

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie
Klinik der Universität München
Leiter: Prof. Dr. Stefan Endres

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

**Die kombinierte Expression der Chemokinrezeptoren CCR4 und
CXCR6 in CD8-positiven Ovalbumin-spezifischen
T-Lymphozyten zur Verbesserung der adoptiven T-Zell Therapie
in einem murinen Pankreaskarzinom-Modell**

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

vorgelegt von
Lena Vökl
aus Bayreuth

Jahr
2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Sebastian Kobold
Mitberichterstatter:	PD Dr. Georg Beyer PD Dr. Michael Haas
Mitbetreuung durch die promovierten Mitarbeiter:	Nicholas Tokarew, Ph.D.
Dekan:	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung:	21.12.2023

Für meine Mutter und Felix

Eidesstattliche Versicherung

Völkl, Lena

Name, Vorname

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

„Die kombinierte Expression der Chemokinrezeptoren CCR4 und CXCR6 in CD8-positiven Ovalbumin-spezifischen T-Lymphozyten zur Verbesserung der adoptiven T-Zell Therapie in einem murinen Pankreaskarzinom-Modell“

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

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

Regensburg, 08.01.2024

Ort, Datum

Lena Völkl

Unterschrift Doktorandin

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die Rolle des Immunsystems bei Tumorerkrankungen	1
1.2 Die adoptive T-Zell Therapie.....	3
1.3 Limitationen der adoptiven T-Zell Therapie bei soliden Tumoren.....	4
1.4 Die Rolle von Chemokinen und Chemokinrezeptoren in der anti-tumoralen Immunantwort	5
1.5 Hintergrund der Dissertationsarbeit	6
1.5.1 Die C-C motif chemokine receptor 4 (CCR4) – C-C motif chemokine ligand 22 (CCL22) – Achse als Angriffspunkt zur Verbesserung der anti-tumoralen Immunantwort	6
1.5.2 Die C-X-C motif chemokine ligand 16 (CXCL16) – C-X-C motif chemokine receptor 6 (CXCR6) – Achse als vielversprechender Ansatz bei der Verbesserung der adoptiven T-Zell Therapie.....	7
1.6 Das Pankreaskarzinom als Anwendungsbeispiel der adoptiven T-Zell Therapie.....	8
1.7 Zielsetzung und Fragestellung.....	9
2. Material und Methoden	11
2.1 Chemikalien und Reagenzien	11
2.2 Geräte und Kits	13
2.3 Puffer, Gele und Zellkulturmedien	14
2.4 Antikörper.....	16
2.5 Zytokine	16
2.6 Oligodesoxyribonukleotide	17
2.7 Versuchstiere, Zellkultur und Zellgewinnung	18
2.7.1 Virusproduzierende Zelllinien	18
2.7.2 Tumorzelllinien	19
2.7.3 Versuchstiere.....	19
2.7.4 Organentnahme zur Zellgewinnung	19
2.7.5 Zellkultivierung, Waschen und Zellzählung	19
2.7.5.1 Zellkultivierung	19
2.7.5.2 Waschen	20
2.7.5.3 Zellzählung.....	20
2.7.6 Zellgewinnung aus Milzen und Differenzierung zu CD8-positiven T-Lymphozyten	21
2.8 Klonierung.....	21
2.8.1 Polymerase-Kettenreaktion und Gelelektrophorese.....	21
2.8.2 Wahl des Vektors und Beschreibung der Konstrukte	21
2.8.3 Digestion.....	22

2.8.4 Ligation	23
2.8.5 Transformation, DNA-Extraktion, Sequenzierung und DNA-Amplifikation	23
2.8.5.1 Transformation	23
2.8.5.2 DNA-Extraktion.....	23
2.8.5.3 Sequenzierung	24
2.8.5.4 DNA-Amplifikation	24
2.9 Retrovirale Transduktion und Expansion primärer muriner T-Zellen sowie Generierung neuer, stabil virusproduzierender Zelllinien	24
2.9.1 Generierung neuer, stabil virusproduzierender Zelllinien und retrovirale Transduktion primärer muriner T-Zellen	24
2.9.2 Expansion primärer muriner T-Zellen	26
2.10 Durchflusszytometrie	26
2.11 Migrationsversuche	26
2.12 Zytotoxizitätsversuche	27
2.12.1 Lactatdehydrogenase assay.....	27
2.12.2 Interferon γ -enzyme-linked immunosorbent assay	28
2.13 Tierversuche	28
2.13.1 Etablierung der Tumore <i>in vivo</i>	28
2.14 Softwares	29
2.15 Statistische Analyse	29
3. Ergebnisse.....	30
3.1 Klonierung der Chemokinrezeptor-Konstrukte	30
3.2 Untersuchung der Aktivität und Zytotoxizität der transduzierten T-Zellen ..	31
3.2.1 Die transduzierten T-Zellen produzieren nach Kokulturen mit Tumorzellen $INF-\gamma$	31
3.2.2 Transduzierte tumorspezifische T-Zellen lysieren Tumorzellen	32
3.3 Chemokinrezeptor-transduzierte T-Zellen migrieren zu ihren korrespondierenden Liganden	33
3.4 Die Therapie mit Chemokinrezeptor-transduzierten T-Zellen führt zu einem reduzierten Tumorwachstum und höherem prozentualen Überleben im Mausmodell.....	35
4. Diskussion	39
4.1 Funktionalität der transduzierten T-Zellen	39
4.2 Migration als Angriffspunkt zur Verbesserung der adoptiven T-Zell Therapie	40
4.2.1 Die Nutzung von Chemokinen und von Zytokinen und ihren Rezeptoren zur Verbesserung der Migration zum Tumor	40
4.2.1.1 Die CCR4-CCL22- und CXCR6-CXCL16-Achse als Ansatz.....	40
4.2.1.2 Weitere Möglichkeiten zur Nutzung von Chemo- beziehungsweise Zytokinen und	

ihren Rezeptoren im Rahmen der adoptiven T-Zell Therapie	42
4.2.2 Weitere Ansätze zur Verbesserung der Tumordinfiltration.....	44
4.3 Die Kombination von CCR4 und CXCR6 im Mausmodell.....	45
4.4 Effekte der adoptiven T-Zell Therapie auf die Langzeitimmunität gegen Tumoren.....	48
4.5 Limitationen und Therapiesicherheit	49
5. Zusammenfassung	53
6. Literaturverzeichnis.....	55
7. Abkürzungsverzeichnis.....	68
8. Danksagung	70

1. Einleitung

1.1 Die Rolle des Immunsystems bei Tumorerkrankungen

Schon zu Anfang des 20. Jahrhunderts vertrat Paul Ehrlich die Idee, dass das Immunsystem zur Karzinomkontrolle beiträgt (Ehrlich 1908). Die genaue Rolle des Immunsystems bei Krebsentstehung und -ausbreitung blieb jedoch noch lange Zeit ungeklärt (Schreiber et al. 2011). Burnet und Thomas postulierten das Prinzip der Immun-„Überwachung“, welches besagt, dass Krebszellen selektiv von gesunden Zellen unterschieden und getötet werden können (Burnet 1957; Thomas 1959; Burnet 1964; Burnet 1970; Dunn et al. 2002; Kobold et al. 2018). Mehrere Studien konnten belegen, dass das Immunsystem neben Pathogenen auch maligne Zellen erkennen und bekämpfen kann (Dighe et al. 1994; Kaplan et al. 1998; Shankaran et al. 2001; Schreiber et al. 2011; Hashimoto et al. 2018). Heute nimmt man an, dass das Immunsystem einerseits das Tumorwachstum hemmen, andererseits eine Selektion von Krebszellen bewirken, beziehungsweise das Mikromilieu in der Tumorumgebung (englisch: *tumor microenvironment*, TME) zu Gunsten einer Malignomausbreitung beeinflussen kann (Shankaran et al. 2001; Schreiber et al. 2011).

Zu dieser ambivalenten Interaktion von Immunsystem und Tumor haben Schreiber et al. drei aufeinanderfolgende Phasen bei der Ausbreitung einer Krebserkrankung beschrieben:

- 1) Bei der „Elimination“ werden Tumorzellen durch das Immunsystem des Patienten zerstört, bevor diese klinisch in Erscheinung treten (Dunn et al. 2004; Schreiber et al. 2011). Um die Rolle des Immunsystems bei der Bekämpfung einer Krebserkrankung zu verstehen, eignet sich der Vergleich zu einer Infektion: *Cluster of differentiation* (CD) 8-positive T-Lymphozyten erkennen im Falle einer viralen Infektion Antigene und expandieren, wodurch neben zytotoxischen T-Lymphozyten (ZTL) zur Beseitigung der pathologischen Zellen auch Gedächtniszellen entstehen, die eine wichtige Rolle in der Langzeitimmunität spielen (Kaech et al. 2012).

- 2) Bei Persistenz einiger entarteter Zellen über diese erste Phase hinaus, stellt sich in der Folge das „Equilibrium“ ein: Eine Elimination des Tumors wird nicht erreicht, eine weitere Ausbreitung jedoch verhindert (Dunn et al. 2004; Schreiber et al. 2011).

- 3) In der letzten Phase, der „Escape“-Phase, kommt es zu einer Proliferation und Ausbreitung des Tumors. Gründe hierfür können ein durch Selektionsmechanismen des Immunsystems verändertes Tumorgewebe oder eine geschwächte Immunabwehr, ausgelöst durch zum Beispiel Immunseneszenz oder -suppression, sein (Dunn et al. 2004; Schreiber et al. 2011).

Vor allem bei einer Antigenpersistenz, wie sie bei chronischen Infektionen oder Krebsleiden auftritt, können CD8-positive T-Zellen in einen Zustand der Erschöpfung, die T-Zell-*exhaustion*, mit deutlich eingeschränkter Funktion verfallen (Day et al. 2006; Baitsch et al. 2011; Speiser et al. 2014; Wherry et al. 2015; Hashimoto et al. 2018). Die T-Zell-*exhaustion* tritt vermutlich zum Schutz des Organismus vor einer überschießenden Immunantwort auf und kann in der Folge zu einer ungenügenden Immunantwort und fehlenden Kontrolle von chronisch-infektiösen oder malignen Erkrankungen führen (Speiser et al. 2014; Hashimoto et al. 2018).

Dass all diese Überlegungen nicht nur theoretische, sondern auch klinische Relevanz besitzen, zeigte sich beim kolorektalen Karzinom: Prognostisch bedeutsam erwiesen sich dabei die Subgruppe, Menge und Verteilung lymphozytärer Zellen innerhalb des TME (Galon et al. 2006). So hat der *Immunoscore*, dem die Quantifizierung von Gedächtnis- und ZTL in Tumorkern- sowie invasiven Randbereichen zugrunde liegt, eine höhere prognostische Aussagekraft beim kolorektalen Karzinom als übliche, eher anatomisch orientierte Klassifikationen, wie zum Beispiel die *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*-, die *Union internationale contre le cancer (UICC)*- oder die *tumor, node, metastasis (TNM)*-Klassifikation (Galon et al. 2006; Mlecnik et al. 2011; Galon et al. 2012; Angell et al. 2013; Galon et al. 2014; Pagès et al. 2018). Eine ähnliche Assoziation zwischen ZTL-Infiltration und anti-tumoralem Effekt konnte auch in anderen Malignomen wie Brustkrebs, Zervixkarzinom und Glioblastom gezeigt werden (Galon et al. 2006; Piersma et al. 2007; Kim et al. 2013; Kmiecik et al. 2013).

1.2 Die adoptive T-Zell Therapie

Die adoptive T-Zell Therapie (AZT) beschreibt die Nutzung von T-Zellen zur direkten Bekämpfung von Malignomkrankungen (Rosenberg et al. 2015; Zhang et al. 2019). Sie basiert auf der Herstellung beziehungsweise Entnahme, Selektion und Vermehrung hochaktiver, Tumor-spezifischer Lymphozyten *ex vivo* (also außerhalb des Organismus) und der anschließenden Verabreichung an den Patienten (Dudley et al. 2003; Kalos et al. 2013; Rosenberg et al. 2015). Aufgrund der Tatsache, dass die dem Patienten verabreichten Zellen *in vivo* (also innerhalb des Organismus) zu einer Vermehrung und Persistenz und damit einer anhaltenden anti-tumoralen Immunantwort fähig sind, wird die AZT auch als eine „lebende“ Therapie bezeichnet (Rosenberg et al. 2015).

Die Modifikation der T-Zellen *ex vivo* ermöglicht eine Reduktion inhibitorischer Einflüsse im Gewebe des Patienten und gleichzeitig die prätherapeutische Beeinflussung des TME zur Optimierung des Therapie-Effekts (Rosenberg et al. 2015). So führen vorbereitende Maßnahmen auf die AZT, wie Chemotherapie oder Kombinationsbehandlungen mit zusätzlicher Ganzkörperbestrahlung, zu einer temporären Lymphozytendepletion und infolgedessen zu einer verbesserten T-Zell-Persistenz der Therapiezellen (Gattinoni et al. 2005; Restifo et al. 2012).

Tumor-spezifische T-Zellen können entweder als Tumor-infiltrierende Lymphozyten direkt aus dem Tumorgewebe entnommen, selektiv stimuliert und vermehrt oder mittels genetischer Modifikation von autologen T-Zellen mit Tumor-spezifischen T-Zell-Rezeptoren (TZR) beziehungsweise chimären Antigenrezeptoren (CAR) generiert werden (Eshhar et al. 2001; Restifo et al. 2012; Rosenberg et al. 2015). Durch die Nutzung der AZT in der Onkologie konnte unter anderem bei Lymphomen und Leukämien ein deutliches Therapieansprechen erzielt werden (Rosenberg et al. 2015; Turtle et al. 2016; Neelapu et al. 2017; Schuster et al. 2017; Maude et al. 2018).

Eine spezifische T-Zell-Immunität via AZT könnte zudem besonders in einem immunsupprimierten Patientenkollektiv mit Toleranz gegen Malignom- oder Infektions-assoziierte Antigene von Vorteil gegenüber anderen onkologischen Immuntherapieformen, beispielsweise Impfungen, sein (Kalos et al. 2013; Rosenberg et al. 2015). Anders als bei Impfungen müssen die Therapiezellen bei der AZT nämlich nicht durch den Organismus selbst aktiviert und expandiert werden (Kalos et al. 2013).

Als Beispiel für die Wirksamkeit der AZT in der Krebstherapie sind die anti-CD19 CAR T-Zellen zu nennen, welche aufgrund ihrer hohen Ansprechraten sowohl durch die *Food and drug administration* in den Vereinigten Staaten von Amerika (USA) als auch durch die Europäische Arzneimittel-Agentur in der Europäischen Union für bestimmte hämatologische Krebserkrankungen zugelassen wurden (Turtle et al. 2016; Neelapu et al. 2017; Schuster et al. 2017; European Medicines Agency 2018; Maude et al. 2018; O'Leary et al. 2019).

Trotz der oben genannten Erfolge sollten die möglichen Nebenwirkungen dieser Therapieform nicht vergessen werden: So können ein Zytokinsturm, welcher durch massive Freisetzung von Zytokinen ein dem *systemic inflammatory response syndrome* ähnliches Krankheitsbild hervorruft, sowie neurologische Nebenwirkungen therapielimitierend sein (Morgan et al. 2010; Kobold et al. 2018). Außerdem sollte erwähnt werden, dass die Herstellung solch neuartiger Therapien derzeit noch mit einem hohen Organisations- und Kostenaufwand verbunden ist (Kobold et al. 2018).

1.3 Limitationen der adoptiven T-Zell Therapie bei soliden Tumoren

Der Transport von ZTL zum Zielort einer infektiösen oder malignen Veränderung im Gewebe ist für eine funktionierende Immunreaktion essenziell (Slaney et al. 2014). Jedoch zeigt sich eine deutlich geringere Infiltration der ZTL in das Tumorgewebe als in entzündliche oder infektiöse Foci (Bellone et al. 2013; Slaney et al. 2014). Dabei muss man das komplexe Zusammenspiel von Tumor-, Endothel- sowie Immunzellen, Fibroblasten, Blut- und Lymphgefäßen beachten, sowie dessen Beeinflussung durch Zytokine und zelluläre Stoffwechselprodukte (Angell et al. 2013).

Eine physikalische Nähe zwischen Tumor- und Effektorzellen ist nötig, damit eine ausreichende anti-tumorale Immunantwort stattfinden kann (Lim et al. 2017). Gerade dies stellt bei soliden Tumoren im Gegensatz zu beispielsweise Leukämien ein Problem dar: Neben physikalischen Barrieren, wie ein dichtes, fibrotisches Gewebe, gilt es hier, ein immunsuppressives TME zu überwinden (Lim et al. 2017; Zhang et al. 2019).

Weiterhin wird die ausreichende Vermehrung und das Überleben der ZTL im TME unter anderem durch Hemmmechanismen via *programmed cell death-protein 1* oder

cytotoxic T lymphocyte antigen 4 und inhibitorische Zellen, wie regulatorische T-Zellen und *myeloid-derived suppressor cells*, erschwert (Fridman et al. 2012; Lim et al. 2017; Zhang et al. 2019).

Schließlich limitieren Kreuzreaktionen, bei denen gesundes Gewebe geschädigt wird, die Therapiesicherheit der AZT (Lim et al. 2017). So kann der Einsatz von CAR- oder TZR-modifizierten T-Zellen bei soliden Tumoren die Schädigung lebenswichtiger Organe mit letalen Folgen hervorrufen (Lim et al. 2017).

1.4 Die Rolle von Chemokinen und Chemokinrezeptoren in der anti-tumoralen Immunantwort

Chemokine spielen als größte Untergruppe der Zytokine eine wichtige Rolle bei der Regulation des Immunsystems, sowohl bei der Reifung und Homöostase von Immunzellen als auch bei der zellulären und humoralen Immunabwehr (Griffith et al. 2014). Sie werden nach dem jeweiligen N-terminalen Zystein-Rest in vier Klassen eingeteilt, die CC-, CXC-, C- und CX3C-Chemokine (Rollins 1997; Proudfoot 2002).

Die Chemokinsekretion durch unter anderem Tumor-, Immun- und Stromazellen innerhalb des TME beeinflusst maßgeblich die Migration verschiedener Leukozytenuntergruppen zum Tumor hin sowie die anti-tumorale Immunantwort als Ganzes (Nagarsheth et al. 2017). Durch das vorherrschende Chemokinmilieu innerhalb des TME kann die Chemotaxis von einerseits anti-tumoralen Effektorzellen oder andererseits immunsuppressiven Zellpopulationen, wie regulatorischen T-Zellen, initiiert werden (Curiel et al. 2004; Schlecker et al. 2012; Zhang et al. 2019). Die Chemokinexpression von Malignomen ist dabei von genetischen, epigenetischen sowie Umweltfaktoren abhängig und häufig so ausgeprägt, dass eine effektive Bekämpfung durch das Immunsystem erschwert wird (man spricht hierbei von engl. *immune escape*) (Nagarsheth et al. 2017). So führt beispielsweise epigenetisches *silencing* von Typ-1-T-Helferzellen-Typ-Chemokinen zu einer schlechteren Infiltration mit CD8-positiven Lymphozyten im humanen Ovarialkarzinom (Peng et al. 2015). Die Nutzung von Chemokinen und ihren Rezeptoren als Ansatzpunkte zur Verbesserung der AZT scheint daher als erfolgsversprechend (Zhang et al. 2019).

1.5 Hintergrund der Dissertationsarbeit

1.5.1 Die C-C motif chemokine receptor 4 (CCR4) – C-C motif chemokine ligand 22 (CCL22) – Achse als Angriffspunkt zur Verbesserung der anti-tumoralen Immunantwort

Der Rezeptor *C-C motif chemokine receptor* (CCR) 4 kommt unter anderem auf Typ-2-T-Helferzellen sowie den immunsuppressiven regulatorischen T-Zellen vor und spielt zusammen mit seinen beiden Liganden *C-C motif chemokine ligand* (CCL) 22 und CCL17 im Organismus eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von T-Zellen in die Haut und bei Pathologien wie Asthma, allergischen Erkrankungen sowie Malignomen (Imai et al. 1999; Iellem et al. 2001; Baatar et al. 2007; Yoshie et al. 2015).

Die intratumorale Expression des Chemokins CCL22 und sein immunsuppressiver Effekt durch das Anlocken von regulatorischen T-Zellen über seinen Bindungspartner CCR4 konnte für verschiedene Tumorerkrankungen, wie Ovarial- und Brustkrebs, gezeigt werden (Iellem et al. 2001; Curiel et al. 2004; Gobert et al. 2009). Mit diesen Ergebnissen übereinstimmend verbesserte ein Anti-CCR4-Antikörper die anti-tumorale Immunantwort *in vivo* beim Menschen (Sugiyama et al. 2013).

Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass CD11-positive Zellen in murinen Tumoren der Pankreaskarzinomlinie Panc02-OVA das Chemokin CCL22 in hohem Maße exprimieren und die Transduktion von ZTL mittels *Ccr4* den anti-tumoralen Effekt der AZT im Mausmodell verstärkt. (Rapp et al. 2016). Die Transduktion mit *Ccr4* scheint neben der ZTL-Migration auch die *intercellular adhesion molecule 1*-abhängige T-Zell-Aktivierung und Antigenerkennung über eine optimierte Interaktion zwischen T-Zellen und dendritischen Zellen zu verbessern (Rapp et al. 2016). Da auch die Umgebung humaner Pankreaskarzinome CCL22 produziert, haben die eben genannten Ergebnisse eine besondere Relevanz (Rapp et al. 2016).

Interessanterweise sezernieren nicht die Tumorzellen selbst CCL22, sondern Immunzellen – sowohl im humanen als auch im murinen TME (Rapp et al. 2016). Die beiden Liganden von CCR4, CCL22 und in geringerer Konzentration auch CCL17, fanden sich vor allem im Tumorgewebe selbst sowie in peripheren Lymphknoten, während sie von normalem Pankreasgewebe nicht exprimiert wurden (Griffith et al. 2014; Rapp et al. 2016).

Derzeit wird – als einer der ersten Chemokinrezeptoren – der Therapieeffekt von CCR4 in CD30-spezifischen CAR T-Zellen in einer klinischen Studie überprüft (NCT 03602157).

1.5.2 Die C-X-C motif chemokine ligand 16 (CXCL16) – C-X-C motif chemokine receptor 6 (CXCR6) – Achse als vielversprechender Ansatz bei der Verbesserung der adoptiven T-Zell Therapie

Unsere Arbeitsgruppe hat zudem die *C-X-C motif chemokine ligand (CXCL) 16-C-X-C motif chemokine receptor (CXCR) 6*-Achse im Hinblick auf eine mögliche Verbesserung der AZT untersucht (Lesch et al. 2021). CXCL16 kommt im Körper sowohl in einer löslichen, chemotaktisch aktiven Form, als auch Membran-gebunden vor (Matloubian et al. 2000; Wilbanks et al. 2001; Agostini et al. 2005). In letzterem Fall vermittelt CXCL16 die Zelladhäsion (Matloubian et al. 2000; Wilbanks et al. 2001; Linke et al. 2019). Durch diese doppelte Wirkweise sowie seine Expression in mehreren malignen Entitäten erscheint dieses Chemokin als Angriffspunkt zur Verbesserung der AZT besonders geeignet (Deng et al. 2010; Lesch et al. 2021).

Es ist bekannt, dass CXCR6 im Organismus unter anderem durch Rekrutierung von zum Beispiel regulatorischen T-Zellen und unreifen, myeloischen Zellen, eine immunsuppressive und tumorfördernde Wirkung entfaltet (La Porta 2012; Oldham et al. 2012; Allaoui et al. 2016). Beim Pankreaskarzinom scheinen CXCL16 und sein korrespondierender Rezeptor CXCR6 eine wichtige Rolle im Hinblick auf die lokale Mobilität, Invasivität und Metastasierung von Krebszellen und damit die Tumorprogression zu spielen (Wente et al. 2008; Chalabi-Dchar et al. 2015). Die Expression von CXCR6 auf CD8-positiven Lymphozyten wird wiederum erst durch Aktivierung hochreguliert, während der Rezeptor sonst kaum auf diesen Zellen zu finden ist (Unutmaz et al. 2000; Agostini et al. 2005; Sato et al. 2005; Lesch et al. 2021). Eine weitere Besonderheit ist, dass CXCL16 ein exklusiver Ligand seines Rezeptors CXCR6 zu sein scheint (Wilbanks et al. 2001).

Lesch et al. konnten zeigen, dass die Transduktion von ZTL mit *Cxcr6* zusätzlich zu einem TZR oder CAR sowohl im Mausmodell als auch in menschlichen Gewebeproben zu einem verbesserten anti-tumoralen Effekt in Mausmodellen von humanen und murinen Pankreaskarzinomen führte (Lesch et al. 2021). Im murinen Modell

produzieren hierbei Karzinomzellen und die umgebenden Zellen im TME, wie CD11c-positive Myeloidzellen, CXCL16 (Lesch et al. 2021). Di Pilato et al. fanden weiterhin heraus, dass Tumor-infiltrierende ZTL eine hohe Expression von CXCR6 aufwiesen und dass dieser Rezeptor nicht nur an der Rekrutierung, sondern auch an ihrem Überleben, der Interaktion mit weiteren Zellen im TME und ihrer anti-tumoralen Aktivität beteiligt ist (Di Pilato et al. 2021). CXCR6 stellte sich schließlich als ein starker Prädiktor für das Überleben von Patienten mit malignem Melanom heraus (Di Pilato et al. 2021).

1.6 Das Pankreaskarzinom als Anwendungsbeispiel der adoptiven T-Zell Therapie

Krebs stellt als die zweithäufigste Todesursache in Deutschland mit einer Inzidenz von circa 500.000 und einer Todesrate von über 230.000 Menschen jährlich, eine bedeutende sozioökonomische Belastung dar (Statisches Bundesamt 2020; Robert Koch-Institut 2021).

Patienten mit Bauspeicheldrüsenkrebs weisen durch eine meist späte Diagnose eine geringe fünf Jahres-Überlebens-Rate von etwa zehn Prozent für beide Geschlechter auf (Robert-Koch-Institut 2021). Trotz Weiterentwicklungen der verschiedenen Therapieansätze, konnte die ungünstige Prognose der Patienten kaum verbessert werden (Ansari et al. 2016). Laut S3-Leitlinie zum exokrinen Pankreaskarzinom gilt momentan allein die Operation als potenziell kurativ (S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom 2022). Viele der Patienten sind jedoch zum Beispiel durch bereits vorhandene Metastasen bei Diagnosestellung einer kurativen, chirurgischen Behandlungsoption nicht mehr zugänglich (Ansari et al. 2016; S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom 2022). Zudem ist letztere als großer Eingriff mit Auswirkungen auf den Organismus verbunden, sodass der präoperative körperliche und mentale Allgemeinzustand des Patienten vor einer Entscheidung zur Operation beachtet werden muss (Ansari et al. 2016).

Daher ist es notwendig, eine Therapie mit höheren Erfolgsaussichten zu finden, die selbst bei nicht-resektablem beziehungsweise ausgedehntem Tumorstadium eine Heilung ermöglicht.

1.7 Zielsetzung und Fragestellung

Wie zuvor beschrieben, bieten sich die Chemokinrezeptoren CCR4 sowie CXCR6 als vielversprechende Angriffspunkte zur Verbesserung der AZT an (Rapp et al. 2016; Di Pilato et al. 2021; Lesch et al. 2021). Gerade weil diese nicht überlappende Quellen und Wirkungsweisen haben, kann dadurch synergistisches Potenzial entstehen.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde daher überprüft, ob die Kombination der Chemokinrezeptoren CCR4 und CXCR6 in ZTL für die AZT genutzt werden kann. Hierzu wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- 1) Sind die transduzierten T-Zellen hinsichtlich ihrer Aktivierung und zytotoxischen Eigenschaften *in vitro* funktional?
- 2) Führen die auf den murinen T-Zellen exprimierten Rezeptoren zu einer verbesserten Migration zu ihren entsprechenden Chemokinliganden?
- 3) Führt die kombinierte Expression von CCR4 und CXCR6 im Vergleich zur AZT mit einfach oder gar nicht transduzierten T-Zellen in einem murinen Pankreaskarzinommodell zu einer verbesserten anti-tumoralen Immunantwort *in vivo*?

Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden *Ccr4-Cxcr6*- sowie *Cxcr6-Ccr4*-Kombinationskonstrukte kloniert. Primäre murine T-Zellen wurden anschließend mit den Konstrukten retroviral transduziert und die Transduktionseffizienz überprüft. Die Funktionalität der ZTL wurde mittels Migrations-, Aktivierungs- und Zytotoxizitätsversuchen getestet. Zuletzt wurde die Effektivität der AZT mittels der transduzierten T-Zellen in einem murinen Pankreaskarzinommodell *in vivo* untersucht.

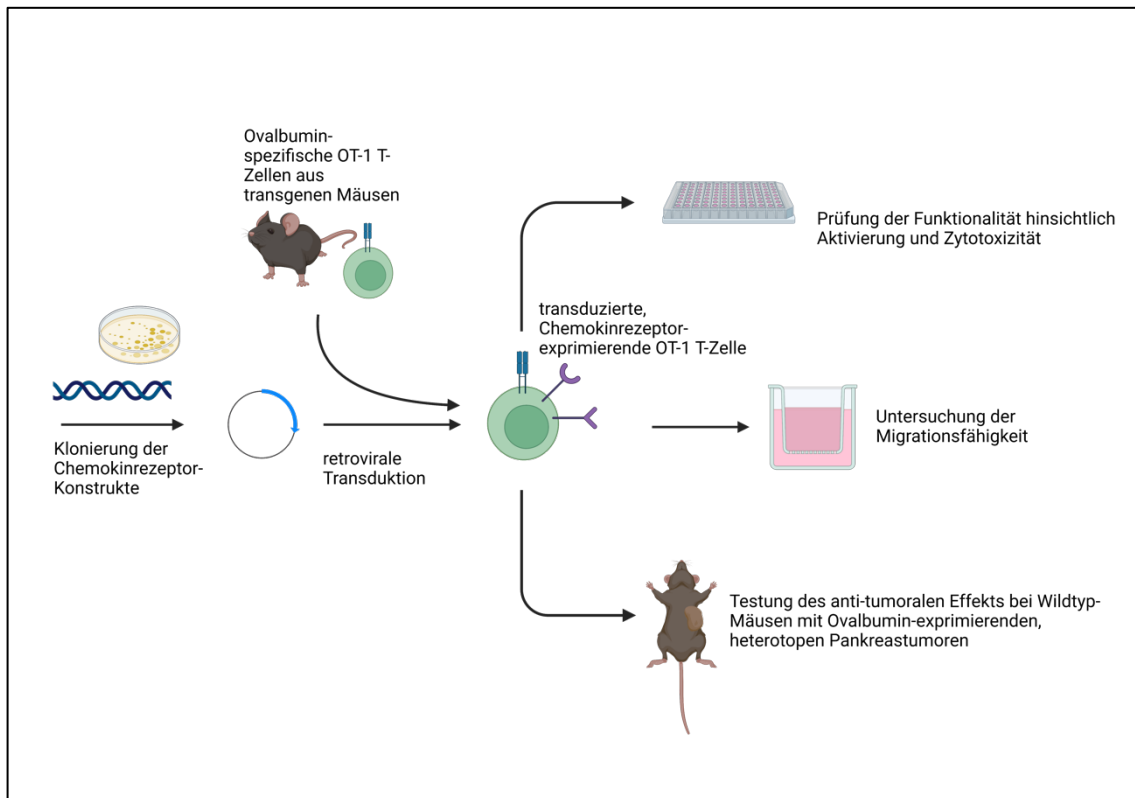


Abbildung 1: Arbeitsablauf des Projekts.

Dargestellt ist der Arbeitsablauf des Projekts. Nach Klonierung der Kombinationskonstrukte aus *Ccr4* und *Cxcr6* erfolgt die retrovirale Transduktion in Ovalbumin-spezifische OT-1-T-Zellen aus transgenen Mäusen. Die transduzierten T-Zellen werden anschließend hinsichtlich ihrer Funktionsfähigkeit (Aktivierung und Zytotoxizität) sowie ihrer Migration zu den entsprechenden Chemokinliganden getestet. Schließlich wird ihr anti-tumoraler Effekt bei heterotop-induzierten, Ovalbumin-exprimierenden Panc02-OVA-Pankreaskarzinomen in Wildtyp-Mäusen untersucht. Die Ergebnisse werden jeweils mit denen von T-Zellen verglichen, die nur einen oder keinen Chemokinrezeptor exprimieren. Die Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 1: Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Firma
Ampicillin	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Blastcidin 100 mg	InvivoGen, San Diego, Kalifornien
bovines Serum-Albumin (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Calciumchlorid (CaCl_2)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>CountBrightTM Absolute Counting Beads</i>	Invitrogen, Eugene, USA
<i>CutSmart Buffer 10 x</i>	New England Biolabs (NEB), Ipswich, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>DNA Loading Dye 6 x</i>	Thermo Scientific, Waltham, USA
<i>Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)</i>	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS)</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
EcoRI-HF	New England Biolabs, Ipswich, USA
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 100 %	VWR Chemicals (BDH Prolabs), Fontenay-sous-Bois France
<i>FACSFlow</i>	BD Biosciences, San Jose, USA
fötales Kälberserum (FBS)	Gibco Products, Grand Island, USA
HEPES-Puffer 1 M	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Isofluran	HENRY SCHEIN, Melville, USA
Kaliumchlorid (KCl)	MERCK, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO_3)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
LB-Agar (Luria/Miller)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
LB-Medium (Luria/Miller)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

2. Material und Methoden

LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
L-Glutamin 200 mM	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
<i>Lipofectamine</i> 2000	Invitrogen, Carlsbad, USA
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumpyruvat	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
NotI-HF	New England Biolabs, Ipswich, USA
Opti-MEM	Gibco Products, Grand Island, USA
PBS Pulver	MERCK, Darmstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (100 x)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
<i>Polybrene Infection/Transfection Reagent</i>	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Puromycin 100 mg	InvivoGen, San Diego, Kalifornien
RetroNectin®	TaKaRa, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
<i>Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium</i>	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
RPMI 1640 <i>medium</i> ohne Phenolrot	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
<i>Roti-Gel Stain</i>	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese 50 x TRIS-Acetat-EDTA-Puffer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Schwefelsäure 2 N	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>T4 deoxyribonucleic acid (DNA) Ligase</i>	New England Biolabs, Ipswich, USA
<i>T4 DNA Ligase Buffer</i> 10 x	New England Biolabs, Ipswich, USA
<i>T cell Mouse Activator Anti-CD3-CD28 Dynabeads</i>	Thermo Fischer, Waltham, MA, USA
<i>TriDye 2-log DNA ladder (0.1-10.0 kb)</i>	New England Biolabs, Ipswich, USA

Trypanblau	Lonza, Verviers, Belgien
Trypsin 10 x	Lonza, Verviers, Belgien
Tween-20	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.2 Geräte und Kits

Tabelle 2: Geräte

Gerätebezeichnung	Firma
Axiovert-40C-Lichtmikroskop	Zeiss, Jena, Deutschland
<i>ChemiDoc Touch Imaging System</i>	Bio-Rad, München, Deutschland
CO2-Brutschrank (BBD 6220)	Heraeus, Hanau, Deutschland
FACSCanto II	BD Biosciences, New Jersey, USA
Lamin Air	Heraeus, Hanau, Deutschland
Mithras LB 940 <i>Multimode Plate Reader</i>	Berthold, Bad Wildbad, Deutschland
MULTIFUGE 4 KR	Heraeus, Hanau, Deutschland
Multifuge X3 FR	Heraeus, Hanau, Deutschland
Nanodrop 2000C Spectrophotometer	Thermo Scientific, Waltham, USA
Neubauer Zählkammer	Optik Labor Frischknecht, Balgach, Deutschland
Rotina 420 R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
SHAKER DOS-10L	neoLab, Heidelberg, Deutschland
TCS-SP5-Konfokalmikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Thermocycler Gene Touch	BIOER, Hangzhou, China
Tischzentrifuge Fresco 17	Heraeus, Hanau, Deutschland
Waage KB 240-3N	KERN, Balingen-Frommern, Deutschland
Wasserbad GFL 1083	GFL, Burgwedel, Deutschland

Tabelle 3: Kits

Bezeichnung	Firma
<i>CytoTox 96 NonRadio Cytotoxicity Assay</i>	Promega, Madison, USA
<i>Gene Jet Gel Extraction Kit</i>	Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Litauen
<i>Gene Jet Plasmid Miniprep Kit</i>	Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Litauen
<i>Mix2Seq Kit</i>	Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland
<i>Mouse IFN-γ-ELISA Set</i>	BD Biosciences, San Diego, USA
<i>Q5 High-Fidelity PCR Kit</i>	New England Biolabs, Ipswich, USA
<i>Zymo Pure II Plasmid Maxiprep Kit</i>	ZYMO RESEARCH, Freiburg, Deutschland

2.3 Puffer, Gele und Zellkulturmedien

Tabelle 4: Puffer, Gele und Zellkulturmedien

Transfektionspuffer		2 % BSA Blockpuffer	
NaCl	1,6 g	ddH ₂ O	25 ml
KCl	74 mg	BSA	0,5 g
Na ₂ HPO ₄	50 mg		
HEPES	1 g		
doppelt destilliertes Wasser (ddH ₂ O)	100 ml		
pH	6,76		
Calciumchloridpuffer		Transduktions-Waschpuffer	
CaCl ₂	2,77 g	HEPES-Puffer 1 M	1 ml
ddH ₂ O	10 ml	PBS	39 ml
ELISA Waschpuffer		Diluent	
PBS	nach Bedarf	PBS	nach Bedarf
Tween 20	0,05 %	FBS	10 %

Natriumcarbonatpuffer		1 % Agarosegel	
NaHCO ₃	7,13 g	LE-Agarose	1 %
Na ₂ CO ₃	1,59 g	50x TRIS-Acetat- EDTA-Puffer	200 ml
Vollentsalztes Wasser	auf 1 l	Vollentsalztes Wasser	10 l
NaOH	bis pH 9,5	<i>Roti-Gel Stain</i>	0,035 µg/ml Gel
DMEM 3+ Medium		DMEM 4+ Medium	
FBS	10 %	FBS	10 %
L-Glutamin	1 mM	L-Glutamin	2 mM
Penicillin	100 IU/ml	Penicillin	100 IU/ml
Streptomycin	100 µg/ml	Streptomycin	100 µg/ml
DMEM	500 ml	DMEM	500 ml
DMEM 5+ Medium		Murines T-Zell-Medium	
FBS	10 %	FBS	10 %
L-Glutamin	1 mM	L-Glutamin	1 mM
Penicillin	100 IU/ml	Penicillin	100 IU/ml
Streptomycin	100 µg/ml	Streptomycin	100 µg/ml
Puromycin	500 µg	Natriumpyruvat	1 %
Blasticidin	5 mg	HEPES	0,1 %
DMEM	500 ml	RPMI 1640 <i>medium</i>	500 ml
CYTOTOX Medium		Erylyse	
RPMI 1640 <i>medium</i>	500 ml	ddH ₂ O	1 l
ohne Phenolrot		NH ₄ Cl	8,92 g
FBS	1 %	KHCO ₃	0,029 g
Natriumpyruvat	1 %	EDTA	1 g
Penicillin	100 IU/ml	pH	7,2
Streptomycin	100 µg/ml		

2. Material und Methoden

Migrationsmedium	
RPMI 1640 <i>medium</i>	500 ml
FBS	2,5 ml
Penicillin	100 IU/ml
Streptomycin	100 µg/ml

2.4 Antikörper

Tabelle 5: T-Zell-aktivierende Antikörper

Antikörper	Konzentration	Klon	Spezies Isotyp	Firma
Anti-Maus- CD3-Antikörper	1 mg/ml	145- 2C11	Armenian hamster IgG	eBiosciences, San Diego, USA
Anti-Maus- CD28-Antikörper	1 mg/ml	37.51	Syrian hamster IgG	eBiosciences, San Diego, USA

2.5 Zytokine

Tabelle 6: Zytokine

Zytokin	Firma
Rekombinantes murines CXCL16	Peptotech, Hamburg, Deutschland
Rekombinantes murines CCL22	Biologend, Koblenz, Deutschland
Rekombinantes Interleukin-2	Peptotech, Los Angeles, USA
Rekombinantes Interleukin-15	Peptotech, Los Angeles, USA

2.6 Oligodesoxyribonukleotide

Das Designen der *Primer* erfolgte mithilfe der Software SnapGene. Alle für diese Arbeit verwendeten *Primer* wurden von der Firma Eurofins Genomics hergestellt. Das Ziel war hierbei, ein Konstrukt aus beiden Chemokinrezeptoren sowie dem Gen des Fluoreszenzproteins *enhanced green fluorescent protein (Egfp)* zu generieren.

Tabelle 7: Primer des Konstrukts *Ccr4 Cxcr6 Egfp*

Fragment	Primer-Sequenz	
1 (<i>Ccr4</i>)	vorwärts	5'-CTC TCC AAG GCG GCC GCG CCA CCA TGA ATG CCA CAG AGG TCA C-3'
	rückwärts	5'-AAA TTC AAA GTC TGT TTC ACC AAA GCG TCA CGG AAG TC-3'
2 (<i>2A</i>)	vorwärts	5'-ATG ACT TCC GTG ACG CTT TGG TGA AAC AGA CTT TGA ATT TTG ACC TTC-3'
	rückwärts	5'-TCT TGA TGC CCA TCA TCC ATC GGG CCT GGG TTG G-3'
3 (<i>Cxcr6</i>)	vorwärts	5'-TGG AGT CCA ACC CAG GCC CGA TGG ATG ATG GGC ATC AAG AG-3'
	rückwärts	5'-GCG GTA AGA TGC TCG AAT TCC TAC AAT TGG AAC ATA CTG GTG GTC TC-3'
4 (<i>2A</i>)	vorwärts	5'-CCA CCA GTA TGT TCC AAT TGG TGA AAC AGA CTT TGA ATT TTG ACC TTC-3'
	rückwärts	5'-CGC CCT TGC TCA CCA TCG GGC CTG GGT TGG-3'
5 (<i>Egfp</i>)	vorwärts	5'-TGG AGT CCA ACC CAG GCC CGA TGG TGA GCA AGG GCG-3'
	rückwärts	5'-GCG GTA AGA TGC TCG AAT TCT TAC TTG TAC AGC TCG TCC ATG C-3'

Tabelle 8: Primer des Konstrukts *Cxcr6 Ccr4 Egfp*

Fragment	Primer-Sequenz	
1 (<i>Cxcr6</i>)	vorwärts	5'-CCT CTC TCC AAG GCG GCC GCG CCA CCA TGG ATG ATG GGC ATC AAG AG-3'
	rückwärts	5'-AAA TTC AAA GTC TGT TTC ACC AAT TGG AAC ATA CTG GTG GTC TC-3'
2 (2A)	vorwärts	5'-CCA CCA GTA TGT TCC AAT TGG TGA AAC AGA CTT TGA ATT TTG ACC TTC-3'
	rückwärts	5'-GTG ACC TCT GTG GCA TTC ATC GGG CCT GGG TTG GAC TCC-3'
3 (<i>Ccr4</i>)	vorwärts	5'-TGG AGT CCA ACC CAG GCC CGA TGA ATG CCA CAG AGG TCA C-3'
	rückwärts	5'-GCG GTA AGA TGC TCG AAT TCC TAC AAA GCG TCA CGG AAG TCA T-3'
4 (2A)	vorwärts	5'-ATG ACT TCC GTG ACG CTT TGG TGA AAC AGA CTT TGA ATT TTG ACC TTC-3'
	rückwärts	5'-CGC CCT TGC TCA CCA TCG GGC CTG GGT TGG-3'
5 (<i>Egfp</i>)	vorwärts	5'-TGG AGT CCA ACC CAG GCC CGA TGG TGA GCA AGG GCG-3'
	rückwärts	5'-GCG GTA AGA TGC TCG AAT TCT TAC TTG TAC AGC TCG TCC ATG C-3'

2.7 Versuchstiere, Zellkultur und Zellgewinnung

2.7.1 Virusproduzierende Zelllinien

Tabelle 9: Virusproduzierende Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Medium	Referenz
Plat-E	HEK293-Zelllinie	DMEM 5+ Medium	(Morita et al. 2000)
293Vec-Eco	HEK293-Zelllinie	DMEM 4+ Medium	BioVec Pharma, USA
293Vec-Galv	HEK293-Zelllinie	DMEM 4+ Medium	BioVec Pharma, USA

2.7.2 Tumorzelllinien

Tabelle 10: Tumorzelllinien

Zelllinie	Ursprung	Entität	Mausstamm	Medium	Referenz
Panc02-OVA	Pankreas	Karzinom	C57BL/6	DMEM 3+	(Jacobs et al. 2011)

2.7.3 Versuchstiere

Weibliche C57BL/6RJ Wild-Typ-Mäuse wurden von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) erworben und im Alter von fünf bis 23 Wochen für Tierversuche verwendet (letzte Altersangabe aufgrund einer Re-Exposition älterer Mäuse mit Tumorzellen, siehe unten). C57BL/6-Tg(TcraTcrb)1100Mjb/J-Mäuse, deren T-Zellen mit einem gegen Ovalbumin spezifischem TZR ausgestattet sind (OT1-CD45.1 beziehungsweise -CD90.1) stammten aus eigener Zucht der Versuchstierhaltung der Arbeitsgruppe TH Ziemssenstraße 1. Die *in vivo*-Experimente erhielten eine Genehmigung von der zuständigen Behörde (Regierung von Oberbayern, München, Deutschland).

2.7.4 Organentnahme zur Zellgewinnung

Nach Tötung von OT1-spezifischen Spendermäusen (siehe 2.7.3) durch zervikale Dislokation unter Isofluran-Narkose und Desinfektion des Fells mittels 70-prozentigem Ethanol, erfolgte die Organentnahme. Der Situs wurde von lateral eröffnet und die Milz entnommen. Diese wurde bis zur Weiterverarbeitung in PBS auf Eis gelagert.

2.7.5 Zellkultivierung, Waschen und Zellzählung

2.7.5.1 Zellkultivierung

Die Inkubation der Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ entweder in Well-Platten oder Flaschen. Ab einer Konfluenz nahe der Maximaldichte wurden die Zellen 1:10 *gesplittet*, was bedeutet,

dass 90 % der Zellen verworfen und die restlichen 10 % in entsprechendem Medium rekultiviert wurden. Dies verhinderte ein Überwachsen und erhielt die Integrität der Zellen. Dazu wurde die Zellsuspension bei 400 x g für 5 Minuten in einem 50 ml-Röhrchen zentrifugiert, der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet am Boden des Röhrchens in frischem Medium durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mit Hilfe eines elektrischen Pipettier-Helfers resuspendiert.

Semiadhärente Zellen wurden durch mehrmaliges Klopfen vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Bei adhärennten Zellen wurde der Medium-Überstand abgenommen, der Zellrasen am Boden der Flasche mit PBS umspült, um restliches Medium zu entfernen, und einfaches Trypsin in entsprechender Menge je nach Größe der Zellkulturflasche hinzugegeben. Nach Ablösung der Zellen, in der Regel nach etwa 2 bis 10 Minuten Inkubation bei 37 °C, wurde die Reaktion mit Medium abgestoppt, die Menge war hierbei abhängig von der des zugegebenen Trypsins.

2.7.5.2 Waschen

Um restliches Medium von Zellen zu waschen, wurden diese zunächst, wie oben beschrieben, aus der Zellkulturflasche entfernt und die Zellsuspension bei 400 x g für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 10 ml PBS resuspendiert. Je nach Versuch und gewünschter Reinheit von Medium wurde dieser Schritt mehrmals wiederholt. Schließlich wurde das Zellpellet nach der letzten Zentrifugation in dem jeweiligen Zielmedium resuspendiert und die Zellsuspension weiterverwendet.

2.7.5.3 Zellzählung

Die Zellzählung unter dem Lichtmikroskop erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer nach Zugabe von Trypanblau im Verhältnis 10:1 zur Zellsuspension. Durch die resultierende Anfärbung toter Zellen, konnte eine Zählung ausschließlich lebender Zellen erfolgen.

2.7.6 Zellgewinnung aus Milzen und Differenzierung zu CD8-positiven T-Lymphozyten

Mit dem Stempel einer 5 ml-Einwegspritze wurden die murinen Milzen auf einem 100 μm -Zellsieb zerquetscht. Danach wurde die Einzelzellsuspension mit Hilfe von murinem T-Zell-Medium durch dieses und ein 30 μm -Zellsieb in ein 50 ml-Röhrchen gespült. Der Inhalt des Röhrchens wurde bei 400 x g für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 2 ml Erylyse resuspendiert. Nach 2 Minuten erfolgte die Zugabe von 10 ml murinem T-Zell-Medium, eine weitere Zentrifugation, wie oben beschrieben, das Verwerfen des Überstands sowie das erneute Resuspendieren in murinem T-Zell-Medium. Nun wurde die Konzentration der Suspension auf 2×10^6 pro ml eingestellt und in einem Verhältnis von 1:1000 Interleukin-2, Anti-Maus-CD3-Antikörper sowie β -Mercaptoethanol und in einem Verhältnis von 1:10000 Anti-Maus-CD28-Antikörper hinzugefügt. Die Zellsuspension wurde über Nacht bei 37 °C in 6-Well-Platten mit jeweils 3 ml pro Well inkubiert.

2.8 Klonierung

2.8.1 Polymerase-Kettenreaktion und Gelelektrophorese

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde gemäß dem Protokoll des „*Q5 High-Fidelity PCR Kit*“ durchgeführt. Die amplifizierte DNA wurde dann mithilfe von *DNA Loading Dye 6* x angefärbt und zusammen mit dem *TriDye 2-log DNA ladder* (0.1-10.0 kb) als Referenz in einem 1 % Agarosegel aufgetragen. Mittels Gelelektrophorese bei circa 120 Volt wurden die DNA-Stücke der Größe nach getrennt. Dadurch ergaben sich Banden, die im *ChemiDoc Touch Imaging* System sichtbar gemacht werden konnten. Die Banden der richtigen Größe konnten im Anschluss ausgeschnitten und die gewünschte DNA gemäß dem Protokoll des „*Gene Jet Gel Extraction Kit*“ extrahiert und weiterverwendet werden.

2.8.2 Wahl des Vektors und Beschreibung der Konstrukte

Alle Konstrukte wurden mittels einer *overlap extension* PCR und Klonierung in den retroviralen Vektor pMP71 mit Resistenz gegen Ampicillin generiert (Sommermeyer et

al. 2006; Heckman et al. 2007; Leisegang et al. 2008). Die verwendeten Primer sind hierbei in Tabelle 7 und 8 dargestellt.

Tabelle 11: Funktionelle Bestandteile der Konstrukte

Abkürzung	Bezeichnung	Uniprot Entry	Herkunft
Egfp	<i>enhanced green fluorescent protein</i>	UniProt Entry, C5MKY7, amino acids 1-239	Medusa
Ccr4	<i>C-C motif chemokine receptor type 4</i>	UniProt Entry P51680, amino acids 1–360	Mus musculus
Cxcr6	<i>C-X-C motif chemokine receptor type 6</i>	UniProt Entry Q9EQ16, amino acids 1- 351	Mus musculus

Tabelle 11 zeigt die funktionellen Bestandteile der verschiedenen Konstrukte. Dazu gehören die murinen Rezeptoren CCR4 und CXCR6 sowie das Fluoreszenzprotein EGFP. Alle Bestandteile wurden über ein selbst-spaltbares 2A-Peptid miteinander gekoppelt, wie in Tabelle 12 gezeigt.

Tabelle 12: Sequenz des selbst spaltbaren 2A-Peptids

Peptid	Sequenz
2A	P V K Q T L N F D L L K L A G D V E S N P

2.8.3 Digestion

Die Digestion erfolgte nach dem „*Optimizing Restriction Endonuclease Reactions*“-Protokoll von NEB (New England Biolabs 2018). Als Restriktionsenzyme wurden die Enzyme EcoRI-HF und NotI-HF, als Puffer der *CutSmart Buffer* von NEB verwendet. Nach der Digestion erfolgten eine erneute Auftrennung der DNA mittels Gelelektrophorese und anschließend die Gelextraktion, wie oben beschrieben.

2.8.4 Ligation

Die Ligation geschah gemäß dem „*Ligation Protocol with T4 DNA Ligase (M0202)*“ von NEB (New England Biolabs 2018). Um die benötigten Mengen für ein molares Insert-zu-Vektor-Verhältnis von 3:1 zu berechnen, wurde der „NEBioCalculator“ verwendet (New England Biolabs 2018).

2.8.5 Transformation, DNA-Extraktion, Sequenzierung und DNA-Amplifikation

2.8.5.1 Transformation

Die Transformation wurde nach einem in der Arbeitsgruppe etablierten und eigens modifiziertem Protokoll durchgeführt. Zunächst erfolgte das Auftauen von NEB 5 alpha kompetenten *Escherichia coli*-Zellen auf Eis. Nach vorsichtigem Auf- und Abpipettieren wurden 100 μ l Zellsuspension in ein 0,5 ml-Röhrchen auf Eis umgefüllt. Anschließend erfolgte der Zusatz von 1 μ l des Ligations-Produktes und erneutes, vorsichtiges Mischen. Nun wurde die Mixtur für 30 Minuten auf Eis inkubiert, bei 42 °C für 90 Sekunden Hitze-geschockt und erneut für 10 Minuten auf Eis inkubiert. 150 μ l LB-Medium auf Raumtemperatur wurde hinzugefügt und die Mixtur für 60 Minuten bei 37 °C und 250 *revolutions per minute* (rpm) inkubiert. Schließlich wurde die gesamte Zellsuspension auf vorgewärmte Ampicillin-Selektions-LB-Agarplatten verteilt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die entstandenen Bakterienkolonien zusammen mit 5 ml LB-Medium und 5 μ l Ampicillin für 6 bis 8 Stunden bei 180 rpm und 37 °C inkubiert.

2.8.5.2 DNA-Extraktion

Sobald der gewünschte Grad an Trübheit in der Mixtur erreicht war, wurde die enthaltene DNA gemäß dem Protokoll des „*Gene Jet Plasmid Miniprep Kit*“ extrahiert. Statt dem im Kit enthaltenen „*Elution Buffer*“ wurde im letzten Schritt allerdings 55 °C warmes ddH₂O verwendet, um zu vermeiden, dass etwaige Inhaltsstoffe nachfolgende Experimente beeinflussen.

2.8.5.3 Sequenzierung

Zur Bestätigung, ob die gewünschte DNA-Sequenz enthalten war, wurde zunächst die Konzentration der purifizierten DNA mit Hilfe des Nanodrop 2000C Spectrophotometer ermittelt. Danach erfolgten die Digestion sowie die Gelelektrophorese, wie oben beschrieben. Ergaben sich Banden der richtigen Größe, wurde die durch Gelextraktion purifizierte DNA gemäß dem Protokoll des „*Mix2Seq Kit*“ weiterverarbeitet und zur Sequenzierung zur Firma Eurofins Genomics abgeschickt.

2.8.5.4 DNA-Amplifikation

Sofern die gewünschte DNA-Sequenz enthalten war, wurde die purifizierte DNA, wie oben geschildert, retransformiert. Die resultierende trübe Zellmischung wurde in einen 500 ml-Erlenmeyer Kolben umgefüllt und zusammen mit 250 ml LB und Ampicillin im Verhältnis 1:1000 bei 37 °C und 180 rpm über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte die DNA-Extraktion nach dem Protokoll des „*Zymo Pure II Plasmid Maxiprep Kit*“.

2.9 Retrovirale Transduktion und Expansion primärer muriner T-Zellen sowie Generierung neuer, stabil virusproduzierender Zelllinien

2.9.1 Generierung neuer, stabil virusproduzierender Zelllinien und retrovirale Transduktion primärer muriner T-Zellen

Die retrovirale Transduktion primärer muriner T-Zellen wurde gemäß eines Standardprotokolls der Arbeitsgruppe durchgeführt (Kobold et al. 2015). Der retrovirale Vektor pMP71 wurde zur Transfektion der ecotrophen Verpackungszelllinie Plat-E beziehungsweise der stabil virusproduzierenden Zelllinie 293Vec-Eco herangezogen.

Plat-E-Zellen wurden hierbei in 6-Well-Platten kultiviert bis sie eine Konfluenz von etwa 70 % zeigten. Im Anschluss erfolgte die Transfektion mittels Kalzium-Phosphat-Präzipitation. Hierbei wurden pro 6-Well 2,5 M CaCl₂, 18 µg retrovirale pMP71-Plasmid-DNA und 150 µl Transfektionspuffer (Gesamtvolumen 300 µl) über die Plat-E-Zellen geträufelt und die Platten, wie unter 2.7.5.1 beschrieben, für 6 Stunden

inkubiert. Danach wurde das Medium mit 3 ml DMEM 3+ Medium ersetzt und für weitere 48 Stunden inkubiert. Der virushaltige Überstand der 6-Well-Platten wurde entnommen und für die Transduktion der ZTL (siehe 2.7.6) verwendet. Im Anschluss wurde murines T-Zell-Medium zu den Plat-E-Zellen gegeben und diese erneut für 24 Stunden inkubiert. Der virushaltige Überstand wurde entnommen und abermals zu den ZTL gegeben, um die Transduktionseffizienz zu erhöhen.

Die Herstellung der stabil virusproduzierenden Zelllinien

293Vec-Eco CCR4 CXCR6 EGFP sowie 293Vec-Eco CXCR6 CCR4 EGFP erfolgte wie von Ghani et al. beschrieben (Ghani et al. 2007). Diese ermöglichten stabilere und gleichzeitig höhere Transduktionseffizienzen bei gleichem Transduktionsprotokoll im Vergleich zur Nutzung der Verpackungszelllinie Plat-E. Hierfür wurden die entsprechenden pMP71-Vektoren in oben genannten Zelllinien etabliert und Einzelzell-Klone hergestellt. Dann wurden diejenigen Klone selektiert, mit denen die größte Transduktionseffizienz primärer muriner T-Zellen erreicht werden konnte.

Die 293Vec-Eco-Zellen produzierten den gewünschten Retrovirus, der wiederum genutzt wurde, um primäre, murine OT-1-T-Zellen zu transduzieren. $1,2 \times 10^6$ 293Vec-Eco-Zellen wurden in einer 6-Well-Platte aufgetragen und ihr virushaltiger Überstand wurde circa ein und zwei Tage nach Aussaat und nach Filterung mittels $0,45 \mu\text{m}$ -Filter für die Transduktion verwendet. Zur Optimierung der örtlichen Nähe zwischen T-Zellen und Virus wurden hierbei 24-Well-Platten bei 4°C mit $6,25 \mu\text{g/ml}$ RetroNectin® benetzt (Hanenberg et al. 1996). Der virushaltige Überstand wurde auf die RetroNectin®-bedeckten 24-Well-Platten aufgetragen und die Platten wurden bei $3000 \times g$, für 120 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der restliche Überstand wurde entfernt und 10^6 OT-1-T-Zellen wurden in die Wells gefüllt. Nach circa 24 Stunden wurde eine zweite Transduktion mit neuem Virus-Überstand durchgeführt.

Die murinen Zellen wurden während dieses Protokolls zunächst mit anti-Maus-CD3- sowie anti-Maus-CD28-Antikörper und Interleukin-2, daraufhin durch Zugabe von *T cell mouse activator anti-CD3-CD28 dynabeads* und schließlich mit humanem Interleukin-15 und β -Mercaptoethanol stimuliert. Die Messung der Transduktionseffizienz erfolgte via Durchflusszytometrie (siehe 2.10)

2.9.2 Expansion primärer muriner T-Zellen

Für die erste Expansion wurden die frisch transduzierten T-Zellen nach 6 Stunden Inkubation bei 37 °C bei 400 x g für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde zunächst in 3 ml murinem T-Zell-Medium resuspendiert und dann wurde in einem Verhältnis von 1:1000 β -Mercaptoethanol und von 1:2000 Interleukin-15 zugegeben. Die Zellsuspension wurde auf eine 6-Well-Platte aufgetragen und für 48 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nun erfolgte alle 2 Tage die Expansion, wie oben geschildert. Allerdings wurden die T-Zellen ab der 2. Expansion nach dem Resuspendieren gezählt und in einer Konzentration von 10^6 Zellen pro ml murinem T-Zell-Medium eingestellt. Ab einer gewissen Zellzahl erfolgte die weitere Kultivierung in Flaschen.

2.10 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (*fluorescence-activated cell sorting*, FACS) wurde mit Hilfe des Geräts BD FACS Canto II und der BD FACSDiva-Software durchgeführt. Die T-Zell-Suspensionen wurden, wie oben beschrieben, mit PBS gewaschen und je 150 μ l in FACS-Röhrchen überführt. Die Transduktion der T-Zellen konnte durch die Detektion des Fluoreszenzproteins EGFP im Fluorescein-Isocyanat-Kanal gemessen werden. Alle Datensätze wurden im Anschluss mit der Software Flow Jo 10.2. ausgewertet. Bei der Analyse der migrierten Zellen im *migration assay* wurden zusätzlich vor Analyse mittels Durchflusszytometrie pro 150 μ l Zellsuspension 2,5 μ l *CountBright™ Absolute Counting Beads* einer Konzentration von $0.52 \times 10^5/50 \mu$ l zugefügt.

2.11 Migrationsversuche

Für die Evaluation der Zell-Migration wurde ein Protokoll herangezogen, das in der Arbeitsgruppe bereits etabliert war. 96-Well-Filtrations-Platten (MERCK, Darmstadt, Deutschland) wurden verwendet. Alle Konditionen wurden in Triplikaten angelegt. Je 10^6 *Egfp-*, *Ccr4 Egfp-*, *Cxcr6 Egfp-*, *Ccr4 Cxcr6 Egfp-* sowie *Cxcr6 Ccr4 Egfp-* transduzierte ZTL wurden in 70 μ l Migrationsmedium auf einen 3,0 μ m-Porenfilter in das obere Well einer solchen Platte pipettiert. Die unteren Wells dieser Platte

enthielten hierbei entweder nur Migrationsmedium, Migrationsmedium mit rekombinantem murinen CXCL16, mit rekombinantem murinen CCL22 oder mit beiden Zytokinen. Dabei wurden jeweils eine Zytokinkonzentration von 50 ng/ml und ein Volumen von 150 μ l verwendet. Die Zellen wurden bei 37 °C für 4 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die durch den Porenfilter in die unteren Wells migrierten Zellen mittels Durchflusszytometrie, wie oben beschrieben, und mit Hilfe der Software Microsoft Office 365 und GraphPad PRISM® Version 9 analysiert.

2.12 Zytotoxizitätsversuche

2.12.1 Lactatdehydrogenase assay

Hierzu wurde das Protokoll des „*CytoTox 96 NonRadio Cytotoxicity Assay*“-Kits verwendet. Alle Konditionen und Kontrollen wurden in Quadruplikaten angelegt. Sämtliche Zellen wurden in 100 μ l CYTOTOX Medium pro Well aufgenommen. Als Kontrollen dienten eine „Tumor_{min}“-Kontrolle, die aus 4 Wells à 25000 Tumorzellen bestand, sowie eine „Tumor_{max}“-Kontrolle, die sich ebenfalls aus 4 Wells à 25000 Tumorzellen zusammensetzte, der aber im Verlauf noch Lyse-Lösung hinzugegeben wurde. Die letzte Kontrolle bestand allein aus CYTOTOX Medium. Die verschiedenen Konditionen setzten sich aus *Egfp*-, *Ccr4 Egfp*-, *Cxcr6 Egfp*-, *Ccr4 Cxcr6 Egfp*- sowie *Cxcr6 Ccr4 Egfp*-transduzierten T-Zellen als Effektorzellen zusammen. Zu jeweils 25000 Tumorzellen als Zielzellen wurden im Verhältnis von Ziel- zu Effektorzellen (Z:E) 1:1, 1:5 und 1:10 T-Zellen hinzugegeben. Für jedes Z:E-Verhältnis wurden Kontrollen angelegt, die dieselbe Anzahl T-Zellen ohne Tumorzellen beinhielten („Effektor_{only}“). Alle Kontroll-Wells wurden mit CYTOTOX Medium aufgefüllt, sodass sich für jedes Well ein Volumen von 200 μ l ergab. Nach 12 Stunden erfolgte die Lyse der „Tumor_{max}“-Kontrolle. Die Platte wurde mit dem Mithras LB 940 *Multimode Plate Reader* ausgelesen und die Daten im Anschluss mit den Softwares Microsoft Office 365 und GraphPad PRISM® Version 9 analysiert. Der Rest des Überstandes wurde in mit Parafilm umschlossenen 96-u-Well-Platten für spätere Interferon γ (IFN- γ)-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) bei – 20 °C gelagert.

Die prozentuale Lyse der Tumorzellen wurde mithilfe der Formel

$$\text{Prozentuale Lyse (\%)} = \frac{\text{Messwert} - \text{Tumor}_{\min} - \text{Effektor}_{\text{only}}}{\text{Tumor}_{\max} - \text{Tumor}_{\min}} \times 100$$

berechnet, wobei Hintergrundeffekte durch das CYTOTOX Medium subtrahiert wurden.

2.12.2 Interferon γ -enzyme-linked immunosorbent assay

Bei der Durchführung des ELISA wurde das Protokoll des „*Mouse IFN- γ -ELISA Set*“ befolgt. Es wurde in Triplikaten gearbeitet und die Platten mit dem Mithras LB 940 *Multimode Plate Reader* ausgelesen. Schließlich wurden die Daten mit Hilfe der Softwares Microsoft Office 365 und GraphPad PRISM® Version 9 ausgewertet.

2.13 Tierversuche

2.13.1 Etablierung der Tumore *in vivo*

Zuerst erfolgte die Ablösung der adhären-wachsenden Panc02-OVA-Zellen mit Trypsin sowie das anschließende dreimalige Waschen der Zellen in PBS. Die Zellen wurden den Mäusen zu je 2×10^6 Zellen pro Versuchstier subkutan in die Flanke verabreicht. Sobald die Tumoren etwa ab einer Größe von 2×2 mm palpabel waren, wurden die Tiere in Gruppen unterteilt und der jeweiligen Therapie zugeführt. Die Tiere wurden dabei so aufgeteilt, dass die Gruppen vor Therapiebeginn jeweils ähnliche Tumor-Durchschnittsgrößen hatten (Randomisierung). Es wurden jeweils 10^7 OT-1-T-Zellen intravenös in die Schwanzvene injiziert. Der Zustand der Tiere wurde pro Woche mindestens dreimal überprüft und der Tumor in jeweils zwei Ebenen vermessen. Die Tumorgröße wurde als Fläche dokumentiert, definiert als Länge in mm x Breite in mm. Ab einer Tumorgröße von $> 225 \text{ mm}^2$, einer Tumorulzeration oder eines im Tierversuchsantrag prädefinierten Kriteriums wurden die Tiere durch Genickbruch aus dem Versuch genommen. Die Durchführung des Experiments erfolgte verblindet.

2.14 Softwares

Für die Analyse der Daten wurden die folgenden Softwares herangezogen:

Tabelle 13: Verwendete Softwares

Bezeichnung	Firma
BD FACSDiva	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
BioRender	BioRender, Toronto, Kanada
Endnote X9	Clarivate Analytics, London, Vereinigtes Königreich
Flow Jo 10.2.	FlowJo LLC, Ashland, USA
GraphPad PRISM® Version 9	GraphPad Software, La Jolla, USA
Microsoft Office 365	Microsoft, Redmond, USA
SnapGene	GSL Biotech, Chicago, USA
NEBioCalculator	New England Biolabs, Ipswich, USA

2.15 Statistische Analyse

Die statistischen Analysen wurden mit Hilfe der Software GraphPad PRISM® Version 9 durchgeführt. Die Darstellung der Daten erfolgte als Mittelwert mit Standardfehler (*standard error of mean*, SEM). Zur Berechnung der statistischen Signifikanz wurden der *unpaired t test*, *multiple unpaired t tests*, der *Two-way ANOVA*-Test sowie der *Log rank (Mantel-Cox) test* verwendet. Etwaige Unterschiede galten als signifikant bei $p \leq 0,05$. Im Folgenden gilt: **** $p \leq 0,0001$, *** $p \leq 0,001$; ** $p \leq 0,01$ und * $p \leq 0,05$ und ns = nicht signifikant.

3. Ergebnisse

3.1 Klonierung der Chemokinrezeptor-Konstrukte

Als Kontrollen für die kombinierten Konstrukte, bestehend aus *Ccr4* und *Cxcr6*, dienen das Fluoreszenzprotein EGFP und die einzelnen Chemokinrezeptoren. Während die Kontrollen im Rahmen früherer Projekte der Arbeitsgruppe bereits vorhanden waren, wurden die Kombinationskonstrukte für dieses Projekt neu generiert. Alle Chemokinrezeptor-Konstrukte wurden ebenfalls an *Egfp* gekoppelt, um eine schnelle Erfassung der jeweiligen Transduktionseffizienz via Durchflusszytometrie zu ermöglichen. Die einzelnen funktionellen Bestandteile wurden über eine selbst spaltbare 2A-Sequenz verbunden, sodass die Rezeptoren und EGFP getrennt und in möglichst äquimolarer Ratio exprimiert wurden.

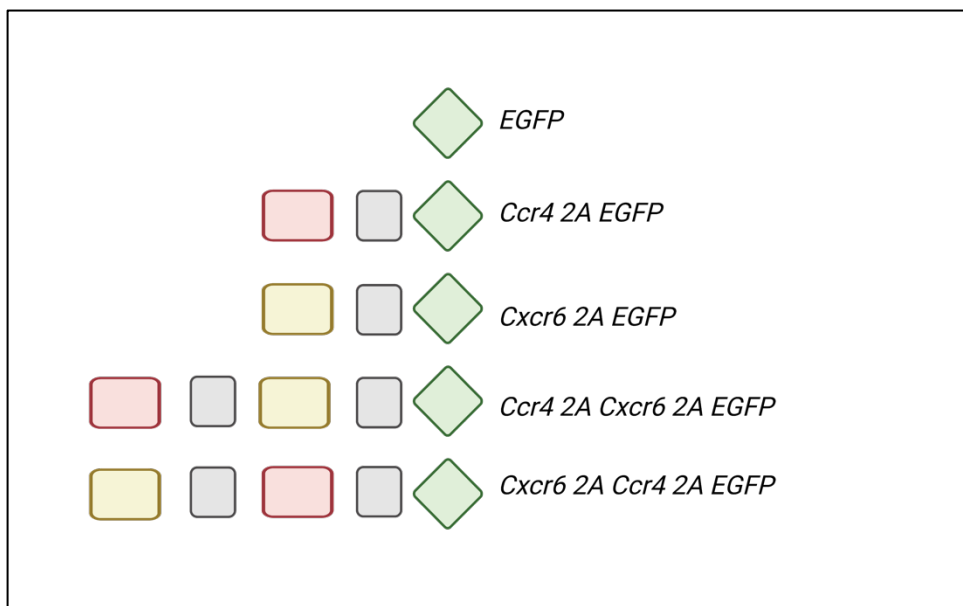


Abbildung 2: Schematische Darstellung der klonierten Konstrukte.

Es sind die Konstrukte dargestellt, die für dieses Projekt verwendet wurden. Die funktionellen Bestandteile *Ccr4* (rot), *Cxcr6* (gelb) sowie *Egfp* (grün) wurden über die Sequenz eines selbst spaltbaren 2A-Peptids (blau) verbunden. Die Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt.

3.2 Untersuchung der Aktivität und Zytotoxizität der transduzierten T-Zellen

3.2.1 Die transduzierten T-Zellen produzieren nach Kokulturen mit Tumorzellen $\text{INF-}\gamma$

Die Funktionalität der T-Zellen wurde anhand ihrer $\text{INF-}\gamma$ -Ausschüttung als Marker der T-Zellaktivierung nach Antigenerkennung *in vitro* untersucht. Hierbei wurden Kokulturen von den Ovalbumin-exprimierenden Panc02-OVA-Tumorzellen mit den für dieses Antigen spezifischen, murinen OT-1-T-Zellen angelegt und anschließend die $\text{INF-}\gamma$ -Konzentration mittels ELISA im Überstand untersucht. Hierbei zeigten T-Zellen, die mit einem oder beiden Chemokinrezeptoren und *Egfp* transduziert worden waren, ähnliche $\text{INF-}\gamma$ -Konzentrationen wie jene, welche nur mit der Kontrolle *Egfp* transduziert worden waren (Abbildung 3).

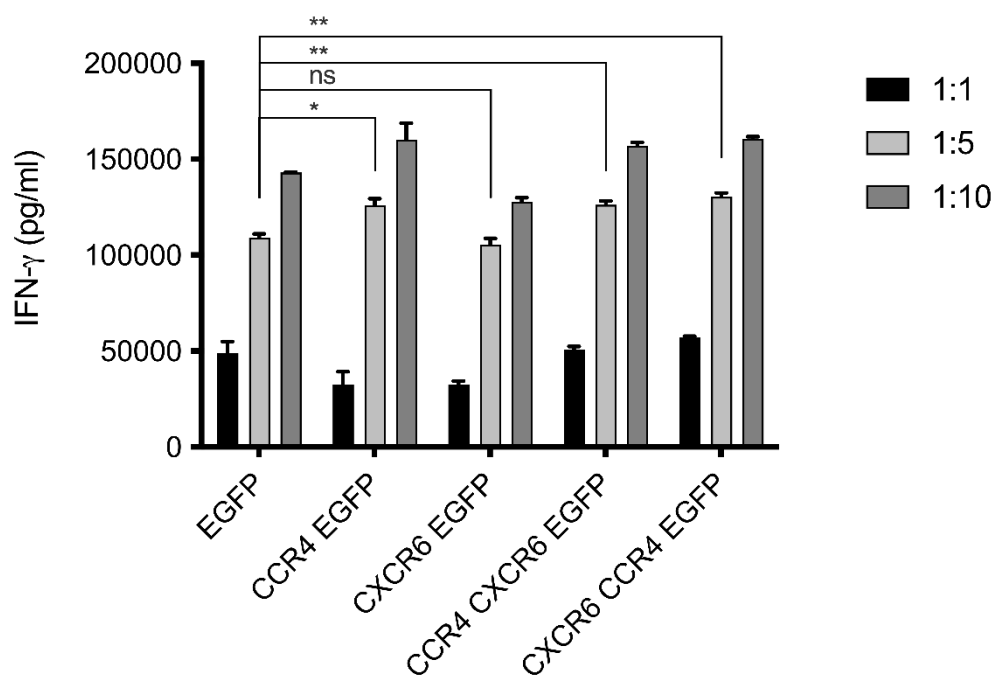


Abbildung 3: Chemokinrezeptor-transduzierte und nicht-Chemokinrezeptor-transduzierte tumorspezifische T-Zellen zeigen eine vergleichbare $\text{INF-}\gamma$ -Sekretion bei Kokultur mit Tumorzellen.

Panc02-OVA-Tumorzellen wurden mit OT-1-T-Zellen, welche entweder nur mit *Egfp* oder in Kombination mit *Ccr4*, *Cxcr6* beziehungsweise beiden Chemokinrezeptoren transduziert worden waren, für 12 Stunden kokultiviert. Hierfür wurden Z:E-Verhältnisse von 1:1, 1:5 und 1:10 verwendet. Im Anschluss erfolgte die Messung der $\text{INF-}\gamma$ -Konzentrationen mittels ELISA im Überstand. Es sind Mittelwerte von technischen Triplikaten \pm SEM dargestellt und repräsentativ für drei unabhängige Versuche. Die Resultate wurden mittels *unpaired t test* auf Signifikanz geprüft. Die Signifikanz ist zur besseren Übersicht nur bei Z:E 1:5 abgebildet.

3.2.2 Transduzierte tumorspezifische T-Zellen lysieren Tumorzellen

Neben der Aktivierung ist die Fähigkeit zur Lyse von Target-Zellen wichtig für die korrekte Funktionsweise von ZTL. Diese wurde anhand des unter physiologischen Bedingungen intrazellulären Enzyms Lactatdehydrogenase (LDH) untersucht, welches nach Zelllyse freigesetzt wird. Hierbei wurden nach den in 3.2.1 beschriebenen Kokulturen von Panc02-OVA-Tumorzellen mit transduzierten, murinen OT-1-T-Zellen die prozentuale Lyse anhand der LDH-Freisetzung berechnet. Der Prozentsatz der lysierten Zellen zeigte bei den Chemokinrezeptor-Konstrukten ein vergleichbares Niveau wie bei der EGFP-Kontrollgruppe (Abbildung 4).

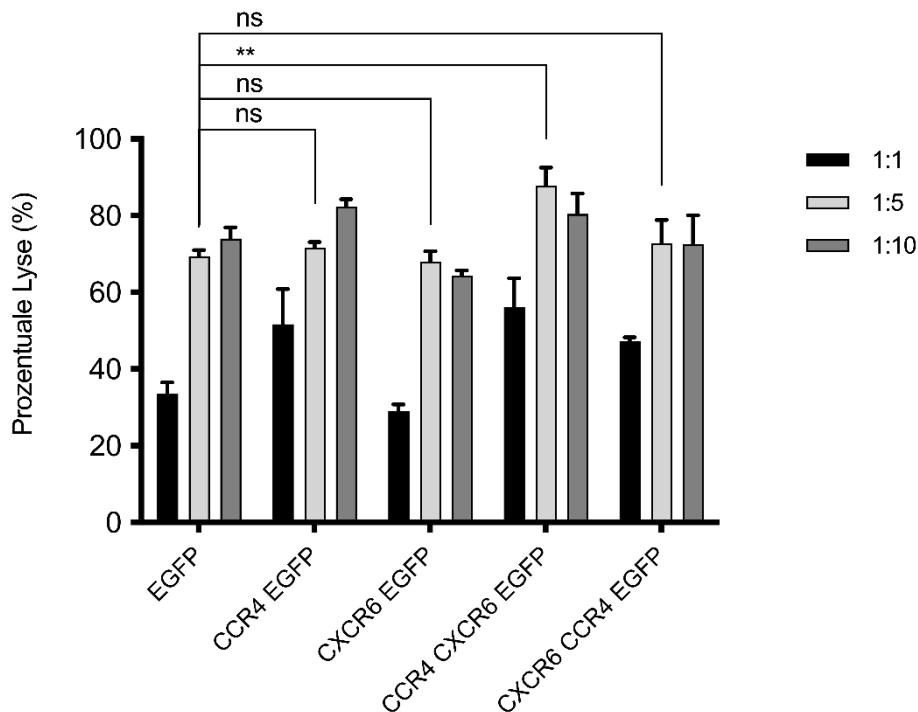


Abbildung 4: Transduzierte OT-1-T-Zellen können Panc02-OVA-Tumorzellen lysieren. Panc02-OVA-Tumorzellen wurden mit OT-1-T-Zellen, welche entweder nur mit *Egfp* oder in Kombination mit *Ccr4*, *Cxcr6* beziehungsweise beiden Chemokinrezeptoren transduziert worden waren, für 12 Stunden kokultiviert. Hierfür wurden Z:E-Verhältnisse von 1:1, 1:5 und 1:10 verwendet. Im Anschluss erfolgte die photometrische Messung der freigesetzten LDH-Konzentration sowie die Berechnung der prozentualen Lyse der Tumorzellen, wie unter 2.12.1 beschrieben. Es sind Mittelwerte von technischen Quadruplikaten \pm SEM dargestellt, welche repräsentativ für drei unabhängige Versuche stehen. Die Resultate wurden mittels *unpaired t test* auf Signifikanz geprüft. Die Signifikanz ist zur besseren Übersicht nur bei Z:E 1:5 abgebildet.

3.3 Chemokinrezeptor-transduzierte T-Zellen migrieren zu ihren korrespondierenden Liganden

Mit Hilfe von Migrationsversuchen wurde geprüft, ob die Expression der jeweiligen Rezeptoren auf den ZTL zu einer spezifischen Migration zu den korrespondierenden Liganden führt. Bei Betrachtung aller Zellen, die durch einen Porenfilter in Richtung der jeweiligen Chemokine migriert waren, zeigte sich bei der *Cxcr6*-transduzierten Population sowie den T-Zellen, die mit *Ccr4* und *Cxcr6* transduziert worden waren, eine signifikant erhöhte Migration zu den korrespondierenden Chemokinen CXCL16 beziehungsweise CXCL16 und CCL22 (Abbildung 5 A).

Bei den CCR4-positiven Lymphozyten zeigte sich eine Migration in allen Chemokinbedingungen, es ergab sich jedoch nur in der CCL22-Einzelkondition ein signifikanter Unterschied im Vergleich zum reinen Medium. In der EGFP-Gruppe ergaben sich wie erwartet keine signifikanten Unterschiede zwischen den Chemokingruppen und dem reinen Medium (Abbildung 5 A).

Um diese Ergebnisse auf die jeweilige Transduktionseffizienz zu normalisieren, wurde die EGFP-Ratio berechnet. Diese bezeichnet das Verhältnis des Prozentsatzes der EGFP-positiven Zellen nach der Migration zu dem der EGFP-positiven Zellen vor der Migration. Letzterer entspricht dabei der jeweiligen Transduktionseffizienz. Eine Ratio über eins bedeutet also eine Anreicherung an transduzierten Zellen in der migrierten Population. Die lediglich EGFP-positiven T-Zellen zeigten ein Verhältnis von circa eins in allen Konditionen. Interessanterweise ergab sich hier ein signifikanter Unterschied in der CXCL16- und der Doppelkondition im Vergleich zum reinen Medium. Die *Ccr4*-transduzierten Lymphozyten wiesen eine signifikant höhere Ratio in den CCL22- und die *Cxcr6*-transduzierten Zellen in den CXCL16-Konditionen auf. Die Populationen, die mit beiden Rezeptoren transduziert worden waren, zeigten ein signifikant höheres Verhältnis über eins in allen Chemokin-Konditionen (Abbildung 5 B).

3. Ergebnisse

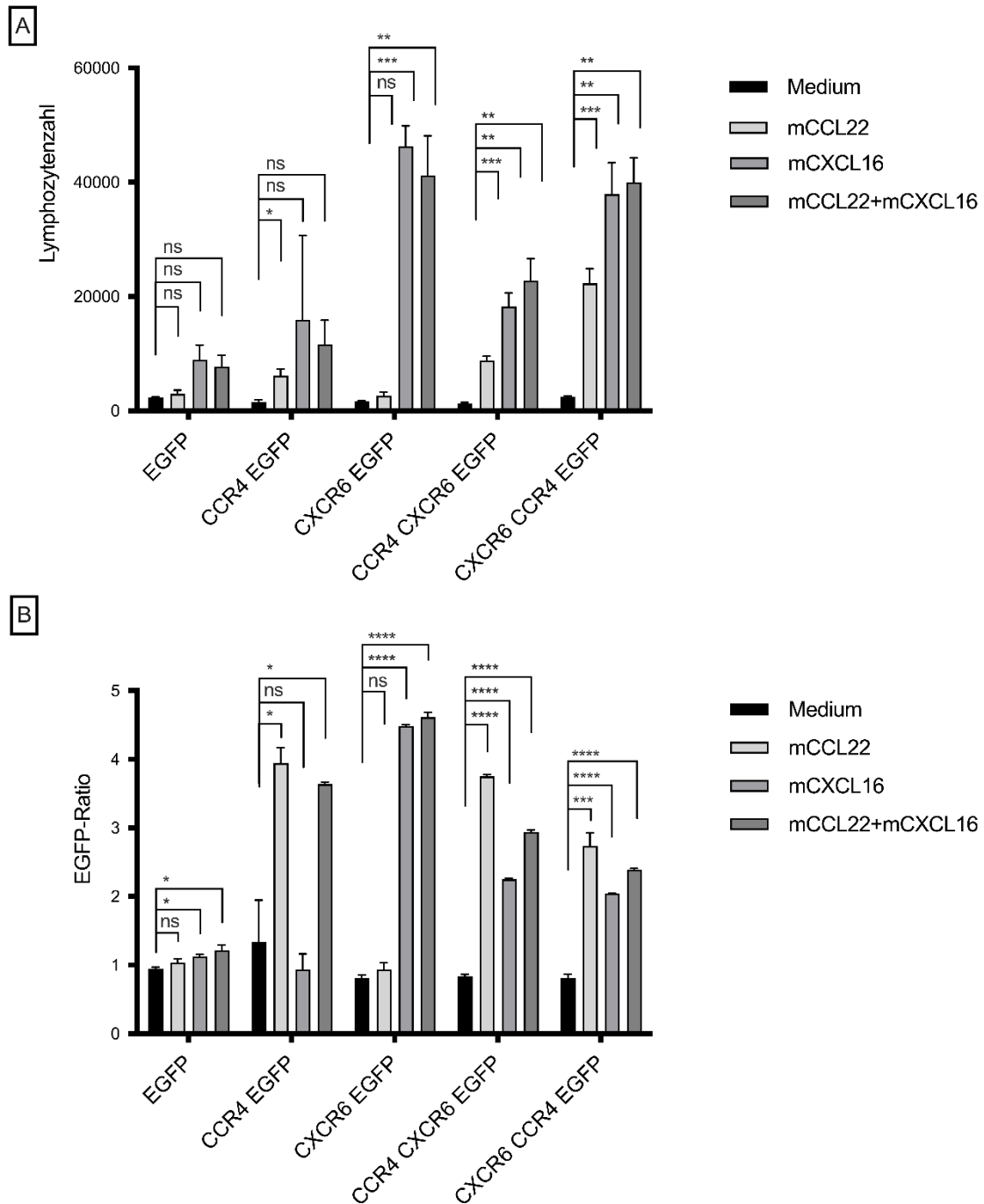


Abbildung 5: Chemokinrezeptor-transduzierte T-Zellen migrieren zu ihren korrespondierenden Liganden.

Transduzierte ZTL wurden auf einen Porenfilter einer Transwell-Platte pipettiert. Die unteren Wells dieser Platte enthielten hierbei entweder nur Migrationsmedium, Migrationsmedium mit rekombinantem murinen CCL22, mit rekombinantem murinen CXCL16 oder mit beiden Zytokinen. Nach 4 Stunden Inkubation wurden die migrierten Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. **(A)** Zu sehen ist die Zahl an Lymphozyten, die durch den Porenfilter migriert sind. **(B)** Die Darstellung zeigt die EGFP-Ratio, also das Verhältnis vom Prozentsatz der EGFP-positiven Zellen nach der Migration zu dem der EGFP-positiven Zellen vor der Migration. Die Daten sind als Mittelwerte von technischen Triplikaten \pm SEM dargestellt und repräsentativ für drei unabhängige Versuche. Die Resultate wurden mittels *multiple unpaired t tests* auf Signifikanz geprüft. Die Signifikanz wird zur besseren Darstellung lediglich gegenüber dem reinen Medium gezeigt.

3.4 Die Therapie mit Chemokinrezeptor-transduzierten T-Zellen führt zu einem reduzierten Tumorwachstum und höherem prozentualen Überleben im Mausmodell

Nach Testung der Funktionalität der transduzierten T-Zellen *in vitro*, erfolgte die Untersuchung ihrer Effektivität in einem murinen Tumormodell *in vivo*. Hierbei wurden Wildtyp-Mäusen Panc02-OVA-Tumorzellen subkutan in die Flanke injiziert und sobald der Tumor palpabel war, eine einmalige intravenöse Therapie mit OT-1-T-Zellen oder einer PBS-Kontrolle verabreicht. Die Zellen wurden zuvor mit einem Retrovirus, der für EGFP, CCR4 EGFP, CXCR6 EGFP oder beide Chemokinrezeptoren kodiert, transduziert. Die Mäuse einer Gruppe erhielten jeweils dieselbe Art transduzierter T-Zellen beziehungsweise die PBS-Kontrolle. Im weiteren Verlauf wurde das Tumorwachstum beobachtet und die durchschnittliche Tumorgöße sowie das Überleben der Mäuse in den verschiedenen Therapiegruppen gegeneinander aufgetragen (Abbildung 6 und 7).

Bei Injektion von PBS zeigte sich ein stetiges Wachstum, wohingegen sich bei allen anderen Konditionen zumindest zunächst eine Verkleinerung des Tumors beobachten ließ. Im weiteren Verlauf zeigte die EGFP-Kondition ein exponentielles Wachstum, während die Tumorgöße in der CCR4 EGFP- und der CXCR6 EGFP-Therapiegruppe ein Plateau erreichte. Die Mäuse, welche mit T-Zellen, die beide Chemokinrezeptoren exprimierten, behandelt worden waren, waren am Ende des Experiments tumorfrei. Signifikante Unterschiede ergaben sich im Vergleich zwischen der EGFP- und den Chemokinrezeptor-Gruppen nicht (Abbildung 6).

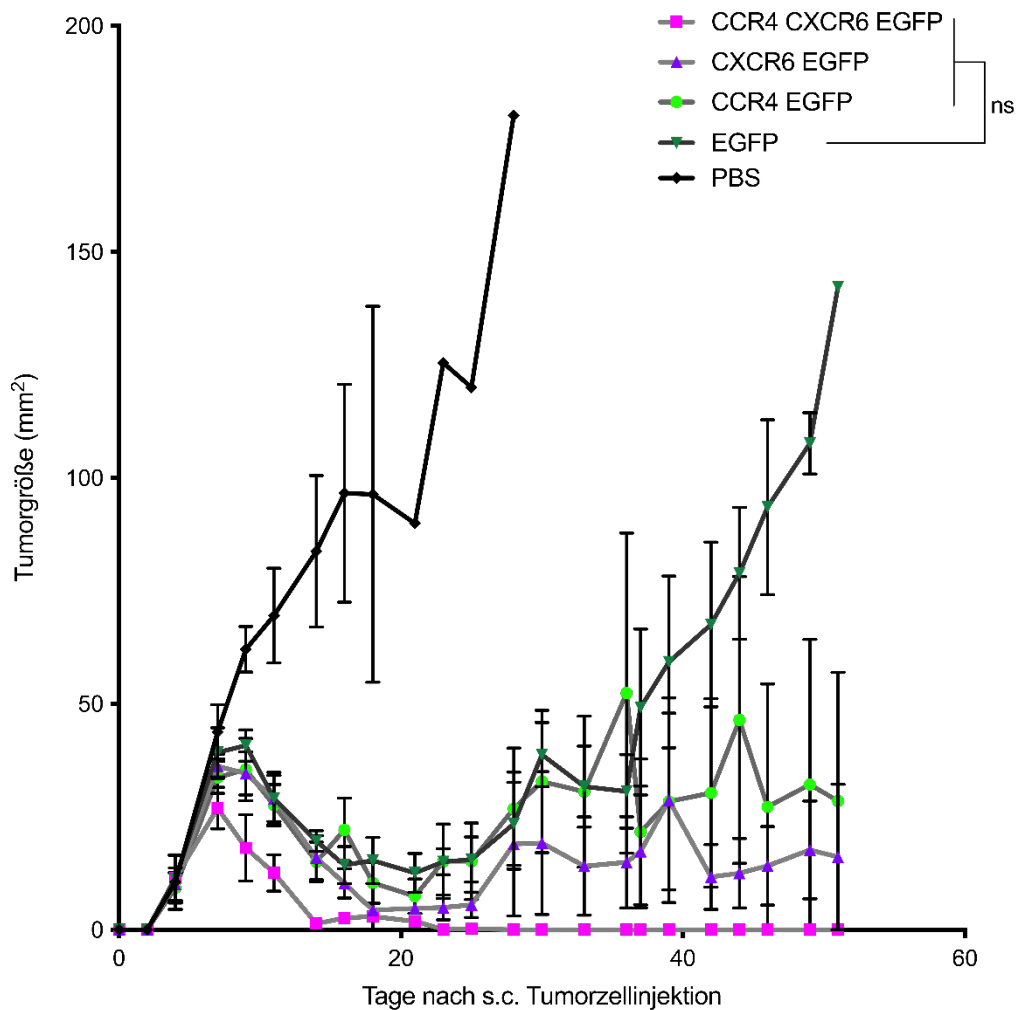


Abbildung 6: Chemokinrezeptor-transduzierte, tumorspezifische T-Zellen führen zu einem geringeren Tumorwachstum beim murinen heterotopen Pankreaskarzinom.

Wildtyp-Mäuse wurden nach Etablierung eines Tumors durch subkutane Injektion von 2×10^6 Panc02-OVA-Zellen in die Flanke intravenös mit PBS oder 10^7 *Egfp*⁻, *Ccr4 Egfp*⁻, *Cxcr6 Egfp*⁻ oder *Ccr4 Cxcr6 Egfp*⁻-transduzierten OT-1-T-Zellen behandelt. Die Abbildung stellt die Tumorgröße in mm² über die Zeit in Tagen dar. Die Ergebnisse wurden mittels *Two-way* ANOVA-Test auf Signifikanz geprüft. Hierbei ergaben sich im Vergleich zwischen der EGFP- und den Chemokinrezeptor-Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Die PBS- und EGFP-Gruppe bestanden jeweils aus 4, die CCR4 EGFP- und die CXCR6 EGFP-Gruppe aus jeweils 6 und die CCR4 CXCR6 EGFP-Gruppe aus 5 biologischen Replikaten respektive 5 Mäusen.

In Übereinstimmung zu diesen Ergebnissen war bei Versuchsende kein Tier der PBS-Gruppe am Leben. Die Überlebensrate der EGFP-Gruppe lag bei 25 %, der CXCR6 EGFP und CCR4 EGFP-Gruppe bei ca. 67 % und das Überleben der Mäuse in der CCR4 CXCR6 EGFP-Gruppe bei 100 %. Ein signifikanter Unterschied gegenüber der EGFP-Gruppe zeigte sich nur in der CCR4 CXCR6 EGFP-Gruppe (Abbildung 7).

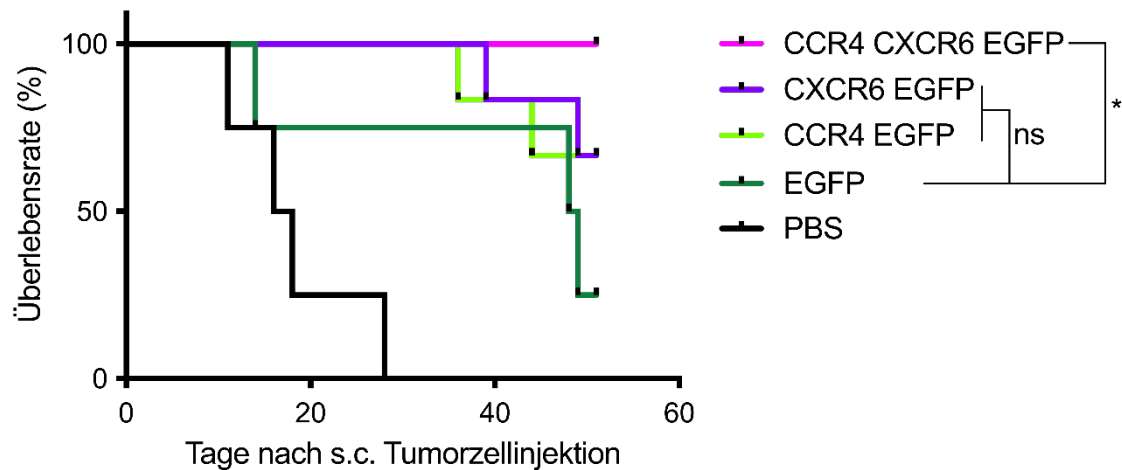


Abbildung 7: Chemokinrezeptor-transduzierte, tumorspezifische T-Zellen führen zu einem längeren Überleben in einem murinen heterotopen Pankreaskarzinom-Modell.

Wildtyp-Mäuse wurden nach Etablierung eines Tumors durch subkutane Injektion von 2×10^6 Panc02-OVA-Zellen in die Flanke intravenös mit PBS oder 10^7 *Egfp*-, *Ccr4 Egfp*-, *Cxcr6 Egfp*- oder *Ccr4 Cxcr6 Egfp*-transduzierten OT-1-T-Zellen behandelt. Die Abbildung zeigt die Überlebensrate der Mäuse in Abhängigkeit der Zeit seit Tumorzellinjektion in Tagen. Die Signifikanz der Chemokinrezeptor-Gruppen gegenüber der EGFP-Gruppe wurde mittels *Log-rank (Mantel-Cox) test* geprüft. Die PBS- und EGFP-Gruppe bestehen jeweils aus 4, die CCR4 EGFP- und die CXCR6 EGFP-Gruppe aus jeweils 6 und die CCR4 CXCR6 EGFP-Gruppe aus 5 biologischen Replikaten respektive 5 Mäusen.

Um zu untersuchen, ob eine Behandlung mit den transduzierten T-Zellen zu einer Langzeitimmunität gegen Panc02-OVA-Tumoren führt, wurden den überlebenden Tieren aus der CCR4 EGFP-, der CXCR6 EGFP- sowie der CCR4 CXCR6 EGFP-Gruppe ein weiteres Mal Tumorzellen subkutan injiziert. Das Tumorstadium wurde gemessen und mit dem von Wildtyp-Mäusen verglichen, denen zum ersten Mal Tumorzellen verabreicht wurden (Abbildung 8).

Die Tumor-naiven Mäuse zeigten ein stetiges Tumorstadium seit Beginn des Experiments. Dahingegen konnte für alle Chemokinrezeptor-Therapiebedingungen aus dem vorherigen Versuch kein Tumorstadium über den gesamten Versuchszeitraum beobachtet werden. Der Unterschied zwischen der Kontroll- und den Chemokinrezeptor-Gruppen war hierbei signifikant (Abbildung 8).

3. Ergebnisse

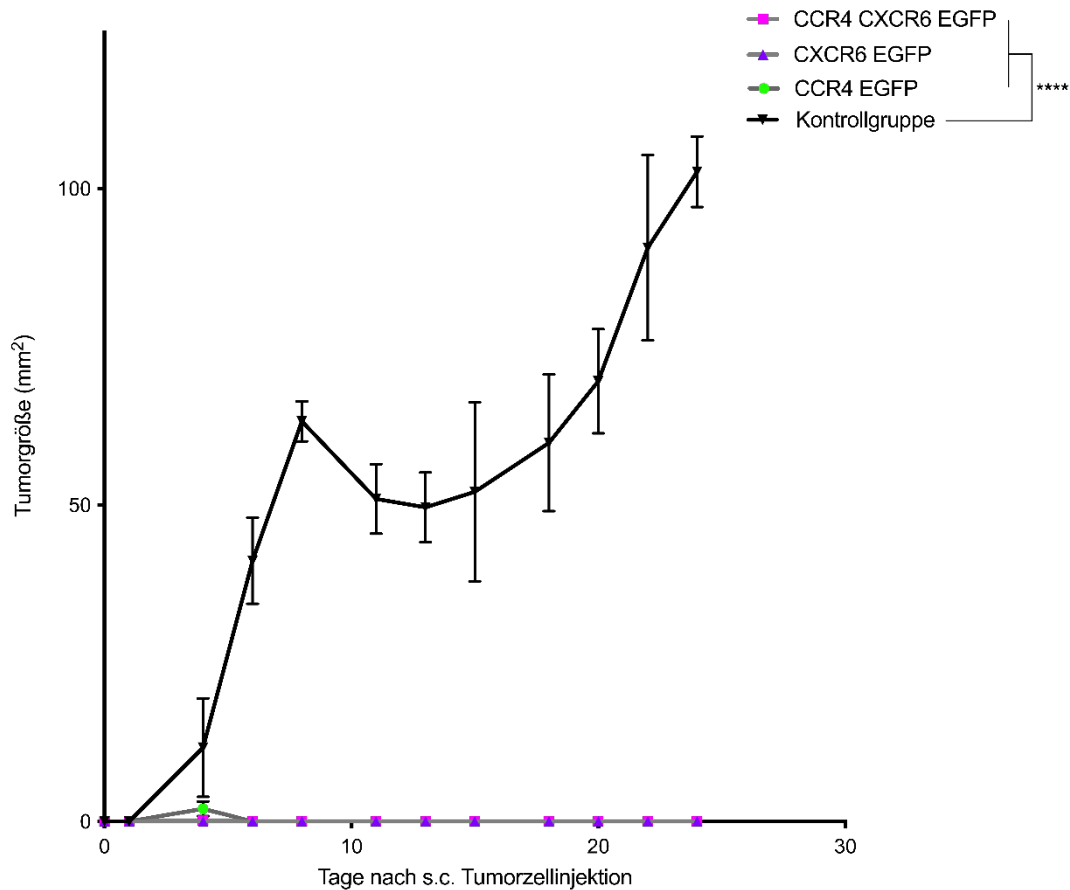


Abbildung 8: Tumorwachstum bei Mäusen nach erneuter oder erstmaliger Injektion von Tumorzellen.

2 x 10⁶ Panc02-OVA-Tumorzellen wurden Mäusen erneut subkutan in die Flanke verabreicht, denen in einem vorangegangenen Versuch bereits Tumorzellen injiziert und die dann mit transduzierten OT-1-T-Zellen behandelt worden waren. Hierzu wurden jeweils 3 überlebende Mäuse der CCR4 EGFP- und CXCR6 EGFP-Gruppe des vorherigen Versuchs mit den 5 überlebenden Tieren aus der CCR4 CXCR6 EGFP-Gruppe verglichen. Als Kontrolle dienten 3 Wildtyp-Mäuse („Kontrollgruppe“), welche vorher nicht mit Tumorzellen oder ZTL injiziert worden waren. Dargestellt ist die Tumorgöße in mm² über die Zeit in Tagen. Der Unterschied zwischen der Kontroll- und den Chemokinrezeptor-Gruppen wurde mittels *Two-way* ANOVA-Test auf Signifikanz geprüft. Es ergab sich bei allen Chemokinrezeptorgruppen ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe.

4. Diskussion

Die AZT hat in den vergangenen Jahren bedeutende Erfolge in der Behandlung von Krebserkrankungen erzielt, steht jedoch weiterhin vor großen Herausforderungen bezüglich ihrer Effektivität, aber auch hinsichtlich auftretender Nebenwirkungen (Kobold et al. 2018; Zhang et al. 2019).

Dass die Nutzung von Chemokinrezeptoren, insbesondere der Rezeptoren CCR4 und CXCR6, zur Verbesserung der AZT vorteilhaft sein kann, wurde bereits mehrfach gezeigt (Rapp et al. 2016; Di Pilato et al. 2021). Auch Untersuchungen zur Kombination von mehreren Ansätzen, wie die genetische Modifikation mittels CAR und Chemokinrezeptor, ergaben vielversprechende Ergebnisse (Lesch et al. 2021). Daher erscheint die Evaluation von weiteren Kombinationen, wie beispielsweise zweier Chemokinrezeptoren, zur Verbesserung der AZT sinnvoll.

4.1 Funktionalität der transduzierten T-Zellen

Um zu untersuchen, ob eine bestimmte Modifikation von T-Zellen für die AZT zukünftig nutzbar gemacht werden kann, ist es wichtig, die entsprechend veränderten Zellen auf ihre Funktionalität zu prüfen. Daher wurde zunächst *in vitro* getestet, ob die mit den Chemokinrezeptoren transduzierten ZTL nach Antigenerkennung aktiviert werden und ihre Targetzellen effektiv lysieren können.

Wie unter 3.2.1 und 3.2.2 dargestellt, zeigten auch die mit den größeren Kombinationskonstrukten transduzierten Zellen keine Einschränkung in oben genannten Fähigkeiten. Natürlich gilt es zu beachten, dass eine adäquate Tumorerkennung via TZR oder CAR notwendig ist. In diesem Fall besaßen die für die Therapiezellen verwendeten transgenen OT-1-Mäuse bereits spezifische T-Zellen für die Tumorzelllinie Panc02-OVA.

Molon et al. postulierten, dass Chemokinrezeptoren als Kostimulatoren innerhalb der immunologischen Synapse wirken können (Molon et al. 2005). Die Akkumulation von CCR5 und CXCR4 in der immunologischen Synapse führte hierbei zu einer besseren Interaktion zwischen T-Zellen und Antigen-präsentierenden Zellen, einer stärkeren

Proliferation und vermehrten Zytokin-Produktion der T-Zellen (Molon et al. 2005). Ähnliche Mechanismen sind auch für CCR4 und CXCR6 beschrieben: CCR4 scheint die T-Zell-Aktivierung und Antigenerkennung über eine optimierte Interaktion zwischen T-Zellen und dendritischen Zellen zu verbessern und auch CXCR6 spielt eine Rolle an der Rekrutierung, dem Überleben und der Interaktion mit weiteren Zellen im TME (Rapp et al. 2016; Di Pilato et al. 2021).

In den unter 3.2.1 und 3.2.2 dargestellten Versuchen wurden nur die Tumorzellen selbst und keine weiteren Zellen des TME verwendet, wie sie normalerweise *in vivo* vorkommen. Da jedoch unter den Bedingungen *in vivo* auch die den Tumor umgebenden Zellen die Chemokine CCL22 und CXCL16 produzieren, könnte die Fähigkeit zur Lyse und Aktivierung der transduzierten Zellen *in vivo* noch ausgeprägter sein (Rapp et al. 2016; Lesch et al. 2021).

Um eine ausreichende anti-tumorale Immunantwort *in vivo* zu erreichen, ist zudem eine adäquate Proliferation der T-Zellen notwendig (Lim et al. 2017). Im Rahmen dieser Arbeit wurde diesbezüglich kein Proliferationsassay, also eine gezielte Untersuchung der Expansion der Zellen, durchgeführt. Da jedoch eine unbeeinträchtigte Zellvermehrung für alle Versuche *in vitro* und *in vivo* gegeben war, wurde von einer intakten Proliferationsfähigkeit der transduzierten T-Zellen ausgegangen. Es bleibt unklar, ob die Chemokinrezeptoren einen Einfluss in der vorliegenden Situation haben, dies sollte aber in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

4.2 Migration als Angriffspunkt zur Verbesserung der adoptiven T-Zell Therapie

4.2.1 Die Nutzung von Chemokinen und von Zytokinen und ihren Rezeptoren zur Verbesserung der Migration zum Tumor

4.2.1.1 Die CCR4-CCL22- und CXCR6-CXCL16-Achse als Ansatz

Ein primäres Ziel der Modifikation von ZTL mit Chemokinrezeptoren ist die Verbesserung der Migration von anti-tumoralen Immunzellen zum Tumor (Di Stasi et al. 2009; Moon et al. 2011; Rapp et al. 2016; Lim et al. 2017).

Mithilfe von *in vitro*-Migrationsassays konnte hier gezeigt werden, dass die T-Zellen, die mit beiden Chemokinrezeptoren transduziert wurden, auch in Richtung beider Chemokine migrieren können. So könnte möglicherweise ein breiteres Tumorspektrum mit variabler Chemokinausschüttung von CXCL16 beziehungsweise CCL22 durch eine AZT mit entsprechend modifizierten T-Zellen erfasst werden.

CXCL16 fand sich in einem breiten Spektrum solider Karzinome, unter anderem beim Pankreas-, Lungen- und Mammakarzinom (Wente et al. 2008; Hu et al. 2014; Allaoui et al. 2016). Lesch et al. konnten zudem eine verbesserte Infiltration von *Cxcr6*-transduzierten T-Zellen in reseziertem, humanem Ovarialkarzinomgewebe zeigen und postulierten, dass in Zukunft eine breite Anwendung solcher Zellen bei einer Gruppe CXCL16-exprimierender, solider Tumoren möglich sein könnte (Lesch et al. 2021).

Neben Pankreastumoren zeigen auch andere solide Tumoren, wie das kolorektale Karzinom, das Magen-, Mamma- und das Ovarialkarzinom, eine intratumorale Expression von CCL22 (Curiel et al. 2004; Mizukami et al. 2008; Wågsäter et al. 2008; Gobert et al. 2009; Anz et al. 2011; Faget et al. 2011; Anz et al. 2015; Rapp et al. 2016). Auch dieses Chemokin könnte daher in Zukunft in einem großen onkologischen Patientenkollektiv genutzt werden.

Dies ist insofern nicht unerheblich, da die AZT als personalisierte Therapie in der Herstellung sehr aufwendig und kostenintensiv und somit in der routinemäßigen Anwendung aktuell noch beschränkt ist (Kobold et al. 2018). Wenn also durch eine bestimmte Modifikation von T-Zellen mehrere Malignome gezielt erfasst würden, könnte dies die Therapie breiter verfügbar und kostengünstiger machen (June et al. 2015). Da beide Chemokin-Chemokinrezeptor-Achsen, wie oben beschrieben, bei einer Vielzahl von Tumoren vorkommen, erscheint diese Kombination besonders günstig (Curiel et al. 2004; Mizukami et al. 2008; Wågsäter et al. 2008; Gobert et al. 2009; Anz et al. 2011; Faget et al. 2011; Hu et al. 2014; Anz et al. 2015; Allaoui et al. 2016; Rapp et al. 2016; Lesch et al. 2021).

Matsumura et al. konnten weiterhin zeigen, dass eine Bestrahlung beim humanen und murinen Brustkrebs eine vermehrte Sekretion von CXCL16 durch Tumorzellen bewirkt und zu einer stärkeren Migration von CD8-positiven, CXCR6-exprimierenden T-Zellen zum Tumor führt (Matsumura et al. 2008). Daher könnte die Radiotherapie, als eine

etablierte Methode in der Onkologie, zusammen mit der AZT die Tumorthherapie weiter verbessern (Matsumura et al. 2008).

Da die CXCL16-CXCR6-Achse im Organismus eine bedeutende tumorfördernde Rolle zu spielen scheint, könnte die Wahrscheinlichkeit eines therapiebedingten Verlusts der CXCL16-Expression geringer sein als bei anderen Formen der zielgerichteten Behandlung (Wente et al. 2008; La Porta 2012; Chalabi-Dchar et al. 2015; Lesch et al. 2021). Der Angriffspunkt der Therapie bliebe in diesem Falle erhalten (Lesch et al. 2021). Dies ist insofern wichtig, da ein Verlust des Zielantigens durch den Selektionsdruck einer AZT bereits bei CD19 CAR T-Zellen gezeigt werden konnte (Sotillo et al. 2015).

Erstaunlich war, dass sich bei dem unter 3.3 gezeigten Migrationsassay auch eine Migration von *Crc4 Egfp*-transduzierten T-Zellen entlang eines CXCL16-Gradienten beobachten ließ. Diese war jedoch nicht signifikant und stellte sich bei Betrachtung der EGFP-Ratio, also der Anreicherung an transduzierten Zellen in der migrierten Population, nicht mehr dar. Daneben zeigte sich eine Erhöhung der EGFP-Ratio bei *Egfp*-transduzierten Zellen in den CXCL16-Einzel- und -Doppelkonditionen. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass der Rezeptor CXCR6 in gewissem Maße auch von nicht transduzierten ZTL exprimiert wird und folglich nicht ausschließlich auf mit diesem Rezeptor transduzierten T-Zellen gefunden werden kann (Unutmaz et al. 2000; Agostini et al. 2005; Sato et al. 2005; Lesch et al. 2021).

4.2.1.2 Weitere Möglichkeiten zur Nutzung von Chemo- beziehungsweise Zytokinen und ihren Rezeptoren im Rahmen der adoptiven T-Zell Therapie

Es ist bekannt, dass auch andere Chemokine und ihre Rezeptoren eine Rolle in der Tumorkontrolle spielen (Karin 2020; Märkl et al. 2022). Beispielsweise führt die CXCR3-abhängige Rekrutierung von ZTL und natürlichen Killerzellen über die Chemokine CXCL9 und CXCL10 zu einem anti-tumoralen Effekt (Karin 2020; Märkl et al. 2022). Dementsprechend resultierte eine adoptive Therapie mittels natürlichen Killerzellen in einer verstärkten Migration, einer geringeren Tumorlast und einem höheren Überleben beim CXCL10-transfizierten Melanom im Vergleich zu Wildtyp-Tumoren im Xenograft-Modell (Wennerberg et al. 2015).

Die Transduktion mit *Cxcr2* verbesserte ebenfalls die T-Zell-Migration in Richtung des im humanen Melanom exprimierten Chemokins CXCL1 (Kershaw et al. 2002; Nguyen et al. 2022). Daneben führte die Modifikation mit CCR2b in einem Neuroblastom-Xenograft-Modell zu einer stärkeren Migration und einem verbessertem anti-tumoralem Effekt (Craddock et al. 2010). Moon et al. konnten für *Ccr2b*-transduzierte T-Zellen ähnliche Ergebnisse in einem malignen Pleura-Mesotheliom-Modell zeigen (Moon et al. 2011).

Daten von Iellem et al. weisen darauf hin, dass die Expression von CCR8 auf regulatorischen T-Zellen selektiver als der hier untersuchte Rezeptor CCR4 ist (Iellem et al. 2001). Man könnte daher zukünftig untersuchen, ob die Koexpression von CCR8 und CXCR6 mit weniger unerwünschten Nebenwirkungen einhergeht als die Kombination mit CCR4. Die Verwendung von CCR8 in CAR T-Zellen zeigte bereits im murinen Modell sowie im humanen Xenograft-Modell vielversprechende Ergebnisse (Cadilha et al. 2021).

Ein weiterer Ansatz, Zytokin- beziehungsweise Chemokine zur Verbesserung der AZT zu nutzen, ist die Verwendung von invertierten Zytokinrezeptoren (Mohammed et al. 2017; Wang et al. 2019; Nguyen et al. 2022). So konnten Wang et al. zeigen, dass ein invertierter Zytokinrezeptor mit der Ektodomäne des Interleukin-4-Rezeptors und der Endodomäne des Interleukin-21-Rezeptors bei Konfrontation mit dem eigentlich tumorfördernden Interleukin-4 zu einem größeren anti-tumoralen Effekt von CAR T-Zellen führt (DeNardo et al. 2009; Wang et al. 2019). Die Stimulation von CD8-positiven T-Zellen mittels Interleukin-21 führte hierbei in einer früheren Arbeit im Rahmen der AZT zu einer stärkeren Tumorregression (Hinrichs et al. 2008).

Weiterhin versucht man, CAR T-Zellen so zu modifizieren, dass sie über die Expression bestimmter Zytokine die Infiltration und den Erhalt der bereits existierenden Tumor-infiltrierenden Lymphozyten fördern (Nguyen et al. 2022). So führte die Koexpression eines anti-VEGFR-2 CAR und Interleukin-12 zu Tumorinfiltration und -regression, während die Transduktion mit den jeweiligen Einzelkonstrukten das Tumorwachstum nicht beeinflusste (Chinnasamy et al. 2012). Adachi et al. konnten wiederum zeigen, dass die AZT mit Interleukin-7- und CCL19-koexprimierenden CAR T-Zellen in Mäusen zu einer verbesserten Tumorinfiltration von dendritischen Zellen und T-Zellen sowie einem stärkeren anti-tumoralem Effekt führt (Adachi et al. 2018). Eine T-Zell-Depletion vor einer solchen AZT resultierte hierbei in einem reduzierten

Behandlungserfolg (Adachi et al. 2018). Dies könnte auf das Zusammenspiel von Therapie- und endogenen Immunzellen bei AZT mit Zytokin-modifizierten CAR T-Zellen zu Gunsten eines anti-tumoralen Effekts hinweisen (Adachi et al. 2018; Nguyen et al. 2022).

Eine weitere Möglichkeit, die Tumordinfiltration mittels Zytokinen im Rahmen der AZT zu verbessern, ist die Nutzung eines onkolytischen Virus als Träger bestimmter Zytokine (Nishio et al. 2014; Nguyen et al. 2022). So führte die Verwendung eines onkolytischen Adenovirus mit intratumoraler Freisetzung von CCL5 und Interleukin-15 in Kombination mit CAR T-Zellen zu einer gesteigerten T-Zell-Infiltration, einem verminderten Tumorwachstum und längeren Überleben in Mäusen (Nishio et al. 2014).

4.2.2 Weitere Ansätze zur Verbesserung der Tumordinfiltration

Neben der Verwendung von Chemokinrezeptoren gibt es noch andere Ansätze, die Tumordinfiltration von T-Zellen zu verbessern (Bellone et al. 2013). So konnten Calcinotto et al. zeigen, dass ein Fusionsprodukt aus Tumornekrosefaktor und dem „Tumor-*homing*“ Peptid NGR im Mausmodell die endotheliale Barriere zu Gunsten einer Infiltration von CD8-positiven T-Zellen verändert und somit eine Immuntherapie verbessern, das Tumorwachstum verzögern und das Überleben verlängern kann (Calcinotto et al. 2012). Der beschriebene Effekt konnte durch eine zusätzliche Chemotherapie noch weiter verstärkt werden (Calcinotto et al. 2012).

Auch die Verwendung eines *Anti-vascular endothelial growth factor*-Antikörpers führte zu einer verbesserten Tumordinfiltration von adoptiven T-Zellen im murinen Melanom-Modell (Shrimali et al. 2010). Daher könnte die Nutzung von Tumornekrosefaktor oder *Anti-vascular endothelial growth factor*-Antikörper den Effekt der Chemokinrezeptor-gestützten AZT, wie sie in dieser Arbeit untersucht wird, noch weiter verbessern (Shrimali et al. 2010; Calcinotto et al. 2012).

Weitere Angriffspunkte sind Bestandteile der extrazellulären Matrix, wie beispielsweise Hyaluronan und Kollagen I (Provenzano et al. 2008; Whatcott et al. 2011; Jacobetz et al. 2013; Venning et al. 2015; Nguyen et al. 2022). Man geht davon aus, dass Hyaluronan mit dem Kollagennetzwerk interagiert und den Druck im Interstitium erhöht (Whatcott et al. 2011). Hyaluronan könnte die Zugänglichkeit von Therapeutika zum

Tumor einschränken und ein Abbau über eine Hyaluronidase daher den Therapieeffekt einer AZT verstärken (Whatcott et al. 2011; Nguyen et al. 2022).

Zusammenfassend zeigen sich neben der hier untersuchten Kombination zweier Chemokinrezeptoren mehrere weitere Ansatzpunkte, die Tumordinfiltration und Migration bei der AZT zu verbessern (Nguyen et al. 2022). Hierbei erscheint die in dieser Arbeit thematisierte Kombination von sich in ihrer Funktion ergänzenden Chemokinrezeptoren biologisch sinnvoll und sehr vielversprechend (Rapp et al. 2016; Di Pilato et al. 2021). Dies muss allerdings in weiteren Studien ferner evaluiert werden.

4.3 Die Kombination von CCR4 und CXCR6 im Mausmodell

Nachdem eine ausreichende Funktionalität der modifizierten ZTL *in vitro* bestätigt werden konnte, erfolgte die *in vivo*-Testung in einem murinen, heterotopen Pankreaskarzinommodell. Da auch die Kontrollzellen, die nur mit *Egfp* transduziert worden waren, einen Ovalbumin- und damit Tumor-spezifischen TZR besaßen, wurde noch eine reine Pufferkontrolle mit PBS in den Versuchsaufbau inkludiert. Bei Therapie mit dieser zeigte sich ein stetiges Wachstum des subkutanen Tumors sowie ein deutlich verkürztes Überleben der entsprechenden Mäuse.

Bei allen anderen Konditionen mit OT-1-T-Zellen ließ sich zumindest zunächst eine Verkleinerung des Tumors beobachten. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass Peptide von Ovalbumin zusammen mit *major histocompatibility complex* (MHC)-Molekülen auf Panc02-OVA-Zellen präsentiert werden und alle verabreichten OT-1-T-Zellen einen Antigen-spezifischen TZR besitzen (Jacobs et al. 2011). Sie können die Zellen somit prinzipiell erkennen und töten (Dembic et al. 1986).

Im Verlauf zeigten sich jedoch deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Therapiekonditionen zugunsten der Kombinationsgruppe: Die Tiere der Gruppe CCR4 CXCR6 EGFP zeigten ein geringeres Tumorstadium sowie eine höhere Überlebensrate sowohl im Vergleich zu den Chemokin-Einzelkonstruktgruppen als auch im Vergleich zur Therapie mit T-Zellen ohne Modifikation mittels Chemokinrezeptor.

Diese Ergebnisse unterstützend, konnten auch Rosenberg et al. bei Patienten mit malignem Melanom zeigen, dass eine große Anzahl Tumor-spezifischer T-Zellen allein die Tumorprogression nicht verhindern kann (Rosenberg et al. 2005). Es müssen daher noch andere Faktoren als die Tumor-Spezifität eine Rolle in der anti-tumoralen Immunantwort spielen.

Ein Grund für den verbesserten *in vivo*-Effekt könnten die oben beschriebenen Mechanismen bei Transduktion von ZTL mit *Ccr4* und *Cxcr6* sein, wie die Verbesserung der Rekrutierung, der T-Zell-Aktivierung und Antigenerkennung sowie der Interaktion von Tumor-infiltrierenden ZTL mit Zellen im TME (Rapp et al. 2016; Di Pilato et al. 2021). Schließlich scheinen Tumor-infiltrierende Lymphozyten eine wichtige Rolle in der Tumorregression zu spielen (Besser et al. 2010). CXCL16 wirkt außerdem dual: Es ist in seiner löslichen Form chemotaktisch aktiv und vermittelt in seiner Membran-gebundenen Form die Zelladhäsion (Matloubian et al. 2000; Wilbanks et al. 2001; Nakayama et al. 2003; Agostini et al. 2005; Linke et al. 2019). All diese Punkte könnten zu dem verbesserten *in vivo*-Effekt bei Transduktion mit Chemokinrezeptoren geführt haben.

Bemerkenswert ist, dass die Kombination der beiden Chemokinrezeptoren einen größeren Therapieeffekt zu haben scheint als die Einzelkonditionen. Zwar ist der Unterschied beim Tumorwachstum zwischen der Kombinations- und der jeweiligen Einzelkonstrukt-Gruppe in dem dargestellten Versuch nicht signifikant, möglicherweise ließe sich aber eine solche Signifikanz durch eine größere Versuchstier-Anzahl zeigen. Beim Überleben zeichnete sich bereits in diesem Versuchs-Setting ein signifikanter Unterschied ab. Dies unterstreicht den synergistischen beziehungsweise additiven anti-tumoralen Effekt der beiden Chemokinrezeptoren in ZTL. Daher scheinen diejenigen Krebsformen, bei denen eine Expression von CXCL16 und CCL22 beschrieben ist, wie das Pankreas- oder Mammakarzinom, für die CCR4 CXCR6-gestützte AZT besonders geeignet (Wente et al. 2008; Anz et al. 2011; Allaoui et al. 2016; Rapp et al. 2016).

Zudem waren nur die an der Flanke sichtbaren, subkutanen Tumoren der Messung zugänglich. Etwaige von außen nicht sichtbare Tumor-Metastasen sowie die Ausdehnung des Tumors nach innen wurde nicht in die Datenerhebung miteinbezogen.

Dass der anfängliche Therapieeffekt im Sinne einer Verkleinerung des Tumors in der EGFP-Gruppe mit der Zeit verschwand, hängt möglicherweise auch mit einer T-Zell-

exhaustion dieser T-Zellen zusammen (Hashimoto et al. 2018). Eine verbesserte Zell-Zell-Interaktion der Therapiezellen mit den *bystander*-Zellen im TME bei Modifikation mit CCR4 oder CXCR6 könnte diese T-Zell-*exhaustion* in den jeweiligen anderen Therapiegruppen abgeschwächt oder verhindert haben (Rapp et al. 2016; Di Pilato et al. 2021). Ein solcher Effekt würde neben der Verbesserung der Migrationsfähigkeit und damit der Herstellung einer physikalischen Nähe zwischen Therapie- und Tumorzellen einen wichtigen Aspekt in der Überwindung von Limitationen der AZT darstellen (Lim et al. 2017). So könnte man eventuell über oben genannte Mechanismen ein sekundäres Therapieversagen durch Ermüdung der ZTL im TME verhindern und eine dauerhafte Tumorkontrolle gewährleisten (Wherry et al. 2015).

Dass Chemokinrezeptoren ein wichtiger Ansatzpunkt zur Verbesserung der AZT sind, spiegelt sich auch in der aktuellen Forschung wider: In einer aktuellen Phase I/II-Studie wird der Effekt von CXCR2 und des *nerve growth factor receptor* bei Patienten mit Stadium 3- und metastasiertem Melanom überprüft (NCT01740557). In einer weiteren klinischen Studie wird der Therapieeffekt von CCR4 in CD30-spezifischen CAR T-Zellen untersucht (NCT 03602157).

Die Nutzung und Umwandlung zweier, eigentlich immunsuppressiver und tumorprogressiver Achsen scheint besonders elegant und wirkungsvoll: Sowohl CCR4 als auch CXCR6 wirken über das Anlocken von unter anderem regulatorischen T-Zellen immununterdrückend und damit tumorfördernd (Iellem et al. 2001; Curiel et al. 2004; Gobert et al. 2009; La Porta 2012; Oldham et al. 2012; Allaoui et al. 2016). Da bei Verwendung von *Cxcr6*- und *Ccr4*-transduzierten ZTL die regulatorischen T-Zellen, welche eine wichtige Rolle in der Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen spielen, im Gegensatz zur Therapie mit Anti-CCR4-Antikörper nicht direkt blockiert werden, könnte das Risiko für Autoimmunreaktionen eventuell reduziert werden (Takahashi et al. 1998; Sugiyama et al. 2013).

Die zukünftige Untersuchung weiterer Kombinationen von Chemokinrezeptoren, wie beispielsweise CCR4 oder CXCR6 mit CXCR2 oder CCR2b erscheint sicherlich sinnvoll (Kershaw et al. 2002; Craddock et al. 2010; Moon et al. 2011; Rapp et al. 2016; Lesch et al. 2021). Die Koexpression von CCR8 und CCR4 wiederum könnte aufgrund ihrer überlappenden biologischen Funktion einen geringeren Benefit im Rahmen der AZT aufweisen (Iellem et al. 2001; Rapp et al. 2016).

Auch die Kombination einer Chemokinrezeptor-gestützten AZT mit einem onkolytischen Virus als Träger bestimmter Zytokine, Therapeutika zur Veränderung der Vaskularisation oder zur Modifikation der extrazellulären Matrix, wie oben beschrieben, erscheint durch die gleichzeitige Nutzung verschiedener Angriffspunkte erfolgsversprechend (Shrimali et al. 2010; Whatcott et al. 2011; Nishio et al. 2014; Nguyen et al. 2022). Es bedarf allerdings noch weiterer Forschung, um sinnvolle Kombinationen zu identifizieren.

4.4 Effekte der adoptiven T-Zell Therapie auf die Langzeitimmunität gegen Tumoren

Für das Überleben von Patienten im klinisch-onkologischen Alltag ist besonders der Aspekt der Langzeitimmunität interessant (Palucka et al. 2011).

Um diese nähergehend zu untersuchen, wurden die überlebenden Mäuse aus der CCR4 EGFP-, der CXCR6 EGFP- sowie der CCR4 CXCR6 EGFP-Gruppe des vorherigen Versuchs erneut mit Tumorzellen konfrontiert und ihr Tumorwachstum mit naiven Mäusen verglichen. Auch hier zeigte sich ein erheblicher Unterschied: Während kein Tier mit vorangegangener AZT bei erneuter Exposition einen Tumor entwickelte, wiesen die Kontrollmäuse ein stetiges Tumorwachstum auf. Da die Tiere, die im vorangegangenen Versuch mit PBS oder *Egfp*-transduzierten T-Zellen behandelt worden waren, aufgrund der prädefinierten Abbruchkriterien aus dem Versuch genommen wurden, konnten diese Konditionen nicht mehr untersucht werden. Jedoch wäre es interessant, ob die Immunität bei Tumorzell-Re-Exposition durch die Expression von Chemokinrezeptoren auf Tumor-spezifischen OT-1-T-Zellen verbessert werden kann.

Ob beispielsweise eine verbesserte Interaktion der Therapiezellen mit den Zellen im TME bei Transduktion mit *Ccr4* oder *Cxcr6* auch in der Entstehung einer Langzeitimmunität bedeutend ist, muss in Zukunft noch weiter untersucht werden (Rapp et al. 2016; Di Pilato et al. 2021).

Dass Zyto- beziehungsweise Chemokine eine Rolle in einer persistierenden Immunantwort gegenüber Malignomen spielen, zeigen Daten von Bajgain et al.:

CAR T-Zellen, welche mit einem invertierten Zytokinrezeptor mit Interleukin-4-Exo- sowie Interleukin-7-Endodomäne modifiziert wurden, re-expandierten und führten zur Tumorabstoßung im Mausmodell bei Re-Exposition mit einer Interleukin-4 produzierenden Mammakarzinom-Zelllinie (Bajgain et al. 2018). Bei gleichzeitiger Re-Exposition mit derselben Tumorzelllinie ohne Interleukin-4-Produktion zeigte sich ein stetiges Tumorwachstum (Bajgain et al. 2018).

Jin et al. konnten zudem für CD70-spezifische CAR T-Zellen, welche mit einem Interleukin-8-spezifischen Chemokinrezeptor (CXCR1 oder CXCR2) ausgestattet waren, eine persistierende Immunität gegenüber Glioblastom-, Ovarial- und Pankreaskarzinom-Xenografts zeigen (Jin et al. 2019).

Auch bei der AZT mit Interleukin-7- und CCL19-koexprimierenden CAR T-Zellen zeigte sich im Verlauf ein Immungedächtnis sowohl durch die Therapiezellen selbst als auch durch endogene T-Zellen (Adachi et al. 2018). Mäuse, welche in einem vorherigen Versuch mit Interleukin-7- und CCL19-exprimierenden, CD20-spezifischen CAR T-Zellen therapiert worden waren, stießen hierbei nicht nur bei Re-Exposition mit CD20-positiven Tumorzellen, sondern auch bei Exposition mit der CD20-negativen Ausgangstumorzelllinie die Tumoren ab (Adachi et al. 2018). Dies weist auf ein Immungedächtnis mit Tumorantigenerkennung über das ursprüngliche Zielantigen der CAR T-Zellen bei dieser Form der AZT hin und könnte in Zukunft von großem Nutzen sein (Adachi et al. 2018).

In jedem Fall wäre dies ein Durchbruch für die AZT und die gesamte Onkologie, da Rezidive in der Tumorthherapie nicht nur eine große sozioökonomische, sondern auch für den Patienten eine enorme psychische und gesundheitliche Belastung darstellen (Wanat et al. 2016; Daamen et al. 2019).

4.5 Limitationen und Therapiesicherheit

Ein wichtiger Aspekt bei der Verbesserung der AZT im klinisch-translationalen Zusammenhang ist die Tumorspezifität der verwendeten T-Zellen (Lim et al. 2017).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich Ovalbumin-exprimierende Tumorzellen verwendet. Dieses Antigen kommt durch Modifikation nur auf den

malignen Zellen und nirgendwo sonst im murinen Organismus vor. Bei spontan entstehenden, soliden Karzinomen im menschlichen Körper ist die Selektion einer solchen stabilen, nur auf dem Tumor exprimierten Zielstruktur weitaus schwieriger (Klebanoff et al. 2016). Dabei betreffen die malignen Mutationen nicht selten Antigene, die zwar auf Tumorzellen überexprimiert werden, jedoch auch in gesundem Gewebe vorkommen (Haridas et al. 2014; Klebanoff et al. 2016).

Das Risiko für eine sogenannte „off-Tumor-Toxizität“, also Schäden an gesunden Zellen und Geweben, durch die AZT wird somit deutlich höher (Klebanoff et al. 2016; Lim et al. 2017). Eine der größten Herausforderungen bei der Verbesserung der AZT ist daher ein gezieltes Angreifen der Tumorzellen durch die Therapie, ohne dass lebenswichtige Organe und Gewebe Schaden nehmen (Rosenberg et al. 2015; Lim et al. 2017).

CCL22 findet sich beispielsweise physiologisch vor allem in lymphatischem Gewebe, wie zum Beispiel im Thymus oder in Lymphknoten (Godiska et al. 1997; Tang et al. 1999). Eine deutlich geringere Expression des Chemokins zeigte sich in Milz, Lunge und Dünndarm (Godiska et al. 1997). Auch wenn der Eintritt von T-Zellen in den Lymphknoten normalerweise nicht über CCL22, sondern über andere Chemokine geregelt wird, ist eine Toxizität außerhalb des Tumorgewebes, gerade bei der oft fehlenden Selektivität von AZT-Zielstrukturen nicht auszuschließen (Luther et al. 2002; Rapp et al. 2016). Für eine gewisse Therapiesicherheit könnten die Ergebnisse von Rapp et al. sprechen: Die mit *Ccr4* transduzierten T-Zellen schienen sich hier hauptsächlich in Tumor-assoziierten Lymphknoten anzureichern (Rapp et al. 2016).

Das zweite in dieser Arbeit zentrale Chemokin ist CXCL16. Auch hier zeigte sich eine Expression nicht nur im Tumorgewebe, sondern in mehreren essenziellen Organen, wie Hoden, Niere und Lunge (Lesch et al. 2021). Zudem konnte im Rahmen von Studien bezüglich Hepatitis und Arthritis eine Rolle der CXCL16-CXCR6-Achse bei der inflammatorisch bedingten Migration von Lymphozyten beobachtet werden (Heydtmann et al. 2005; Nanki et al. 2005). Dass CXCL16 in entzündeten Geweben vorkommt, ist auch im Rahmen des Pankreaskarzinoms relevant: Eine CXCL16-Expression fand sich hierbei nicht nur in der inflammatorisch veränderten Tumorumgebung, sondern auch bei Patienten mit chronischer Pankreatitis – ein bedeutender Risikofaktor für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms (Wente et al. 2008; Raimondi et al. 2010). So besteht die Gefahr, dass auch nicht maligne

verändertes Pankreasgewebe im Falle einer Therapie mit CXCR6-modifizierten Zellen Schaden nehmen würde (Lesch et al. 2021). In der Arbeit von Lesch et al. wurde jedoch keine oder eine nur geringe Expression von CXCL16 in gesunden duktalem beziehungsweise azinären Pankreaszellen beschrieben, was für eine intratumorale und gegen eine peritumorale Anreicherung CXCR6-positiver T-Zellen spricht (Lesch et al. 2021).

Interessanterweise fanden sich bei Patienten mit duktalem Adenokarzinom des Pankreas höhere Plasma-CXCL16-Konzentrationen im Vergleich zu gesunden Probanden (Wente et al. 2008; Lesch et al. 2021). Dies ist insofern relevant, da CXCL16 dadurch in Zukunft als Biomarker für eine Tumorerkrankung genutzt werden könnte, bei der die Diagnose meist spät erfolgt (Stathis et al. 2010; Lesch et al. 2021). Da solch erhöhte Serumlevel von CXCL16 jedoch auch bei Patienten mit chronischer Pankreatitis, Arthritis sowie chronisch entzündlichen Darmerkrankungen auftreten, müssen die Möglichkeiten zur diagnostischen Nutzung dieses Chemokins als Marker noch genauer evaluiert werden. (Kageyama et al. 2007; Lehrke et al. 2008; Wente et al. 2008).

Aber auch die Heterogenität des Tumorgewebes erschwert die Selektion einer geeigneten Zielstruktur in der Tumorthherapie. So können sich die vorherrschenden Mutationen im Tumorgewebe sowohl örtlich als auch im Zeitverlauf deutlich unterscheiden und damit eine gezielte Therapie erschweren (Yachida et al. 2010; Gerlinger et al. 2012; Klebanoff et al. 2016).

Insgesamt erscheint die selektive Tumorerkennung durch spezifische CAR oder TZR bei Nutzung der CXCL16-CXCR6-Achse im Rahmen der AZT von zentraler Bedeutung, um keine therapielimitierende *off*-Tumor-Toxizität zu riskieren (Lesch et al. 2021). Ein wichtiger Forschungsschwerpunkt bei einer „lebenden Therapie“ wie der AZT ist auch die Untersuchung von Kontrollmechanismen oder Feedbacksystemen, um überschießende und fehlgeleitete Immunreaktionen der autonomen Zellen und damit einen erheblichen Schaden für den Patienten zu verhindern (Lim et al. 2017). So wird beispielsweise versucht, ein Suizidgen in die genetisch modifizierten Zellen einzubauen, um so schnell und effektiv die entsprechenden Therapiezellen zu erkennen und bei überschießender Toxizität auszuschalten (Philip et al. 2014).

Es bedarf in Zukunft weiterer Studien, welche die Kombination eines CAR oder TZR mit beiden Chemokinrezeptoren untersuchen. Bei Verwendung von Antigenen, welche – anders als Ovalbumin – tatsächlich in menschlichem Tumorgewebe vorkommen, ließe sich der Therapieeffekt sowie die „*off*-Tumor-Toxizität“ besser abschätzen.

Die Therapiesicherheit der AZT wurde auch wegen der insertionellen Mutagenese bei Transduktion von Zellen über virale Vektoren hinterfragt (June 2007). Montini et al. konnten jedoch bei lentiviralen Vektoren lediglich ein geringes onkogenes Potential feststellen, was für eine größere Sicherheit bei dieser Art der Zellmodifikation spricht (Montini et al. 2006). Zudem könnten die exprimierten Proteine auf den modifizierten Zellen der AZT im menschlichen Körper immunogen wirken, was wiederum einen Einfluss auf den Therapieeffekt haben könnte (June 2007). Da humane im Gegensatz zu murinen T-Zellen über MHC-II Antigene präsentieren können, spielt die Immunogenität im menschlichen Organismus möglicherweise eine größere Rolle (Mauri et al. 1995; June 2007).

Schlussendlich sind weitere präklinische Studien notwendig, um die bisherigen, vielversprechenden Ergebnisse bezüglich der AZT zu bestätigen, diese weiter zu verbessern und Sicherheitsfragen zu klären – gerade auch im Hinblick auf die großen interindividuellen Unterschiede bei onkologischen Patienten im klinischen Alltag (June 2007; Zhang et al. 2019).

5. Zusammenfassung

Die adoptive T-Zell Therapie ist ein vielversprechender Ansatz in der modernen Krebstherapie. Einige Limitationen der Therapieeffektivität und -sicherheit müssen jedoch noch durch weitere Forschung und daraus hergeleitete Verbesserungen überwunden werden (Klebanoff et al. 2016; Zhang et al. 2019). Die erfolgreiche Transduktion von T-Zellen mit den Chemokinrezeptoren *Ccr4* und *Cxcr6* zur Verbesserung der adoptiven T-Zell Therapie konnte im Tierversuch gezeigt werden (Rapp et al. 2016; Di Pilato et al. 2021; Lesch et al. 2021). Ziel dieser Arbeit ist es daher, zu untersuchen, ob eine kombinierte Transduktion beider dieser Chemokinrezeptoren zu einer weiteren Optimierung der adoptiven T-Zell Therapie beitragen kann.

Die *in vitro*-Testung der Funktionalität der mit dem Kombinationskonstrukt transduzierten OT-1-T-Zellen ergab keine Einschränkung im Hinblick auf Aktivierung und Zytotoxizität der T-Zellen. Auch die gewünschte Migration der modifizierten Zellen zu den korrespondierenden Liganden konnte gezeigt werden. Im Tierversuch stellte sich ein deutlicher Trend zu Gunsten der Kombination von CCR4 und CXCR6 dar: Während die Tumorgroße von subkutan induzierten Tumoren der Zelllinie Panc02-OVA bei Therapie mit Ovalbumin-spezifischen OT-1-T-Zellen ohne Modifikation mit einem Chemokinrezeptor deutlich stieg, stellte sich für die *Ccr4*- und *Cxcr6*-Einzelkonstrukt-transduzierten T-Zell-Gruppen ein Plateau ein. Die Tiere, welche jedoch mit OT-1-T-Zellen therapiert wurden, die CCR4 und CXCR6 kombiniert exprimierten, waren zum Ende des Versuchs alle tumorfrei. Dies spiegelte sich auch im Überleben wider: In der Kombinationsgruppe lag die Überlebensrate bei 100 %, in der Einzelkonstrukt-Gruppe bei circa 67 %, in der EGFP-Gruppe bei 25 % und bei den Tieren, die mit PBS behandelt wurden, bei 0 %. Bemerkenswert war zudem, dass im Falle einer Re-Exposition mit Tumorzellen, Mäuse, die bereits mit Chemokinrezeptor-transduzierten T-Zellen therapiert worden waren, keinen neuen Tumor entwickelten.

Diese Ergebnisse sprechen für eine verbesserte anti-tumorale Immunantwort bei Kombination der beiden Chemokinrezeptoren CCR4 und CXCR6 im Vergleich zur Verwendung der Einzelkonstrukte. Die vorliegende Arbeit unterstreicht somit das Potenzial der adoptiven T-Zell Therapie in der Therapie auch solider Tumore. Weitere

Forschung zur Kombination von CCR4 und CXCR6, insbesondere im klinischen Setting, sowie die kombinierte Expression, zum Beispiel mit CAR, sind jedoch notwendig.

6. Literaturverzeichnis

Adachi K, Kano Y, Nagai T, Okuyama N, Sakoda Y and Tamada K. 'IL-7 and CCL19 expression in CAR-T cells improves immune cell infiltration and CAR-T cell survival in the tumor'. *Nat Biotechnol* 2018. 36: 346-351.

Agostini C, Cabrelle A, Calabrese F, Bortoli M, Scquizzato E, Carraro S, Miorin M, Beghè B, Trentin L, Zambello R, Facco M and Semenzato G. 'Role for CXCR6 and its ligand CXCL16 in the pathogenesis of T-cell alveolitis in sarcoidosis'. *Am J Respir Crit Care Med* 2005. 172: 1290-1298.

Allaoui R, Bergenfelz C, Mohlin S, Hagerling C, Salari K, Werb Z, Anderson RL, Ethier SP, Jirström K, Pålman S, Bexell D, Tahin B, Johansson ME, Larsson C and Leandersson K. 'Cancer-associated fibroblast-secreted CXCL16 attracts monocytes to promote stroma activation in triple-negative breast cancers'. *Nat Commun* 2016. 7: 13050.

Angell H and Galon J. 'From the immune contexture to the Immunoscore: the role of prognostic and predictive immune markers in cancer'. *Curr Opin Immunol* 2013. 25: 261-267.

Ansari D, Tingstedt B, Andersson B, Holmquist F, Stureson C, Williamsson C, Sasor A, Borg D, Bauden M and Andersson R. 'Pancreatic cancer: yesterday, today and tomorrow'. *Future Oncol* 2016. 12: 1929-1946.

Anz D, Eiber S, Scholz C, Endres S, Kirchner T, Bourquin C and Mayr D. 'In breast cancer, a high ratio of tumour-infiltrating intraepithelial CD8+ to FoxP3+ cells is characteristic for the medullary subtype'. *Histopathology* 2011. 59: 965-974.

Anz D, Rapp M, Eiber S, Koelzer VH, Thaler R, Haubner S, Knott M, Nagel S, Golic M, Wiedemann GM, Bauernfeind F, Wurzenberger C, Hornung V, Scholz C, Mayr D, Rothenfusser S, Endres S and Bourquin C. 'Suppression of intratumoral CCL22 by type I interferon inhibits migration of regulatory T cells and blocks cancer progression'. *Cancer Res* 2015. 75: 4483-4493.

Baatar D, Olkhanud P, Sumitomo K, Taub D, Gress R and Biragyn A. 'Human peripheral blood T regulatory cells (Tregs), functionally primed CCR4+ Tregs and unprimed CCR4- Tregs, regulate effector T cells using FasL'. *J Immunol* 2007. 178: 4891-4900.

Baitsch L, Baumgaertner P, Devèvre E, Raghav SK, Legat A, Barba L, Wieckowski S, Bouzourene H, Deplancke B, Romero P, Rufer N and Speiser DE. 'Exhaustion of tumor-specific CD8+ T cells in metastases from melanoma patients'. *J Clin Invest* 2011. 121: 2350-2360.

Bajgain P, Tawinwung S, D'elia L, Sukumaran S, Watanabe N, Hoyos V, Lulla P, Brenner MK, Leen AM and Vera JF. 'CAR T cell therapy for breast cancer: harnessing the tumor milieu to drive T cell activation'. *J Immunother Cancer* 2018. 6: 34.

Bellone M and Calcinotto A. 'Ways to enhance lymphocyte trafficking into tumors and fitness of tumor infiltrating lymphocytes'. *Front Oncol* 2013. 3: 231.

Besser MJ, Shapira-Frommer R, Treves AJ, Zippel D, Itzhaki O, HersHKovitz L, Levy D, Kubi A, Hovav E, Chermoshniuk N, Shalmon B, Hardan I, Catane R, Markel G, Apter S, Ben-Nun A, Kuchuk I, Shimoni A, Nagler A and Schachter J. 'Clinical responses in a phase II study using adoptive transfer of short-term cultured tumor infiltration lymphocytes in metastatic melanoma patients'. *Clin Cancer Res* 2010. 16: 2646-2655.

Burnet FM. 'The concept of immunological surveillance'. *Prog Exp Tumor Res* 1970. 13: 1-27.

Burnet M. 'Cancer: a biological approach. III. Viruses associated with neoplastic conditions. IV. Practical applications'. *Br Med J* 1957. 1: 841-847.

Burnet M. 'Immunological factors in the process of carcinogenesis'. *Br Med Bull* 1964. 20: 154-158.

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 and Kobold S. 'Combined tumor-directed recruitment and protection from immune suppression enable CAR T cell efficacy in solid tumors'. *Sci Adv* 2021. 7.

Calcinotto A, Grioni M, Jachetti E, Curnis F, Mondino A, Parmiani G, Corti A and Bellone M. 'Targeting TNF- α to neoangiogenic vessels enhances lymphocyte infiltration in tumors and increases the therapeutic potential of immunotherapy'. *J Immunol* 2012. 188: 2687-2694.

Chalabi-Dchar M, Cassant-Sourdy S, Duluc C, Fanjul M, Lulka H, Samain R, Roche C, Breibach F, Delisle MB, Poupot M, Dufresne M, Shimaoka T, Yonehara S, Mathonnet M, Pyronnet S and Bousquet C. 'Loss of somatostatin receptor subtype 2 promotes growth of KRAS-induced pancreatic tumors in mice by activating PI3K signaling and overexpression of CXCL16'. *Gastroenterology* 2015. 148: 1452-1465.

Chinnasamy D, Yu Z, Kerkar SP, Zhang L, Morgan RA, Restifo NP and Rosenberg SA. 'Local delivery of interleukin-12 using T cells targeting VEGF receptor-2 eradicates multiple vascularized tumors in mice'. *Clin Cancer Res* 2012. 18: 1672-1683.

Craddock JA, Lu A, Bear A, Pule M, Brenner MK, Rooney CM and Foster AE. 'Enhanced tumor trafficking of GD2 chimeric antigen receptor T cells by expression of the chemokine receptor CCR2b'. *J Immunother* 2010. 33: 780-788.

Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, Conejo-Garcia JR, Zhang L, Burow M, Zhu Y, Wei S, Kryczek I, Daniel B, Gordon A, Myers L, Lackner A, Disis ML, Knutson KL, Chen L and Zou W. 'Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival'. *Nat Med* 2004. 10: 942-949.

Daamen LA, Groot VP, Intven MPW, Besselink MG, Busch OR, Koerkamp BG, Mohammad NH, Hermans JJ, Van Laarhoven HWM, Nuyttens JJ, Wilmink JW, Van Santvoort HC, Molenaar IQ and Stommel MWJ. 'Postoperative surveillance of pancreatic cancer patients'. *Eur J Surg Oncol* 2019. 45: 1770-1777.

Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, Brown JA, Moodley ES, Reddy S, Mackey EW, Miller JD, Leslie AJ, Depierres C, Mncube Z, Duraiswamy J, Zhu B, Eichbaum Q, Altfeld M, Wherry EJ, Coovadia HM, Goulder PJ, Klenerman P, Ahmed R, Freeman GJ and Walker BD. 'PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression'. *Nature* 2006. 443: 350-354.

Dembic Z, Haas W, Weiss S, Mccubrey J, Kiefer H, Von Boehmer H and Steinmetz M. 'Transfer of specificity by murine alpha and beta T-cell receptor genes'. *Nature* 1986. 320: 232-238.

Denardo DG, Barreto JB, Andreu P, Vasquez L, Tawfik D, Kolhatkar N and Coussens LM. 'CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages'. *Cancer Cell* 2009. 16: 91-102.

Deng L, Chen N, Li Y, Zheng H and Lei Q. 'CXCR6/CXCL16 functions as a regulator in metastasis and progression of cancer'. *Biochim Biophys Acta* 2010. 1806: 42-49.

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 and Mempel TR. 'CXCR6 positions cytotoxic T cells to receive critical survival signals in the tumor microenvironment'. *Cell* 2021. 184: 4512-4530.e4522.

Di Stasi A, De Angelis B, Rooney CM, Zhang L, Mahendravada A, Foster AE, Heslop HE, Brenner MK, Dotti G and 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: 6392-6402.

Dighe AS, Richards E, Old LJ and Schreiber RD. 'Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors'. *Immunity* 1994. 1: 447-456.

Dudley ME and Rosenberg SA. 'Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer'. *Nat Rev Cancer* 2003. 3: 666-675.

Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ and Schreiber RD. 'Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape'. *Nat Immunol* 2002. 3: 991-998.

Dunn GP, Old LJ and Schreiber RD. 'The three Es of cancer immunoediting'. *Annu Rev Immunol* 2004. 22: 329-360.

Ehrlich P. Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung. 1908.

Erdmann F, Spix C, Katalinic A, Christ M, Folkerts J, Hansmann J, Kranzhoefer K, Kunz B, Manegold K, Penzkofer A, Tremel K, Vollmer G, Weg-Remers S, Barnes B, Buttman-Schweiger N, Dahm S, Fiebig J, Franke M, Gurung-Schoenfeld I, Haberland J, Imhoff M, Kraywinkel K, Starker A, Von Berenberg-Gossler P and Wienecke A. Krebs in Deutschland für 2017/2018. 2021. (Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.: Berlin).

Eshhar Z, Waks T, Bendavid A and Schindler DG. 'Functional expression of chimeric receptor genes in human T cells'. *J Immunol Methods* 2001. 248: 67-76.

European Medicines Agency. 'First two CAR-T cell medicines recommended for approval in the European Union'. 2018. Accessed 10/11/2022. <https://www.ema.europa.eu/en/news/first-two-car-t-cell-medicines-recommended-approval-european-union>.

Faget J, Biota C, Bachelot T, Gobert M, Treilleux I, Goutagny N, Durand I, Léon-Goddard S, Blay JY, Caux C and Ménétrier-Caux C. 'Early detection of tumor cells by innate immune cells leads to T(reg) recruitment through CCL22 production by tumor cells'. *Cancer Res* 2011. 71: 6143-6152.

Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C and Galon J. 'The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome'. *Nat Rev Cancer* 2012. 12: 298-306.

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 and Pagès F. 'Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome'. *Science* 2006. 313: 1960-1964.

Galon J, Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, Berger A, Lagorce C, Lugli A, Zlobec I, Hartmann A, Bifulco C, Nagtegaal ID, Palmqvist R, Masucci GV, Botti G, Tatangelo F, Delrio P, Maio M, Laghi L, Grizzi F, Asslaber M, D'arrigo C, Vidal-Vanaclocha F, Zavadova E, Chouchane L, Ohashi PS, Hafezi-Bakhtiari S, Wouters BG, Roehrl M, Nguyen L, Kawakami Y, Hazama S, Okuno K, Ogino S, Gibbs P, Waring P, Sato N, Torigoe T, Itoh K, Patel PS, Shukla SN, Wang Y, Kopetz S, Sinicrope FA, Scripcariu V, Ascierto PA, Marincola FM, Fox BA and Pagès F. 'Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours'. *J Pathol* 2014. 232: 199-209.

Galon J, Pagès F, Marincola FM, Thurin M, Trinchieri G, Fox BA, Gajewski TF and Ascierto PA. 'The immune score as a new possible approach for the classification of cancer'. *J Transl Med* 2012. 10: 1.

Gattinoni L, Finkelstein SE, Klebanoff CA, Antony PA, Palmer DC, Spiess PJ, Hwang LN, Yu Z, Wrzesinski C, Heimann DM, Surh CD, Rosenberg SA and Restifo NP. 'Removal of homeostatic cytokine sinks by lymphodepletion enhances the efficacy of adoptively transferred tumor-specific CD8+ T cells'. *J Exp Med* 2005. 202: 907-912.

Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Math M, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, Martinez P, Matthews N, Stewart A, Tarpey P, Varela I, Phillimore B, Begum S, McDonald NQ, Butler A, Jones D, Raine K, Latimer C, Santos CR, Nohadani M, Eklund AC, Spencer-Dene B, Clark G, Pickering L, Stamp G, Gore M, Szallasi Z, Downward J, Futreal PA and Swanton C. 'Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing'. *N Engl J Med* 2012. 366: 883-892.

Ghani K, Cottin S, Kamen A and Caruso M. 'Generation of a high-titer packaging cell line for the production of retroviral vectors in suspension and serum-free media'. *Gene Ther* 2007. 14: 1705-1711.

Gobert M, Treilleux I, Bendriss-Vermare N, Bachelot T, Goddard-Leon S, Arfi V, Biota C, Doffin AC, Durand I, Olive D, Perez S, Pasqual N, Faure C, Ray-Coquard I, Puisieux A, Caux C, Blay JY and Ménétrier-Caux C. 'Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome'. *Cancer Res* 2009. 69: 2000-2009.

Godiska R, Chantry D, Raport CJ, Sozzani S, Allavena P, Leviten D, Mantovani A and Gray PW. 'Human macrophage-derived chemokine (MDC), a novel chemoattractant for monocytes, monocyte-derived dendritic cells, and natural killer cells'. *J Exp Med* 1997. 185: 1595-1604.

Griffith JW, Sokol CL and Luster AD. 'Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity'. *Annu Rev Immunol* 2014. 32: 659-702.

Hanenberg H, Xiao XL, Dilloo D, Hashino K, Kato I and Williams DA. 'Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells'. *Nat Med* 1996. 2: 876-882.

Haridas D, Ponnusamy MP, Chugh S, Lakshmanan I, Seshacharyulu P and Batra SK. 'MUC16: molecular analysis and its functional implications in benign and malignant conditions'. *Faseb j* 2014. 28: 4183-4199.

Hashimoto M, Kamphorst AO, Im SJ, Kissick HT, Pillai RN, Ramalingam SS, Araki K and Ahmed R. 'CD8 T Cell Exhaustion in Chronic Infection and Cancer: Opportunities for Interventions'. *Annu Rev Med* 2018. 69: 301-318.

Heckman KL and Pease LR. 'Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension'. *Nat Protoc* 2007. 2: 924-932.

Heydtmann M, Lalor PF, Eksteen JA, Hübscher SG, Brisikin M and Adams DH. 'CXC chemokine ligand 16 promotes integrin-mediated adhesion of liver-infiltrating lymphocytes to cholangiocytes and hepatocytes within the inflamed human liver'. *J Immunol* 2005. 174: 1055-1062.

Hinrichs CS, Spolski R, Paulos CM, Gattinoni L, Kerstann KW, Palmer DC, Klebanoff CA, Rosenberg SA, Leonard WJ and Restifo NP. 'IL-2 and IL-21 confer opposing differentiation programs to CD8+ T cells for adoptive immunotherapy'. *Blood* 2008. 111: 5326-5333.

Hu W, Liu Y, Zhou W, Si L and 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.

Iellem A, Mariani M, Lang R, Recalde H, Panina-Bordignon P, Sinigaglia F and D'ambrosio D. 'Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells'. *J Exp Med* 2001. 194: 847-853.

Imai T, Nagira M, Takagi S, Kakizaki M, Nishimura M, Wang J, Gray PW, Matsushima K and Yoshie O. 'Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine'. *Int Immunol* 1999. 11: 81-88.

Jacobetz MA, Chan DS, Neesse A, Bapiro TE, Cook N, Frese KK, Feig C, Nakagawa T, Caldwell ME, Zecchini HI, Lolkema MP, Jiang P, Kultti A, Thompson CB, Maneval DC, Jodrell DI, Frost GI, Shepard HM, Skepper JN and Tuveson DA. 'Hyaluronan impairs vascular function and drug delivery in a mouse model of pancreatic cancer'. *Gut* 2013. 62: 112-120.

Jacobs C, Duewell P, Heckelsmiller K, Wei J, Bauernfeind F, Ellermeier J, Kisser U, Bauer CA, Dauer M, Eigler A, Maraskovsky E, Endres S and Schnurr M. 'An ISCOM vaccine combined with a TLR9 agonist breaks immune evasion mediated by regulatory T cells in an orthotopic model of pancreatic carcinoma'. *Int J Cancer* 2011. 128: 897-907.

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 and 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.

June CH. 'Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic'. *J Clin Invest* 2007. 117: 1466-1476.

June CH, Riddell SR and Schumacher TN. 'Adoptive cellular therapy: a race to the finish line'. *Sci Transl Med* 2015. 7: 280ps287.

Kaech SM and Cui W. 'Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation'. *Nat Rev Immunol* 2012. 12: 749-761.

Kageyama Y, Torikai E and Nagano A. 'Anti-tumor necrosis factor-alpha antibody treatment reduces serum CXCL16 levels in patients with rheumatoid arthritis'. *Rheumatol Int* 2007. 27: 467-472.

Kalos M and June CH. 'Adoptive T cell transfer for cancer immunotherapy in the era of synthetic biology'. *Immunity* 2013. 39: 49-60.

Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ and Schreiber RD. 'Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice'. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998. 95: 7556-7561.

Karin N. 'CXCR3 ligands in cancer and autoimmunity, chemoattraction of effector T cells, and beyond'. *Front Immunol* 2020. 11: 976.

Kershaw MH, Wang G, Westwood JA, Pachynski RK, Tiffany HL, Marincola FM, Wang E, Young HA, Murphy PM and Hwu P. 'Redirecting migration of T cells to chemokine secreted from tumors by genetic modification with CXCR2'. *Hum Gene Ther* 2002. 13: 1971-1980.

Kim ST, Jeong H, Woo OH, Seo JH, Kim A, Lee ES, Shin SW, Kim YH, Kim JS and Park KH. 'Tumor-infiltrating lymphocytes, tumor characteristics, and recurrence in patients with early breast cancer'. *Am J Clin Oncol* 2013. 36: 224-231.

Klebanoff CA, Rosenberg SA and Restifo NP. 'Prospects for gene-engineered T cell immunotherapy for solid cancers'. *Nat Med* 2016. 22: 26-36.

Kmieciak J, Poli A, Brons NH, Waha A, Eide GE, Enger P, Zimmer J and Chekenya M. 'Elevated CD3+ and CD8+ tumor-infiltrating immune cells correlate with prolonged survival in glioblastoma patients despite integrated immunosuppressive mechanisms in the tumor microenvironment and at the systemic level'. *J Neuroimmunol* 2013. 264: 71-83.

Kobold S, Krackhardt A, Schlösser H and Wolf D. '[Immuno-Oncology: A Brief Overview]'. *Dtsch Med Wochenschr* 2018. 143: 1006-1013.

Kobold S, Steffen J, Chaloupka M, Grassmann S, Henkel J, Castoldi R, Zeng Y, Chmielewski M, Schmollinger JC, Schnurr M, Rothenfußer S, Schendel DJ, Abken H, Sustmann C, Niederfellner G, Klein C, Bourquin C and Endres S. 'Selective bispecific T cell recruiting antibody and antitumor activity of adoptive T cell transfer'. *J Natl Cancer Inst* 2015. 107: 364.

La Porta CA. 'CXCR6: the role of environment in tumor progression. Challenges for therapy'. *Stem Cell Rev Rep* 2012. 8: 1282-1285.

Lehrke M, Konrad A, Schachinger V, Tillack C, Seibold F, Stark R, Parhofer IG and Broedl UC. 'CXCL16 is a surrogate marker of inflammatory bowel disease'. *Scand J Gastroenterol* 2008. 43: 283-288.

Leisegang M, Engels B, Meyerhuber P, Kieback E, Sommermeyer D, Xue SA, Reuss S, Stauss H and Uckert W. 'Enhanced functionality of T cell receptor-redirected T cells is defined by the transgene cassette'. *J Mol Med (Berl)* 2008. 86: 573-583.

Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF). 'S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, Kurzversion 2.0'. 2021. Accessed 09/11/2022. <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/pankreaskarzinom>.

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, Donnadiou E, Rothenfusser S, Duester P, König LM, Schnurr M, Subklewe M, Liss AS, Halama N, Reichert M, Mempel TR, Endres S and 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: 1246-1260.

Lim WA and June CH. 'The Principles of Engineering Immune Cells to Treat Cancer'. *Cell* 2017. 168: 724-740.

Linke B, Meyer Dos Santos S, Picard-Willems B, Keese M, Harder S, Geisslinger G and Scholich K. 'CXCL16/CXCR6-mediated adhesion of human peripheral blood mononuclear cells to inflamed endothelium'. *Cytokine* 2019. 122: 154081.

Luther SA, Bidgol A, Hargreaves DC, Schmidt A, Xu Y, Paniyadi J, Matloubian M and Cyster JG. 'Differing activities of homeostatic chemokines CCL19, CCL21, and CXCL12 in lymphocyte and dendritic cell recruitment and lymphoid neogenesis'. *J Immunol* 2002. 169: 424-433.

Märkl F, Huynh D, Endres S and Kobold S. 'Utilizing chemokines in cancer immunotherapy'. *Trends Cancer* 2022. 8: 670-682.

Matloubian M, David A, Engel S, Ryan JE and 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 and Demaria S. 'Radiation-induced CXCL16 release by breast cancer cells attracts effector T cells'. *J Immunol* 2008. 181: 3099-3107.

Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, Rives S, Boyer M, Bittencourt H, Bader P, Verneris MR, Stefanski HE, Myers GD, Qayed M, De Moerloose B, Hiramatsu H, Schlis K, Davis KL, Martin PL, Nemecek ER, Yanik GA, Peters C, Baruchel A, Boissel N, Mechinaud F, Balduzzi A, Krueger J, June CH, Levine BL, Wood P, Taran T, Leung M, Mueller KT, Zhang Y, Sen K, Lebwohl D, Pulsipher MA and Grupp SA. 'Tisagenlecleucel in children and young adults with B-cell lymphoblastic leukemia'. *N Engl J Med* 2018. 378: 439-448.

Mauri D, Wyss-Coray T, Gallati H and Pichler WJ. 'Antigen-presenting T cells induce the development of cytotoxic CD4+ T cells. I. Involvement of the CD80-CD28 adhesion molecules'. *J Immunol* 1995. 155: 118-127.

Mizukami Y, Kono K, Kawaguchi Y, Akaike H, Kamimura K, Sugai H and Fujii H. 'CCL17 and CCL22 chemokines within tumor microenvironment are related to accumulation of Foxp3+ regulatory T cells in gastric cancer'. *Int J Cancer* 2008. 122: 2286-2293.

Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, Berger A, Bindea G, Meatchi T, Bruneval P, Trajanoski Z, Fridman WH, Pagès F and Galon J. 'Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction'. *J Clin Oncol* 2011. 29: 610-618.

Mohammed S, Sukumaran S, Bajgain P, Watanabe N, Heslop HE, Rooney CM, Brenner MK, Fisher WE, Leen AM and Vera JF. 'Improving chimeric antigen receptor-modified T cell function by reversing the immunosuppressive tumor microenvironment of pancreatic cancer'. *Mol Ther* 2017. 25: 249-258.

Molon B, Gri G, Bettella M, Gómez-Moutón C, Lanzavecchia A, Martínez AC, Mañes S and Viola A. 'T cell costimulation by chemokine receptors'. *Nat Immunol* 2005. 6: 465-471.

Montini E, Cesana D, Schmidt M, Sanvito F, Ponzoni M, Bartholomae C, Sergi L, Benedicenti F, Ambrosi A, Di Serio C, Doglioni C, Von Kalle C and Naldini L. 'Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumor-prone mouse model uncovers low genotoxicity of lentiviral vector integration'. *Nat Biotechnol* 2006. 24: 687-696.

Moon EK, Carpenito C, Sun J, Wang LC, Kapoor V, Predina J, Powell DJ, Jr., Riley JL, June CH and 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: 4719-4730.

Morgan RA, Yang JC, Kitano M, Dudley ME, Laurencot CM and 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: 843-851.

Morita S, Kojima T and Kitamura T. 'Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses'. *Gene Ther* 2000. 7: 1063-1066.

Nagarsheth N, Wicha MS and Zou W. 'Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy'. *Nat Rev Immunol* 2017. 17: 559-572.

Nakayama T, Hieshima K, Izawa D, Tatsumi Y, Kanamaru A and Yoshie O. 'Cutting edge: profile of chemokine receptor expression on human plasma cells accounts for their efficient recruitment to target tissues'. *J Immunol* 2003. 170: 1136-1140.

Nanki T, Shimaoka T, Hayashida K, Taniguchi K, Yonehara S and Miyasaka N. 'Pathogenic role of the CXCL16-CXCR6 pathway in rheumatoid arthritis'. *Arthritis Rheum* 2005. 52: 3004-3014.

Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, Lekakis LJ, Miklos DB, Jacobson CA, Braunschweig I, Oluwole OO, Siddiqi T, Lin Y, Timmerman JM, Stiff PJ, Friedberg JW, Flinn IW, Goy A, Hill BT, Smith MR, Deol A, Farooq U, Mcsweeney P, Munoz J, Avivi I, Castro JE, Westin JR, Chavez JC, Ghobadi A, Komanduri KV, Levy R, Jacobsen ED, Witzig TE, Reagan P, Bot A, Rossi J, Navale L, Jiang Y, Aycock J, Elias M, Chang D, Wiecek J and Go WY. 'Axicabtagene Ciloleucel CAR T-cell therapy in refractory large B-cell lymphoma'. *N Engl J Med* 2017. 377: 2531-2544.

New England Biolabs. 'Ligation calculator v1.9.0'. 2018. Accessed 25/09/2018. <http://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>

New England Biolabs. 'Ligation protocol with T4 DNA ligase (M0202)'. Accessed 25/09/2018. <https://international.neb.com/Protocols/0001/01/01/dna-ligation-with-t4-dna-ligase-m0202>

New England Biolabs. 'Optimizing restriction endonuclease reactions'. Accessed 25/09/2018. <https://international.neb.com/tools-and-resources/usage-guidelines/optimizing-restriction-endonuclease-reactions>

Nguyen DT, Ogando-Rivas E, Liu R, Wang T, Rubin J, Jin L, Tao H, Sawyer WW, Mendez-Gomez HR, Cascio M, Mitchell DA, Huang J, Sawyer WG, Sayour EJ and Castillo P. 'CAR T cell locomotion in solid tumor microenvironment'. *Cells* 2022. 11.

Nishio N, Diaconu I, Liu H, Cerullo V, Caruana I, Hoyos V, Bouchier-Hayes L, Savoldo B and Dotti G. 'Armed oncolytic virus enhances immune functions of chimeric antigen receptor-modified T cells in solid tumors'. *Cancer Res* 2014. 74: 5195-5205.

O'leary MC, Lu X, Huang Y, Lin X, Mahmood I, Przepiorka D, Gavin D, Lee S, Liu K, George B, Bryan W, Theoret MR and Pazdur R. 'FDA approval summary: Tisagenlecleucel for treatment of patients with relapsed or refractory B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia'. *Clin Cancer Res* 2019. 25: 1142-1146.

Oldham KA, Parsonage G, Bhatt RI, Wallace DM, Deshmukh N, Chaudhri S, Adams DH and Lee SP. 'T lymphocyte recruitment into renal cell carcinoma tissue: a role for chemokine receptors CXCR3, CXCR6, CCR5, and CCR6'. *Eur Urol* 2012. 61: 385-394.

Pagès F, Mlecnik B, Marliot F, Bindea G, Ou FS, Bifulco C, Lugli A, Zlobec I, Rau TT, Berger MD, Nagtegaal ID, Vink-Börger E, Hartmann A, Geppert C, Kolwelter J, Merkel S, Grützmann R, Van Den Eynde M, Jouret-Mourin A, Kartheuser A, Léonard D, Remue C, Wang JY, Bavi P, Roehrl MHA, Ohashi PS, Nguyen LT, Han S, Macgregor HL, Hafezi-Bakhtiari S, Wouters BG, Masucci GV, Andersson EK, Zavadova E, Vocka M, Spacek J, Petruzella L, Konopasek B, Dundr P, Skalova H, Nemejcova K, Botti G, Tatangelo F, Delrio P, Ciliberto G, Maio M, Laghi L, Grizzi F, Fredriksen T, Buttard B, Angelova M, Vasaturo A, Maby P, Church SE, Angell HK, Lafontaine L, Bruni D, El Sissy C, Haicheur N, Kirilovsky A, Berger A, Lagorce C, Meyers JP, Paustian C, Feng Z, Ballesteros-Merino C, Dijkstra J, Van De Water C, Van Lent-Van Vliet S, Knijn N, Muşină AM, Scripcariu DV, Popivanova B, Xu M, Fujita T, Hazama S, Suzuki N, Nagano H, Okuno K, Torigoe T, Sato N, Furuhata T, Takemasa I, Itoh K, Patel PS, Vora HH, Shah B, Patel JB, Rajvik KN, Pandya SJ, Shukla SN, Wang Y, Zhang G, Kawakami Y, Marincola FM, Ascierto PA, Sargent DJ, Fox BA and Galon J. 'International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study'. *Lancet* 2018. 391: 2128-2139.

Palucka K, Ueno H, Fay J and Banchereau J. 'Dendritic cells and immunity against cancer'. *J Intern Med* 2011. 269: 64-73.

Peng D, Kryczek I, Nagarsheth N, Zhao L, Wei S, Wang W, Sun Y, Zhao E, Vatan L, Szeliga W, Kotarski J, Tarkowski R, Dou Y, Cho K, Hensley-Alford S, Munkarah A, Liu R and Zou W. 'Epigenetic silencing of TH1-type chemokines shapes tumour immunity and immunotherapy'. *Nature* 2015. 527: 249-253.

Philip B, Kokalaki E, Mekkaoui L, Thomas S, Straathof K, Flutter B, Marin V, Marafioti T, Chakraverty R, Linch D, Quezada SA, Peggs KS and Pule M. 'A highly compact epitope-based marker/suicide gene for easier and safer T-cell therapy'. *Blood* 2014. 124: 1277-1287.

Piersma SJ, Jordanova ES, Van Poelgeest MI, Kwappenberg KM, Van Der Hulst JM, Drijfhout JW, Melief CJ, Kenter GG, Fleuren GJ, Offringa R and Van Der Burg SH. 'High number of intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes is associated with the absence of lymph node metastases in patients with large early-stage cervical cancer'. *Cancer Res* 2007. 67: 354-361.

Proudfoot AE. 'Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets'. *Nat Rev Immunol* 2002. 2: 106-115.

Provenzano PP, Inman DR, Eliceiri KW, Knittel JG, Yan L, Rueden CT, White JG and Keely PJ. 'Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression'. *BMC Med* 2008. 6: 11.

Raimondi S, Lowenfels AB, Morselli-Labate AM, Maisonneuve P and Pezzilli R. 'Pancreatic cancer in chronic pancreatitis; aetiology, incidence, and early detection'. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2010. 24: 349-358.

Rapp M, Grassmann S, Chaloupka M, Layritz P, Kruger S, Ormanns S, Rataj F, Janssen KP, Endres S, Anz D and Kobold S. 'C-C chemokine receptor type-4 transduction of T cells enhances interaction with dendritic cells, tumor infiltration and therapeutic efficacy of adoptive T cell transfer'. *Oncoimmunology* 2016. 5: e1105428.

Restifo NP, Dudley ME and Rosenberg SA. 'Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response'. *Nat Rev Immunol* 2012. 12: 269-281.

Rollins BJ. 'Chemokines'. *Blood* 1997. 90: 909-928.

Rosenberg SA and Restifo NP. 'Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer'. *Science* 2015. 348: 62-68.

Rosenberg SA, Sherry RM, Morton KE, Scharfman WJ, Yang JC, Topalian SL, Royal RE, Kammula U, Restifo NP, Hughes MS, Schwartzentruber D, Berman DM, Schwarz SL, Ngo LT, Mavroukakis SA, White DE and Steinberg SM. 'Tumor progression can occur despite the induction of very high levels of self/tumor antigen-specific CD8+ T cells in patients with melanoma'. *J Immunol* 2005. 175: 6169-6176.

Sato T, Thorlacius H, Johnston B, Staton TL, Xiang W, Littman DR and Butcher EC. 'Role for CXCR6 in recruitment of activated CD8+ lymphocytes to inflamed liver'. *J Immunol* 2005. 174: 277-283.

Schlecker E, Stojanovic A, Eisen C, Quack C, Falk CS, Umansky V and Cerwenka A. 'Tumor-infiltrating monocytic myeloid-derived suppressor cells mediate CCR5-dependent recruitment of regulatory T cells favoring tumor growth'. *J Immunol* 2012. 189: 5602-5611.

Schreiber RD, Old LJ and Smyth MJ. 'Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion'. *Science* 2011. 331: 1565-1570.

Schuster SJ, Svoboda J, Chong EA, Nasta SD, Mato AR, Anak Ö, Brogdon JL, Pruteanu-Malinici I, Bhoj V, Landsburg D, Wasik M, Levine BL, Lacey SF, Melenhorst JJ, Porter DL and June CH. 'Chimeric antigen receptor T cells in refractory B-cell lymphomas'. *N Engl J Med* 2017. 377: 2545-2554.

Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ and Schreiber RD. 'IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity'. *Nature* 2001. 410: 1107-1111.

Shrimali RK, Yu Z, Theoret MR, Chinnasamy D, Restifo NP and Rosenberg SA. 'Antiangiogenic agents can increase lymphocyte infiltration into tumor and enhance the effectiveness of adoptive immunotherapy of cancer'. *Cancer Res* 2010. 70: 6171-6180.

Slaney CY, Kershaw MH and Darcy PK. 'Trafficking of T cells into tumors'. *Cancer Res* 2014. 74: 7168-7174.

Sommermeier D, Neudorfer J, Weinhold M, Leisegang M, Engels B, Noessner E, Heemskerk MH, Charo J, Schendel DJ, Blankenstein T, Bernhard H and Uckert W. 'Designer T cells by T cell receptor replacement'. *Eur J Immunol* 2006. 36: 3052-3059.

Sotillo E, Barrett DM, Black KL, Bagashev A, Oldridge D, Wu G, Sussman R, Lanauze C, Ruella M, Gazzara MR, Martinez NM, Harrington CT, Chung EY, Perazzelli J, Hofmann TJ, Maude SL, Raman P, Barrera A, Gill S, Lacey SF, Melenhorst JJ, Allman D, Jacoby E, Fry T, Mackall C, Barash Y, Lynch KW, Maris JM, Grupp SA and Thomas-Tikhonenko A. 'Convergence of acquired mutations and alternative splicing of CD19 enables resistance to CART-19 immunotherapy'. *Cancer Discov* 2015. 5: 1282-1295.

Speiser DE, Utzschneider DT, Oberle SG, Münz C, Romero P and Zehn D. 'T cell differentiation in chronic infection and cancer: functional adaptation or exhaustion?'. *Nat Rev Immunol* 2014. 14: 768-774.

Stathis A and Moore MJ. 'Advanced pancreatic carcinoma: current treatment and future challenges'. *Nat Rev Clin Oncol* 2010. 7: 163-172.

Statistisches Bundesamt (Destatis). 'Todesursachen'. 2020. Accessed 09/11/2022. https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/_inhalt.html#235880.

Sugiyama D, Nishikawa H, Maeda Y, Nishioka M, Tanemura A, Katayama I, Ezoe S, Kanakura Y, Sato E, Fukumori Y, Karbach J, Jäger E and Sakaguchi S. 'Anti-CCR4 mAb selectively depletes effector-type FoxP3+CD4+ regulatory T cells, evoking antitumor immune responses in humans'. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013. 110: 17945-17950.

Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, Shimizu J and Sakaguchi S. 'Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state'. *Int Immunol* 1998. 10: 1969-1980.

Tang HL and Cyster JG. 'Chemokine up-regulation and activated T cell attraction by maturing dendritic cells'. *Science* 1999. 284: 819-822.

Thomas L. 1959. "In HS Lawrence, cellular and humoral aspects of the hypersensitive states." In *Symposia of the Section on Microbiology, New York Academy of Medicine*.

Turtle CJ, Hanafi LA, Berger C, Gooley TA, Cherian S, Hudecek M, Sommermeyer D, Melville K, Pender B, Budiarto TM, Robinson E, Steevens NN, Chaney C, Soma L, Chen X, Yeung C, Wood B, Li D, Cao J, Heimfeld S, Jensen MC, Riddell SR and Maloney DG. 'CD19 CAR-T cells of defined CD4+:CD8+ composition in adult B cell ALL patients'. *J Clin Invest* 2016. 126: 2123-2138.

Unutmaz D, Xiang W, Sunshine MJ, Campbell J, Butcher E and Littman DR. 'The primate lentiviral receptor Bonzo/STRL33 is coordinately regulated with CCR5 and its expression pattern is conserved between human and mouse'. *J Immunol* 2000. 165: 3284-3292.

Venning FA, Wullkopf L and Erler JT. 'Targeting ECM disrupts cancer progression'. *Front Oncol* 2015. 5: 224.

Wågsäter D, Dienus O, Löfgren S, Hugander A and Dimberg J. 'Quantification of the chemokines CCL17 and CCL22 in human colorectal adenocarcinomas'. *Mol Med Rep* 2008. 1: 211-217.

Wanat M, Boulton M and Watson E. 'Patients' experience with cancer recurrence: a meta-ethnography'. *Psychooncology* 2016. 25: 242-252.

Wang Y, Jiang H, Luo H, Sun Y, Shi B, Sun R and Li Z. 'An IL-4/21 inverted cytokine receptor improving CAR-T cell potency in immunosuppressive solid-tumor microenvironment'. *Front Immunol* 2019. 10: 1691.

Wennerberg E, Kremer V, Childs R and Lundqvist A. 'CXCL10-induced migration of adoptively transferred human natural killer cells toward solid tumors causes regression of tumor growth in vivo'. *Cancer Immunol Immunother* 2015. 64: 225-235.

Wente MN, Gaida MM, Mayer C, Michalski CW, Haag N, Giese T, Felix K, Bergmann F, Giese NA and Friess H. 'Expression and potential function of the CXC chemokine CXCL16 in pancreatic ductal adenocarcinoma'. *Int J Oncol* 2008. 33: 297-308.

Whatcott CJ, Han H, Posner RG, Hostetter G and Von Hoff DD. 'Targeting the tumor microenvironment in cancer: why hyaluronidase deserves a second look'. *Cancer Discov* 2011. 1: 291-296.

Wherry EJ and Kurachi M. 'Molecular and cellular insights into T cell exhaustion'. *Nat Rev Immunol* 2015. 15: 486-499.

Wilbanks A, Zondlo SC, Murphy K, Mak S, Soler D, Langdon P, Andrew DP, Wu L and Briskin M. 'Expression cloning of the STRL33/BONZO/TYMSTRligand reveals elements of CC, CXC, and CX3C chemokines'. *J Immunol* 2001. 166: 5145-5154.

Yachida S, Jones S, Bozic I, Antal T, Leary R, Fu B, Kamiyama M, Hruban RH, Eshleman JR, Nowak MA, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B and Iacobuzio-Donahue CA. 'Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer'. *Nature* 2010. 467: 1114-1117.

Yoshie O and Matsushima K. 'CCR4 and its ligands: from bench to bedside'. *Int Immunol* 2015. 27: 11-20.

Zhang J, Endres S and Kobold S. 'Enhancing tumor T cell infiltration to enable cancer immunotherapy'. *Immunotherapy* 2019. 11: 201-213.

7. Abkürzungsverzeichnis

AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
AZT	adoptive T-Zell Therapie
BSA	bovines Serum-Albumin
CaCl ₂	Calciumchlorid
CAR	chimärer Antigenrezeptor
CCL	<i>C-C motif chemokine ligand</i>
CCR	<i>C-C motif chemokine receptor</i> , Protein
<i>Ccr</i>	<i>C-C motif chemokine receptor</i> , Gen
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CXCL	<i>C-X-C motif chemokine ligand</i>
CXCR	<i>C-X-C motif chemokine receptor</i> , Protein
<i>Cxcr</i>	<i>C-X-C motif chemokine receptor</i> , Gen
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i> , Protein
<i>Egfp</i>	<i>enhanced green fluorescent protein</i> , Gen
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FBS	fötales Kälberserum
IFN- γ	Interferon γ
KCl	Kaliumchlorid
KHCO ₃	Kaliumhydrogencarbonat
LDH	Lactatdehydrogenase
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NEB	New England Biolabs

NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SEM	<i>standard error of mean</i>
TME	<i>tumor microenvironment</i>
TNM	<i>tumor, node, metastasis</i>
TZR	T-Zell-Rezeptor
UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i>
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
Z:E	Verhältnis von Ziel- zu Effektorzellen
ZTL	zytotoxische T-Lymphozyten

8. Danksagung

Hier möchte ich allen Personen danken, die an der Fertigstellung meiner Dissertation mitgewirkt haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Sebastian Kobold, Prof. Dr. med. Stefan Endres sowie Dr. Nicholas Tokarew für die außerordentliche Unterstützung und hervorragende Betreuung bei der Umsetzung dieser Arbeit. Auch möchte ich meinen Dank gegenüber allen Mitarbeitern der Abteilung für Klinische Pharmakologie der Ludwig-Maximilians-Universität München aussprechen, die mich im Rahmen meiner Dissertation mit Ratschlägen und anregenden Gesprächen begleitet haben.

Bedanken möchte ich mich des Weiteren bei dem Förderprogramm für Forschung und Lehre der Ludwig-Maximilians-Universität München für die finanzielle und ideelle Unterstützung.

Ich danke zudem meinen Eltern Helmut und Andrea, meiner Schwester Eva sowie meinem Partner Felix für ihre Geduld und den Zuspruch während der Fertigstellung dieser Arbeit.