)	Ratiolab	Dreieich, DE
LS Säule	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, DE
Millex-HA Filter (0,45 µm)	Merck	Darmstadt, DE
Minisart NML Plus Filter (0,2 µm)	Sartorius	Göttingen, DE
Parafilm	Bemis	Neenah, US
Polymerase Kettenreaktion (PCR) Tube (0,2 ml)	Sarstedt	Nümbrecht, DE
Petrischalen Cellstar	Greiner Bio-One	Kremsmünster, AT
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Corning	New York, US
Transwell Migrations Platte (96-Well, 3 µm Poren)	Corning	New York, US
Zellkulturflaschen (50 ml, 250 ml, 550 ml)	Corning	New York, US
Zellkulturplatten (6- bis 96-Well)	Corning	New York, US
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One	Kremsmünster, AT

Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien

Reagenz	Hersteller	Hauptsitz
Albumin Fraktion V	Carl Roth	Karlsruhe, DE
Ampicillin	Sigma Aldrich	St. Louis, US
BD FACS Clean	BD Biosciences	Franklin Lake, US
BD FACS Flow	BD Biosciences	Franklin Lake, US
Biocoll Trennlösung (1,077 g/ml)	Biochrom	Berlin, DE
Calciumchlorid	Carl Roth	Karlsruhe, DE
CD3 Microbeads Human	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, DE
Count Bright Absolute Counting Beads	Life Technologies	Carlsbad, US
CutSmart Puffer	New England Biolabs	Ipswich, US
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth	Karlsruhe, DE
Dithiothreitol 1M	Thermo Fisher Scientific	Waltham, US
DNA Loading Dye (6 x)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, US
Desoxynukleosidtriphosphat (dNTP) Lösung	New England Biolabs	Ipswich, US

Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28	Thermo Fisher Scientific	Waltham, US
Ethanol Absolut	VWR International	Radnor, US
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich	St. Louis, US
Gel Loading Dye Purple (6 x)	New England Biolabs	Ipswich, US
Heparin-Natrium (25000 IE/5 ml)	Ratiopharm	Ulm, DE
Intrazellulärer Fixierungspuffer	eBioscience	Hatfield, UK
Isofluran	CP Pharma	Burgdorf, DE
Isopropanol	Carl Roth	Karlsruhe, DE
Isotone Kochsalzlösung	Baxter	Deerfield, US
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich	St. Louis, US
Luria/Miller (LB) Medium	Carl Roth	Karlsruhe, DE
Lipofectamin 2000	Invitrogen	Carlsbad, US
Low electroendosmosis (LE) Agarose	Biozym Scientific	Hessisch-Oldendorf, DE
LB Agar	Carl Roth	Karlsruhe, DE
Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Sigma-Aldrich	St. Louis, US
Polybren	Sigma Aldrich	St. Louis, US
Q5 High-fidelity (HF) DNA-Polymerase	New England Biolabs	Ipswich, US
Q5 Reaktionspuffer (5 x)	New England Biolabs	Ipswich, US
Rekombinantes humanes CXCL16	Peptotech	Hamburg, DE
Restriktionsenzym EcoRI-HF	New England Biolabs	Ipswich, US
Restriktionsenzym NotI-HF	New England Biolabs	Ipswich, US
RetroNectin	TaKaRa	Kyoto, JP
Rotiphorese Tris-Acetat EDTA (TAE) Puffer (50 x)	Carl Roth	Karlsruhe, DE
Schwefelsäure (1 M)	Carl Roth	Karlsruhe, DE
Serva DNA Stain Clear G	SERVA Electrophoresis	Heidelberg, DE
T4 DNA-Ligase Puffer (10 x)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, US
T4 Ligase Enzym	Thermo Fisher Scientific	Waltham, US
TriDye 2-Log DNA Ladder	New England Biolabs	Ipswich, US
Trypanblau Lösung	Sigma-Aldrich	St. Louis, US
Tween 20	Carl Roth	Karlsruhe, DE
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	St. Louis, US

Tabelle 4: Medien und Zusätze für die Zellkultur

Reagenz	Hersteller	Hauptsitz
Blasticidin	InvivoGen	San Diego, US
Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)	Lonza	Basel, CH
Phosphate-buffered saline (PBS)	Lonza	Basel, CH
Nicht-esentielle Aminosäurenlösung (NEAA)	Sigma-Aldrich	St. Louis, US
Fetales Kälberserum (FBS)	Gibco Life Technologies	Carlsbad, US
HEPES-Lösung (1 M)	Sigma-Aldrich	St. Louis, US
Humanes Serum	Sigma-Aldrich	St. Louis, US

L-Glutamin (200 mM)	Sigma-Aldrich	St. Louis, US
Natrium-Pyruvat Lösung (100 mM)	Sigma-Aldrich	St. Louis, US
Opti-Minimal essential medium (MEM)	Gibco Life Technologies	Carlsbad, US
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich	St. Louis, US
Puromycin	InvivoGen	San Diego, US
Rekombinantes humanes Interleukin (IL)-15	Peprotech	Hamburg, DE
Rekombinantes humanes IL-2	Peprotech	Hamburg, DE
Trypsin	Lonza	Basel, CH
Very low endotoxin (VLE) Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640	Biochrom	Berlin, DE

Tabelle 5: Kits

Kit	Hersteller	Hauptsitz
BD OptEIA Human IFN- γ ELISA Set	BD Bioscience	Franklin Lakes, US
GeneJet Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific	Waltham, US
Human CXCL16 DuoSet ELISA	R&D Systems	Minneapolis, US
InviTrap Spin Cell RNA Mini Kit	Invitec Molecular	Berlin, DE
Mix2Seq Kit	Eurofins Genomics	Ebersberg, DE
MycoAlert Mycoplasma Detection Kit	Lonza	Basel, CH
PureLink Quick Gel Extraction Kit	Thermo Fisher Scientific	Waltham, US
PureLink Quick PCR Purification Kit	Thermo Fisher Scientific	Waltham, US
PureYield Plasmid Maxiprep System	Promega	Madison, US
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific	Waltham, US
ZymoPURE II Plasmid Maxiprep Kit	Zymo Research	Irvine, US

Tabelle 6: Antikörper und Durchflusszytometer Reagenzien

Spezifität	Klon	Hersteller	Hauptsitz
anti-c-myc (FITC)	SH1-26E7.1.3	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, DE
Anti-Hu CD28 Functional Grade	CD28.2	eBioscience	San Diego, US
anti-human CD3 (APC)	UCHT1	Biolegend	San Diego, US
anti-human CD3 (FITC)	UCHT1	Biolegend	San Diego, US
Anti-Human CD3 Functional Grade	HIT3a	eBioscience	San Diego, US
anti-human CXCR6 (APC)	K041E5	Biolegend	San Diego, US
anti-human Mesothelin (PE)	420411	R&D Systems	Minneapolis, US
Isotyp-Kontrolle Maus IgG1 κ (FITC)	MOPC-21	Biolegend	San Diego, US
Isotyp-Kontrolle Maus IgG2 α (APC)	MOPC-173	Biolegend	San Diego, US
Isotyp-Kontrolle Ratte IgG2a (PE)	54447	R&D Systems	Minneapolis, US

Tabelle 7: Puffer

Puffer	Zusammensetzung
ELISA Waschpuffer	191 g PBS
	10 ml Tween
	20 l doppelt-destilliertes Wasser (ddH ₂ O)
Transfektionspuffer	1,6 g NaCl
	1 g HEPES
	74 mg KCl
	50 mg Na ₂ PO ₄
	100 ml ddH ₂ O

Tabelle 8: Software

Software	Hersteller	Hauptsitz
BD FACSDiva	BD Biosciences	Franklin Lakes, US
EndNote	Clarivate	Philadelphia, US
FlowJo	FlowJo	Ashland, US
GraphPad Prism	GraphPad Software	San Diego, US
Microsoft 365 (Word, Excel, PowerPoint)	Microsoft	Redmond, US
Mikrowin	Mikrotek Laborsysteme	Overath, DE
Nanodrop 2000c	Thermo Fisher Scientific	Waltham, US
NEB Tm Calculator	New England Biolabs	Ipswich, US
NEBcloner	New England Biolabs	Ipswich, US
RTCA Software	ACEA Biosciences	San Diego, US
Snapgene	GSL Biotech	San Diego, US

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Retrovirale Vektoren

Zur Expression der Rezeptor-Konstrukte in primären humanen T-Zellen wurde der freundlicherweise von Christopher Baum (Hannover, DE) zur Verfügung gestellte retrovirale Vektor pMP71 verwendet (Engels et al. 2003). Zur Expression von humanem Mesothelin und humanem CXCL16 in SUIT-2 Tumorzellen wurde der retrovirale Vektor pMXs verwendet (Kitamura et al. 2003). Beide Vektor-Plasmide tragen ein Ampicillin-Resistenzgen um die Selektion transformierter Bakterien zu ermöglichen.

2.2.2 *Overlap extension* PCR und Primer Design

Die einzelnen Sequenzabschnitte des humanen anti-Mesothelin-CAR-Konstrukts wurden per *overlap extension* PCR (Heckman et al. 2007) zum vollständigen Rezeptor zusammengefügt. Dabei existierten die Sequenzabschnitte für die VL-Domäne, den aus den Aminosäuren Glycin und Serin bestehenden $(G_4S)_4$ -Linker (Krebber et al. 1997) und die VH-Domäne dank Vorarbeiten durch die Arbeitsgruppe bereits in Form von Plasmid-DNA. Für die Generierung der Sequenzabschnitte des Signalpeptids (UniProtKB – P01732), der Spacer-Domäne (UniProtKB – P01732), der Transmembran-Domäne (UniProtKB – P10747), der kostimulatorischen Domäne (UniProtKB – P10747) und der CD3 ζ -Kette (UniProtKB – P20963) wurde zuerst aus primären humanen T-Zellen RNA isoliert. Diese RNA wurde anschließend in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben, welche wiederum als Template für die nachfolgenden Schritte diente. Für die Generation des CAR-CXCR6-Konstrukts existierten ebenfalls aufgrund von Vorarbeiten durch die Arbeitsgruppe bereits Plasmide mit der F2A-Sequenz (Szymczak et al. 2004) und mit der humanen CXCR6-Sequenz (UniProtKB – O00574).

Die für die *overlap extension* PCR verwendeten Primer wurden bei Metabion (Planegg, DE) bestellt und mithilfe von Snapgene und des NEB Tm Calculators anhand der folgenden Kriterien entworfen:

1. Die Primerlänge sollte 15 bis 35 Nukleotide betragen
2. Primer dürfen nur an einer Stelle komplementär zum Template sein
3. Primer dürfen nicht komplementär zu gleichzeitig verwendeten Primern sein
4. Die Annealing-Temperatur der Primer sollte zwischen 65 und 72 °C liegen

Als DNA-Polymerase diente dabei die Q5 HF DNA-Polymerase. Bei deren Verwendung wurden die Angaben des Herstellers befolgt. Die entstehenden DNA-Amplicons wurden anschließend per Agarose-Gel-Elektrophorese aufgetrennt. Das korrekte Amplicon wurde anhand der Länge identifiziert und mittels PureLink Quick Gel Extraction Kit extrahiert und entweder erneut als Template für die *overlap extension* PCR verwendet oder in den folgenden Schritten in den jeweiligen Zielvektor eingefügt.

2.2.3 Restriktion und Ligation

Als Restriktionsenzyme wurden in dieser Arbeit NotI-HF und EcoRI-HF gemeinsam mit CutSmart Puffer in einem *double-digest*-Ansatz gemäß Herstellerangaben verwendet. Anschließend wurden die Restriktionsenzyme für 20 Minuten bei 65 °C hitzeinaktiviert.

Das korrekte, durch Restriktionsenzyme zerschnittene DNA-Fragment, wurde für die Ligation per Agarose-Gel-Elektrophorese oder mittels PureLink Quick PCR Purification Kit isoliert. Mittels *sticky-end*-Ligation durch T4 Ligase wurde das gewünschte DNA-Fragment nach Herstellerangaben in einen ebenfalls durch NotI-HF und EcoRI-HF zerschnittenen retroviralen Vektor eingefügt.

2.2.4 Plasmid-Amplifikation

Zur Amplifikation von Plasmiden wurden kompetente Escherichia coli Bakterien (Stamm Mach1 oder DH5 α) per Hitzeschock (42 °C für 42 Sekunden) transformiert. Die transformierten Bakterien wurden darauffolgend entweder auf LB-Agar-Platten zu Einzelkolonien ausgestrichen (bei erstmaliger Generation neuer Konstrukte) oder direkt in flüssigem LB-Medium kultiviert (bei Retransformation bereits sequenzierter Plasmide) und anhand der Plasmid-vermittelten Ampicillin Resistenz selektiert (Ampicillin Zielkonzentration: 100 μ g/ml). Zufällig ausgewählte Einzelkolonien wurden nachfolgend ebenfalls in flüssiges LB-Medium überführt und kultiviert.

Zur Aufreinigung der Plasmide aus flüssiger Bakterienkultur wurde in dieser Arbeit entweder das GeneJet Plasmid Miniprep Kit (bei erstmaliger Generation neuer Konstrukte) oder (zur Gewinnung größerer Mengen an Plasmid) das PureYield Plasmid Maxiprep System beziehungsweise das ZymoPURE II Plasmid Maxiprep Kit verwendet. Es wurden die Anweisungen der Hersteller befolgt. Die DNA-Konzentration wurde im Anschluss mittels Nanodrop2000c bestimmt und die Plasmide bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.5 DNA-Sequenzierung

Bei erstmaliger Generation neuer Plasmide wurde in der Regel eine Miniprep oder die erste Maxiprep sequenziert, um sicherzustellen, dass sich keine Mutationen in der DNA-Sequenz befinden. Dazu wurde das Mix2seq Kit von Eurofins Genomics gemäß Herstellerangaben verwendet.

2.2.6 Agarose-Gel-Elektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde die Agarose-Gel-Elektrophorese verwendet. Dazu wurde LE-Agarose in TAE-Puffer aufgelöst (0,5 bis 1 %), in der Mikrowelle erhitzt und mit der vom Hersteller empfohlenen Menge an Serva DNA Stain Clear G vermischt. Das abgekühlte, noch flüssige Gel wurde dann zum Aushärten in eine entsprechende Form gegossen. DNA wurde mit DNA Loading Dye auf das Gel aufgetragen und eine Spannung von 100 mV für 30 bis 60 Minuten angelegt. Als Indikator für die Größe der DNA-Fragmente diente TriDye 2-Log DNA Ladder. Die DNA-Banden wurden anschließend mittels eines Gel Transilluminators beziehungsweise eines DNA-Gel Imagers visualisiert.

2.2.7 RNA-Extraktion aus primären humanen T-Zellen

Für die RNA-Extraktion aus primären humanen T-Zellen wurde das InviTrap Spin Cell RNA Mini Kit nach Herstellerangaben verwendet. Die isolierte RNA wurde anschließend entweder in cDNA umgeschrieben oder bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.8 Reverse Transkription

Um die aus T-Zellen isolierte RNA in cDNA umzuschreiben, wurde das RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit nach Herstellerangaben verwendet. Die cDNA diente anschließend als Template für die *overlap extension* PCR oder wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

2.3 Zellkulturmethoden

2.3.1 Allgemeine Zellkulturmethoden

Alle Zellen wurden im Zellkulturinkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert und regelmäßig per PCR oder mit dem MycoAlert Mycoplasma Detection Kit auf Mykoplasmen-Infektion getestet. Zellen wurden regelmäßig bei 80 % Konfluenz passagiert und bei allen Experimenten wurde auf eine möglichst niedrige Passagenzahl der Zellen geachtet. Die Zellzahl wurde nach Verdünnung in Trypan-Blau mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Die Pankreaskarzinomzelllinie SUIT-2 (Iwamura et al. 1987) wurde der Arbeitsgruppe freundlicherweise von Kirsten Lauber (München, DE) zur Verfügung gestellt und in DMEM³⁺ (DMEM supplementiert mit 10 % FBS, 2 mmol/l L-Glutamin, 100 IU/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin) kultiviert. Die Verpackungszelllinien 293Vec-RD114 und 293Vec-Galv (Ghani et al. 2009) wurden der Arbeitsgruppe freundlicherweise von Manuel Caruso (Québec, CA) zur Verfügung gestellt und in DMEM⁴⁺ (DMEM supplementiert mit 10 % FBS, 4 mmol/l L-Glutamin, 100 IU/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin) kultiviert. Die von Cell Biolabs (San Diego, US) erworbene Verpackungszelllinie Platinum A (Kitamura et al. 2003) wurde in DMEM⁵⁺ (DMEM supplementiert mit 10 % FBS, 2 mmol/l L-Glutamin, 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 1 µg/ml Puromycin und 10 µg/ml Blasticidin) kultiviert. Primäre humane T-Zellen wurden in humanem T-Zellmedium (VLE RPMI 1640 supplementiert mit 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mmol/l L-Glutamin, 2,5 % humanem Serum, 1 mmol/l Natrium-Pyruvat und 1 x nicht-essentielle Aminosäurenlösung) expandiert.

Zum Einfrieren von Zellen wurden diese in 10 % DMSO und 90 % hitzeinaktiviertem FBS resuspendiert und die Kryo-Röhrchen mittels Mr. Frosty langsam auf -80 °C gekühlt. Gegebenenfalls wurden diese anschließend in flüssigem Stickstoff langzeitgelagert. Frisch aufgetaute Zellen wurden resuspendiert, einmalig gewaschen und in frischem Medium in Zellkulturflaschen kultiviert.

2.3.2 Generation neuer Zelllinien

2.3.2.1 SUIT-2-MSLN und SUIT-2-MSLN-CXCL16

Die Zelllinie SUIT-2 wurde mittels der retroviralen Verpackungszelllinie Platinum A mit humanem Mesothelin (UniProtKB - Q13421) transduziert, um die Zelllinie SUIT-2-MSLN zu generieren. Dabei wurden 2×10^5 SUIT-2 in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen in 1,5 ml gefiltertem (Millex-HA Filter 0,45 µm) Virusüberstand der Platinum A Zelllinie resuspendiert und anschließend mit Polybren (Zielkonzentration: 8 µg/ml) bei 800 G und 4 °C für 33 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen über Nacht in DMEM³⁺ kultiviert. Die Zentrifugation mit Virusüberstand wurde einmal innerhalb von 24 Stunden wiederholt und die transduzierten SUIT-2-MSLN anschließend in Kultur genommen.

Um die Zelllinie SUI-2-MSLN-CXCL16 zu generieren, wurde die Zelllinie SUI-2-MSLN zusätzlich mit humanem CXCL16 (UniProtKB - Q9H2A7) transduziert. Im Anschluss daran wurden durch serielle Verdünnung in 96-Well Platten Einzelzellklone generiert und diese per Durchflusszytometrie auf ihre Mesothelin- und per *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) auf ihre CXCL16-Expression getestet. Die verwendeten Vektor-Plasmide mit humanem Mesothelin und humanem CXCL16 wurden bereits in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe generiert und unverändert übernommen.

2.3.2.2 293Vec-RD114-basierte Virus-produzierende Zelllinie

Für diese Arbeit wurden stabile Retrovirus-produzierende Zellen basierend auf der Zelllinie 293Vec-RD114 generiert (Ghani et al. 2009). Dazu wurden $0,8 \times 10^6$ 293Vec-Galv Zellen in 3 ml DMEM⁴⁺ in 6-Well Platten ausgesät und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurden 3 µg der gewünschten Plasmid-DNA (mit dem jeweiligen Rezeptorkonstrukt) in einem 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß mit 750 µl OptiMEM vermischt. In einem zweiten Reaktionsgefäß wurden 12 µl Lipofectamin 2000 in 750 µl OptiMEM gelöst. Nach gründlichem Vortexen beider Reaktionsgefäße wurde das Plasmid-OptiMEM-Gemisch tropfenweise in das Lipofectamin-OptiMEM-Gemisch überführt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur ruhen gelassen. Nach Austausch des Mediums der am Vortag ausgesäten 293Vec-Galv Zellen durch 1,5 ml OptiMEM wurden 1,5 ml des Plasmid-Lipofectamin-OptiMEM-Gemischs vorsichtig auf die Zellen getropft und diese für 4 Stunden im Inkubator kultiviert. Danach wurde das Medium durch 3 ml frisches DMEM⁴⁺ ersetzt und die Zellen für 48 Stunden kultiviert. Am darauffolgenden Tag wurden $0,8 \times 10^6$ 293Vec-RD114 Zellen in 6-Well Platten in DMEM⁴⁺ ausgesät und diese über Nacht kultiviert. Nach 48 Stunden wurde der Virus-Überstand der 293Vec-Galv vorsichtig abgenommen, durch einen 0,45 µm Filter gepresst, mit Polybren vermischt (8 µg/ml Zielkonzentration) und vorsichtig auf die am Vortag plattierten 293Vec-RD114 getropft. Nach 24 Stunden im Inkubator wurden Einzelzellklone der nun transduzierten 293Vec-RD114 Zellen generiert. Diese wurden anschließend indirekt anhand der jeweils erreichbaren Transduktionseffizienz von primären humanen T-Zellen auf ihre Fähigkeit zur Virusproduktion untersucht. Aufgrund von Vorarbeiten der Arbeitsgruppe existierten zudem bereits *Green fluorescent protein* (GFP) Retrovirus-produzierende 293Vec-RD114 Zellen.

2.3.3 Virusproduktion mittels Platinum A oder 293Vec-RD114

Für die Produktion der gewünschten Retroviren mittels Platinum A Verpackungszellen (Kitamura et al. 2003) wurden diese in unterschiedlicher Zelldichte (0,6, 0,8 und 1×10^6 Zellen pro Well) in 6-Well Platten in 3 ml DMEM³⁺ ausgesät und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurden Wells mit 80 % Konfluenz zur Transfektion mit den gewünschten Plasmiden ausgewählt. Dazu wurden in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen 18 µg Plasmid-DNA mit 15 µl CaCl₂ (2,5 M) mit doppelt-destilliertem Wasser in 150 µl absolutem Volumen vermischt. Danach wurde dieses Gemisch tropfenweise, unter kontinuierlichem Vortexen zu 150 µl Transfektionspuffer (siehe Tabelle 7) in ein zweites 15 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur aufbewahrt. 300 µl dieses Transfektionsgemischs wurden danach auf die Platinum A Zellen geträufelt und diese für 6 Stunden im Inkubator kultiviert. Danach wurde vorsichtig das Medium gegen 3 ml frisches DMEM³⁺ ausgetauscht und die transfizierten Platinum A Zellen für 48 Stunden zur Virusproduktion kultiviert.

Für die Produktion der gewünschten Retroviren mittels 293Vec-RD114 Verpackungszellen (Ghani et al. 2009), wurden, nach erfolgter Generation der Verpackungszellen mit dem jeweiligen Konstrukt, $0,8 \times 10^6$ Zellen in 6-Well Platten in 3 ml DMEM⁴⁺ pro Well ausgesät und für 24 Stunden zur Virusproduktion kultiviert.

2.3.4 Transduktion primärer humaner T-Zellen

Für die T-Zelltransduktion wurden 6-Well Platten mit anti-human CD3 und anti-human CD28 Antikörpern in 1,2 ml PBS pro Well (Zielkonzentration 2 µg/ml) beschichtet und über Nacht bei 4 °C in Parafilm eingewickelt aufbewahrt. Am nächsten Tag wurden 50 bis 100 ml venöses Blut von freiwilligen Spendern in einer heparinisierten Spritze (2500 IE pro 50 ml Spritze) gewonnen. Dieses Blut wurde anschließend mit isotoner Kochsalzlösung verdünnt (25 ml Blut mit 20 ml Kochsalz). In 50 ml Zentrifugerröhrchen wurden 15 ml Biocoll Separating Solution (1,077 g/ml) gegeben und 30 ml verdünntes Blut vorsichtig mittels serologischer Pipetten über der Biocoll Lösung aufgeschichtet. Diese Röhrchen wurden 20 Minuten bei 1000 G und Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert. Danach wurden die *peripheral blood mononuclear cells* (PBMC) über der Biocoll Separating Solution mittels serologischer Pipetten abgenommen und zweimalig mit isotoner Kochsalzlösung gewaschen. Danach wurden CD3⁺ T-Zellen mithilfe von

CD3 Microbeads nach Herstellerangaben aus den PBMC isoliert und mit PBS gewaschen. Die am Vortag vorbereiteten anti-human CD3- und anti-human CD28-beschichteten 6-Well Platten wurde ebenfalls mit PBS gewaschen. Humanes T-Zellmedium wurde mit rekombinantem humanem IL-2 (20 ng/ml Zielkonzentration), IL-15 (5 ng/ml Zielkonzentration) und β -Mercaptoethanol (50 μ M Zielkonzentration) supplementiert. Anschließend wurden pro 6-Well 4×10^6 T-Zellen in 4 ml supplementiertem T-Zellmedium ausgesät und nach Zugabe von 33 μ l Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 pro Well für 48 Stunden im Inkubator kultiviert. 24 Stunden nach Isolation der T-Zellen wurden 24-Well Platten mit 400 μ l RetroNectin in PBS (Zielkonzentration 12,5 ng/ μ l) beschichtet und die Platten über Nacht bei 4 °C, in Parafilm eingewickelt aufbewahrt. Am nächsten Tag wurden die 24-Well Platten nach Entfernung des RetroNectins für 30 Minuten mit 500 μ l steril-filtriertem Blocking Puffer (2 % BSA in PBS) bei Raumtemperatur geblockt und anschließend einmalig mit 1 ml Washing Puffer (25 mM HEPES in PBS) gewaschen. Zwischenzeitlich wurde Virus-Überstand von 24 Stunden zuvor ausgesäten 293Vec-RD114 Zellen gewonnen und durch einen 0,45 μ m Filter gepresst. Um erneut Virus produzieren zu können wurden die 293Vec-RD114 Zellen in 3 ml frischem DMEM⁴⁺ für weitere 24 Stunden in der 6-Well Platte kultiviert, und erst danach verworfen. Anschließend wurde pro Well 1 ml des filtrierten, zellfreien Virusüberstands bei 3000 G für 90 Minuten und 32 °C auf der RetroNectin-beschichteten 24-Well Platte konzentriert. Anschließend wurde das überschüssige Medium entfernt und je 10^6 humane T-Zellen pro Well in 1 ml supplementiertem T-Zellmedium für 24 Stunden in der Virus-beschichteten 24-Well Platte kultiviert. Um untransduzierte (UT) Kontroll-T-Zellen zu erhalten, wurden die T-Zellen in RetroNectin- und Virus-freien Wells kultiviert. Am darauffolgenden Tag wurden die T-Zellen auf eine neue, ebenso mit Virus beschichtete 24-Well Platte (Vorgehen wie oben beschrieben) transferiert und erneut für 24 Stunden inkubiert. Gegebenenfalls wurde auf diese zweite Transduktionrunde verzichtet. Am nächsten Tag wurden die nun transduzierten T-Zellen per Durchflusszytometrie auf die Expression des jeweiligen Rezeptors untersucht und anschließend in supplementiertem T-Zellmedium in 6-Well Platten in einer Konzentration von 10^6 T-Zellen pro ml kultiviert, während das T-Zellmedium alle 48 Stunden erneuert wurde.

2.3.5 Durchflusszytometrie

Für die durchflusszytometrischen Methoden dieser Arbeit wurden die Antikörper und Reagenzien aus Tabelle 6 nach Herstellerangaben verwendet. Die Geräte FACS Canto II und FACSLSR Fortessa wurden für alle Durchflusszytometrie-basierten Experimente verwendet und die Daten wurden mittels der Software Flowjo ausgewertet. Als Gatingstrategie wurde bei allen durchflusszytometrischen Experimenten immer zuerst ein Morphologiegate und Einzelzellgate gesetzt, erst danach erfolgte die Analyse der Zellen anhand der jeweilig gefärbten Oberflächenmarker.

2.4 Zellbasierte Assays

2.4.1 Migrations-Assay

Die Migration von T-Zellen wurde in Anlehnung an eine frühere Publikation der Arbeitsgruppe (Rapp et al. 2016) in einem Transwell-Migrations-Assay untersucht. Dazu wurden $0,5$ bis 1×10^6 transduzierte oder untransduzierte T-Zellen in $70 \mu\text{l}$ Medium in die oberen Wells der Transwell-Migrations-Platte pipettiert. Die unteren Wells enthielten entweder rekombinantes humanes CXCL16 (Zielkonzentration 50 ng/ml) oder 5×10^4 SUIT-2-MSLN-CXCL16 Zellen in $225 \mu\text{l}$ Medium. Die Tumorzellen wurden dazu 12 bis 24 Stunden vor Zugabe der T-Zellen ausplattiert. Als Negativkontrolle wurde Medium ohne CXCL16 und ohne Tumorzellen verwendet. Nach 4 Stunden im Inkubator wurde die Anzahl der migrierten T-Zellen im unteren Well durchflusszytometrisch mithilfe von Count Bright Absolute Counting Beads bestimmt. Bei Migrationsversuchen zu Tumorzellen wurden transduzierte T-Zellen mit anti-c-myc (FITC) gefärbt, während untransduzierte T-Zellen mit anti-CD3 (FITC) gefärbt wurden. Bei Migrationsversuchen zu rekombinanten humanen CXCL16 wurde auf die CD3-Färbung der untransduzierten T-Zellen verzichtet. Im Falle von transduzierten T-Zellen wurde jeweils die absolute Anzahl der transduzierten Einzelzellen im unteren Well bestimmt, bei untransduzierten T-Zellen wurde die absolute Anzahl der Einzelzellen bestimmt.

2.4.2 Zytotoxizitäts-Assay

Mithilfe des iCelligence Systems kann die Fähigkeit von T-Zellen zur Abtötung von adhärennten Tumorzellen untersucht werden (Peper et al. 2014, Türker Şener et al.

2017). Dabei steigt der Zellindex in Abhängigkeit von der Anzahl adhärenter Tumorzellen (Peper et al. 2014, Türker Şener et al. 2017). Für die Zytotoxizitätsversuche dieser Arbeit wurden 5×10^4 Tumorzellen (SUIT-2-MSLN oder SUIT-2-MSLN-CXCL16) in 300 μl Medium in iCelligence L8 E-Platten ausgesät und abgewartet bis ein Zellindex zwischen 1 und 2 erreicht wurde. Danach wurden T-Zellen in unterschiedlicher *Effector-to-target ratio* (3:1 bis 5:1) in 100 μl Medium hinzugegeben und der Zellindex im Verlauf der Zeit durch das System aufgezeichnet.

2.4.3 T-Zell-Stimulations-Assay

Als Surrogatparameter für die Aktivierung der T-Zellen wurde deren Interferon (IFN)- γ -Produktion bestimmt. Dazu wurden T-Zellen in einer 3:1 *Effector-to-target ratio* mit Tumorzellen (SUIT-2-MSLN, SUIT-2-MSLN-CXCL16) für 24 Stunden in 200 μl Medium in einer flachen 96-Well-Platte kultiviert. Danach wurde das Medium nach Zentrifugation der Platte bei 400 G für 5 Minuten vorsichtig abgenommen und bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ bis zur Analyse aufbewahrt. Zur Bestimmung der IFN- γ Konzentration wurde das humane IFN- γ -ELISA Set von BD Bioscience nach Herstellerangaben verwendet. Die Absorption wurde innerhalb von 10 Minuten bei 450 nm mithilfe des Mithras LB 940 gemessen. Die IFN- γ -Konzentration der Proben wurde mittels Nicht-linearer Regression (*log(agonist) vs. response – variable slope*) in GraphPad Prism anhand der Standardkurve extrapoliert und mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor multipliziert. Unverdünnte bis maximal 1:5 verdünnte Proben, deren Messwerte unterhalb der Standardkurve lagen (entsprechend einer IFN- γ -Konzentration im Bereich von 0 pg/ml bis 25 pg/ml), wurden, aufgrund der vernachlässigbar geringen Menge an IFN- γ in den Proben, als nicht detektierbar gewertet.

2.4.4 CXCL16-Assay

Die CXCL16-Sekretion durch Tumorzellen wurde mittels ELISA quantifiziert. Dazu wurden 5×10^4 SUIT-2-MSLN oder SUIT-2-MSLN-CXCL16 Zellen in 225 μl Medium in flachen 96-Well Platten ausgesät und für 24 Stunden kultiviert. Die CXCL16 Konzentration im Tumorüberstand wurde mittels Human CXCL16 DuoSet ELISA Kit nach Herstellerangaben bestimmt und anschließend mithilfe von GraphPad Prism ausgewertet.

2.5 Tierversuche

2.5.1 Voraussetzungen zur Durchführung der Tierversuche

Weibliche NOD *scid* gamma (NSG)-Mäuse (NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ) wurden entweder von Charles River Laboratories (Sulzfeld, DE) bezogen oder in der Zentralen Versuchstierhaltung (ZVH) Innenstadt (Nußbaumstraße 20, München) gezüchtet. Die Haltung und Betreuung der Tiere erfolgte durch fachkundiges Personal der ZVH. Alle Tierversuche wurden mit Genehmigung der Regierung von Oberbayern durchgeführt. Für die Durchführung der Tierversuche als medizinischer Doktorand bestand eine Ausnahmegenehmigung nach der Tierschutz-Versuchstierverordnung, ausgestellt von der Regierung von Oberbayern.

2.5.2 Subkutanes Xenograft Pankreaskarzinommodell

Zu Versuchsbeginn wurden sechs bis acht Wochen alten NSG Mäusen 10^6 SUIT-2-MSLN-CXCL16 Zellen subkutan in die linke Flanke injiziert. Sobald die Tumore palpabel waren (neun Tage nach Tumorinjektion) wurden 10^7 humane T-Zellen intravenös in die Schwanzvene injiziert. Das Tumorwachstum wurde regelmäßig mit einem Messschieber bestimmt und anhand folgender Formel berechnet:

$$\text{Länge (mm)} \times \text{Breite (mm)} = \text{Tumorfläche (mm}^2\text{)}$$

Bei Erreichen von prädefinierten Abbruchskriterien (beispielsweise bei einer Tumorfläche über 225 mm^2 oder Tumorulzeration) oder zu Versuchsende wurden die Mäuse schmerzlos getötet.

2.6 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurde die Software Graphpad Prism verwendet. Statistische Signifikanz wurde angenommen bei $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) beziehungsweise abgelehnt bei $p > 0,05$ (ns). Der jeweils angewandte statistische Test wird in der entsprechenden Abbildungslegende spezifiziert.

3 Ergebnisse

3.1 Modifikation der Pankreaskarzinomzelllinie SUIT-2

Als Tumormodell dieser Arbeit diente die humane Pankreaskarzinomzelllinie SUIT-2, welche von einer metastatischen Leberläsion abgeleitet wurde (Iwamura et al. 1987). Aufgrund der durchflusszytometrisch geringen Nachweisbarkeit des Ziel-Antigens Mesothelin auf SUIT-2 Zellen (Abbildung 1a), wurden diese mit humanem Mesothelin transduziert um die Zelllinie SUIT-2-MSLN zu generieren. In einem weiteren Schritt wurden SUIT-2-MSLN zusätzlich mit humanem CXCL16 transduziert. Nach der Generierung von Einzelzellklonen wurde ein Mesothelin- und CXCL16-positiver Klon ausgewählt und fortan als SUIT-2-MSLN-CXCL16 bezeichnet.

Die Mesothelin-Expression von SUIT-2-MSLN und SUIT-2-MSLN-CXCL16 wurde durchflusszytometrisch nachgewiesen (Abbildung 1a). Die CXCL16-Produktion von SUIT-2-MSLN und SUIT-2-MSLN-CXCL16 wurde mittels ELISA quantifiziert. SUIT-2-MSLN-CXCL16 produzierten erwartungsgemäß deutlich mehr CXCL16 als SUIT-2-MSLN (Abbildung 1b). Die Zelllinie SUIT-2-MSLN-CXCL16 stellt somit den Idealfall für die Anwendung einer Mesothelin- und CXCL16-gerichteten Kombinationstherapie dar.

3.2 Generation und Struktur der Rezeptoren für die T-Zellmodifikation

Der in dieser Arbeit verwendete CAR ist gegen humanes Mesothelin gerichtet. Die einzelnen Domänen wurden per *overlap extension* PCR zum vollständigen Rezeptor zusammengefügt. Die Antigenerkennungsdomäne basiert auf dem SS1-scFv (Chowdhury et al. 1999). Dabei ist die VL-Domäne über den Glycin-Serin-Linker (G₄S)₄ mit der VH-Domäne verbunden, um das vollständige scFv zu bilden. Zur durchflusszytometrischen Detektion des CAR wurde C-terminal der Antigenerkennungsdomäne ein c-myc tag eingefügt. Als CAR der zweiten Generation enthält der anti-Mesothelin-CAR neben der CD3ζ Kette noch die kostimulatorische Domäne CD28. Die vollständige Rezeptorstruktur des CAR ist schematisch in Abbildung 2 gezeigt.

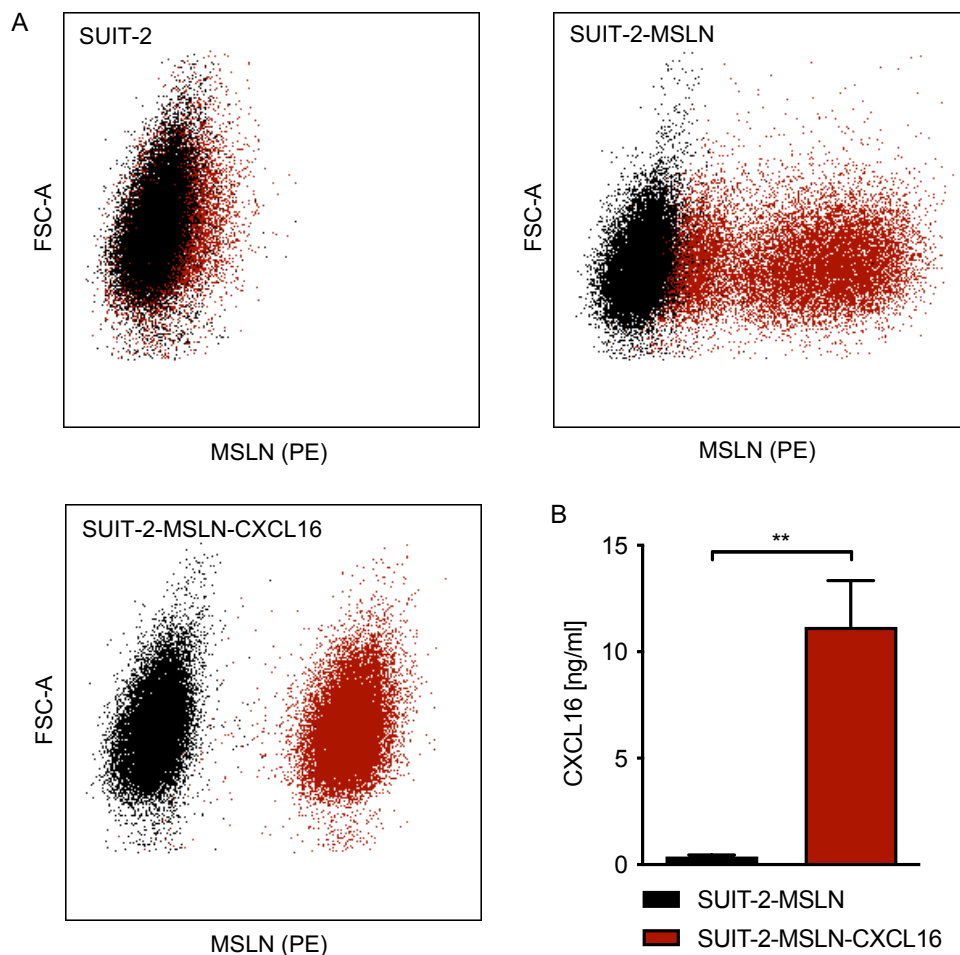


Abbildung 1: Mesothelin- und CXCL16-Expression von SUIT-2 Tumorzellen.

A) SUIT-2, SUIT-2-MSLN und SUIT-2-MSLN-CXCL16 Tumorzellen wurden mit Phycoeretrin (PE)-konjugierten anti-human Mesothelin Antikörpern (rot) oder mit der geeigneten Isotyp-Kontrolle (schwarz) angefärbt und durchflusszytometrisch auf ihre Mesothelin-Expression untersucht. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für ein (SUIT-2), für drei (SUIT-2-MSLN) oder für fünf (SUIT-2-MSLN-CXCL16) unabhängige Experimente. B) SUIT-2-MSLN und SUIT-2-MSLN-CXCL16 Tumorzellen wurden für 24 Stunden kultiviert und der Überstand mittels ELISA auf CXCL16 untersucht. Daten zeigen den Mittelwert und den *standard error of the mean* (SEM) von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei Replikaten. Die Ergebnisse wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem t-Test auf Signifikanz überprüft.

Weiterhin wurde der CAR über eine *self-cleaving* F2A-Sequenz (Szymczak et al. 2004) mit humanem CXCR6 zu einem polycistronischen Rezeptorkonstrukt (CAR-CXCR6)

fusioniert. Aufgrund eines ribosomalen *skip*-Mechanismus während der Translation ermöglicht die 2A-Sequenz die Produktion von zwei getrennten Peptidketten ausgehend von einer einzelnen DNA-Sequenz (Donnelly et al. 2001). Damit wird die gleichzeitige Expression von zwei verschiedenen Rezeptoren in einer T-Zelle mithilfe eines einzelnen Konstrukts ermöglicht. Außerdem kann unter bestimmten Voraussetzungen vom Vorhandensein eines Rezeptors in den modifizierten Zellen auf das Vorhandensein des jeweils anderen geschlossen werden. CXCR6 wird durch Bindung von CXCL16 vorübergehend internalisiert (Koenen et al. 2017, Lesch et al. 2021) und ist somit nicht uneingeschränkt zur Identifikation der transduzierten Zellen geeignet. Die CAR-Expression der CAR-CXCR6 T-Zellen sollte dagegen von CXCL16 unbeeinflusst bleiben und diene deshalb situativ als Surrogatparameter für die simultane CXCR6-Überexpression der jeweiligen T-Zellen.

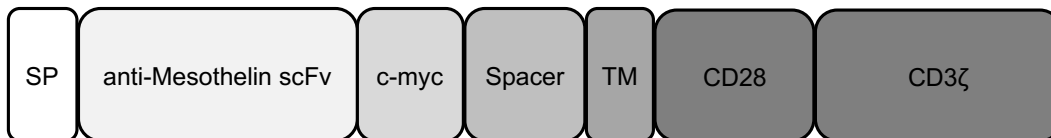


Abbildung 2: Schematischer Aufbau des anti-Mesothelin CAR-Konstrukts.

Von N-terminal nach C-terminal besteht der anti-Mesothelin CAR aus einem CD8 α Signalpeptid (SP), dem anti-Mesothelin scFv, einem c-myc *tag*, einem CD8 α Spacer, einer CD28 Transmembrandomäne (TM) sowie der Intrazellulärdomäne von CD28 und CD3 ζ .

3.3 Expression der Rezeptorkonstrukte in primären humanen T-Zellen

Die verschiedenen Rezeptorkonstrukte wurden mittels retroviraler Transduktion in primären humanen T-Zellen überexprimiert. Die erfolgreiche Expression des CAR- und des CAR-CXCR6-Konstrukts wurde durchflusszytometrisch bestätigt (Abbildung 3).

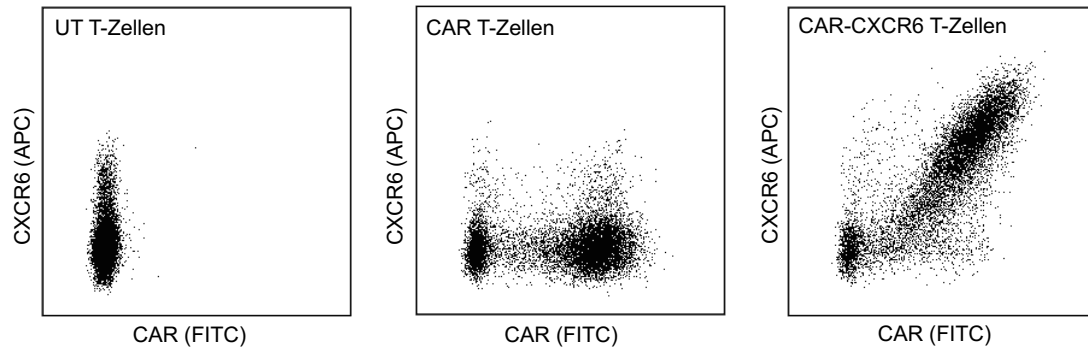


Abbildung 3: CAR- und CXCR6-Expression primärer humaner T-Zellen.

Untransduzierte (UT), CAR-transduzierte und CAR-CXCR6-transduzierte T-Zellen wurden mit anti-c-myc (FITC) und anti-CXCR6 (APC) Antikörpern angefärbt und durchflusszytometrisch auf die Expression des jeweiligen Rezeptors untersucht. Die Daten sind repräsentativ für mindestens sieben verschiedene T-Zell Spender. Daten dieser Abbildung wurden bereits publiziert (Lesch et al. 2021).

3.4 Endogene CXCR6-Expression primärer humaner T-Zellen

Sollten humane CAR T-Zellen endogen bereits hohe Level an CXCR6 exprimieren, wäre der zusätzliche Nutzen der CXCR6-Überexpression zur Verbesserung der CAR T-Zelltherapie fraglich. Deshalb wurde die endogene CXCR6-Expression primärer humaner T-Zellen durchflusszytometrisch zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Sowohl unmittelbar nach der Isolation als auch nach der Transduktion und im Verlauf der weiteren *in vitro* Kultivierung zeigte sich nur ein geringer Anteil der untersuchten T-Zellen endogen CXCR6-positiv (Abbildung 4a). Dementsprechend ließ sich die CXCR6-Expression der T-Zellen durch Transduktion mit dem CAR-CXCR6 Konstrukt deutlich steigern (Abbildung 4a und 4b). In den ersten zehn Tagen nach T-Zellisolation blieb die endogene Expression ebenso wie die retrovirale Überexpression von CXCR6 weitestgehend stabil (Abbildung 4a). Außerdem scheint die Expression des CAR-Konstrukts in T-Zellen keinen wesentlichen Einfluss auf deren endogene CXCR6-Expression zu haben (Abbildung 4b).

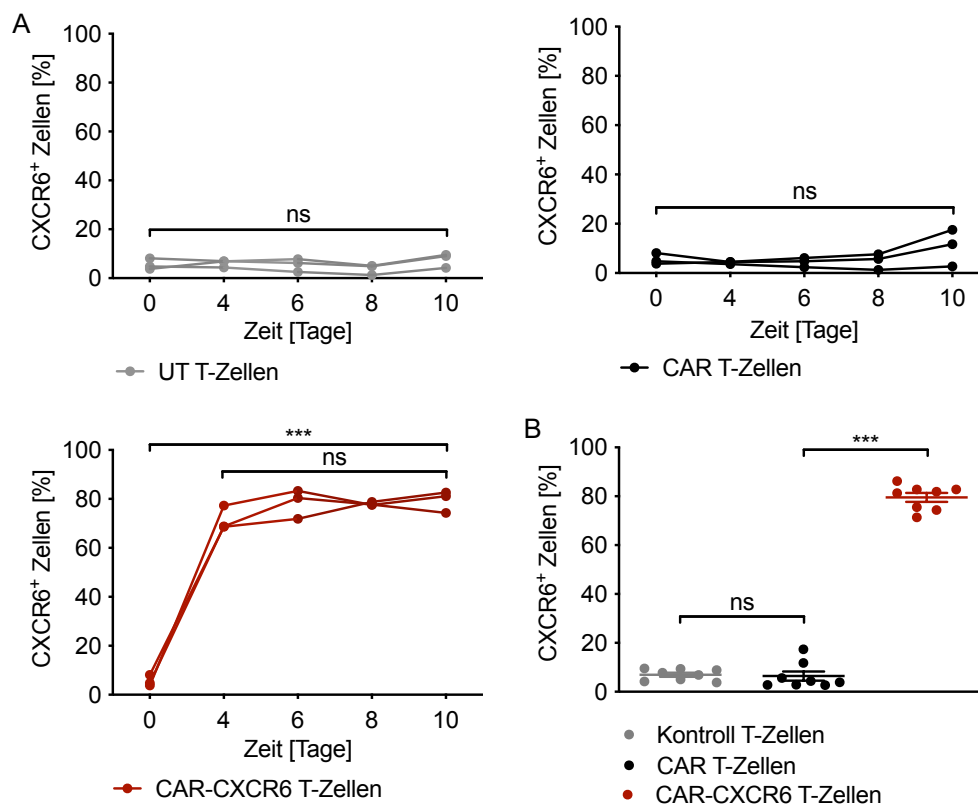


Abbildung 4: CXCR6-Expression primärer humaner T-Zellen.

(A) Untransduzierte (UT), CAR und CAR-CXCR6 T-Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten durchflusszytometrisch auf ihre CXCR6-Expression untersucht. Der Tag der T-Zellisolation aus Spenderblut definiert den Zeitpunkt 0, die erstmalige Untersuchung der transduzierten T-Zellen auf die Expression der jeweiligen Rezeptoren fand an Tag 4 statt. Von Tag 6 bis 10 wurden die T-Zellen expandiert. Die Daten zeigen wiederholte Messungen von drei verschiedenen T-Zell-Spendern. Die Ergebnisse wurden mittels *one-way Analysis of variance* (ANOVA) mit Messwiederholung und Bonferroni-Korrektur auf Signifikanz überprüft. (B) Kontroll T-Zellen (untransduzierte oder GFP-transduzierte), CAR und CAR-CXCR6 T-Zellen wurden zu einem Zeitpunkt während der Expansion auf ihre CXCR6-Expression untersucht. Daten zeigen den Mittelwert und SEM von acht verschiedenen T-Zell-Spendern. Die Ergebnisse wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem t-Test auf Signifikanz überprüft. Daten dieser Abbildung wurden bereits publiziert (Lesch et al. 2021).

3.5 Funktionalität der Rezeptoren in primären humanen T-Zellen

Um die Funktionalität des CAR-Konstrukts zu testen, wurden CAR-transduzierte T-Zellen mit SUIT-2 oder SUIT-2-MSLN kultiviert und anschließend deren Interferon (IFN)- γ -Produktion als Surrogatparameter der T-Zellaktivierung bestimmt. Während die CAR T-Zellen in Kokultur mit SUIT-2-MSLN aktiviert wurden, produzierten sie kaum IFN- γ nach Kontakt mit den nur schwach Mesothelin-positiven SUIT-2 (Abbildung 5). GFP-transduzierte T-Zellen produzierten weder in Kokultur mit SUIT-2 noch in Kokultur mit SUIT-2-MSLN relevante Mengen an IFN- γ (Abbildung 5). Zusammenfassend deuten diese Versuche auf die spezifische Aktivierung der CAR T-Zellen durch stark Mesothelin-positive Tumorzellen hin.

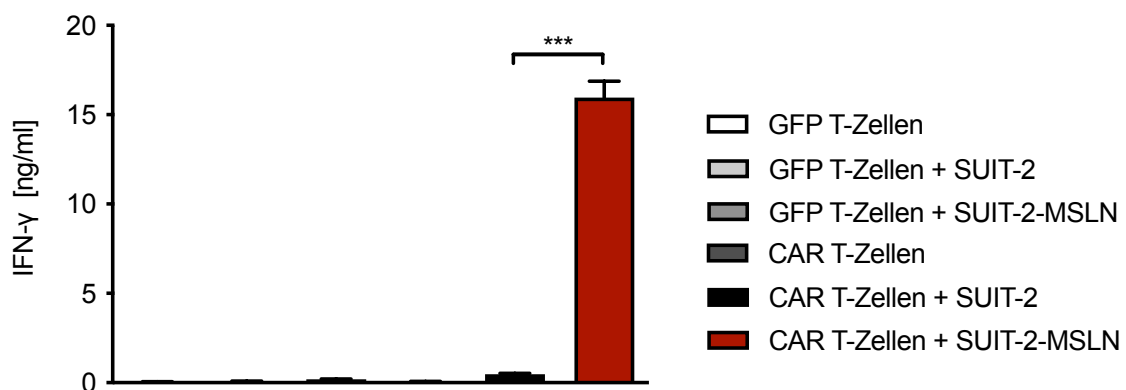


Abbildung 5: CAR T-Zellen erkennen spezifisch Mesothelin-positive Tumorzellen.

GFP und CAR T-Zellen wurden im Verhältnis 3:1 mit SUIT-2 oder SUIT-2-MSLN Tumorzellen oder ohne Tumorzellen für 24 Stunden kultiviert und die IFN- γ Produktion der T-Zellen mittels ELISA gemessen. Die Daten zeigen den Mittelwert und SEM von drei Replikaten und sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente mit verschiedenen T-Zell-Spendern. Die Ergebnisse wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem t-Test auf Signifikanz überprüft.

Als nächstes sollte die Zytotoxizität der CAR T-Zellen gegenüber Mesothelin-positiven Tumorzellen untersucht werden. Dafür wurden T-Zellen gemeinsam mit SUIT-2-MSLN kultiviert und der Zellindex als Surrogatparameter für die Anzahl lebender Tumorzellen aufgezeichnet. Während CAR T-Zellen in der Lage waren SUIT-2-MSLN Tumorzellen zu zerstören, zeigten die GFP-transduzierten T-Zellen keine relevante Zytotoxizität (Abbildung 6).

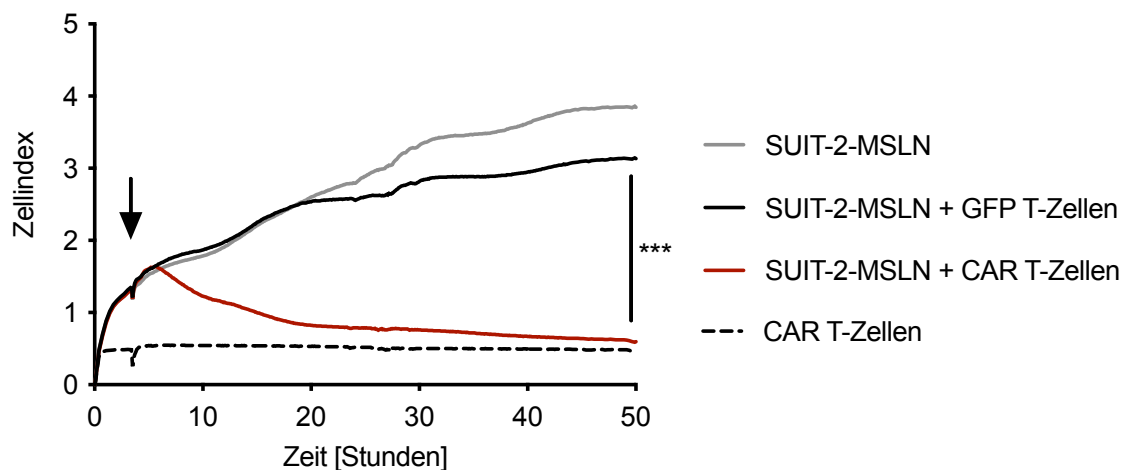


Abbildung 6: CAR T-Zellen töten Mesothelin-positive Tumorzellen.

GFP und CAR T-Zellen wurden im Verhältnis 5:1 mit SUI-2-MSLN Tumorzellen kultiviert und der Zellindex als Surrogatparameter für die Viabilität der Tumorzellen aufgezeichnet. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der T-Zellzugabe. Daten zeigen den Mittelwert von zwei Replikaten und sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente mit verschiedenen T-Zell-Spendern. Die Ergebnisse wurden mittels *two-way* ANOVA mit Messwiederholung und Bonferroni-Korrektur auf Signifikanz überprüft.

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass CXCR6-transduzierte humane T-Zellen verstärkt zu rekombinatem humanem CXCL16 migrieren (Lesch et al. 2021). Um sicherzustellen, dass CXCR6 auch im Kontext der Transduktion mit dem CAR-CXCR6-Konstrukt weiterhin funktionell ist, wurde das Migrationverhalten von CAR-CXCR6-transduzierten T-Zellen zu rekombinatem CXCL16 untersucht. Während die Kontroll T-Zellen nicht verstärkt zu CXCL16 migrierten, zeigten die CAR-CXCR6 T-Zellen eine deutlich gesteigerte Migration zu CXCL16 im Vergleich zur Mediumkontrolle (Abbildung 7).

Zusammenfassend vermittelt der CAR die spezifische Tumorzellerkennung und Aktivierung der T-Zell-Effektorfunktionen während die Überexpression des CAR-CXCR6-Konstrukts die T-Zellen zur CXCL16-gerichteten Chemotaxis befähigt.

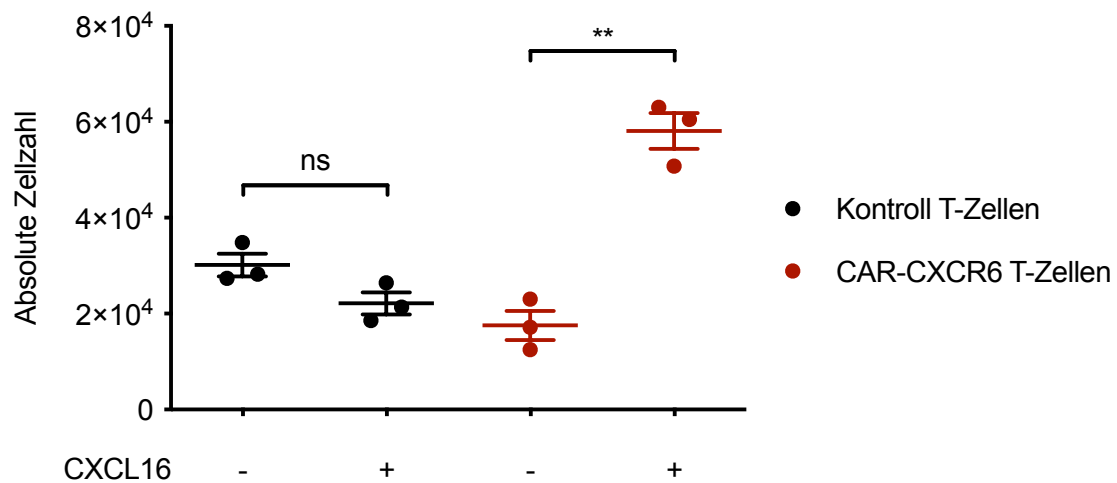


Abbildung 7: CAR-CXCR6 T-Zellen migrieren zu rekombinantem CXCL16.

Kontroll T-Zellen (UT oder GFP-transduzierte) und CAR-CXCR6 T-Zellen wurden auf ihre Fähigkeit zur Migration zu 50 ng/ml rekombinantem humanem CXCL16 (+) im Vergleich zur Mediumkontrolle (-) untersucht. Dazu wurde nach vier Stunden durchflusszytometrisch jeweils die absolute Zellzahl der transduzierten (CAR oder GFP) oder untransduzierten T-Zellen im unteren Well der Transwell-Migrations-Platte bestimmt. Die Daten zeigen den Mittelwert und SEM von drei Replikaten und sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente mit verschiedenen T-Zellspendern. Die Ergebnisse wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem t-Test auf Signifikanz überprüft. Daten dieser Abbildung wurden bereits publiziert (Lesch et al. 2021).

3.6 Funktionalität von CAR und CAR-CXCR6 T-Zellen im Vergleich

Nun sollte festgestellt werden, ob *in vitro* funktionelle Unterschiede zwischen CAR- und CAR-CXCR6-transduzierten T-Zellen bestehen, wenn Tumorzellen sowohl das Zielantigen Mesothelin als auch CXCL16 exprimieren. In Kokultur mit SUIT-2-MSLN-CXCL16 zeigten sich weder in der T-Zellaktivierung (Abbildung 8a) noch in der Zytotoxizität (Abbildung 8b) relevante Unterschiede zwischen CAR- und CAR-CXCR6-transduzierten T-Zellen.

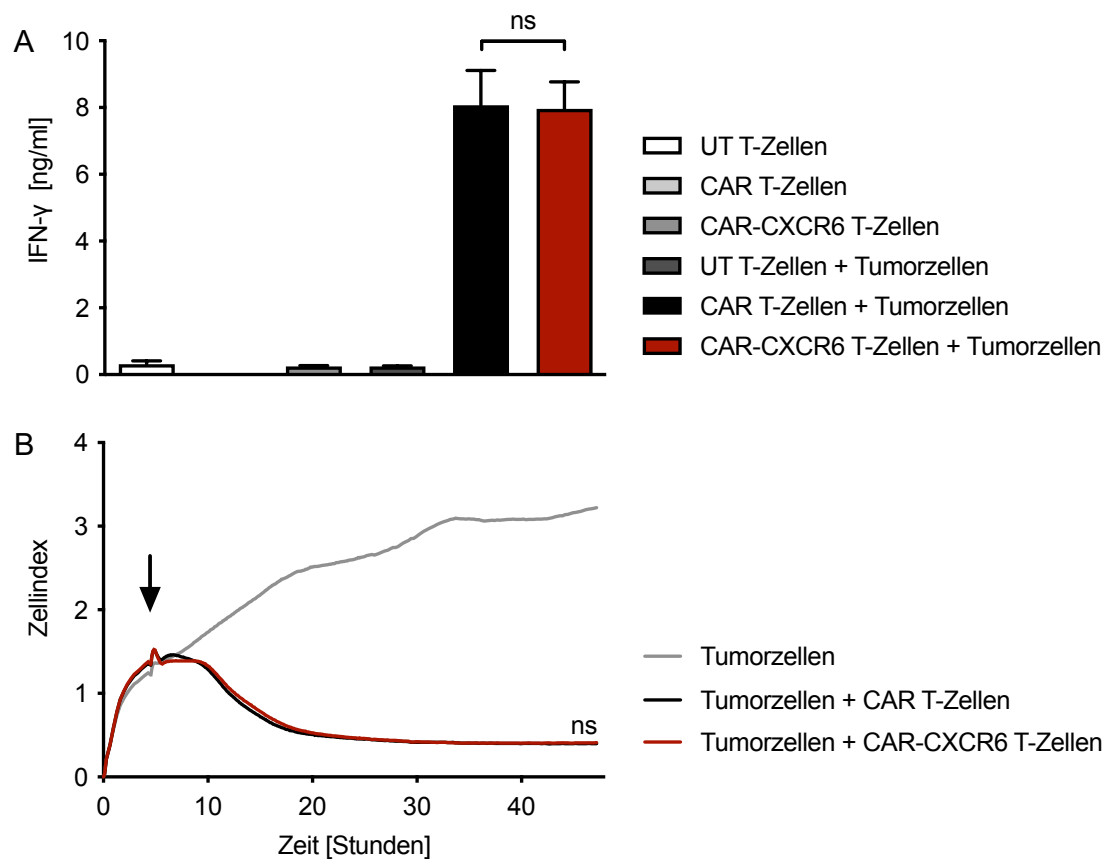


Abbildung 8: Vergleichbare Aktivierung (A) und Zytotoxizität (B) von CAR- und CAR-CXCR6 T-Zellen.

(A) Untransduzierte (UT), CAR und CAR-CXCR6 T-Zellen wurden im Verhältnis 3:1 mit Tumorzellen (SUIT-2-MSLN-CXCL16) für 24 Stunden kultiviert und die IFN- γ Produktion der T-Zellen mittels ELISA gemessen. Daten zeigen den Mittelwert und SEM von drei Replikaten und sind repräsentativ für drei Experimente mit verschiedenen T-Zellspendern. (B) CAR und CAR-CXCR6 T-Zellen wurden im Verhältnis 3:1 mit Tumorzellen (SUIT-2-MSLN-CXCL16) kultiviert und der Zellindex als Surrogatparameter für die Viabilität der Tumorzellen aufgezeichnet. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der T-Zellzugabe. Daten zeigen den Mittelwert von zwei Replikaten und sind repräsentativ für drei verschiedene T-Zell-Spender. Die Ergebnisse wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem t-Test (A) oder mittels *two-way* ANOVA mit Messwiederholung und Bonferroni-Korrektur (B) auf Signifikanz überprüft. Daten dieser Abbildung wurden bereits publiziert (Lesch et al. 2021).

Während demnach die direkten antitumoralen Effektorfunktionen der CAR-CXCR6 T-Zellen im Vergleich zu CAR T-Zellen *in vitro* nicht gesteigert zu sein scheinen, zeigten die CAR-CXCR6 T-Zellen erwartungsgemäß eine deutlich verbesserte Migrationsfähigkeit zu Mesothelin-CXCL16-positiven Tumorzellen (Abbildung 9).

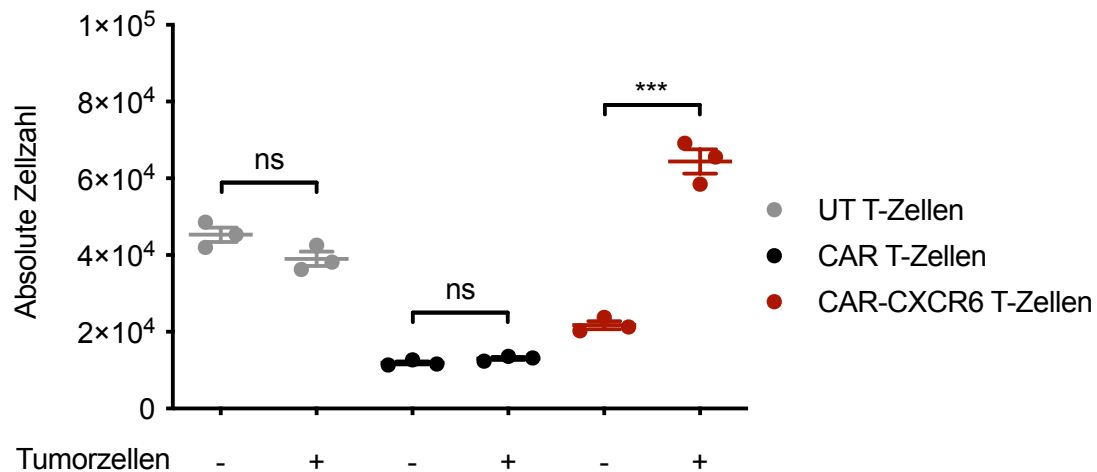


Abbildung 9: Verstärkte Migration von CAR-CXCR6 T-Zellen zu Tumorzellen.

Untransduzierte (UT), CAR und CAR-CXCR6 T-Zellen wurden auf ihre Fähigkeit zur Migration zu SUIT-2-MSLN-CXCL16 Tumorzellen (+) im Vergleich zur Mediumkontrolle (-) untersucht. Dazu wurde nach vier Stunden durchflusszytometrisch jeweils die absolute Zellzahl der transduzierten (CAR und CAR-CXCR6) oder untransduzierten T-Zellen im unteren Well der Transwell-Migrations-Platte bestimmt. Daten zeigen den Mittelwert und SEM von drei Replikaten und sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente mit verschiedenen T-Zellspendern. Die Ergebnisse wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem t-Test auf Signifikanz überprüft.

3.7 *In vivo* Funktionalität der modifizierten T-Zellen

Um die Effektivität der T-Zellen *in vivo* zu untersuchen, wurden SUIT-2-MSLN-CXCL16 subkutan in NSG-Mäuse implantiert. Nach erfolgreicher Verpflanzung der Tumorzellen wurden die Mäuse einmalig mit GFP-, CAR- oder CAR-CXCR6-transduzierten T-Zellen behandelt. Während alle Mäuse der GFP-Gruppe innerhalb weniger Wochen ein Tumor-bedingtes Abbruchkriterium erreichten, führte die Therapie mit CAR T-Zellen oder mit CAR-CXCR6 T-Zellen bei den meisten Mäusen zur vollständigen Tumorfreiheit (Abbildung 10).

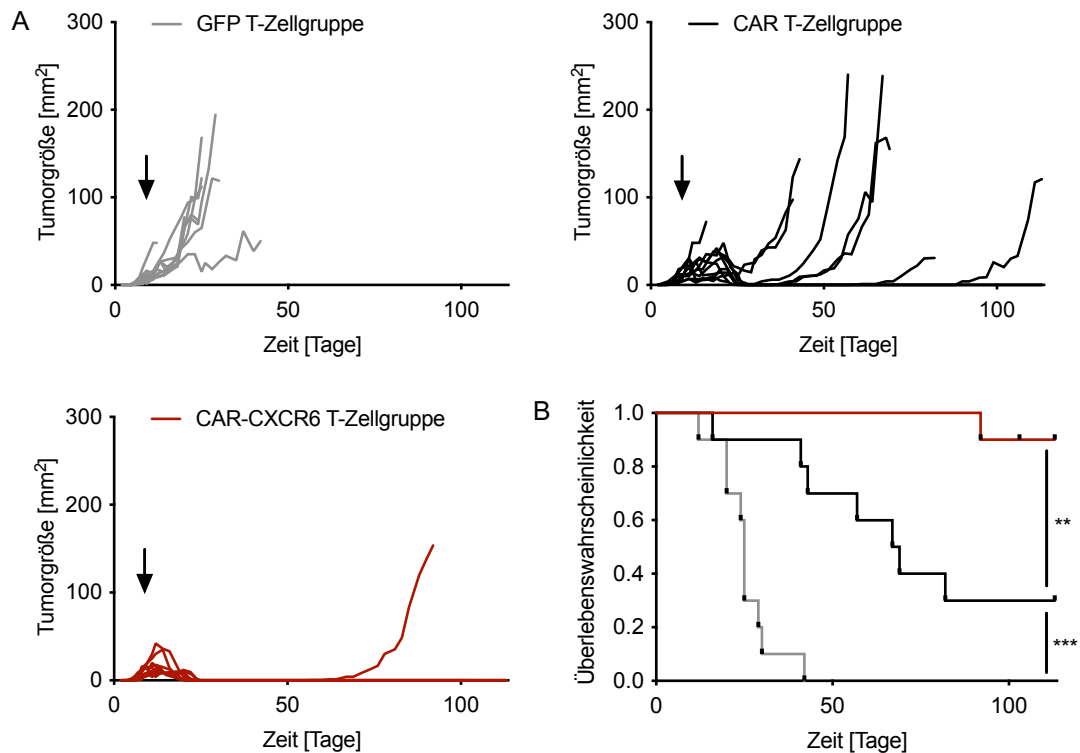


Abbildung 10: CAR-CXCR6 T-Zellen verbessern die Tumorkontrolle und verlängern das Überleben in einem subkutanen Pankreaskarzinom Mausmodell.

Nach erfolgreicher subkutaner Verpflanzung von 10^6 SUIT-2-MSLN-CXCL16 in NSG-Mäuse wurden diese einmalig mit jeweils 10^7 GFP T-Zellen, CAR T-Zellen oder CAR-CXCR6 T-Zellen behandelt und das subkutane Tumorwachstum (A) und das Überleben (B) aufgezeichnet. Abgebildet sind die einzelnen Tumorwachstumskurven der Mäuse (A) und die Überlebenswahrscheinlichkeit der verschiedenen Therapiegruppen mit jeweils $n = 10$ Mäusen (B). Die Daten wurden aus zwei unabhängigen Experimenten gepoolt. Der Unterschied der Überlebenswahrscheinlichkeit wurde mittels Log-rank (Mantel-Cox) Test auf Signifikanz überprüft. Eine Maus der CAR-CXCR6-Gruppe musste am Tag 103 des Experiments aufgrund einer unklaren, aber mutmaßlich von der subkutanen Tumorumplantation unabhängigen, Nackenschwellung getötet werden und wurde daher zu diesem Zeitpunkt zensiert. Daten dieser Abbildung wurden bereits publiziert (Lesch et al. 2021).

In der CAR-CXCR6-Gruppe blieben im weiteren Verlauf neun von zehn Mäuse tumorfrei. Im Gegensatz dazu erlitten acht Mäuse der CAR-Gruppe einen

Tumorrückfall und sieben erreichten ein Tumor-bedingtes Abbruchskriterium innerhalb des experimentellen Beobachtungszeitraums. Folglich war das Überleben der CAR-CXCR6-behandelten Mäuse im Vergleich zu CAR-behandelten Mäusen signifikant verlängert (Abbildung 10). Die Fähigkeit Mesothelin-spezifischer CAR T-Zellen zur *in vivo* Tumorkontrolle konnte folglich durch die Überexpression von CXCR6 in den CAR T-Zellen deutlich verbessert werden.

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde ein gegen das Zielantigen Mesothelin gerichteter CAR etabliert. Dieser konnte erfolgreich allein oder gemeinsam mit CXCR6 in primären humanen T-Zellen überexprimiert werden. Erwartungsgemäß vermittelte der CAR die Mesothelin-abhängige Aktivierung der T-Zellen und führte zur Lyse der Antigen-tragenden Tumorzellen durch die modifizierten T-Zellen. Die Überexpression von CXCR6 steigerte die Migration der Rezeptor-tragenden T-Zellen entlang eines CXCL16-Gradienten. Im Hinblick auf die T-Zellaktivierung und Tumorzelllyse fand sich *in vitro* kein nennenswerter Unterschied zwischen CAR- und CAR-CXCR6-transduzierten T-Zellen. CAR-CXCR6-exprimierende T-Zellen zeigten allerdings eine deutlich gesteigerte CXCL16-gerichtete Migrationsfähigkeit. In einem xenogenen Pankreaskarzinommodell verbesserte die Überexpression von CXCR6 in CAR T-Zellen die Tumorkontrolle deutlich und verlängerte das Überleben der behandelten Mäuse.

4.2 Struktur der Rezeptorkonstrukte für die T-Zellmodifikation

4.2.1 Aufbau des CAR-Konstrukts

Der CAR dieser Arbeit wurde in Anlehnung an einen bereits publizierten Mesothelin-CAR (Carpenito et al. 2009) entworfen. Seit ihrer Konzeption wurde die Struktur von chimären Antigenrezeptoren durch das wachsende Verständnis für die funktionelle Relevanz einzelner Domänen kontinuierlich weiterentwickelt. Die Integration einer kostimulatorischen Domäne in den Rezeptor führte zur Verbesserung der Expansion und Persistenz von CAR T-Zellen in Patienten (Savoldo et al. 2011) und trug damit maßgeblich zum Erfolg der CAR T-Zelltherapie bei (Wagner et al. 2020). Die Mehrheit der bisher klinisch getesteten CAR T-Zellen beinhalten als kostimulatorische Domäne entweder CD28 oder 4-1BB (Cappell et al. 2021). Während diese kostimulatorischen Domänen durchaus unterschiedliche Effekte auf die *in vivo* Persistenz der CAR T-Zellen (Priceman et al. 2018, Zhao et al. 2015) deren Metabolismus und Differenzierung (Kawalekar et al. 2016) sowie deren Aktivierung (Salter et al. 2018) haben können, gilt derzeit keine der beiden Domänen als grundsätzlich überlegen (Cappell et al. 2021). Demnach zeigten sich die

verschiedenen CD19-gerichteten CAR T-Zellprodukte in ihrer klinischen Wirksamkeit und Toxizität bisher im Wesentlichen ähnlich (Cappell et al. 2021), ein direkter Vergleich in großen klinischen Studien ist jedoch noch ausstehend. Gleichfalls zeigte sich die Effektivität von Rezeptoren der dritten Generation mit zwei kostimulatorischen Domänen bislang nicht eindeutig überlegen (Cappell et al. 2021), sodass deren Stellenwert nicht endgültig geklärt ist. Demnach entspricht die Verwendung einer einzelnen, CD28-basierten kostimulatorischen Domäne im CAR dieser Arbeit dem derzeitigen klinischen Standard.

Der Beitrag der anderen CAR-Domänen zur Rezeptorfunktionalität wurde bisher weniger gründlich untersucht. Es finden sich jedoch vermehrt Hinweise, dass diese vergleichsweise wenig beachteten Domänen unter Umständen äußerst wichtig für die adäquate Funktion der CAR T-Zellen sein können (Stoiber et al. 2019).

4.2.2 Struktur von CXCR6

CXCR6 enthält in der dritten transmembranen Helix die Aminosäureabfolge Asparaginsäure-Arginin-Phenylalanin (DRF) im Gegensatz zu der an dieser Stelle üblichen Aminosäureabfolge Asparaginsäure-Arginin-Tyrosin (DRY) und nimmt damit aus struktureller Sicht eine Sonderstellung unter den Chemokinrezeptoren ein (Koenen et al. 2017, Nomiya et al. 2015). Funktionelle Untersuchungen ergaben, dass dieses DRF-Motiv das Kalzium-Signal und damit die chemotaktische Antwort von CXCR6-tragenden *human embryonic kidney* (HEK) 293 und monozytischen THP-1 Zellen abschwächte, während die adhäsiven Eigenschaften des Rezeptors weitgehend unbeeinflusst blieben (Koenen et al. 2017). Zudem reduzierte die gezielte Mutation dieses Motives in CX₃CR1 (DRY zu DRF) die CX₃CL1-gerichtete Migration der Zellen (Koenen et al. 2017). Die Autoren postulieren deshalb, dass die DRF-Sequenz generell die chemotaktische Funktion von Chemokinrezeptoren dämpft und CXCR6 damit an die Rolle eines primär adhäsiven Chemokinrezeptors angepasst ist (Koenen et al. 2017). Inwiefern diese Beobachtungen und Schlussfolgerungen auch für primäre humane T-Zellen gelten, ist allerdings noch unklar. In Übereinstimmung mit oben genannter Hypothese konnte jedoch in einem murinen Ovarialkarzinommodell gezeigt werden, dass CXCR6-positive Tumor-infiltrierende T-Zellen durch CXCL16 im Tumormilieu zurückgehalten werden, wodurch wiederum die Tumorkontrolle verbessert wurde (Muthuswamy et al. 2021). Weiterhin wurde die CXCR6-Expression der T-Zellen

erst im Tumor hochreguliert und schien demnach nicht primär für deren Tumorerkrankung verantwortlich zu sein (Muthuswamy et al. 2021). Die Möglichkeit der selektiven Modulation CXCR6-vermittelter Funktionen könnte für die Therapie mit CXCR6-modifizierten CAR T-Zellen relevant sein. Die funktionelle Bedeutung der CXCR6-Struktur in humanen T-Zellen bedarf deshalb weiterer Untersuchungen.

4.2.3 Einfluss der 2A-Sequenz im CAR-CXCR6-Konstrukt

Es ist erwähnenswert, dass sich von den CAR-CXCR6-transduzierten T-Zellen nicht alle durchflusszytometrisch CAR-positiven Zellen auch CXCR6-positiv zeigten (Abbildung 4a und 4b). Während diese Beobachtung auch auf eine möglicherweise niedrige Sensitivität des anti-CXCR6 Antikörpers zurückgeführt werden könnte, ist sie wahrscheinlicher durch die Funktionsweise von 2A-Sequenzen bedingt. Im Optimalfall führt die Fusion zweier Rezeptoren durch eine 2A-Sequenz aufgrund des ribosomalen *skip*-Mechanismus zur äquimolaren Produktion von zwei voneinander getrennten Proteinen (Donnelly et al. 2001, Liu et al. 2017). Das Ribosom kann jedoch die Translation bei Erreichen der 2A-Sequenz stoppen (ribosomales *fall-off*) beziehungsweise ohne Unterbrechung der Peptidkette fortführen (ribosomales *read-through*) (Donnelly et al. 2001, Liu et al. 2017). Während das ribosomale *fall-off* zur verminderten Expression des zweiten Proteins in 2A-verbundenen Konstrukten beiträgt, führt das ribosomale *read-through* zur unerwünschten Produktion eines Fusionsproteins (Donnelly et al. 2001, Liu et al. 2017). Ein derartiges Fusionsprotein könnte gegebenenfalls unvorhersehbare Auswirkungen auf die transduzierten T-Zellen haben. Der funktionelle Vergleich der CAR- und CAR-CXCR6-transduzierten T-Zellen legte jedoch nahe, dass die 2A-Sequenz keine offensichtlich nachteiligen Konsequenzen für die modifizierten T-Zellen hat. Möglicherweise könnte die Effizienz des ribosomalen *skip*-Mechanismus in CAR-CXCR6-transduzierten T-Zellen durch die Inklusion eines (Glycin-Serin-Glycin) GSG-Linkers vor der 2A-Sequenz erhöht werden (Szymczak-Workman et al. 2012).

4.3 Funktionalität der Rezeptorkonstrukte

Die CAR-vermittelte Aktivierung der T-Zellen und die Zerstörung der Tumorzellen werden allgemein als wesentliche Kriterien der adäquaten Funktionalität eines neu konstruierten Rezeptors betrachtet. Es ist jedoch bekannt, dass die *in vitro* Funktionalität von CAR T-Zellen deren *in vivo* Effektivität nicht immer verlässlich

vorhersagt (Künkele et al. 2015). Der in dieser Arbeit generierte CAR zeigte sich allerdings auch im murinen Xenograft-Modell wirksam und erfüllt demnach die grundlegenden funktionellen Anforderungen für eine erfolgreiche Anwendung in der Mesothelin-gerichteten Tumorthherapie.

Der funktionelle Nutzen der CXCR6-Überexpression in CAR T-Zellen basiert im Wesentlichen darauf, dass diese endogen kaum CXCR6 exprimieren. Aus der Literatur ist bekannt, dass vor allem aktivierte T-Zellen verstärkt CXCR6 exprimieren (Liao et al. 1997, Loetscher et al. 1997, Matloubian et al. 2000). Obwohl die T-Zellen im Rahmen des Transduktionsprozesses ebenfalls aktiviert wurden, zeigten sie durchflusszytometrisch keine messbaren Veränderungen der CXCR6-Expression. Letztlich fehlte für diese Beobachtung jedoch die adäquate Vergleichspopulation nicht-stimulierter T-Zellen. Während eine gewisse Steigerung der CXCR6-Expression im Rahmen der Transduktion daher zwar nicht endgültig ausgeschlossen werden konnte, wäre diese jedoch aus funktioneller Sicht vernachlässigbar gering. Weiterhin ist bekannt, dass CAR-Konstrukte selbst in Abwesenheit ihres jeweiligen Antigens aktivierende Signale an die T-Zelle senden können (Ajina et al. 2018). Daher könnte die Überexpression des chimären Rezeptors durch die Antigen-unabhängige Aktivierung der T-Zellen ebenfalls zur verstärkten Expression von CXCR6 führen. Die CAR-Expression hatte in dieser Arbeit allerdings nachweislich keinen Einfluss auf die endogene CXCR6-Expression der T-Zellen. Eine frühe Arbeit weist darauf hin, dass hohe CXCR6-Level nötig sind, um die CXCL16-gerichtete Migration der Rezeptor-tragenden Zellen zu vermitteln (Matloubian et al. 2000). Dementsprechend konnte sowohl die CXCR6-Expression der CAR T-Zellen als auch deren CXCL16-gerichtete Migrationsfähigkeit durch die Transduktion mit dem CAR-CXCR6-Konstrukt erheblich gesteigert werden.

Weiterhin wurde gezeigt, dass CXCR6 neben der CXCL16-gerichteten Chemotaxis auch die Adhäsion der Rezeptor-tragenden Zellen an das membrangebundene Chemokin vermittelt (Shimaoka et al. 2004). Aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe im murinen System war zudem bekannt, dass CXCR6-transduzierte Tumor-spezifische T-Zellen eine gesteigerte Aktivierung und Zytotoxizität gegenüber CXCL16-positiven Tumorzellen zeigen (Lesch et al. 2021). Vermutlich ist dies auf eine verbesserte Adhäsion der T-Zellen an die Tumorzellen zurückzuführen (Lesch et al. 2021). In der hier präsentierten Arbeit war die Aktivierung und Zytotoxizität von humanen

CAR-CXCR6-transduzierten T-Zellen in Kokultur mit CXCL16-positiven Tumorzellen allerdings nicht gesteigert. In Anbetracht der starken T-Zellaktivierung durch chimäre Antigenrezeptoren schließen die durchgeführten *in vitro* Versuche subtile Unterschiede in der Aktivierung und Zytotoxizität von CAR- und CAR-CXCR6-transduzierten T-Zellen jedoch nicht definitiv aus. Beispielsweise zeigen CAR-CXCR6-transduzierte T-Zellen im Vergleich zu CAR-transduzierten T-Zellen einen initial gesteigerten intrazellulären Kalziumspiegel in Kokultur mit CXCL16-positiven Tumorzellen (Lesch et al. 2021). Dies suggeriert eine gewisse Modulation der Aktivierung CAR-CXCR6-transduzierter T-Zellen, welche sich möglicherweise auf die Effektorfunktion der T-Zellen auswirken könnte (Lesch et al. 2021).

Die Therapie mit CAR-CXCR6-transduzierten T-Zellen führte im Vergleich zur Therapie mit CAR-transduzierten T-Zellen zur deutlich gesteigerten Tumorkontrolle *in vivo*. In Zusammenschau mit den veröffentlichten Daten der Arbeitsgruppe (Lesch et al. 2021), scheint die gesteigerte Wirksamkeit der T-Zellen vor allem durch deren verbesserte CXCL16-abhängige Infiltration ins Tumorgewebe erklärbar zu sein. Ein verlängertes Überleben oder die gesteigerte Proliferation der CAR-CXCR6-transduzierten T-Zellen im Tumor wurde allerdings experimentell nicht endgültig ausgeschlossen. Daher wäre ein Beitrag dieser beiden Mechanismen zur Steigerung der antitumoralen Effektivität von CXCR6-exprimierenden CAR T-Zellen grundsätzlich weiterhin denkbar.

4.4 Translation des Therapieansatzes in die Klinik

Durch die Modifikation der Zelllinie SUIT-2 zu SUIT-2-MSLN-CXCL16 wurden in dieser Arbeit optimale Voraussetzungen für die erfolgreiche Therapie mit CAR-CXCR6-transduzierten T-Zellen geschaffen. Aufgrund der homogenen Überexpression des Zielantigens Mesothelin in den Tumorzellen und dessen Abwesenheit in gesundem Mausegewebe, erfüllte Mesothelin in dieser Arbeit nahezu alle postulierten Kriterien eines idealen Antigens für die CAR T-Zelltherapie (Morello et al. 2016). Während diese günstige Antigenverteilung auch den CXCR6-negativen CAR T-Zellen zugutekam, führte nur die Therapie mit CXCR6-transduzierten CAR T-Zellen zur dauerhaften Tumorkontrolle *in vivo*. Der Erfolg der CAR T-Zelltherapie in soliden Tumoren wäre also selbst durch die Identifikation eines idealen Zielantigens nicht garantiert und erfordert demnach die Überwindung weiterer Hindernisse.

Diese Arbeit zeigt konzeptionell, welche wesentliche Rolle der CXCR6-vermittelten Migrationsfähigkeit von CAR T-Zellen zukommt, wenn die Tumorzellen ausreichende Mengen CXCL16 produzieren. Bei der Translation des Therapieansatzes in die Klinik ist im Vergleich zum Xenograft-Modell dieser Arbeit jedoch mit weniger idealen Bedingungen zu rechnen. Tumore von Patienten zeigen sich sowohl in Bezug auf die Mesothelin-Expression (Argani et al. 2001) als auch auf die CXCL16-Expression (Lesch et al. 2021, Wente et al. 2008) vergleichsweise heterogen. Insofern ist das Tumormodell dieser Arbeit für die klinische Translation der Therapiestrategie nur von eingeschränkter Relevanz. Allerdings konnte in der Publikation der Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die Überexpression von CXCR6 in CAR T-Zellen auch die Tumorkontrolle in einem Patienten-abgeleiteten Xenograft-Modell verbessert (Lesch et al. 2021). Dieses Modell spiegelt die tatsächlich zu erwartende Mesothelin- und CXCL16-Expression in Tumorpatienten deutlich besser wider und hat daher für die Translation der Therapiestrategie in die Klinik große Bedeutung.

Mutmaßlich würden vor allem Patienten mit starker CXCL16-Expression im Tumorgewebe von einer Therapie mit CXCR6-transduzierten CAR T-Zellen profitieren. Aufgrund der beobachteten interindividuellen Heterogenität der CXCL16-Expression im humanen Pankreaskarzinom (Lesch et al. 2021, Wente et al. 2008) erscheint daher die gezielte Selektion der für die Therapie besonders geeigneten Patienten sinnvoll.

4.5 Adoptive T-Zelltherapie mit CXCR6-modifizierten CAR T-Zellen

Die Überexpression von CXCR6 in CAR T-Zellen scheint eine vielversprechende Strategie zur Verbesserung des adoptiven T-Zelltransfers zu sein. Einerseits zeigte sich die antitumorale Wirksamkeit der CAR-CXCR6-transduzierten T-Zellen in der vorliegenden Arbeit deutlich gesteigert. Andererseits haben CXCR6-transduzierte CAR T-Zellen aufgrund ihrer präferentiellen Rekrutierung in CXCL16-exprimierendes Tumorgewebe möglicherweise auch ein günstigeres Sicherheitsprofil. Ein wesentlicher Mechanismus der CAR T-Zell-vermittelten Toxizität ist die Aktivierung der CAR T-Zellen durch Antigen-tragendes gesundes Gewebe (Lamers et al. 2013, Morgan et al. 2010). Durch die Überexpression von CXCR6 sollten die T-Zellen allerdings vorwiegend in CXCL16-positiven Geweben akkumulieren (Lesch et al. 2021). Damit würden Organe, welche wenig CXCL16 exprimieren von den Effektorfunktionen der CAR T-Zellen weitestgehend verschont bleiben. Die CXCL16-Expression in gesundem

Gewebe (Day et al. 2009, Gutwein et al. 2009, Lesch et al. 2021, Matloubian et al. 2000, Schramme et al. 2008) stellt daher offensichtlich ein Risiko für die fehlgeleitete Rekrutierung CXCR6-transduzierter T-Zellen dar. In diesem Fall ist es besonders wichtig, dass das Zielantigen der CAR T-Zellen in diesen Geweben nicht exprimiert wird, um die Schädigung gesunder Organe zu vermeiden. Das uneingeschränkte Effektorpotential der CAR-CXCR6-transduzierten T-Zellen sollte sich somit ausschließlich in Geweben entfalten, welche sowohl das Zielantigen als auch CXCL16 in relevanter Menge exprimieren.

Tumorzellen steigern unter dem Einfluss proinflammatorischer Zytokine wie IFN- γ und Tumornekrosefaktor (TNF)- α die Expression von CXCL16 (Darash-Yahana et al. 2009, Lesch et al. 2021). Diese Zytokine werden bekanntermaßen auch von aktivierten CAR T-Zellen produziert (Carpenito et al. 2009). Die initiale Infiltration der Tumore durch einige CAR T-Zellen sollte demnach zur Produktion dieser Zytokine im Tumormilieu führen. Mutmaßlich würde dadurch die CXCL16-Expression der Tumorzellen verstärkt, wodurch weitere CXCR6-positive CAR T-Zellen rekrutiert würden. Ein derartiger positiver *feedback-loop* der CAR T-Zellrekrutierung wäre für deren antitumorale Wirksamkeit von großem Vorteil.

Darüber hinaus scheint CXCR6 in der antitumoralen T-Zellimmunität unabhängig von der Vermittlung der CXCL16-abhängigen Tumordinfiltration eine wichtige Rolle zu spielen. Demnach wurde in Mäusen gezeigt, dass CXCR6 essenziell für das Überleben von Tumor-infiltrierenden T-Zellen ist (Di Pilato et al. 2021). Die CXCR6-Expression auf Tumor-reaktiven T-Zellen ermöglichte dabei deren Interaktion mit CXCL16-positiven dendritischen Zellen, welche den T-Zellen wichtige Überlebenssignale in Form von transpräsentiertem IL-15 darboten (Di Pilato et al. 2021). Demgegenüber schien die CXCL16-abhängige Infiltration der Tumore in dieser Arbeit eine untergeordnete Rolle zu spielen, da die T-Zellen CXCR6 erst im Tumormilieu hochregulierten (Di Pilato et al. 2021). Die Autoren spekulieren jedoch, dass CXCL16 nach Abspaltung von dendritischen Zellen chemotaktisch auf CXCR6-positive T-Zellen wirken und damit deren Positionierung im Tumorgewebe beeinflussen könnte (Di Pilato et al. 2021).

Mutmaßlich sollte die Identität der CXCL16-sezernierenden Zellen im Tumorgewebe für die chemotaktische Rekrutierung CXCR6-positiver T-Zellen keine tragende Rolle spielen. Abhängig vom zellulären Ursprung scheint CXCL16 jedoch in weitere

Funktionen involviert zu sein. Es ist allerdings noch unklar, ob CXCR6-transduzierte CAR T-Zellen im Tumormilieu ebenfalls von der oben beschriebenen Interaktion mit CXCL16-positiven dendritischen Zellen profitieren können. Ein Beitrag dieses Mechanismus zur beobachteten Wirkungssteigerung der humanen CXCR6-transduzierten CAR T-Zellen im immundefizienten NSG-Mausmodell der vorgelegten Arbeit erscheint allerdings, nicht zuletzt aufgrund der Speziesbarriere, eher unwahrscheinlich.

Interessanterweise war die Wirksamkeit von CXCR6-transduzierten murinen CAR T-Zellen mit Spezifität für das Zielantigen *epithelial cell adhesion molecule* (EpCAM) der Wirksamkeit von CXCR3- und CCR4-transduzierten CAR T-Zellen in einem Panc02-Tumormodell überlegen (Lesch et al. 2021). Sowohl die CXCR3-Liganden CXCL4, CXCL10 und CXCL11 als auch der CCR4-Ligand CCL22 werden in diesem Tumormodell nachweislich exprimiert (Lesch et al. 2021, Rapp et al. 2016). Dennoch könnte eine im Vergleich zu CXCL16 unzureichende Expression dieser Chemokine im Tumormilieu die beobachtete Wirkungsdifferenz erklären. Alternativ könnte die gesteigerte Effektivität der CXCR6-transduzierten CAR T-Zellen auch auf die CXCR6-vermittelte Adhäsion der T-Zellen an die Tumorzellen (Lesch et al. 2021) oder auf das verlängerte Überleben der CXCR6-modifizierten T-Zellen im Tumormilieu (Di Pilato et al. 2021) zurückzuführen sein. Ein tatsächlicher Beitrag eines oder mehrerer dieser Mechanismen zur beobachteten Wirkungssteigerung der CXCR6-transduzierten CAR T-Zellen wurde in diesem Modell allerdings bisher nicht eindeutig nachgewiesen.

4.6 Translation des Therapieansatzes in anderen Tumorentitäten

CXCL16 ist nicht nur im Pankreaskarzinom exprimiert, sondern spielt in verschiedenen Tumorentitäten eine Rolle. Für Patienten mit kolorektalem Karzinom wurde gezeigt, dass CXCL16 im Vergleich zur gesunden Schleimhaut in tumorösem Gewebe überexprimiert wird (Hojo et al. 2007). Die starke Expression von CXCL16 in den Tumorzellen korrelierte dabei mit der gesteigerten Infiltration von CD4- und CD8-positiven T-Zellen (Hojo et al. 2007). Außerdem zeigten Patienten mit stark CXCL16-positiven kolorektalen Karzinomen, trotz vergleichbarer Tumorstadien, eine bessere Prognose als Patienten mit schwach CXCL16-positiven Tumoren (Hojo et al. 2007). Während CXCL16 beispielsweise auch im Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (Hald et al. 2015) und im Ovarialkarzinom (Gooden et al. 2014) nachgewiesen wurde,

korrelierte die CXCL16-Expression in diesen Studien nicht mit der Immunzellinfiltration der Tumore. In anderen Arbeiten zum Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (Hu et al. 2014) und zum Ovarialkarzinom (Mir et al. 2019) steigerte CXCL16 allerdings die Invasivität der Tumorzellen *in vitro*.

Aufgrund der weitverbreiteten Expression von CXCL16 in verschiedenen Tumoren, könnten CXCR6-modifizierte CAR T-Zellen womöglich in der Therapie verschiedener Krebsentitäten zur Anwendung kommen. Diese Hypothese wird von Versuchen der Arbeitsgruppe untermauert, die zeigen, dass die Infiltration von CXCR6-transduzierten T-Zellen in humane Ovarialkarzinomproben gesteigert ist (Lesch et al. 2021).

4.7 Multimodale Therapie mit CXCR6-transduzierten CAR T-Zellen

Grundsätzlich wäre die synergistische Kombination von CXCR6-transduzierten CAR T-Zellen mit anderen, bereits etablierten Therapiemodalitäten denkbar. Beispielsweise konnte in einem murinen Brustkrebsmodell gezeigt werden, dass die Bestrahlung des Tumors zur verstärkten Expression von CXCL16 in Tumorzellen und Tumorgefäßen führt (Matsumura et al. 2008). Zudem schien die Tumordinfiltration von CD8-positiven T-Zellen in diesem Modell hauptsächlich CXCR6-abhängig zu sein (Matsumura et al. 2008). In einem präklinischen Lungenkrebsmodell steigerte die präkonditionierende Chemotherapie mit Oxaliplatin und Cyclophosphamid die Tumordinfiltration von CAR T-Zellen (Srivastava et al. 2021). Dabei war vor allem die initiale Rekrutierung von CAR T-Zellen partiell CXCR6-abhängig. Als Quelle für CXCL16 identifizierten die Autoren Tumor-infiltrierende Makrophagen. Die rekrutierten CAR T-Zellen führten mutmaßlich zur Aktivierung weiterer Tumor-infiltrierender Makrophagen, welche durch die Produktion von CXCL9 und CXCL10 zusätzlich CXCR3-positive CAR T-Zellen anlockten.

Allerdings wurde die gesteigerte Tumordinfiltration der CAR T-Zellen von der Hochregulation von *programmed cell death 1 ligand 1* (PD-L1) auf Tumormakrophagen begleitet, wodurch die antitumorale Wirksamkeit der CAR T-Zellen unterdrückt wurde. Die zusätzliche Blockade dieses Immuncheckpoints zeigte demnach synergistische Wirkung und verbesserte die Tumorkontrolle deutlich (Srivastava et al. 2021). Demnach könnten CXCR6-transduzierte CAR T-Zellen möglicherweise einen

attraktiven Kombinationspartner in der multimodalen Therapie verschiedener Tumorentitäten darstellen.

4.8 Strategien zur Überwindung weiterer Limitationen

CXCR6-transduzierte T-Zellen haben in verschiedenen Tumormodellen erhebliche Wirksamkeit gezeigt (Lesch et al. 2021). Ungeachtet der verbesserten Akkumulation von CXCR6-positiven CAR T-Zellen in CXCL16-positiven Tumoren bleiben in dieser Arbeit jedoch einige wesentliche Limitationen der CAR T-Zelltherapie weiterhin unadressiert.

Wenn CXCL16 nicht ausreichend im Tumorgewebe exprimiert wird, ist die Modifikation der CAR T-Zellen mit CXCR6 nicht geeignet, um die Tumordinfiltration der T-Zellen zu verbessern. Für einige Chemokinrezeptoren wurde bereits gezeigt, dass sie die Infiltration von CAR T-Zellen in eine Vielzahl verschiedener Tumorentitäten steigern (Cadilha et al. 2021, Craddock et al. 2010, Di Stasi et al. 2009, Jin et al. 2021, Jin et al. 2019, Li et al. 2021, Liu et al. 2020a, Moon et al. 2011, Wang et al. 2021, Whilding et al. 2019). Dementsprechend scheint es ratsam, das Chemokinrezeptorprofil der CAR T-Zellen möglichst individuell an die jeweils vorhandenen Chemokine im Tumormilieu anzupassen, um die präferenzielle Akkumulation der CAR T-Zellen im Tumor zu gewährleisten. Darüber hinaus können CAR T-Zellen mit Enzymen ausgestattet werden, um die Degradation von Bestandteilen der extrazellulären Matrix und damit die T-Zellinfiltration Stroma-reicher Tumore zu ermöglichen (Caruana et al. 2015). Beispielsweise verbesserte die retrovirale Expression von Heparanase in CAR T-Zellen deren Tumordinfiltration in einer präklinischen Studie (Caruana et al. 2015).

Der Verlust des Zielantigens auf den Tumorzellen würde auch CXCR6-transduzierte CAR T-Zellen ihrer Wirksamkeit berauben. Dieses Problem kann unter Umständen durch die Generation von CAR T-Zellen, welche mehr als ein Tumor-exprimiertes Antigen erkennen, überwunden werden (Ruella et al. 2016). Zudem ermöglichte die Verwendung multispezifischer CAR T-Zellen in einer Arbeit die effektive Behandlung von Patienten-abgeleiteten Xenograft-Tumoren mit interindividuell heterogener Antigenexpression (Bielamowicz et al. 2018). Insgesamt scheint die kombinatorische Ausrichtung der CAR T-Zellspezifität daher eine vielversprechende Strategie zur Optimierung der CAR T-Zelltherapie zu sein.

Für die Funktion der CAR T-Zellen spielt sowohl die Optimierung der CAR Struktur (Stoiber et al. 2019) als auch die Auswahl der geeigneten T-Zellpopulation zur genetischen Modifikation (Wagner et al. 2020) eine wesentliche Rolle. Auch die Integrationsstelle des CAR-Transgens im Genom kann die Effektivität von CAR T-Zellen maßgeblich beeinflussen (Eyquem et al. 2017, Fraietta et al. 2018). Die gezielte Integration eines CD19-gerichteten Rezeptors in den genetischen Locus der T-Zellrezeptor α -Kette führte beispielsweise zur Generation wesentlich potenterer CAR T-Zellen (Eyquem et al. 2017).

Das immunsuppressive Tumormilieu stellt eine beachtliche Herausforderung für transferierte CAR T-Zellen dar (Wagner et al. 2020). Die Kombination von CAR T-Zellen mit Checkpoint-Inhibitoren stellt deshalb eine pathophysiologisch gut begründete Strategie zur Verbesserung der CAR T-Zelltherapie dar (Adusumilli et al. 2021). Weiterhin können CAR T-Zellen mit immunstimulatorischen Zytokinen beladen werden, um die Tumorumgebung zugunsten einer effektiven antitumoralen Immunantwort umzuprogrammieren (Hoyos et al. 2010, Koneru et al. 2015, Yeku et al. 2017). Zudem können CAR T-Zellen mit sogenannten dominant-negativen Rezeptoren ausgestattet werden, welche die immunsuppressiven Einflüsse der Tumorumgebung abmildern. Diese Rezeptoren binden zwar an ihre jeweiligen Liganden, geben aber aufgrund der gekürzten intrazellulären Domäne das inhibitorische Signal nicht an die T-Zelle weiter (Cadilha et al. 2021, Cherkassky et al. 2016). Außerdem können T-Zell-inhibitorische Signale durch den Einsatz von chimären Fusionsmolekülen in T-Zell-aktivierende Signale umgewandelt werden. Beispielsweise kann durch einen Fusionsrezeptor aus extrazellulärem *programmed cell death protein 1* (PD-1) und intrazellulärem CD28 ein inhibitorisches *programmed cell death 1 ligand 1* (PD-L1)-Signal in ein stimulatorisches CD28-Signal umgewandelt werden (Kobold et al. 2015).

Die potenten Effektorfunktionen der CAR T-Zellen und das damit verbunden Potential für schwere Nebenwirkungen, erfordern außerdem Maßnahmen, um die Sicherheit der Therapie zu gewährleisten. Dahingehend können CAR T-Zellen mit Suizid-Genen ausgestattet werden, welche im Notfall die selektive Ablation der modifizierten Zellen ermöglichen (Hoyos et al. 2010, Jones et al. 2014, Koneru et al. 2015).

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die Fähigkeit von Tumorzellen sich an veränderte Umweltbedingungen anzupassen, erschwert wesentlich die Therapie von Krebserkrankungen. Daher scheint es ratsam diesen Erkrankungen mit einer ebenso anpassungsfähigen Therapiemodalität zu begegnen. Die Nutzung des körpereigenen Immunsystems zur Tumorzellbekämpfung ist in dieser Hinsicht besonders geeignet, um langanhaltende Erfolge zu erzielen (Robert et al. 2020). Während die CAR T-Zelltherapie die Behandlung bestimmter hämatologischer Krebserkrankungen revolutioniert hat, konnte dieser Erfolg bislang nicht in soliden Tumorentitäten reproduziert werden (Wagner et al. 2020).

Dennoch besitzt die CAR T-Zelltherapie aufgrund der vielfältigen Möglichkeiten zur gezielten Modifikation der T-Zellen enormes Potenzial. Das wachsende Verständnis für die wesentlichen Limitationen der Therapie ermöglicht die Entwicklung innovativer Strategien, um CAR T-Zellen effektiv im Kampf gegen solide Tumore zu unterstützen. Eine wesentliche Voraussetzung für die Wirksamkeit von CAR T-Zellen in soliden Tumoren ist deren ausreichende Infiltration ins Tumorgewebe (Slaney et al. 2014). Chemokinrezeptoren spielen in der Organdistribution von Immunzellen eine entscheidende Rolle (Zlotnik et al. 2012) und können deshalb zur Verbesserung der CAR T-Zellinfiltration in Tumore beitragen.

In der vorgelegten Arbeit steigerte die Überexpression des Chemokinrezeptors CXCR6 in Mesothelin-spezifischen CAR T-Zellen deren Migrationsfähigkeit zu CXCL16 *in vitro*, während die direkten antitumoralen Effektorfunktionen der T-Zellen im Wesentlichen unverändert blieben. *In vivo* verbesserte die CXCR6-Überexpression in CAR T-Zellen deren Effektivität in der Therapie CXCL16-exprimierender Tumore und verlängerte das Überleben der behandelten Mäuse. Diese Arbeit leistet somit einen kleinen Beitrag zum besseren Verständnis und zur Optimierung der CAR T-Zelltherapie für solide Tumore. Nichtsdestotrotz ist es wahrscheinlich, dass multiple Modifikationen der CAR T-Zellen nötig sind, um deren volles Potenzial in schwierig zu behandelnden Tumorentitäten zu realisieren und der Behandlung dieser komplexen Erkrankungen gerecht zu werden.

6 Literaturverzeichnis

Krebs in Deutschland für 2017/2018. 13. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2021

Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, Langversion 2.0, 2021, AWMF Registernummer: 032-0100L.

Abel S, Hundhausen C, Mentlein R, Schulte A, Berkhout TA, Broadway N, Hartmann D, Sedlacek R, Dietrich S, Muetze B, Schuster B, Kallen KJ, Saftig P, Rose-John S, Ludwig A. The transmembrane CXC-chemokine ligand 16 is induced by IFN-gamma and TNF-alpha and shed by the activity of the disintegrin-like metalloproteinase ADAM10. *J Immunol* 2004; 172:6362-72.

Adusumilli PS, Zauderer MG, Rivière I, Solomon SB, Rusch VW, O'Cearbhaill RE, Zhu A, Cheema W, Chintala NK, Halton E, Pineda J, Perez-Johnston R, Tan KS, Daly B, Araujo Filho JA, Ngai D, McGee E, Vincent A, Diamonte C, Sauter JL, Modi S, Sikder D, Senechal B, Wang X, Travis WD, Gönen M, Rudin CM, Brentjens RJ, Jones DR, Sadelain M. A phase I trial of regional Mesothelin-targeted CAR T-cell therapy in patients with malignant pleural disease, in combination with the anti-PD-1 agent Pembrolizumab. *Cancer Discov* 2021; 11:2748-63.

Ajina A, Maher J. Strategies to address chimeric antigen receptor tonic signaling. *Mol Cancer Ther* 2018; 17:1795-815.

Argani P, Iacobuzio-Donahue C, Ryu B, Rosty C, Goggins M, Wilentz RE, Murugesan SR, Leach SD, Jaffee E, Yeo CJ, Cameron JL, Kern SE, Hruban RH. Mesothelin is overexpressed in the vast majority of ductal adenocarcinomas of the pancreas: identification of a new pancreatic cancer marker by serial analysis of gene expression (SAGE). *Clin Cancer Res* 2001; 7:3862-8.

Beatty GL, Haas AR, Maus MV, Torigian DA, Soulen MC, Plesa G, Chew A, Zhao Y, Levine BL, Albelda SM, Kalos M, June CH. Mesothelin-specific chimeric antigen receptor mRNA-engineered T cells induce anti-tumor activity in solid malignancies. *Cancer Immunol Res* 2014; 2:112-20.

Beatty GL, O'Hara MH, Lacey SF, Torigian DA, Nazimuddin F, Chen F, Kulikovskaya IM, Soulen MC, McGarvey M, Nelson AM, Gladney WL, Levine BL, Melenhorst JJ, Plesa G, June CH. Activity of Mesothelin-specific chimeric antigen receptor T cells against pancreatic carcinoma metastases in a phase 1 trial. *Gastroenterology* 2018; 155:29-32.

Benmebarek MR, Karches CH, Cadilha BL, Lesch S, Endres S, Kobold S. Killing mechanisms of chimeric antigen receptor (CAR) T cells. *Int J Mol Sci* 2019; 20.

Bernhard H, Neudorfer J, Gebhard K, Conrad H, Hermann C, Nährig J, Fend F, Weber W, Busch DH, Peschel C. Adoptive transfer of autologous, HER2-specific, cytotoxic T lymphocytes for the treatment of HER2-overexpressing breast cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2008; 57:271-80.

Bielamowicz K, Fousek K, Byrd TT, Samaha H, Mukherjee M, Aware N, Wu MF, Orange JS, Sumazin P, Man TK, Joseph SK, Hegde M, Ahmed N. Trivalent CAR T cells overcome interpatient antigenic variability in glioblastoma. *Neuro Oncol* 2018; 20:506-18.

Bird RE, Hardman KD, Jacobson JW, Johnson S, Kaufman BM, Lee SM, Lee T, Pope SH, Riordan GS, Whitlow M. Single-chain antigen-binding proteins. *Science* 1988; 242:423-6.

Brown CE, Aguilar B, Starr R, Yang X, Chang WC, Weng L, Chang B, Sarkissian A, Brito A, Sanchez JF, Ostberg JR, D'Apuzzo M, Badie B, Barish ME, Forman SJ. Optimization of IL13R α 2-targeted chimeric antigen receptor T cells for improved anti-tumor efficacy against glioblastoma. *Mol Ther* 2018; 26:31-44.

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

Cadilha BL, Benmebarek MR, Dorman K, Oner A, Lorenzini T, Obeck H, Vanttinen M, Di Pilato M, Pruessmann JN, Stoiber S, Huynh D, Märkl F, Seifert M, Manske K, Suarez-Gosalvez J, Zeng Y, Lesch S, Karches CH, Heise C, Gottschlich A, Thomas M, Marr C, Zhang J, Pandey D, Feuchtinger T, Subklewe M, Mempel TR, Endres S, Kobold S. Combined tumor-directed recruitment and protection from immune suppression enable CAR T cell efficacy in solid tumors. *Sci Adv* 2021; 7.

Cappell KM, Kochenderfer JN. A comparison of chimeric antigen receptors containing CD28 versus 4-1BB costimulatory domains. *Nat Rev Clin Oncol* 2021; 18:715-27.

Carpenito C, Milone MC, Hassan R, Simonet JC, Lakhai M, Suhoski MM, Varela-Rohena A, Haines KM, Heitjan DF, Albelda SM, Carroll RG, Riley JL, Pastan I, June CH. Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106:3360-5.

Caruana I, Savoldo B, Hoyos V, Weber G, Liu H, Kim ES, Ittmann MM, Marchetti D, Dotti G. Heparanase promotes tumor infiltration and antitumor activity of CAR-redirected T lymphocytes. *Nat Med* 2015; 21:524-9.

Chang K, Pai LH, Batra JK, Pastan I, Willingham MC. Characterization of the antigen (CAK1) recognized by monoclonal antibody K1 present on ovarian cancers and normal mesothelium. *Cancer Res* 1992a; 52:181-6.

Chang K, Pastan I, Willingham MC. Isolation and characterization of a monoclonal antibody, K1, reactive with ovarian cancers and normal mesothelium. *Int J Cancer* 1992b; 50:373-81.

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

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

Chowdhury PS, Pastan I. Improving antibody affinity by mimicking somatic hypermutation in vitro. *Nat Biotechnol* 1999; 17:568-72.

Clemente CG, Mihm MC, Jr., Bufalino R, Zurrida S, Collini P, Cascinelli N. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer* 1996; 77:1303-10.

Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y, Adenis A, Raoul J-L, Gourgou-Bourgade S, de la Fouchardière C, Bennouna J, Bachet J-B, Khemissa-Akouz F, Péré-Vergé D, Delbaldo C, Assenat E, Chauffert B, Michel P, Montoto-Grillot C, Ducreux M. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med* 2011; 364:1817-25.

Conroy T, Hammel P, Hebbar M, Ben Abdelghani M, Wei AC, Raoul J-L, Choné L, Francois E, Artru P, Biagi JJ, Lecomte T, Assenat E, Faroux R, Ychou M, Volet J, Sauvanet A, Breysacher

G, Di Fiore F, Cripps C, Kavan P, Texereau P, Bouhier-Leporrier K, Khemissa-Akouz F, Legoux J-L, Juzyna B, Gourgou S, O'Callaghan CJ, Jouffroy-Zeller C, Rat P, Malka D, Castan F, Bachet J-B. FOLFIRINOX or gemcitabine as adjuvant therapy for pancreatic cancer. *N Engl J Med* 2018; 379:2395-406.

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

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

Day C, Patel R, Guillen C, Wardlaw AJ. The chemokine CXCL16 is highly and constitutively expressed by human bronchial epithelial cells. *Exp Lung Res* 2009; 35:272-83.

Deng HK, Unutmaz D, KewalRamani VN, Littman DR. Expression cloning of new receptors used by simian and human immunodeficiency viruses. *Nature* 1997; 388:296-300.

DePeaux K, Delgoffe GM. Metabolic barriers to cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2021; 21:785-97.

Di Pilato M, Kfuri-Rubens R, Pruessmann JN, Ozga AJ, Messemaker M, Cadilha BL, Sivakumar R, Cianciaruso C, Warner RD, Marangoni F, Carrizosa E, Lesch S, Billingsley J, Perez-Ramos D, Zavala F, Rheinbay E, Luster AD, Gerner MY, Kobold S, Pittet MJ, Mempel TR. CXCR6 positions cytotoxic T cells to receive critical survival signals in the tumor microenvironment. *Cell* 2021; 184:4512-30.e22.

Di Stasi A, De Angelis B, Rooney CM, Zhang L, Mahendravada A, Foster AE, Heslop HE, Brenner MK, Dotti G, Savoldo B. T lymphocytes coexpressing CCR4 and a chimeric antigen receptor targeting CD30 have improved homing and antitumor activity in a Hodgkin tumor model. *Blood* 2009; 113:6392-402.

Donnelly MLL, Luke G, Mehrotra A, Li X, Hughes LE, Gani D, Ryan MD. Analysis of the aphthovirus 2A/2B polyprotein 'cleavage' mechanism indicates not a proteolytic reaction, but a novel translational effect: a putative ribosomal 'skip'. *J Gen Virol* 2001; 82:1013-25.

Dudley ME, Wunderlich JR, Shelton TE, Even J, Rosenberg SA. Generation of tumor-infiltrating lymphocyte cultures for use in adoptive transfer therapy for melanoma patients. *J Immunother* 2003; 26:332-42.

Engels B, Cam H, Schüler T, Indraccolo S, Gladow M, Baum C, Blankenstein T, Uckert W. Retroviral vectors for high-level transgene expression in T lymphocytes. *Hum Gene Ther* 2003; 14:1155-68.

Eshhar Z, Waks T, Gross G, Schindler DG. Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90:720-4.

Eyquem J, Mansilla-Soto J, Giavridis T, van der Stegen SJ, Hamieh M, Cunanan KM, Odak A, Gönen M, Sadelain M. Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection. *Nature* 2017; 543:113-7.

Feng K, Liu Y, Guo Y, Qiu J, Wu Z, Dai H, Yang Q, Wang Y, Han W. Phase I study of chimeric antigen receptor modified T cells in treating HER2-positive advanced biliary tract cancers and pancreatic cancers. *Protein Cell* 2018; 9:838-47.

Fraietta JA, Nobles CL, Sammons MA, Lundh S, Carty SA, Reich TJ, Cogdill AP, Morrissette JJD, DeNizio JE, Reddy S, Hwang Y, Gohil M, Kulikovskaya I, Nazimuddin F, Gupta M, Chen F, Everett JK, Alexander KA, Lin-Shiao E, Gee MH, Liu X, Young RM, Ambrose D, Wang Y, Xu J, Jordan MS, Marcucci KT, Levine BL, Garcia KC, Zhao Y, Kalos M, Porter DL, Kohli RM, Lacey SF, Berger SL, Bushman FD, June CH, Melenhorst JJ. Disruption of TET2 promotes the therapeutic efficacy of CD19-targeted T cells. *Nature* 2018; 558:307-12.

Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, Zinzindohoué F, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Pagès F. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006; 313:1960-4.

Ghani K, Wang X, de Campos-Lima PO, Olszewska M, Kamen A, Rivière I, Caruso M. Efficient human hematopoietic cell transduction using RD114- and GALV-pseudotyped retroviral vectors produced in suspension and serum-free media. *Hum Gene Ther* 2009; 20:966-74.

Gooden MJ, Wiersma VR, Boerma A, Leffers N, Boezen HM, ten Hoor KA, Hollema H, Walenkamp AM, Daemen T, Nijman HW, Bremer E. Elevated serum CXCL16 is an independent predictor of poor survival in ovarian cancer and may reflect pro-metastatic ADAM protease activity. *Br J Cancer* 2014; 110:1535-44.

Gough PJ, Garton KJ, Wille PT, Rychlewski M, Dempsey PJ, Raines EW. A disintegrin and metalloproteinase 10-mediated cleavage and shedding regulates the cell surface expression of CXC chemokine ligand 16. *J Immunol* 2004; 172:3678-85.

Gutwein P, Abdel-Bakky MS, Schramme A, Doberstein K, Kämpfer-Kolb N, Amann K, Hauser IA, Obermüller N, Bartel C, Abdel-Aziz AA, El Sayed el SM, Pfeilschifter J. CXCL16 is expressed in podocytes and acts as a scavenger receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Am J Pathol* 2009; 174:2061-72.

Haas AR, Tanyi JL, O'Hara MH, Gladney WL, Lacey SF, Torigian DA, Soulen MC, Tian L, McGarvey M, Nelson AM, Farabaugh CS, Moon E, Levine BL, Melenhorst JJ, Plesa G, June CH, Albelda SM, Beatty GL. Phase I study of lentiviral-transduced chimeric antigen receptor-modified T cells recognizing mesothelin in advanced solid cancers. *Mol Ther* 2019; 27:1919-29.

Hald SM, Kiselev Y, Al-Saad S, Richardsen E, Johannessen C, Eilertsen M, Kilvaer TK, Al-Shibli K, Andersen S, Busund LT, Bremnes RM, Donnem T. Prognostic impact of CXCL16 and CXCR6 in non-small cell lung cancer: combined high CXCL16 expression in tumor stroma and cancer cells yields improved survival. *BMC Cancer* 2015; 15:441.

Heckman KL, Pease LR. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nat Protoc* 2007; 2:924-32.

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

Hoyos V, Savoldo B, Quintarelli C, Mahendravada A, Zhang M, Vera J, Heslop HE, Rooney CM, Brenner MK, Dotti G. Engineering CD19-specific T lymphocytes with interleukin-15 and a suicide gene to enhance their anti-lymphoma/leukemia effects and safety. *Leukemia* 2010; 24:1160-70.

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

Huston JS, Levinson D, Mudgett-Hunter M, Tai MS, Novotný J, Margolies MN, Ridge RJ, Brucoleri RE, Haber E, Crea R, et al. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85:5879-83.

Iwamura T, Katsuki T, Ide K. Establishment and characterization of a human pancreatic cancer cell line (SUIT-2) producing carcinoembryonic antigen and carbohydrate antigen 19-9. *Jpn J Cancer Res* 1987; 78:54-62.

Jin L, Cao L, Zhu Y, Cao J, Li X, Zhou J, Liu B, Zhao T. Enhance anti-lung tumor efficacy of chimeric antigen receptor-T cells by ectopic expression of C–C motif chemokine receptor 6. *Sci Bull* 2021; 66:803-12.

Jin L, Tao H, Karachi A, Long Y, Hou AY, Na M, Dyson KA, Grippin AJ, Deleyrolle LP, Zhang W, Rajon DA, Wang QJ, Yang JC, Kresak JL, Sayour EJ, Rahman M, Bova FJ, Lin Z, Mitchell DA, Huang J. CXCR1- or CXCR2-modified CAR T cells co-opt IL-8 for maximal antitumor efficacy in solid tumors. *Nat Commun* 2019; 10:4016.

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

Joyce JA, Fearon DT. T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. *Science* 2015; 348:74-80.

June CH, Sadelain M. Chimeric antigen receptor therapy. *N Engl J Med* 2018; 379:64-73.

Katz SC, Point GR, Cunetta M, Thorn M, Guha P, Espat NJ, Boutros C, Hanna N, Junghans RP. Regional CAR-T cell infusions for peritoneal carcinomatosis are superior to systemic delivery. *Cancer Gene Ther* 2016; 23:142-8.

Kawalekar OU, O'Connor RS, Fraietta JA, Guo L, McGettigan SE, Posey AD, Jr., Patel PR, Guedan S, Scholler J, Keith B, Snyder NW, Blair IA, Milone MC, June CH. Distinct signaling of coreceptors regulates specific metabolism pathways and impacts memory development in CAR T cells. *Immunity* 2016; 44:380-90.

Kershaw MH, Westwood JA, Parker LL, Wang G, Eshhar Z, Mavroukakis SA, White DE, Wunderlich JR, Canevari S, Rogers-Freezer L, Chen CC, Yang JC, Rosenberg SA, Hwu P. A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12:6106-15.

Kitamura T, Koshino Y, Shibata F, Oki T, Nakajima H, Nosaka T, Kumagai H. Retrovirus-mediated gene transfer and expression cloning: powerful tools in functional genomics. *Exp Hematol* 2003; 31:1007-14.

Kobold S, Grassmann S, Chaloupka M, Lampert C, Wenk S, Kraus F, Rapp M, Düwell P, Zeng Y, Schmollinger JC, Schnurr M, Endres S, Rothenfuß S. Impact of a new fusion receptor on PD-1-mediated immunosuppression in adoptive T cell therapy. *J Natl Cancer Inst* 2015; 107.

Koenen A, Babendreyer A, Schumacher J, Pasqualon T, Schwarz N, Seifert A, Deupi X, Ludwig A, Dreytmüller D. The DRF motif of CXCR6 as chemokine receptor adaptation to adhesion. *PLoS One* 2017; 12:e0173486.

Koneru M, Purdon TJ, Spriggs D, Koneru S, Brentjens RJ. IL-12 secreting tumor-targeted chimeric antigen receptor T cells eradicate ovarian tumors in vivo. *Oncoimmunology* 2015; 4:e994446.

Krebber A, Bornhauser S, Burmester J, Honegger A, Willuda J, Bosshard HR, Plückthun A. Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system. *J Immunol Methods* 1997; 201:35-55.

Künkele A, Johnson AJ, Rolczynski LS, Chang CA, Hoglund V, Kelly-Spratt KS, Jensen MC. Functional tuning of CARs reveals signaling threshold above which CD8⁺ CTL antitumor potency is attenuated due to cell Fas-FasL-dependent AICD. *Cancer Immunol Res* 2015; 3:368-79.

Lamers CH, Sleijfer S, van Steenbergen S, van Elzakker P, van Krimpen B, Groot C, Vulto A, den Bakker M, Oosterwijk E, Debets R, Gratama JW. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with CAIX CAR-engineered T cells: clinical evaluation and management of on-target toxicity. *Mol Ther* 2013; 21:904-12.

Lesch S, Blumenberg V, Stoiber S, Gottschlich A, Ogonek J, Cadilha BL, Dantes Z, Rataj F, Dorman K, Lutz J, Karches CH, Heise C, Kurzay M, Larimer BM, Grassmann S, Rapp M, Nottebrock A, Kruger S, Tokarew N, Metzger P, Hoerth C, Benmebarek MR, Dhoqina D, Grünmeier R, Seifert M, Oener A, Umut Ö, Joaquina S, Vimeux L, Tran T, Hank T, Baba T, Huynh D, Megens RTA, Janssen KP, Jastroch M, Lamp D, Ruehland S, Di Pilato M, Pruessmann JN, Thomas M, Marr C, Ormanns S, Reischer A, Hristov M, Tartour E, Donnadieu E, Rothenfusser S, Duewell P, König LM, Schnurr M, Subklewe M, Liss AS, Halama N, Reichert M, Mempel TR, Endres S, Kobold S. T cells armed with C-X-C chemokine receptor type 6 enhance adoptive cell therapy for pancreatic tumours. *Nat Biomed Eng* 2021; 5:1246-60.

Li G, Guo J, Zheng Y, Ding W, Han Z, Qin L, Mo W, Luo M. CXCR5 guides migration and tumor eradication of anti-EGFR chimeric antigen receptor T cells. *Mol Ther Oncolytics* 2021; 22:507-17.

Liao F, Alkhatib G, Peden KW, Sharma G, Berger EA, Farber JM. STRL33, A novel chemokine receptor-like protein, functions as a fusion cofactor for both macrophage-tropic and T cell line-tropic HIV-1. *J Exp Med* 1997; 185:2015-23.

Liu G, Rui W, Zheng H, Huang D, Yu F, Zhang Y, Dong J, Zhao X, Lin X. CXCR2-modified CAR-T cells have enhanced trafficking ability that improves treatment of hepatocellular carcinoma. *Eur J Immunol* 2020a; 50:712-24.

Liu Y, Guo Y, Wu Z, Feng K, Tong C, Wang Y, Dai H, Shi F, Yang Q, Han W. Anti-EGFR chimeric antigen receptor-modified T cells in metastatic pancreatic carcinoma: A phase I clinical trial. *Cytotherapy* 2020b; 22:573-80.

Liu Z, Chen O, Wall JBJ, Zheng M, Zhou Y, Wang L, Vaseghi HR, Qian L, Liu J. Systematic comparison of 2A peptides for cloning multi-genes in a polycistronic vector. *Sci Rep* 2017; 7:2193.

Loetscher M, Amara A, Oberlin E, Brass N, Legler D, Loetscher P, D'Apuzzo M, Meese E, Rousset D, Virelizier JL, Baggiolini M, Arenzana-Seisdedos F, Moser B. TYMSTR, a putative chemokine receptor selectively expressed in activated T cells, exhibits HIV-1 coreceptor function. *Curr Biol* 1997; 7:652-60.

Maher J, Brentjens RJ, Gunset G, Rivière I, Sadelain M. Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCRzeta /CD28 receptor. *Nat Biotechnol* 2002; 20:70-5.

Mantovani A. The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunol Today* 1999; 20:254-7.

Martinez M, Moon EK. CAR T cells for solid tumors: New strategies for finding, infiltrating, and surviving in the tumor microenvironment. *Frontiers in Immunology* 2019; 10.

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

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

Mir H, Kaur G, Kapur N, Bae S, Lillard JW, Jr., Singh S. Higher CXCL16 exodomain is associated with aggressive ovarian cancer and promotes the disease by CXCR6 activation and MMP modulation. *Sci Rep* 2019; 9:2527.

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

Morello A, Sadelain M, Adusumilli PS. Mesothelin-targeted CARs: Driving T cells to solid tumors. *Cancer Discov* 2016; 6:133-46.

Morgan RA, 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.

Morgan RA, Yang JC, Kitano M, Dudley ME, Laurencot CM, Rosenberg SA. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol Ther* 2010; 18:843-51.

Muthuswamy R, McGray AR, Battaglia S, He W, Miliotto A, Eppolito C, Matsuzaki J, Takemasa T, Koya R, Chodon T, Lichty BD, Shrikant P, Odunsi K. CXCR6 by increasing retention of memory CD8(+) T cells in the ovarian tumor microenvironment promotes immunosurveillance and control of ovarian cancer. *J Immunother Cancer* 2021; 9.

Nagarsheth N, Wicha MS, Zou W. Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2017; 17:559-72.

Naito Y, Saito K, Shiiba K, Ohuchi A, Saigenji K, Nagura H, Ohtani H. CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58:3491-4.

Nomiyama H, Yoshie O. Functional roles of evolutionary conserved motifs and residues in vertebrate chemokine receptors. *J Leukoc Biol* 2015; 97:39-47.

Peper JK, Schuster H, Löffler MW, Schmid-Horch B, Rammensee HG, Stevanović S. An impedance-based cytotoxicity assay for real-time and label-free assessment of T-cell-mediated killing of adherent cells. *J Immunol Methods* 2014; 405:192-8.

Priceman SJ, Gerds EA, Tilakawardane D, Kennewick KT, Murad JP, Park AK, Jeang B, Yamaguchi Y, Yang X, Urak R, Weng L, Chang WC, Wright S, Pal S, Reiter RE, Wu AM, Brown CE, Forman SJ. Co-stimulatory signaling determines tumor antigen sensitivity and persistence

of CAR T cells targeting PSCA+ metastatic prostate cancer. *Oncoimmunology* 2018; 7:e1380764.

Quante AS, Ming C, Rottmann M, Engel J, Boeck S, Heinemann V, Westphalen CB, Strauch K. Projections of cancer incidence and cancer-related deaths in Germany by 2020 and 2030. *Cancer Med* 2016; 5:2649-56.

Rabilloud T, Potier D, Pankaew S, Nozais M, Loosveld M, Payet-Bornet D. Single-cell profiling identifies pre-existing CD19-negative subclones in a B-ALL patient with CD19-negative relapse after CAR-T therapy. *Nat Commun* 2021; 12:865.

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

Robert C. A decade of immune-checkpoint inhibitors in cancer therapy. *Nat Commun* 2020; 11:3801-.

Rosenberg SA, Packard BS, Aebbersold PM, Solomon D, Topalian SL, Toy ST, Simon P, Lotze MT, Yang JC, Seipp CA, et al. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *N Engl J Med* 1988; 319:1676-80.

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

Ruella M, Barrett DM, Kenderian SS, Shestova O, Hofmann TJ, Perazzelli J, Klichinsky M, Aikawa V, Nazimuddin F, Kozłowski M, Scholler J, Lacey SF, Melenhorst JJ, Morrissette JJ, Christian DA, Hunter CA, Kalos M, Porter DL, June CH, Grupp SA, Gill S. Dual CD19 and CD123 targeting prevents antigen-loss relapses after CD19-directed immunotherapies. *J Clin Invest* 2016; 126:3814-26.

Salmon H, Franciszkiewicz K, Damotte D, Dieu-Nosjean MC, Validire P, Trautmann A, Mami-Chouaib F, Donnadieu E. Matrix architecture defines the preferential localization and migration of T cells into the stroma of human lung tumors. *J Clin Invest* 2012; 122:899-910.

Salter AI, Ivey RG, Kennedy JJ, Voillet V, Rajan A, Alderman EJ, Voytovich UJ, Lin C, Sommermeyer D, Liu L, Whiteaker JR, Gottardo R, Paulovich AG, Riddell SR. Phosphoproteomic analysis of chimeric antigen receptor signaling reveals kinetic and quantitative differences that affect cell function. *Sci Signal* 2018; 11.

Savoldo B, Ramos CA, Liu E, Mims MP, Keating MJ, Carrum G, Kamble RT, Bollard CM, Gee AP, Mei Z, Liu H, Grilley B, Rooney CM, Heslop HE, Brenner MK, Dotti G. CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells in lymphoma patients. *J Clin Invest* 2011; 121:1822-6.

Schramme A, Abdel-Bakky MS, Gutwein P, Obermüller N, Baer PC, Hauser IA, Ludwig A, Gauer S, Schäfer L, Sobkowiak E, Altevogt P, Koziolok M, Kiss E, Gröne HJ, Tikkanen R, Goren I, Radeke H, Pfeilschifter J. Characterization of CXCL16 and ADAM10 in the normal and transplanted kidney. *Kidney Int* 2008; 74:328-38.

Sharma P, Hu-Lieskovan S, Wargo JA, Ribas A. Primary, adaptive, and acquired resistance to cancer immunotherapy. *Cell* 2017; 168:707-23.

Shimaoka T, Nakayama T, Fukumoto N, Kume N, Takahashi S, Yamaguchi J, Minami M, Hayashida K, Kita T, Ohsumi J, Yoshie O, Yonehara S. Cell surface-anchored SR-PSOX/CXC

chemokine ligand 16 mediates firm adhesion of CXC chemokine receptor 6-expressing cells. *J Leukoc Biol* 2004; 75:267-74.

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

Speiser DE, Ho PC, Verdeil G. Regulatory circuits of T cell function in cancer. *Nat Rev Immunol* 2016; 16:599-611.

Srivastava S, Furlan SN, Jaeger-Ruckstuhl CA, Sarvothama M, Berger C, Smythe KS, Garrison SM, Specht JM, Lee SM, Amezcua RA, Voillet V, Muhunthan V, Yechan-Gunja S, Pillai SPS, Rader C, Houghton AM, Pierce RH, Gottardo R, Maloney DG, Riddell SR. Immunogenic chemotherapy enhances recruitment of CAR-T cells to lung tumors and improves antitumor efficacy when combined with checkpoint blockade. *Cancer Cell* 2021; 39:193-208.e10.

Stoiber S, Cadilha BL, Benmebarek MR, Lesch S, Endres S, Kobold S. Limitations in the design of chimeric antigen receptors for cancer therapy. *Cells* 2019; 8.

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

Szymczak-Workman AL, Vignali KM, Vignali DA. Design and construction of 2A peptide-linked multicistronic vectors. *Cold Spring Harb Protoc* 2012; 2012:199-204.

Türker Şener L, Albeniz G, Dinç B, Albeniz I. iCELLigence real-time cell analysis system for examining the cytotoxicity of drugs to cancer cell lines. *Exp Ther Med* 2017; 14:1866-70.

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

von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, Chiorean EG, Infante J, Moore M, Seay T, Tjulandin SA, Ma WW, Saleh MN, Harris M, Reni M, Dowden S, Laheru D, Bahary N, Ramanathan RK, Tabernero J, Hidalgo M, Goldstein D, Van Cutsem E, Wei X, Iglesias J, Renschler MF. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *N Engl J Med* 2013; 369:1691-703.

Wagner J, Wickman E, DeRenzo C, Gottschalk S. CAR T cell therapy for solid tumors: Bright future or dark reality? *Mol Ther* 2020; 28:2320-39.

Waldman AD, Fritz JM, Lenardo MJ. A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nat Rev Immunol* 2020; 20:651-68.

Wang Y, Wang J, Yang X, Yang J, Lu P, Zhao L, Li B, Pan H, Jiang Z, Shen X, Liang Z, Liang Y, Zhu H. Chemokine receptor CCR2b enhanced anti-tumor function of chimeric antigen receptor T cells targeting Mesothelin in a non-small-cell lung carcinoma model. *Front Immunol* 2021; 12:628906.

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

Whatcott CJ, Diep CH, Jiang P, Watanabe A, LoBello J, Sima C, Hostetter G, Shepard HM, Von Hoff DD, Han H. Desmoplasia in primary tumors and metastatic lesions of pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2015; 21:3561-8.

Whilding LM, Halim L, Draper B, Parente-Pereira AC, Zabinski T, Davies DM, Maher J. CAR T-cells targeting the integrin $\alpha\beta6$ and co-expressing the chemokine receptor CXCR2 demonstrate enhanced homing and efficacy against several solid malignancies. *Cancers (Basel)* 2019; 11.

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

Yeku OO, Purdon TJ, Koneru M, Spriggs D, Brentjens RJ. Armored CAR T cells enhance antitumor efficacy and overcome the tumor microenvironment. *Sci Rep* 2017; 7:10541.

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

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

Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000; 12:121-7.

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

7 Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 9: Abkürzungsverzeichnis

ADAM10	<i>A disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
CAR	Chimärer Antigenrezeptor
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
(c)DNA	(komplementäre) Desoxyribonukleinsäure
CXCL16	C-X-C-Motiv-Chemokinligand 16
CXCR6	C-X-C-Motiv-Chemokinrezeptor 6
ddH ₂ O	Doppelt-destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DRF	Asparaginsäure-Arginin-Phenylalanin
DRY	Asparaginsäure-Arginin-Tyrosin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EpCAM	<i>Epithelial cell adhesion molecule</i>
FBS	Fetales Kälberserum
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GSG	Glycin-Serin-Glycin
HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
HF	<i>High-fidelity</i>
IFN	Interferon
IL	Interleukin
LB	Luria/Miller
MEM	Minimal essential medium
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
(m)RNA	<i>(messenger) Ribonukleinsäure</i>
MSLN	Mesothelin
NEAA	Nicht-essentielle Aminosäurelösung
Ns	Nicht signifikant
NSG	NOD <i>scid</i> gamma
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PD-1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
PD-L1	<i>Programmed cell death 1 ligand 1</i>
PE	Phycoeritrin
RPMI	Roswell Park Memorial Institute

scFv	<i>Single-chain variable fragment</i>
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
TAE	Tris-Acetat EDTA
TIL	Tumor-infiltrierende Lymphozyten
TNF	Tumornekrosefaktor
UT T-Zellen	Untransduzierte T-Zellen
VH	<i>Heavy chain variable domain</i>
VL	<i>Light chain variable domain</i>
VLE	Very low endotoxin
ZVH	Zentrale Versuchstierhaltung

8 Publikationen

Einige Daten dieser Arbeit wurden bereits in ähnlicher Form in der Fachzeitschrift *Nature Biomedical Engineering* veröffentlicht (Lesch et al. 2021). Auf diesen Sachverhalt wird in der jeweiligen Abbildungslegende hingewiesen.

Originalarbeiten

Rataj F, Jacobi SJ, **Stoiber S**, Asang F, Ogonek J, Tokarew N, Cadilha BL, van Puijenbroek E, Heise C, Duewell P, Endres S, Klein C, Kobold S. High-affinity CD16-polymorphism and Fc-engineered antibodies enable activity of CD16-chimeric antigen receptor-modified T cells for cancer therapy. *Br J Cancer* 2019; 120(1):79-87.

Cadilha BL, Benmebarek MR, Dorman K, Oner A, Lorenzini T, Obeck H, Vanttinen M, Di Pilato M, Pruessmann JN, **Stoiber S**, Huynh D, Märkl F, Seifert M, Manske K, Suarez-Gosalvez J, Zeng Y, Lesch S, Karches CH, Heise C, Gottschlich A, Thomas M, Marr C, Zhang J, Pandey D, Feuchtinger T, Subklewe M, Mempel TR, Endres S, Kobold S. Combined tumor-directed recruitment and protection from immune suppression enable CAR T cell efficacy in solid tumors. *Sci Adv* 2021; 7.

Lesch S, Blumenberg V, **Stoiber S**, Gottschlich A, Ogonek J, Cadilha BL, Dantes Z, Rataj F, Dorman K, Lutz J, Karches CH, Heise C, Kurzay M, Larimer BM, Grassmann S, Rapp M, Nottebrock A, Kruger S, Tokarew N, Metzger P, Hoerth C, Benmebarek MR, Dhoqina D, Grünmeier R, Seifert M, Oener A, Umut Ö, Joaquina S, Vimeux L, Tran T, Hank T, Baba T, Huynh D, Megens RTA, Janssen KP, Jastroch M, Lamp D, Ruehland S, Di Pilato M, Pruessmann JN, Thomas M, Marr C, Ormanns S, Reischer A, Hristov M, Tartour E, Donnadieu E, Rothenfusser S, Duewell P, König LM, Schnurr M, Subklewe M, Liss AS, Halama N, Reichert M, Mempel TR, Endres S, Kobold S. T cells armed with C-X-C chemokine receptor type 6 enhance adoptive cell therapy for pancreatic tumours. *Nat Biomed Eng* 2021; 5:1246-60.

Benmebarek MR, Cadilha BL, Herrmann M, Lesch S, Schmitt S, **Stoiber S**, Darwich A, Augsberger C, Brauchle B, Rohrbacher L, Oner A, Seifert M, Schwerdtfeger M, Gottschlich A, Rataj F, Fenn NC, Klein C, Subklewe M, Endres S, Hopfner KP, Kobold S. A modular and controllable T cell therapy platform for acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2021; 35(8):2243-2257.

Übersichtsarbeiten

Stoiber S, Cadilha BL, Benmebarek MR, Lesch S, Endres S, Kobold S. Limitations in the design of chimeric antigen receptors for cancer therapy. *Cells* 2019; 8.

Lesch S, Benmebarek MR, Cadilha BL, **Stoiber S**, Subklewe M, Endres S, Kobold S. Determinants of response and resistance to CAR T cell therapy. *Semin Cancer Biol* 2020; 65:80-90.

Stoiber S, Cadilha B, Kobold S. Klinische Anwendung der CAR-T-Zell-Therapie. *Trillium Immunologie*, Heft 2/2020.

9 Danksagung

Diese Arbeit wäre ohne die Unterstützung der im Folgenden genannten Person nicht möglich gewesen.

Zunächst gilt mein Dank Prof. Dr. med. Sebastian Kobold. Für die vielfältigen Möglichkeiten zur uneingeschränkten Verfolgung wissenschaftlicher Hypothesen, das einzigartige Mentoring und nicht zuletzt für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe.

Ebenso gebührt mein Dank Prof. Dr. med. Stefan Endres. Für die herausragende Leitung der Abteilung für Klinische Pharmakologie, welche ohne dich nicht vorstellbar ist. Weiterhin möchte ich mich für die großartige Unterstützung und die hilfreichen Ratschläge auch Jahre nach dem Abschluss meiner experimentellen Tätigkeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt darüber hinaus Dr. Felicitas Stein, für das geduldige Heranführen an die Laborbank, die konstruktive Kritik und den unerschütterlichen Beistand in experimentellen Notsituationen.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Abteilung für Klinische Pharmakologie für die produktive Zusammenarbeit und die positive Atmosphäre bedanken.

Abschließend möchte ich meinen Freunden und meinen Eltern für die großzügige und bedingungslose Unterstützung danken, ihr wisst, was sie mir bedeutet.