

Aus der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Jörg Schipper

**Modifikation der Zytotoxizität adoptiver
Immuntherapie mittels CAR T-Zellen gegenüber
Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches und weiteren
Plattenepithelkarzinomen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Zoé Sophie Poschinski

2025

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. med. Kathrin Scheckenbach

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Matthias Kassack

Für meine Familie

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Haist C, Poschinski Z, Bister A, Hoffmann MJ, Grunewald CM, Hamacher A, et al. *Engineering a single-chain variable fragment of cetuximab for CAR T-cell therapy against head and neck squamous cell carcinomas*. Oral Oncol. 2022;129(August 2021):105867.

Haist C, Schulte E, Bartels N, Bister A, Poschinski Z, Ibach TC, et al. *CD44v6-targeted CAR T-cells specifically eliminate CD44 isoform 6 expressing head/neck squamous cell carcinoma cells*. Oral Oncol (2021):105259.

Poschinski Z, Haist C, Hamacher A, Kassack M, Hanenberg H, Scheckenbach K. *CAR-T-Zelltherapie als mögliche neue Therapieoption für Cisplatin-resistente Plattenepithelkarzinome*. Vortrag auf der 92. & 91. Online-Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e.V, online (Mai 2021)

Haist C, Bister A, Schulte E, Poschinski Z, Wiek C, Scheckenbach K, Hanenberg H. *EGFR- und CD44v6-basierte CAR T-Zell-Therapie für Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome bei Fanconi-Anämie*. Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie, Frankfurt am Main, Germany (Posterpräsentation 2021)

Zusammenfassung

Tumore des Kopf-Hals-Bereiches sind trotz der fortschrittlichen Medizin weiterhin mitunter schwer zu behandeln, unter anderem aufgrund von Resistenzbildung gegenüber Chemotherapeutika sowie der teils inoperablen primären Lage der Malignome. Ein neuer vielversprechender Therapieansatz sind T-Zellen, die chimäre Antigenrezeptoren (CARs) tragen. Bereits für hämatologische Malignome zugelassen, stehen der Verwendung bei soliden Tumoren jedoch einige Hürden entgegen. Eine Herausforderung der Anwendung bei soliden Malignomen stellt das immunsuppressive Milieu des Tumors dar, sowie die Heterogenität der exprimierten Oberflächenantigene.

Ein Hauptziel dieser Arbeit war deshalb zu untersuchen, welchen Effekt eine Vorbehandlung mit epigenetischen Modulatoren auf die Zytotoxizität von CARs hat. Dazu wurden verschiedene HNSCC Zelllinien vorab mit Decitabine, einem DNMTi, sowie Romidepsin, einem HDACi, über mehrere Tage behandelt, bevor sie dann mit CAR T-Zellen koinkubiert wurden. Die Zielantigene der CARs entsprachen häufigen Oberflächenantigenen von HNSCC: EGFR, CD44v6 und HER2/neu. Gemessen wurde die Expression dieser Zielantigene vor und nach der Behandlung mit epigenetischen Substanzen sowie die Lyse durch die CARs. Hierbei zeigte sich eine Heterogenität bezüglich des Effekts der epigenetischen Regulation bezogen auf die Expression der Antigene, aber auch auf die Zytotoxizität der CAR T-Zellen. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war das Verhalten von Cisplatin-resistenten Zelllinien verschiedener Entitäten von Plattenepithelkarzinomen zu untersuchen, da dies häufig eine Therapielimitation im klinischen Alltag darstellt. Hierzu wurden Pärchenweise bei Cisplatin-sensitiven und -resistenten Zelllinien die Expression der Zielantigene und die Lyse der CARs nach Koinkubation gemessen. Auch hier zeigten sich verschiedene Trends, die keine eindeutige Korrelation zwischen Antigenexpression und Zytotoxizität von CAR T-Zellen zeigten. Des Weiteren ist ein möglichst tumorspezifisches Ziel der CAR-Therapie nötig, um unerwünschte Wirkungen zu minimieren. Daher wurde ein CAR gegen EpCAM gerichtet etabliert und auf drei HNSCC Zelllinien getestet.

Aufgrund dieser Ergebnisse ist es notwendig weitergehende Forschung zu betreiben, um die genauen Effekte einer epigenetischen Modulation sowie Cisplatin-Resistenz zu untersuchen, um eine Verbesserung der Therapie von Patienten mit HNSCC zu ermöglichen.

Summary

Despite medical advances, HNSCC remain difficult to treat. Reasons include resistance mechanisms towards chemotherapeutics and the sometimes inoperable primary location of the tumor itself. A new promising therapeutic approach are T cells that carry chimeric antigen receptors (CARs). Already approved for hematological malignancies, there are multiple obstacles regarding therapy for solid tumors. Among other things, the immunosuppressive environment is challenging in solid tumors as well as the heterogeneity of expressed surface antigens.

Therefore, a major focus of this work was to investigate the effect of pretreatment with epigenetic modulators on the cytotoxicity of CARs. For this purpose, various HNSCC cell lines were pretreated with decitabine, a DNMTi, and Romidepsin, a HDACi, prior to co-incubation with CAR T cells. The target antigens of the CARs corresponded to common surface antigens of HNSCC: EGFR, CD44v6 and HER2/neu. The expression of these antigens before and after treatment with the epigenetic substances and the lysis by the CARs were measured. A heterogeneity was observed regarding the effect of the epigenetic regulation in terms of the expression of the antigens as well as the cytotoxicity of the CAR T cells.

Another goal of this work was to analyze the behavior of cisplatin-resistant cell lines of different entities of squamous cell carcinoma, as this represents a common therapeutic limitation in the clinical setting. Concerning this, the expression of the target antigens and the lysis of CAR T cells after co-incubation was determined in pairs of cisplatin-sensitive and -resistant cell lines. Various trends were seen, which did not show a clear correlation between antigen expression and cytotoxicity of the CAR T cells.

Furthermore, a more tumor-specific target of CAR therapy is necessary to minimize adverse effects. Therefore, a CAR directed against EpCAM was established and tested on HNSCC cell lines.

Based on these results, further research is necessary to investigate the exact effects of epigenetic modulation and cisplatin resistance in order to improve the therapy of patients with HNSCC.

Abkürzungsverzeichnis

C	Celsius
BCL	<i>B cell lymphoma</i>
BCL-XL	<i>B cell lymphoma extra large</i>
CAR	<i>Chimeric Antigen Receptor</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CDKN2D	Cyclin-abhängiger-Kinase-4-Inhibitor D
CEA	Carcinoembryonales Antigen
cm	Zentimeter
COX	Cyclooxygenase
CO₂	Kohlenstoffdioxid
CRISPR	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
CTA	<i>Cancer testis antigens</i>
CTLA4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4</i>
Dest.	Destilliert
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
DNMTi	DNA-Methyltransferase-Inhibitor
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EpCAM	Epitheliales Zelladhäsionsmolekül
FACS	<i>Fluorescent activated cell sorting</i>
h	<i>Hour</i>
HDAC	Histon-Deacetylase
HDACi	Histon-Deacetylase-Inhibitor
HER	Humaner epidermaler Rezeptor

HNSCC	<i>Head and neck squamous cell carcinoma</i>
HPV	Humane Papillomviren
IC	Inhibitorische Konzentration
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i>
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IMDM	<i>Iscoe's Modified Dulbecco's Medium</i>
kb	Kilobasen
LB	<i>Lysogeny broth</i>
L1-CAM	Neurales Zelladhäsionsmolekül 1
M	Molar
MACS	<i>Magnetic-activated cell sorting</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MFI	<i>Median fluorescent intensity</i>
mg	Milligramm
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMP	Matrix-Metalloproteasen
MRP2	<i>Multidrug resistance-associated protein 2</i>
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
NK	<i>Natural killer</i>
NKG2A	<i>Natural killer group 2 a</i>
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
ng	Nanogramm
OD	Optische Dichte
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen
PD-1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
PD-L1	<i>Programmed cell death ligand 1</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur

scFv	<i>Single chain variable Fragment</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TZR	T-Zell Rezeptor
U	<i>Units</i>
VSV-G	Glykoprotein des vesikulären Stomatitis
	Virus
μ	Mikro
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar

Inhaltverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Plattenepithelkarzinome	1
1.2 Zelluläre Therapien	4
1.3 Epigenetische Modulatoren	8
1.3.1 Romidepsin	9
1.3.2 Decitabine	10
1.4 Ziele der Arbeit	11
2 Material	12
2.1 Kits und Längenstandard	12
2.2 Plasmide	12
2.3 Bakterien	15
2.4 Zelllinien	15
2.5 Primäre Zellen	16
2.6 Antikörper	16
2.7 Puffer und Lösungen	16
2.8 Epigenetische Inhibitoren	18
2.9 Geräte	18
2.10 Software	18
3 Methoden	19
3.1 Molekularbiologische Methoden	19
3.1.1 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA	19
3.1.2 Gelelektrophorese	19
3.1.3 Ligation	20
3.1.4 Transformation von Plasmid DNA <i>in E. coli</i>	20
3.1.5 Isolation von Plasmid DNA	20
3.1.6 DNA-Sequenzierung	20
3.2. Zellbiologische Methoden	21
3.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen	21
3.2.1.1 Subkultivierung	21
3.2.2 Zellzählung	22
3.2.3 Kryokonservierung	22
3.2.4 Isolierung von humanen T-Lymphozyten	23
3.2.5 Transfektion von HEK293T Zellen	23
3.2.6 Virusernte und Transduktion humaner T-Zellen	24
3.2.7 Selektion der transduzierten T-Zellen	24
3.2.9. IC50-Messung / Dosisfindung	25
3.2.10 Behandlung mit epigenetischen Substanzen	25
3.2.11 Ko-inkubation der CAR T-Zellen mit Tumorzellen und Messung der Zytotoxizität (MTS Assay)	26
3.2.12 Durchflusszytometrische-Analyse	26

4 Ergebnisse	28
4.1 Testung von Cetuximab CAR T-Zellen bei varianter EGFR-Expression	28
4.1.1 Aufreinigung von CAR T-Zellen	28
4.1.2 Zytotoxizitätsassay	29
4.2 Epigenetische Einflüsse auf die CAR Toxizität	33
4.2.1 Dosisfindung Romidepsin	33
4.2.2 Dosisfindung Decitabine	35
4.2.3 Zytotoxizitätsassay	36
4.3 Effekt von Cisplatin-Resistenz auf die Zytotoxizität	43
4.3.1 Expression der Zielantigene	43
4.3.2 Zytotoxizitätsassay	43
4.4. Etablierung eines EpCAM-CAR	51
4.4.1 Expression von EpCAM auf HNSCC	51
4.4.2 Klonierungsstrategie	52
4.4.3 Funktionelle Austestung des EpCAM Konstruktes	53
5 Diskussion	56
5.1 Zielantigene von CARs	58
5.2 Cisplatin-Resistenz zeigt heterogene Trends auf die Zytotoxizität von CAR T-Zellen	62
5.3 Einfluss von epigenetischen Modulatoren	64
5.4 Ausblick	68
6 Literatur- und Quellenverzeichnis	71
7 Anhang	78
7.1 Abbildungsverzeichnis	78
7.2 Tabellenverzeichnis	78
8 Danksagung	79

1 Einleitung

1.1 Plattenepithelkarzinome

Plattenepithelkarzinome können an unterschiedlichen Stellen des Körpers aus vorhandenem Plattenepithel entstehen, unter anderem gehören folgende Lokalisationen dazu: Kopf-Hals-Bereich, Ösophagus, Rektum und Anus, Vagina und Zervix, Haut sowie selten Harnblase und Ovarien. Trotz jeweiliger Unterschiede in der Therapie haben viele dieser Karzinome eine ähnliche Systemtherapie in der Folge. Eine Chemotherapie ist häufig dann notwendig, wenn der Tumor nicht vollständig operativ zu entfernen ist oder sich bereits auf andere Strukturen ausgebreitet hat, diese wird bei vielen Plattenepithelkarzinomen unter anderem mit Cisplatin durchgeführt. Cisplatin ist ein Zystostatikum aus der Gruppe der Platin-Komplex-Bildner und hemmt durch „DNA-cross-linking“ die Replikation der DNA [1]. Neben den Indikationen bei Plattenepithelkarzinomen wird es ebenfalls für die Therapie anderer Entitäten genutzt, unter anderem bei Ovarial- und Urothelkarzinomen. Als Nebenwirkungen sind bei Cisplatin vor allem eine Nephrotoxizität, Neurotoxizität und Ototoxizität anzuführen sowie die Schädigung von Nerven im Sinne einer peripheren Polyneuropathie [2], [3]. Ein Problem in der Therapie dieser Karzinome liegt darin, dass Patienten einerseits häufig bereits vor der onkologischen Diagnose multipel vorerkrankt sind und teilweise als „Chemo unfit“ gelten, da beispielsweise ihre Nierenfunktion zu schlecht ist, um eine Therapie mit Cisplatin zu erhalten. Für viele Patienten fällt somit ein großer Pfeiler der möglichen Therapie bereits zu Anfang weg. Ein weiteres Problem ist eine Zunahme von Resistenzbildung gegenüber Cisplatin während der Therapie. Bei Tumoren, die am Anfang noch gut auf eine Cisplatin Therapie ansprechen, können sich im Laufe der Zeit Resistenzen gegenüber Cisplatin ausbilden und in der Folge unter laufender Therapie einen Progress des Tumors zeigen, sodass auch hier eine Therapielimitation für die Patienten im Raum steht [1], [4].

Plattenepithelkarzinome gehören zu den häufigsten Malignomen im oberen Schluck-Atemtrakt. Hierrunter fasst man Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle und des Mundbodens, des Rachens sowie des Kehlkopfes zusammen. Sie zeigen in den letzten Jahren eine international immer weiter ansteigende Inzidenz und Prävalenz. Weltweit werden rund 550.000 Neuerkrankungen und 380.000 Todesfälle pro Jahr erfasst. Sie

stehen somit an 15. Stelle der häufigsten Krebserkrankungen. Die geschlechterabhängige Inzidenz liegt mit Verhältnissen von 2:1 bis 4:1 deutlich auf der Seite des Mannes [5], [6]. Zu den klassischen Risikofaktoren gehören Tabak- und Alkoholkonsum. Ebenfalls hat die Ernährung und Mundhygiene einen Einfluss auf die Entstehung von Kopf-Hals-Tumoren [7]. Das Rauchen von Tabak führt zu einem 5-25-fach erhöhtem Risiko, alleiniger Alkoholkonsum steigert das Risiko um das doppelte. Bei Kombination beider Substanzen, kann es bis zu einem 35-fachen Anstieg des Risikos für Tumore des Kopf-Hals-Bereiches kommen [5], [7]. Ein weiterer Risikofaktor, der in den letzten Jahren auffallend an Relevanz zugenommen hat, ist eine Infektion mit onkogenen humanen Papillomviren (HPV), hierbei insbesondere mit den Typen HPV 16 und HPV18. HPV-positive Tumoren nehmen deutlich in ihrer Zahl zu, während die Zahl der klassischen Tabak-assoziierten Tumore abnehmen. Dieses Phänomen ist vor allem in großen Industrienationen zu beobachten, in denen eine Anti-Tabak-Kampagne gefördert wird [7].

Der Grundsatz der Therapie von Plattenepithelkarzinomen besteht aus drei Pfeilern: Operatives Vorgehen, Chemotherapie und Bestrahlung. Die jeweilige Kombination der Therapie ergibt sich aus verschiedenen Faktoren, unter anderem der Lage, der Größe, der Ausbreitung und dem Metastasierungsstatus des Karzinoms sowie histologischen Kriterien. Die TNM-Klassifikation teilt die Tumor nach Größe („T“), Lage, lymphogenes („N“) und peripheres Metastasierungsverhalten („M“) ein. Derzeit ist die 8. Auflage aus dem Jahr 2017 der allgemeine Standard. Für die Wahl der adäquaten Therapie hat die Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF; <https://register.awmf.org/de/start>) für die meisten Lokalisationen Leitlinien publiziert. Für einen T1 Tumor der Mundhöhle ohne Hinweis für lokale oder systemische Metastasierung ergibt sich daraus zum Beispiel als Therapie eine primär operative Entfernung. Prinzipiell kann eine Radiatio oder Chemotherapie in Kombination mit Bestrahlung sowohl primär als auch adjuvant oder neoadjuvant angewandt werden. Die Chemotherapie für viele Plattenepithelkarzinome wird standardmäßig mit dem Platinumbasierten Cisplatin eingeleitet [8]. Als weitere Optionen für HNSCC sind das ebenfalls Platinumbasierte Carboplatin, sowie die Taxanbasierten Docetaxel und Paclitaxel, als auch das Pyrimidinbasierte 5-Fluorouracil (5-FU) als Chemotherapeutika nutzbar [9]. Für Plattenepithelkarzinome des Ösophagus wird

ebenfalls standardmäßig eine Kombinationschemotherapie mit Cisplatin als fester Bestandteil eingeleitet [10].

Das Standardmedikament Cisplatin zeigt eine gute Wirksamkeit bei Primärtumoren aller HNO-Lokalisationen sowie weiterer Entitäten. Problematisch ist, dass fast alle Tumoren im Laufe der Behandlung eine Resistenz gegenüber Cisplatin ausbilden. Dadurch kommt es zu weniger stark ausgeprägten Zytotoxizität und folglich zu einer niedrigeren Wirksamkeit der Chemotherapie [11], [12]. Klinisch ist eine Cisplatin Resistenz definiert, als ein Rezidiv innerhalb von 6 Monaten nach Therapie mit Cisplatin [13]. Des Weiteren gibt es Tumore, die eine primäre Resistenz gegenüber Cisplatin aufzeigen. Zur Zeit gibt es viele Studien, die sich mit den Mechanismen hinter der Resistenz sowie den verursachenden Genen auf verschiedenen Entitäten von Plattenepithelkarzinomen beschäftigen [12]. Ein mögliches Prozedere wäre es, bei einer bestehenden Resistenz des Tumors eine alternative Behandlungsmethode zu etablieren, die dann ergänzend zum Einsatz kommen kann.

Einen neuen Pfeiler der Therapie stellt die Immuntherapie dar. Bei der Immuntherapie werden Oberflächenantigene der Tumoren und assoziierten Immunzellen ausgenutzt, um eine Schädigung von Tumorzellen zu erwirken. Neben weniger stark ausgeprägten Nebenwirkungen wie sie bei systemischen Chemotherapien auftreten, gibt diese Therapieoption außerdem die Möglichkeit Tumore zielgerichteter und daher individueller anhand ihres Immunprofils zu therapieren. Der erste Vertreter dieser Medikamente für HNSCC ist der monoklonale EGFR-Antikörper Cetuximab, welcher 2008 als erste molekulare Therapiemöglichkeit bei Metastasierung oder Rezidiv in Kombination mit Bestrahlung zugelassen wurde [9]. Die Kombination von Cetuximab und Bestrahlung zeigt einen signifikanten Anstieg der Überlebenszeit der betroffenen Patienten [9]. Aufgrund der mitunter hohen PD-L1 Expression der Tumore des Kopf-Hals-Bereiches, wurden ebenfalls Immuncheckpoint-Inhibitoren in klinischen Studien untersucht und 2017 wurde der monoklonale Antikörper Nivolumab sowie 2019 Pembrolizumab für metastasierte oder rezidivierte Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches zugelassen. Beide Antikörper sind gegen PD-1 gerichtet und zeigen allein oder in Kombination mit etablierten Therapien eine gute Prognose für Patienten. So zeigt Nivolumab als Monotherapie signifikante Ergebnisse im Gesamtüberleben, aber auch in Form von erhöhter Lebensqualität, besonders bei Patienten mit Metastasierung oder

Rezidiven, bei denen eine Chemotherapie mit Cisplatin keinen Erfolg gezeigt hat [9]. In klinischen Studien konnte ein positiver Effekt von Pembrolizumab auf das Gesamtüberleben in Kombination mit Chemotherapie gezeigt werden [14]. Zusätzlich zu den bereits zugelassenen Wirkstoffen, befinden sich weitere zahlreiche Substanzen in klinischen Studien. Unter anderem werden anti-CTLA4-Antikörper wie Ipilumab [15] sowie anti-NKG2A-Antikörper wie Monalizumab [16] zur Therapie von Kopf-Hals-Tumoren getestet. Als Weiterentwicklung der Immuntherapie schließen sich zelluläre, immunbasierte Therapien an.

Die invasive, systemische Chemotherapie führt zu starken Nebenwirkungen. Häufige Nebenwirkungen sind Fatigue, Übelkeit und Erbrechen, Myalgie und Arthralgie sowie symmetrische periphere sensorische Neuropathie [3], [17]. Teilweise führen diese Nebenwirkungen auch zu einem Abbruch oder einer Unterbrechung der Therapie. Die unerwünschten Wirkungen einer Immuntherapie präsentieren sich anders: Starke dermatologische Nebenwirkungen im Sinne eines makulopapulösen Exanthems, Vitiligo und Pruritus treten häufig nach der Gabe von immunmodulatorischen Substanzen und Antikörpern wie Cetuximab oder Pembrolizumab auf. Bei Verwendung dieser Substanzen kann es außerdem zu lebensgefährlichen Zuständen wie dem Stevens-Johnson Syndrom kommen [18].

Obwohl es diese erprobten Therapiemöglichkeiten gibt, werden pro Jahr bis zu 380.000 Todesfälle erfasst [5]. Dies zeigt die Notwendigkeit einer neuen Therapiemöglichkeit, die die Mortalität verringern kann. Ebenfalls notwendig ist eine Therapie mit weniger starken Nebenwirkungen, um auch geschwächten Patienten durch ein hohes Alter oder andere Vorerkrankungen, eine wirksame und angenehmere Therapie anbieten zu können.

1.2 Zelluläre Therapien

Chimeric Antigen Receptors (CARs) sind rekombinante Rezeptoren für ein Zielantigen, welche auf verschiedenen Immunzellen exprimiert werden können. Das Grundprinzip besteht darin, eine möglichst tumorspezifische Immunabwehr zu generieren [19]. CARs können auf verschiedenen Zellen des Immunsystems exprimiert

werden, wie beispielsweise T- oder NK-Zellen. Durch Bindung des Antigens an den CAR kommt es zur Aktivierung der jeweiligen Immunzelle und dann zu den physiologischen Folgeeffekten, wie die Lyse von Zellen nach Aktivierung zytotoxischer T-Zellen.

Ein klassischer CAR besteht aus einem extrazellulärem *single chain variable fragment* (scFv) eines monoklonalen Antikörpers, welches je nach Zielantigen variiert und ausgetauscht werden kann. Das scFv Fragment beinhaltet die variable schwere und leichte Kette des Antikörpers. Das Zielepitop kann ein Tumor-assoziiertes Antigen sein, ein Protein oder ein Kohlenhydrat [20]. Darauf folgt die *Hinge* Region, welche den Nutzen hat, eine räumliche Verbesserung des Andockens an das Zielantigen zu gewährleisten und den CAR grundsätzlich flexibler zu gestalten. Es gibt Hinweise darauf, dass eine unterschiedliche Länge der *Hinge* Region einen Einfluss auf die Zytotoxizität haben kann [19]. Die Transmembran-Einheit verbindet den extra- und intrazellulären Teil miteinander. Intrazellulär findet sich je nach Generation des CAR verschiedene Signaldomänen. CARs der ersten Generation besitzen nur eine CD ζ Einheit, die zweite Generation hat eine weitere Signaldomäne: CD28, OX40 oder 4-1BB. Die dritte Generation trägt insgesamt zwei der weiteren Signaldomänen. Heute werden in der klinischen Anwendung vor allem CARs der zweiten und dritten Generation genutzt, da die Effizienz der ersten Generation *in vivo* gering war [21]. Als Weiterentwicklung gibt es zusätzlich die 4. Generation, welche durch zusätzlich induzierbare Freisetzung von Immunmodifikation wie beispielsweise Interleukin-12 charakterisiert sind und daher u.a. für die Nutzung an soliden Tumoren von Interesse sind. Als neueste, fünfte Generation tragen CARs zusätzlich eine intrazelluläre Domäne eines Zytokinrezeptors, sodass sie folgend Signaltransduktion induzieren können. Dadurch kann die Produktion und Freisetzung von Zytokinen gefördert werden, was zu einer verbesserten Aktivierung und Proliferation der CARs führt [22].

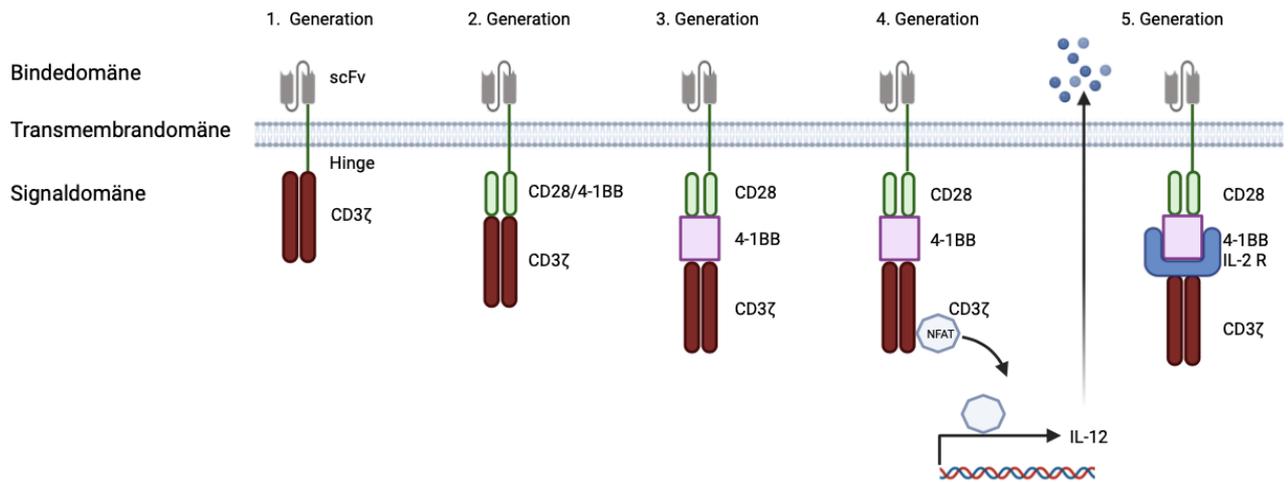


Abbildung 1: **Evolution von CAR-Generationen.** Aufbau der fünf verschiedenen CAR Generationen mit ihren verschiedenen Domänen.

CARs werden bereits zur Bekämpfung verschiedener Tumorentitäten des blutbildenden Systems angewandt. Die erste klinische Zulassung erfolgte für die Therapie von B-Zell Leukämien mit CARs gegen CD19 gerichtet - ein Oberflächenantigen, welches exklusiv auf B-Zellen exprimiert wird. Zugelassen sind die Substanzen Axicabtagene und Tisagenlecleucel für B-Zell Tumore als *third-line* Therapie in therapierefraktären oder rezidivierenden Tumoren [23]. Bislang ist noch keine CAR Therapie für solide Tumoren zugelassen. Jedoch werden CARs zur Zeit in verschiedenen klinischen Studien für Patienten mit soliden Tumoren getestet, unter anderem für Glioblastome, Pankreas- oder Brustkrebs, sowie auch Tumore des Kopf-Hals-Bereiches [20], [24].

Das ideale Zielantigen für eine CAR Therapie ist jenes, welches tumorspezifisch ist, sprich auf dem Tumor überexprimiert wird und nur sehr gering beziehungsweise nicht vorhanden auf gesunden Körperzellen ist. Wie bereits erwähnt, sind CD19 CARs für die Behandlung von B-Zell Tumoren zugelassen [25]. Das Zielantigen CD19 wird ausschließlich auf B-Zellen und keinen anderen Körperzellen exprimiert, sodass die *on-target, off-tumor* Aktivität hier sehr niedrig ist. *On-target, off-tumor* Aktivität beschreibt das Phänomen, dass CARs ihr Zielantigen auch auf anderen Zellen erkennen können und somit außerhalb des gewünschten, tumorösen Feldes ebenfalls zu einer zytotoxischen Wirkung führen können [20]. Problematisch wird dies bei Antigenen, welche in vielen Zelltypen, vor allem in sich schnell teilenden Zellen, exprimiert sind und eine hohe Antigendichte aufweisen. Beispielsweise kommt es zu schweren Hautreaktionen durch

eine Therapie mit anti-EGFR-CARs beziehungsweise -Antikörpern. EGFR ist nicht nur auf vielen Tumorgeweben überexprimiert, es wird auch in den meisten Körperzellen, jedoch vor allem in der Haut exprimiert. Kommt es hier zu einer *on-target, off-tumor* Aktivität, schädigt dies die gesunden Körperzellen und es kommt zu Nebenwirkungen wie Hautausschlägen und Schleimhauterosionen im Magen-Darm-Trakt [26]. Die Suche nach tumorspezifischen Antigenen gestaltet sich jedoch schwierig, da Tumorzellen entartete, jedoch zuvor gesunde Körperzellen darstellen und dementsprechend teils die gleichen Oberflächenantigene exprimieren.

Bisher sind Therapien mit CAR T-Zellen nur für Tumoren des blutbildenden Systems zugelassen. Da sich hier die entarteten Zellen innerhalb des Körperkreislaufs und der Blutbahn befinden, sind die Effektorzellen nach Applikation sofort an ihrem Wirkungsort und können ihr Zielantigen dort binden. Vorreiter sind hier gegen CD19 gerichtete CAR T-Zellen, welche für verschiedene hämatologische Malignitäten, unter anderem akute lymphatische Leukämie, Non-Hodgkin Lymphom und chronische lymphatische Leukämie zugelassen sind. Obwohl es hier eine sehr gute klinische Anti-Tumoraktivität gibt, sind hier häufig Nebenwirkungen abgrenzbar: neben einem Zytokin-Freisetzungssyndrom, Neurotoxizität und Zytopenie, sind ebenfalls ein Tumorlysesyndrom, B-Zell Aplasie und Anaphylaxie häufige Nebenwirkungen. Interessant anzumerken ist, dass die Nebenwirkungen eine unterschiedliche Häufigkeit und Zeitbeginn bis auftreten zeigen, je nachdem welche Generation von CAR und dementsprechend verschiedene Signaldomänen verwendet wird [27].

Für solide Tumoren gibt es bislang noch keine zugelassene Therapie mit CAR T-Zellen, da hier einige Hürden zu überwinden sind. Die Suche nach einem tumorspezifischen Antigen zeigt sich deutlich erschwert bei einer potenziellen Therapieoption für solide Tumoren. Anders als CD19 bei B-Zellen, gibt es kein Alleinstellungsmerkmal von Tumorzellen, sodass es immer Körperzellen gibt, die das Zielantigen zumindest sehr gering exprimieren. Daher wird für solide Tumoren vor allem an sogenannten *tumor-associated antigens* (TAA) geforscht, welche nicht ausschließlich von Tumorgewebe exprimiert werden, jedoch hier am stärksten vorhanden sind. Zu diesen Zielantigenen gehören unter anderem: HER2, L1-CAM (Neurales Zelladhäsionsmolekül 1), Mesothelin und CEA (Carcinoembryonale Antigen) [21]. Aufgrund der bislang fehlenden Spezifität kommt es in klinischen Studien mit CAR T-

Zellen zu mittelschweren bis starken Nebenwirkungen, sodass es weiteren Entwicklungen bedarf, um diese Art von Immuntherapie zuzulassen [21]. Beispiele für Zielantigene für Karzinome des Kopf-Hals-Bereiches sind Wachstumsrezeptoren wie EGFR und HER2, ebenfalls untersucht werden Zelladhäsionsmoleküle wie EpCAM und CD44, welche die Zell-Zell-Kontakte herstellen [20], [28].

Die Heterogenität in der Ausprägung von Antigenen auf Tumorzellen stellt ein weiteres Hindernis dar: nicht alle Tumorzellen exprimieren die gleichen Antigene und sie zeigen weitergehend eine Heterogenität bezogen auf die Dichte von Antigenen. Je nach Affinität des für den CAR zugrunde liegenden Antikörpers, ist es möglich, dass CAR T-Zellen im Tumor nur stark exprimierende Zellen abtöten. Hieraus kann sich wiederum eine Art negative Selektion einstellen, sodass solche Tumorzellen bevorzugt wachsen und sich teilen, welche das Zielantigen der CAR Therapie nicht tragen. Infolgedessen würde es zu einer Resistenz gegenüber der Therapie kommen [29].

CARs müssen bei soliden Tumoren einige Barrieren überwinden, die es bei Leukämien nicht gibt. So müssen sie erst zum Ort des tumorösen Wachstums gelangen: Dementsprechend bei einer intravenösen Gabe aus der Blutbahn hinaus zum Tumor. Dort angekommen, müssen sie den Tumor infiltrieren, um eine effiziente Zytotoxizität ausführen zu können [30]. Wenn CAR T-Zellen es zum Ort des Tumors geschafft haben, müssen sie in dieser Umgebung jedoch weiterhin überleben, um einen anti-Tumor-Effekt zu erzeugen. Aufgrund des tumorspezifischen, immunsuppressiven Milieus, kann es jedoch zu einem nur kurzen Überleben der CARs kommen [29]. Neben diesen zellulären Therapien, die teilweise schon für hämatonkologische Erkrankungen zugelassen sind, ist aktuell Bestand der Forschung weitere, bislang noch nicht etablierte Methoden wie unter anderem eine epigenetische Modulation.

1.3 Epigenetische Modulatoren

Wie bereits oben erwähnt, zeigen verschiedene Tumorentitäten entweder bereits zu Beginn oder im Verlauf eine Resistenz gegenüber klassischen Therapieregimen. Hierbei spielt unter anderem die Epigenetik eine entscheidende Rolle. Die epigenetische Dysregulation von Histonen und somit die Regulation von Genaktivität ist ein häufiges

Phänomen verschiedener Erkrankungen, besonders häufig vorkommend bei malignen Erkrankungen [13]. Daher ist eine medikamentöse epigenetische Modulation dieses Mechanismus eine geeignete Angriffsstelle für neue Therapieoptionen in der Krebsbekämpfung. Durch einen gezielten Eingriff in die Epigenetik wird versucht, die Aktivität von Genen, die eine Rolle beim Zellzyklus und bei Apoptose spielen zu verändern [31]. Zwei große Gruppen von Medikamenten, die in diesen Prozess eingreifen, sind die Histon-Deacetylase-Inhibitoren (HDACi) sowie die DNA-Methyltransferase-Inhibitoren (DNMTi). Bislang ist diese neuartige Gruppe von Medikamenten vor allem für maligne hämatologische Erkrankungen wie Lymphome und das myelodysplastische Syndrom zugelassen. Es gibt jedoch zahlreiche klinische Studien, die den Einsatz von epigenetischen Modulatoren bei soliden Tumoren untersuchen [32], [33].

1.3.1 Romidepsin

Histon-Deacetylasen (HDAC) sind Enzyme, welche Acetylreste aus Seitenketten von Histonen entfernen. In ihrer Gruppe gibt es eine weitere Unterteilung in vier Klassen: I, II, III und IV mit mindestens 18 verschiedenen HDAC Enzymen. Eine Überexpression von HDAC2 und HDAC6 konnte in oralen Tumoren dargestellt werden und mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium in Zusammenhang gebracht werden [34].

Romidepsin ist ein bizyklisches Peptid, primär isoliert aus einem Bakterium, welches vor allem HDAC1, HDAC2 und HDAC3 suffizient hemmt [35]. Seit 2009 ist es für die Behandlung von T-Zell Lymphomen zugelassen [36] und wird zur Zeit in klinischen Studien bei Patienten mit rezidierten oder metastasierten Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches getestet [31]. In Experimenten mit Lebertumorzellen konnte gezeigt werden, dass Romidepsin zu einem Zellzyklusarrest zwischen der G2 und M-Phase führt. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit Romidepsin eine erhöhte Rate von Apoptose in den Krebszellen zur Folge hat [37].

1.3.2 Decitabine

Epigenetische Modulation in Form von DNA-Methylierung ist ein häufiges Phänomen von Tumorzellen. Durch diesen Vorgang kommt es unter anderem zur Repression von Tumorsuppressorgenen und somit zu einem Überlebensvorteil der Tumorzellen [38]. Daher bietet die Inhibition dieser Methylierung einen Angriffspunkt für eine potenzielle Therapie. DNA-Methyltransferasen (DNMT) übertragen Methylgruppen auf Nukleinbasen und werden nach ihrer modifizierenden Base, entweder Cytosin oder Adenin, in drei große Gruppen unterteilt: DNMT1, DNMT3A und DNMT3B. Die häufigste Stelle der Methylierung ist dabei die C5 Position [39].

Inhibitoren von DNA-Methyltransferasen wie Decitabine (5-Aza-2'-Desoxycytidin) unterbinden diesen Vorgang und können durch die folgende Demethylierung die Genaktivität wieder aktivieren. Decitabine ist ein strukturelles Analogon des Nukleosids Cytidin und wird an dessen Stelle während der Replikation in die DNA eingebaut. Die C5 Stelle ist bei Decitabine durch ein Stickstoff Molekül ausgetauscht, sodass die Methyltransferasen gehemmt werden [40].

In klinischen Phase I und II Studien wurde die Wirkung von Decitabine in Kombination mit Chemotherapie auf verschiedene solide Tumoren wie Kolorektale-, Leber-, Ösophagus- und Ovarialkarzinome getestet, mit guten Ergebnissen bezüglich einer *stable disease* Einteilung. So konnten bei 70 Prozent von Platin-resistenten Ovarialkarzinom Patienten eine *stable disease* durch die Kombination von Decitabine und Carboplatin erreicht werden [38], [41]. Die tumorsuppressiven Effekte gehen hier zumeist aus einer Sensitivitätssteigerung für das jeweilige Zystostatikum hervor, weshalb sich eine Vorbehandlung mit epigenetischen Modulatoren vor einer geplanten Chemotherapie als geeignet darstellt [38]. Des Weiteren gibt es *in vitro* Versuche, in denen gezeigt wurde, dass Decitabine die Sensitivität gegenüber Cisplatin in Cisplatin-resistenten Kopf-Hals-Tumoren erhöhen und infolgedessen zu einer erhöhten Zytotoxizität der Tumorzellen führen kann [42].

1.4 Ziele der Arbeit

Aufgrund der ansteigenden Inzidenz und hohen Mortalität von Plattenepithelkarzinomen bedarf es neuer Therapiemöglichkeiten. Die Immuntherapie stellt in den letzten Jahren eine neue Option da, um verschiedene Tumorentitäten zu behandeln. Eine Therapie mit CAR T-Zellen ist bereits für hämatologische Tumorerkrankungen zugelassen und hat das Potential, ebenfalls bei soliden Tumoren einen positiven Effekt bezüglich Tumorreduktion und Verlängerung des Gesamtüberlebens zu erzeugen. Zunächst wurde daher auf Basis eines bereits zugelassenen und klinisch eingesetzten Antikörper Cetuximab ein anti-EGFR-CAR Konstrukt auf verschiedenen Entitäten von Plattenepithelkarzinomen sowie verschiedener Antigenexpression etabliert.

Angesichts häufiger epigenetischer Veränderungen in Tumorzellen, ist ein weiterer, potenzieller Ansatz eine medikamentöse epigenetische Modulation zu erzeugen, um die tumorspezifischen Veränderungen zu revidieren, um sie im Anschluss empfindlicher für nachfolgende Therapien zu machen. Deshalb ist eines der Hauptziele dieser Arbeit festzustellen, ob eine Behandlung mit epigenetischen Substanzen wie Romidepsin und Decitabine zu einer Verbesserung der Zytotoxizität von CAR T-Zellen führt.

Ein weiteres Problem im Verlauf der aktuellen Standardtherapie von Kopf-Hals-Tumoren ist eine häufige Resistenzbildung gegenüber dem Chemotherapeutikum Cisplatin. Daraus ergibt sich die Fragestellung für das zweite Ziel dieser Arbeit, ob diese erworbene Resistenz zu einer Veränderung der Effektivität von CAR T-Zellen führt und ob so eine potenzielle neue Therapieoption für diese therapierefraktären Tumore etabliert werden kann.

Ein wichtiger Faktor für eine erfolgreiche Therapie mit CARs ist ein geeignetes, möglichst tumorspezifisches Zielantigen zu finden, um etwaige Nebenwirkungen möglichst gering bei hoher Antitumor-Aktivität zu halten. Daher ist das dritte Ziel dieser Arbeit mit EpCAM ein Zielantigen für ein neues CAR Konstrukt zu etablieren, welches spezifisch EpCAM-exprimierende Zellen erkennt, welche häufig auf Tumore überexprimiert werden, und somit einen neuen Ansatz für CAR T-Zell Therapie zu finden.

2 Material

2.1 Kits und Längenstandard

Tabelle 1: Kits und Längenstandard

Kit	Hersteller
Plasmid DNA Purification NucleoBond Xtra Maxi	Macherey-Nagel (#740414100)
CD34 MicroBead Kit	Miltenyi Biotech (#130-046-702)
PureYield Plasmid Miniprep System	Promega (#A1222)
FastGene Gel/PCR Extraction Kit	Nippon Genetics (#G-91202)
Phusion High-Fidelity PCR Kit	New England Biolabs (#E0553S)
Längenstandard	Hersteller
GeneRuler 1kB Plus DNA ladder	Thermo Scientific (#SM1333)

2.2 Plasmide

Eine schematische Darstellung eines selbstinaktivierenden (SIN) lentiviralen Vektors, der in dieser Arbeit verwendet wurde, ist in Abbildung 14 dargestellt. Der 5'-*Long Terminal Repeat* (LTR) besteht aus einem Zytomegalievirus (CMV) abgeleiteten Promotor, gefolgt von der R- und U5-Region. Darüber hinaus beinhaltet der Vektor Sequenzen für das Verpackungssignal (Ψ), das Rev-bindende-Element (RRE) und den zentralen Polypurintrakt (cPPT). Die Transgenkassette wird von einem internen Promotor (iP) angetrieben. Um mehr als ein Transgen zu exprimieren, wird das HAT-Element (*Internal Ribosome Entry Site*) oder eine T2A Site verwendet. WPRO (*woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element*, optimiert) fördert den mRNA-Transport und die Stabilität. Auf das WPRO folgt der 3'-LTR, bestehend aus einer Δ U3, R- und U5-Region.

Alle CAR-Expressionsvektoren, die in dieser Dissertation verwendet wurden, enthielten einen internen Promotor des myeloproliferativen Sarkomvirus (MPSV), ein blau fluoreszierendes Protein (BFP), eine T2A-Stelle und 2. Generation CAR-

Konstrukte, bestehend aus dem CD8-alpha-Signalpeptid-Leader (J.) oder hIgG (R.), dem scFv, der c6-Scharnierdomäne, den CD28-TM- und zytoplasmatischen Regionen (CP) sowie der CD3ζ-zytosolischen Domäne.

Tabelle 2: **Plasmide und Vektoren**

Helfer-Plasmid	Beschreibung
pCD/NL-BH	Helferplasmid, dient als Expressionsvektor für lentivirale <i>gag/pol</i> -Gene, nach Entfernung des Hüllproteins und dem Beschichtungssignal [43]
pczVSV-G wt	Helferplasmid, Expressionsvektor für das Glykoprotein G des Vesikulären Stomatitis-Virus (VSV-G) [44]

Expressions-Plasmid	Beschreibung
p2CL21BFPT2ARCD19c6CD2828z	Spezifisches CAR: Humanes CD19
p2CL21BFPT2ACD44v6c6CD2828z	Spezifisches CAR: Humanes CD44 Variante 6
p2CL21BFPT2AJ.Cetuxkurz.c6CD2828z	Spezifisches CAR: Humanes EGFR, basierend auf dem verkürzten Antikörper Cetuximab
p2CL21BFPT2AJ.Her2neu.c6CD2828z	Spezifisches CAR: Humanes HER2/neu
p2CL21BFPT2AJ.EpCAM317c6CD2828z	Spezifisches CAR: Humanes EpCAM, Klon 317
p2CL21BFPT2AJ.EpCAM1464c6CD2828z	Spezifisches CAR: Humanes EpCAM Klon 1464

Klonierungsvektoren	Beschreibung
pMK_RQ_R12_C5	Kommerzieller GeneArt-Vektor mit Ampicillin-Resistenz
pMA_RQ_J.EpCAM1464	Kommerzieller GeneArt-Vektor mit Ampicillin-Resistenz, der das kodonoptimierte EpCAM 1464 scFv mit J-Leader enthält
pMK_RQ_J.EpCAM3170	Kommerzieller GeneArt-Vektor mit Ampicillin-Resistenz, der das kodonoptimierte EpCAM 3170 scFv mit J-Leader enthält
pMK_RQ_J.R12c6CD2828z	Kommerzieller GeneArt-Vektor mit Kanamycin-Resistenz, der den kodonoptimierten 2. Generation CAR mit J-Leader, ROR1 R12 scFv, der c6-Scharnierdomäne, CD28 TM, CD28 CP und Zeta enthält
pMK_RQ_J.EpCAM1464c6CD2828z	Kommerzieller GeneArt-Vektor mit Kanamycin-Resistenz, der den kodonoptimierten 2. Generation CAR mit J-Leader, EpCAM 1464 scFv, der c6-Scharnierdomäne, CD28 TM, CD28 CP und Zeta enthält
pMK_RQ_J.EpCAM3170c6CD2828z	Kommerzieller GeneArt-Vektor mit Kanamycin-Resistenz, der den kodonoptimierten 2. Generation CAR mit J-Leader, EpCAM 3170 scFv, der c6-Scharnierdomäne, CD28 TM, CD28 CP und Zeta enthält

2.3 Bakterien

Für die Transformation wurden Top10 *Escherichia coli* (*E. coli*) Zellen von Invitrogen genutzt.

2.4 Zelllinien

Tabelle 3: **Zelllinien**

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
HEK293T	Humane, embryonale Nierenzelllinie; transformiert mittels Adenovirus	[45]
UM11B	Humane Tumorzelllinie des Larynx	[46]
UM14C	Humane Tumorzelllinie des Mundbodens	[46]
UT24A	Humane Tumorzelllinie der Zunge	[46]
UT33	Humane Tumorzelllinie des Zahnfleisches	[46]
UM74A	Humane Tumorzelllinie der Zunge	[47]
UM104	Humane Tumorzelllinie des Mundbodens	[48]
Cal27	Humane Tumorzelllinie der Zunge	[49]
Kyse510	Humane Tumorzelllinie des Ösophagus	[50]
RT112	Humane Tumorzelllinie der Harnblase	[51]
J82	Humane Tumorzelllinie der Harnblase	[52]
Hey	Humane Tumorzelllinie des Ovars	[53]
A2780	Humane Tumorzelllinie des Ovars	[54]
CAOV3	Humane Tumorzelllinie des Ovars	[53]
TOV21G	Humane Tumorzelllinie des Ovars	[55]
TOV112D	Humane Tumorzelllinie des Ovars	[55]
OV90	Humane Tumorzelllinie des Ovars	[55]

Die Zelllinien Cal27, Kyse510, Hey, A2780, OV90, CAOV3, TOV21G, TOV112D, J82 und RT112 wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Matthias Kassack aus dem Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf als Cisplatin-sensitive sowie Cisplatin-resistente Variante zur Verfügung gestellt.

2.5 Primäre Zellen

Primäre T-Lymphozyten wurden aus dem peripheren Blut von gesunden Spendern gewonnen und mithilfe des Ficoll-Protokolls (Kapitel 3.2.4) isoliert. Alle Spender haben freiwillig ihr Blut zur Verfügung gestellt und schriftlich eingewilligt. Es liegt ein positives Ethikvotum vom Ethikkomitee der Heinrich-Heine-Universität vor (Studien-Nr.: 2019-623-andere Forschung erstvotierend).

2.6 Antikörper

Tabelle 4: Antikörper

Antikörper	Konzentration	Hersteller
CD34-PE (QBEND/10)	0,5 mg/ml	Thermo Fischer (#MA1-10205)
Anti-human CD3 (OKT-3)	1 µg/cm ²	eBioscience (#19-0037-85)
mouse anti-human CD28	1 µg/cm ²	BD Pharmingen™ (#555725)
EGFR PE (REA688)	0,5 mg/ml	Milteniy Biotec (#130-110-528)
CD44v6 PE-vio (REA706)	0,5 mg/ml	Milteniy Biotec (#130-111-239)
ErbB2 APC-vio	0,5 mg/ml	Milteniy Biotec (#130-106-756)
CD326 APC-vio (REA764)	0,5 mg/ml	Milteniy Biotec (#130-111-002)

2.7 Puffer und Lösungen

Tabelle 5: Lösungen/Puffer

Zellkultur	Beschreibung	Hersteller
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	GIBCO™ (#31966-047)
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium	Sigma Aldrich (#I3390)
Zusätze	- 100 U/ml Penicillin + 100 µl/ml Streptomycin (PenStrep)	GIBCO™ (#15140-122)
	- 2 mM L-Glutamin	GIBCO™ (#25030)
	- Interleukin-2 1000 U/µl	

	- MycoZap Plus-PR 500x	Lonza (#VZA-2022)
Trypsin-EDTA	0,05 % Trypsin und 0,02 % EDTA	PAA™ (#L11-004)
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	GIBCO™ (14190169)
Gelatine Lösung	1g Gelatine in 1 l dest. Aqua gelöst und autoklaviert	Sigma Aldrich (#G1890)
MACS Puffer	0,5% BSA mit 2 mM EDTA gelöst in PBS, pH 7,2	Sigma Aldrich (#A7906-10G)
Erythrozytenlysis-Puffer	8,99 g NH ₄ CL, 1 g KHCO ₃ und 40 µl 0,5 M EDTA, ad 1 l dest. Aqua, pH 7,3	
Celltiter 96® AQueous One Solution	Cell Proliferation Assay Substrat	Promega (#G3581)
PEI	Polyethylenimin, 1 mg/ml	Sigma Aldrich (#MKBK7352V)
Protaminsulfat	1 µg/µl in dest. Aqua	Sigma Aldrich (#P4020)
TE Puffer	242 g Tris Base 57,1 ml Essigsäure 100ml 0,5 M EDTA ad 1 l dest. Aqua	
DMSO	Dimethylsulfoxid	Sigma Aldrich (#D8418)
Propidiumiodid-Lösung	0,5 µg/ml Propidiumiodid (PI) in PBS	Sigma Aldrich (#P4864)
FCS	<i>Fetal calf serum heat-inactivated</i>	Gibco (#10500-064)
Trypanblau Lösung	0,4%	Thermofisher (#15250061)

Mikrobiologie	Beschreibung	Hersteller
LB-Medium	20 g LB Broth Miller aufgefüllt mit 1 l dest. Aqua	Sigma Aldrich (#L3022)
LB-Agar	37 g LB Agar aufgefüllt mit 1 l dest. Aqua	Sigma Aldrich (#L2897)

2.8 Epigenetische Inhibitoren

Tabelle 6: Epigenetische Inhibitoren

Pharmakon	Konzentration	Hersteller
Romidepsin	10 mM	Sellekchem (#S3020)
Decitabine (5-Aza-2'-deoxycytidine)	10 mM	Sigma-Aldrich (#A3656)

2.9 Geräte

Tabelle 7: Geräte

Gerät	Hersteller	Nutzung
MACS Quant Analyzer 10	Miltenyi Biotec	Durchflusszytometrie
NanoDrop 2000/2000c	Thermo Scientific	Bestimmung des DNA-Gehaltes
TC20™ Automated Cell Counter	Bio-Rad	Automatisierte Zellzählung
Sunrise Microplate Reader	Tecan	Plattenlesegerät
Biometra T3 Thermocycler	Analytik Jena	PCR Amplifikation

2.10 Software

Tabelle 8: Software

Software	Hersteller	Nutzung
Mendeley 1.19.4	Elsevier	Literaturverwaltung
MACS Quant Software	Miltenyi Biotec	Durchflusszytometrie
GraphPad Prism 9	GraphPad Software	IC50 Kalkulation
BioRender	BioRender	Erstellung von Abbildungen
Magellan	Tecan	Platten-Auswertung
SnapGene	GSL Biotech LLC	Erstellung von Klonierungen

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Zur analytischen Identifikation und präparativen Klonierung der Plasmid DNA sowie zum Klonieren wurde die DNA durch Restriktionsendonukleasen geschnitten, welche spezifische palindromische Sequenzen erkennen können und somit sequenzspezifisch schneiden können, um beispielsweise im Anschluss per Gelelektrophorese analysiert zu werden. Die jeweilige DNA (bis zu 3.000 ng) wurde mit 1 µl Enzym und 2 µl Restriktionspuffer (10x), aufgefüllt mit dest. Wasser auf 20 µl und nach Herstellerangaben inkubiert.

3.1.2 Gelelektrophorese

Nach beschriebener Vorbereitung der DNA und um die DNA-Fragmente zu trennen und sichtbar zu machen, wurden 1 %ige Agarosegele genutzt. Hierzu wurde zunächst 1 g Agarose in 100 ml TAE Puffer gelöst. Hinzugegeben wurde 0.2 µg/ml Ethidiumbromid, ein DNA-interkalierendes Agens, das genutzt wird um die aufgetrennten DNA-Banden auf einem UV-Transilluminator zu detektieren. Ein elektrisches Feld wurde erzeugt, sodass die DNA-Fragmente ihrer Größe nach zur Anode wandern. Dabei wanderten kleine, negativ geladene Teilchen am schnellsten. Zur Beurteilung der Banden wurde die 1 kb Plus Ladder aufgetragen. Durch einen mitgeführten DNA-Standard-Größenmarker konnte die Zuordnung einzelner Banden ihrer entsprechenden Größe erfolgen und die gewünschte Bande mit einem Skalpell herausgeschnitten werden. Die Elution der gewünschten DNA-Fragmente geschah mithilfe des *Gel/PCR Extraction Kits* nach Herstellerangaben.

3.1.3 Ligation

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurden Insert und Vektor in einem molekularen Verhältnis von 1:3 gemischt unter Hinzugabe von 1 µl T4 Ligase sowie 2 µl Ligase Puffer. Die Reaktion wurde für 3 h bei Raumtemperatur inkubiert.

3.1.4 Transformation von Plasmid DNA in *E. coli*

Zur Vermehrung des gewünschten Plasmids wurden *E. coli* genutzt. Zunächst wurden 50 µl der *E. coli*-Top10-Bakteriensuspension auf Eis aufgetaut und diese mit Plasmid-DNA oder dem Ligationsansatz versetzt. Einminütiger Hitzeschock bei 42 °C, gefolgt von einer Abkühlung auf Eis. Es wurden 300 µl LB-Medium ohne Zusätze hinzugegeben und der Ansatz anschließend bei 37 °C inkubiert. Ansätze mit Ampicillin-Resistenz wurden 30 min inkubiert, Plasmide mit Kanamycin-Resistenz wurden 2 h inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen auf einer Agarplatte mit dem jeweiligen Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.1.5 Isolation von Plasmid DNA

Nach der Transformation wurde die Isolation von Plasmid DNA entweder mit dem *PureYield Plasmid Miniprep System* (bis 5 ml) oder dem *DNA Purification NucleoBond Xtra Maxi Kit* (bis 150 ml) nach den Herstellerangaben durchgeführt. Anschließend wurde die DNA in TE Puffer eluiert und der DNA-Gehalt per Spektrometer (NanoDrop 2000/200c, Thermo Scientific) quantifiziert.

3.1.6 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte für die Sequenzüberprüfung amplifizierter Klonierungsprodukte. Hierbei wurde die Kettenabbruchmethode nach Sanger verwendet. Für die DNA-Sequenzierung wurde das Microsynth Seqlab beauftragt. Hierzu wurde

100-200 µg DNA in dest. Wasser verdünnt und mit dem jeweiligen Primer in das Labor geschickt.

3.2. Zellbiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Jegliche Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilwerkbank der Sicherheitsklasse II in einem S2-Labor durchgeführt. Alle Medien und Lösungen wurden zuvor sofern notwendig autoklaviert oder steril filtriert und anschließend steril genutzt.

Zur Kultivierung der HEK293T-Zellen sowie der Tumorzelllinien wurde das DMEM Medium mit Zusatz von 10 % FCS und 1 % PenStrep genutzt. Bei den Tumorzelllinien wurde zur Prävention von einer Mykoplasmen Infektion zusätzlich 1 ml MycoZap (500x) hinzugefügt. Die Kultivierung erfolgte auf zellkulturbeschichteten 10 cm Kulturschalen bei 37 °C und 5 % CO₂-Versorgung sowie 95 % relativer Luftfeuchtigkeit in geeigneten Inkubatoren. Sobald die Zellen einen konfluenten Monolayer gebildet hatten, mussten diese vereinzelt werden.

3.2.1.1 Subkultivierung

Zur Ablösung der adhärennten Zellen von der Oberfläche der Zellkulturschale wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Daraufhin wurde pro 10 cm Schale 1 ml Trypsin-EDTA hinzugegeben, sodass die gesamte Oberfläche bedeckt war. Die Zellkulturschale wurde bis zur vollständigen Ablösung der Zellen unter Kultivierungsbedingungen im Inkubator gehalten. Nach vollständiger Ablösung wurde die Trypsin-EDTA-Lösung mit Medium abgestoppt und die Zellen mehrmals resuspendiert, um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen im Medium zu gewährleisten. Die gewünschte Menge an Zellen wurde entweder für ein Experiment abgenommen oder weiterkultiviert. Hierzu wurden die Zellen auf eine neue Zellkulturschale mit frischem Medium überführt.

3.2.2 Zellzählung

Für die Zellzahlbestimmung wurde eine Neubauer-Zählkammer genutzt. Hierzu wurde die Zählkammer angehaucht und das Deckglas so darauf aufgelegt, dass Newton'sche Ringe erkennbar waren. Für die Suspension wurden die Zellen 1:1 mit Trypanblau vermischt und in die Zählkammer pipettiert. Unter dem Mikroskop wurden alle vier Großquadrate der Zählkammer gezählt, welche selbst aus 16 Kleinquadraten bestehen. Die tatsächliche Zellzahl wurde ausgerechnet, indem die Quadratanzahl sowie die Verdünnung der Suspension herausgerechnet wurde. Durch die Hinzugabe von Trypanblau wurden tote Zellen blau angefärbt und nicht mitgezählt. Als Alternative zur manuellen Zellzählung wurde die Zellzahl und -viabilität mittels automatisiertem Zellcounter bestimmt. Dazu wurde die zuvor beschriebene Suspension aus Zellen und Trypanblau auf ein *counting slide* gegeben und per *TC20™ Automated Cell Counter* gemessen. Angezeigt wurde die Gesamtzellzahl sowie die Lebendzellzahl in Zellen/ml.

3.2.3 Kryokonservierung

Zur langfristigen Lagerung wurde die jeweilige Passage der Zelllinien kryokonserviert. Hierzu wurde eine mit 90-100 % Zellen konfluente 10 cm Schale mit 1 ml Trypsin abgelöst und dieses mit 9 ml Medium inaktiviert. Die Zellsuspension wurde 10 min bei 350 g zentrifugiert und das Zellpellet wurde in einem Gemisch aus 100 µl DMSO, 100 µl FCS sowie 800 µl des jeweiligen Komplettmediums aufgenommen. Pro Kryo-Röhrchen wurde 1 ml der Lösung hinzugegeben und in einer Einfrierbox pro Minute um 1 °C gekühlt bis auf -80°C. Wenn dies erreicht wurde, wurden die Zellen langfristig in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur Rekultivierung der Zellen wurden diese aufgetaut und im Anschluss zentrifugiert um das vorhandene DMSO zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in frischem Medium weiter kultiviert.

3.2.4 Isolierung von humanen T-Lymphozyten

Die Isolation der peripher mononukleären Blutzellen (PBMC) wurde per Ficoll-Protokoll durchgeführt. Zur Gewinnung von humanen T-Lymphozyten wurde zunächst von gesunden Spendern Vollblut in EDTA-Röhrchen gewonnen. Dieses wurde 1:1 mit PBS verdünnt und jeweils 7 ml dieser Lösung wurde auf bereits vorgelegte 7 ml Ficoll Plaque geschichtet. Die Zellen wurden anschließend 30 min bei 350 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Die Bremse der Zentrifuge wurde für diesen Schritt ausgestellt, sodass es nach Beendigung des Zentrifugier-Vorganges zu keiner Vermischung der aufgetrennten Schichten des Blutes kam. Die obere Schicht, welche Plasma und Thrombozyten beinhaltet, wurde abgenommen und verworfen, sodass die gewünschte PBMC-Schicht direkt abgenommen und gesammelt werden konnte. Die geernteten PBMCs wurden mit 50 ml PBS gewaschen und 10 min bei Raumtemperatur und 350 g zentrifugiert. Anschließend wurde pro EDTA-Röhrchen Blut 1 ml Erythrozytenlysis-Puffer auf das Zellsediment gegeben, resuspendiert und anschließend für 5 min bei 4 °C inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde der Puffer mit 45 ml PBS neutralisiert und die Zellen wurden erneut 10 min bei Raumtemperatur und 350 g zentrifugiert. Das finale Zellsediment wurde in IMDM Medium mit 100 U/ml IL-2 aufgenommen und resuspendiert. Eine 6-Well Platte wurde mit 9ml PBS, 60 µl CD3 sowie 60 µl CD28 beschichtet, hierauf wurde das Suspension gegeben und kultiviert. Nach einer Kultivierung von 3 Tagen haben sich die T-Zellen ausdifferenziert.

3.2.5 Transfektion von HEK293T Zellen

Pro 10 cm-Schale wurden 5×10^6 HEK293T-Zellen in einem Volumen von 10 ml ausgesät und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert, sodass eine Konfluenz von 70-80 % für die Transfektion genutzt werden konnte. Für die Transfektion wurden pro Ansatz jeweils ein DNA-Mix bestehend aus je 6 µg der DNA der beiden Helferplasmide (pczVSV-G wt und pCD/NL-BH) und 6 µg DNA des jeweiligen Expressionsvektors erstellt und folgend mit einem Ansatz aus 45 µl Polyethylenimin (1 mg/ml) und 1,935 ml DMEM Medium ohne Zusätze per Vortex gemischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde das alte Medium der Zellen abgenommen und durch 4 ml neues 15 %-FCS-haltiges DMEM Medium ersetzt. Nach der

Inkubationszeit wurden die 2 ml Transfektionslösung vorsichtig auf die Zellen gegeben, sodass es zu einer finalen Serumkonzentration von 10 % FCS kam. Anschließend wurden die Zellen inkubiert und nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel mit 10 ml IMDM.

3.2.6 Virusernte und Transduktion humaner T-Zellen

Zwei Tage nach der Transfektion wurde zunächst der Viruspartikel-enthaltende Zellkulturüberstand der transfizierten HEK293T-Zellen mittels einer sterilen Einmalspritze aufgenommen und über einen Filter mit einer Porenweite von 0,45 µm gefiltert. In dem auf diese Weise gewonnenen zellfreien Überstand befinden sich die extrazellulären viralen Partikel, die auf die Zielzellen gegeben werden konnten (Transduktion). Für jeden Ansatz wurden jeweils 500.000 T-Zellen, eluiert in 500 µl Medium mit 500 U/ml IL-2, mit 2 ml Virusüberstand transduziert. Für eine verbesserte Transduktionseffizienz wurde 25 µl Protaminsulfat (8 µg/ml) hinzugefügt. Nach 24 h wurden 5 ml IMDM Medium mit 100 U/ml IL-2 hinzugefügt.

3.2.7 Selektion der transduzierten T-Zellen

Die transduzierten T-Zellen wurden nach 2 Tagen per *MACS[®] CD34 MicroBeads* System nach dem Hersteller Protokoll aufgereinigt. *MACS[®] MicroBeads* sind magnetische Partikel, welche gegen das Antigen CD34 gerichtet sind und das Epitop binden. Alle in dieser Arbeit genutzten CARs tragen eine von CD34 abgeleitete c6-*Hinge*-Region, sodass alle positiv transduzierten T-Zellen von dem *MicroBeads* gebunden werden. Die Zellen wurden mit dem magnetischen Antikörper markiert und auf eine Säule gegeben, welche sich an einem Magneten befindet. Nach mehreren Waschschritten konnten die unmarkierten, nicht-transduzierten T-Zellen aus der Säule gewaschen werden (Durchfluss). Daraufhin wurde die Säule vom Magneten entfernt und die markierten Zellen wurden mit Hilfe von mit MACS-Puffer von der Säule eluiert, mit PBS gewaschen und in 5 ml IMDM Medium mit 100 U/ml IL-2 resuspendiert und in eine zellkulturbeschichteten 6-Well-Platte ausgesät.

3.2.9. IC50-Messung / Dosisfindung

Zur Dosisfindung der Behandlung mit epigenetischen Modulatoren wurden die Zellen in 96-Well Platten ausgesät und im Anschluss mit verschiedenen Konzentrationen der jeweiligen Substanz, Decitabine oder Romidepsin, behandelt. Mittels *Celltiter 96® AQueous One Assay (MTS Assay)* wurde nach 72 Stunden die Viabilität der Zellen gemessen sowie der IC50 bestimmt.

3.2.10 Behandlung mit epigenetischen Substanzen

Um eine epigenetische Modulation zu erzeugen, wurden die Tumorzellen mit dem HDAC-Inhibitor Romidepsin sowie dem DNMT-Inhibitor Decitabine behandelt.

Für die Behandlung mit Decitabine wurden pro Zelllinie 10^6 Zellen in eine 10 cm Schale ausgesät und an Tag 1, 2 und 3 mit Decitabine (100 nM) behandelt. Dazu wurde der Decitabine Stock (100 nM) $1:10^4$ mit DMEM-Medium verdünnt und auf die Schale gegeben. An Tag 6 wurden 2×10^4 Zellen pro Well in eine 96-Well Platte umgesetzt.

Für die Romidepsin Behandlung wurden pro Zelllinie 8.000-20.000 Zellen pro Well einer 96-Well Platte ausgesät. Aufgrund der verschiedenen Wachstumsmuster sowie Zellgröße, wurde hier eine höhere Breite an auszusäenden Zahlen genutzt. Die Zellen wurden an Tag 1 entsprechend ihres IC50 mit 0,3 nM, 1 nM, 1,5 nM oder 3 nM Romidepsin behandelt.

An Tag 4 der Romidepsin behandelten Zellen sowie Tag 8 der Decitabine behandelten Zellen erfolgte die Koinkubation mit den transduzierten T-Zellen. Parallel erfolgte pro Zelllinie eine äquivalente Behandlung mit dem Lösungsmittel DMSO als Negativkontrolle.

3.2.11 Ko-inkubation der CAR T-Zellen mit Tumorzellen und Messung der Zytotoxizität (MTS Assay)

Zur Analyse der Zytotoxizität mittels *CellTiter96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay* (Promega) wurden die CAR T-Zellen mit den jeweiligen Tumorzellen koinkubiert. Die Tumorzellen wurden in 100 µl DMEM Medium in TCT 96-Well Platten ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. In Abhängigkeit von der Größe der Zellen sowie des weiteren Vorgehens wurde eine Zellzahl zwischen 10.000-30.000 Zellen pro Well gewählt. Nach einem Tag wurden die mit MACS selektierten transduzierten T-Zellen mit PBS gewaschen und in T-Zell-Medium (IMDM ohne IL-2) resuspendiert. Dann wurden 100 µl der T-Zell-Suspension zu den Zielzellen bei unterschiedlichen Effektor-zu-Zielzellen Verhältnissen (3:1 bis 0,01:1) hinzugefügt. Untransduzierte T-Zellen dienten als negativer Kontrollwert und Medium wurde als Kontrolle verwendet.

Nach 16 h Koinkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Platten dreimal mit 200 µl PBS pro Vertiefung gewaschen, um nicht-adhärenente T-Zellen und tote Zielzellen zu entfernen. Im Anschluss wurde pro Well 100 µl DMEM-Medium sowie 20 µl *Celltiter 96® AQueous One Solution* Substrat hinzugegeben. Die Platten wurden bei 37 ° C inkubiert. Lebende Zellen setzten das Substrat bei Reduktionen innerhalb der Atmungskette um, sodass die Farbe von gelb nach braun umschlug. Die Messung der Absorption erfolgte mittels des *Sunrise Microplate Reader* von Tecan Plate und der Software Magellan bei einer Absorptionslänge von 492 nm.

Die Berechnung der Viabilität in Prozent erfolgte anhand folgender Formel:

$$Viabilität = \frac{OD\ Tumorzellen\ behandelt - OD\ Kontrolle}{OD\ Tumorzellen\ unbehandelt} \times 100$$

3.2.12 Durchflusszytometrische-Analyse

Mittels Durchflusszytometrie werden Größe, Granularität und Fluoreszenz von Zellen bestimmt. Dies ermöglicht die Charakterisierung von Zellpopulationen beispielsweise mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern.

Die Zellen wurden in Röhrchen für die Durchflusszytometrie überführt. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit dem entsprechenden Antikörper in 100 Öl MACS-Puffer gemäß den Anweisungen des Herstellers gefärbt. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen erneut gewaschen und in 200 - 400 Öl MACS-Puffer resuspendiert, gemäß dem Protokoll des Herstellers. Die Proben wurden mittels des *MACS Quant Analyzer 10* analysiert und mit dem dazugehörigen Programm, *MACS Quant Software*, ausgewertet.

Tabelle 9: Inkubationsanweisung Antikörper FACS

Antikörper	Inkubationszeit	Menge	Temperatur
EGFR-PE	30 min	2 Öl	4 �C
CD44v6-PE/Vio	30 min	2 Öl	4 �C
HER2/neu-APC/Vio	30 min	10 Öl	4 �C
CD326-APC/Vio	30 min	2 Öl	4 �C
CD34-PE	30 min	10 Öl	4 �C

4 Ergebnisse

4.1 Testung von Cetuximab CAR T-Zellen bei varianter EGFR-Expression

Als geeignetes Zielantigen für die potenzielle Behandlung von Plattenepithelkarzinomen zeigt sich EGFR, mit Expressionsraten von bis zu 90% auf Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches [56]. Um die Eignung des Zielantigens weitergehend zu untersuchen, wurde auf verschiedenen Plattenepithelkarzinomlinien unterschiedlicher Entitäten (HNSCC: Cal27, UM10B, UM14C, UT24A, UM11B, UM17A; Ösophaguskarzinom: Kyse510; Ovarialkarzinom: A2780, TOV21G, Hey; Urothelkarzinom: RT112) die Expression von EGFR untersucht. Hierzu wurden die Zellen per FACS mit dem Antikörper EGFR-PE analysiert. Hierbei zeigte sich eine variable Expression in den unterschiedlichen Zelllinien. Die Ovarialkarzinomzelllinie A2780 exprimiert EGFR fast nicht, RT112, Kyse510 und TOV21G zeigten eine geringe Expression. Cal27 und UM17A exprimierten EGFR moderat während bei den restlichen Zelllinien eine hohe Expression vorlag. Im Verlauf wurden alle diese Zelllinien jeweils mit CAR T-Zellen, die gegen EGFR gerichtet waren, in unterschiedlichen Tumor- zu CAR T-Zell Verhältnissen inkubiert und die jeweilige Zytotoxizität für die Tumorzellen gemessen. Hierbei wurde in der Auswertung Zytotoxizität im Verhältnis zur EGFR-Expression der jeweiligen Zelllinien beachtet (siehe Abbildungen 3 und 4).

4.1.1 Aufreinigung von CAR T-Zellen

Nach der Transduktion von naiven T-Zellen exprimieren diese 72 h später den jeweiligen CAR auf ihrer Oberfläche. Um im Weiteren nur mit einer möglichst hohen positiv-transduzierten Fraktion von T-Zellen zu arbeiten, bedarf es einer Aufreinigung. Die genutzten CARs tragen alle das Oberflächenmolekül CD34 in ihrer *hinge* Region, während naive T-Zellen dieses Oberflächenmerkmal nicht besitzen. Daher kann CD34 als positiv-Marker für transduzierte T-Zellen dienen. Zur Selektion und Aufreinigung der T-Zellen wurde das MACS System mit dem CD34 MicroBead Kit genutzt. Die Transduktionseffizienz variiert je nach transduziertem CAR: bei CD19 lag sie bei 47 %

($\pm 2\%$) und für EGFR bei $42\% (\pm 1\%)$. Im Durchfluss der Reinigungsschritte ging eine Fraktion von positiv-transduzierten CAR T-Zellen verloren, dies variierte zwischen 10-13%. Nach Aufreinigung wurde je nach CAR mit einer positiven Fraktion von 97-98% von CAR T-Zellen weitergearbeitet (siehe Abbildung 2).

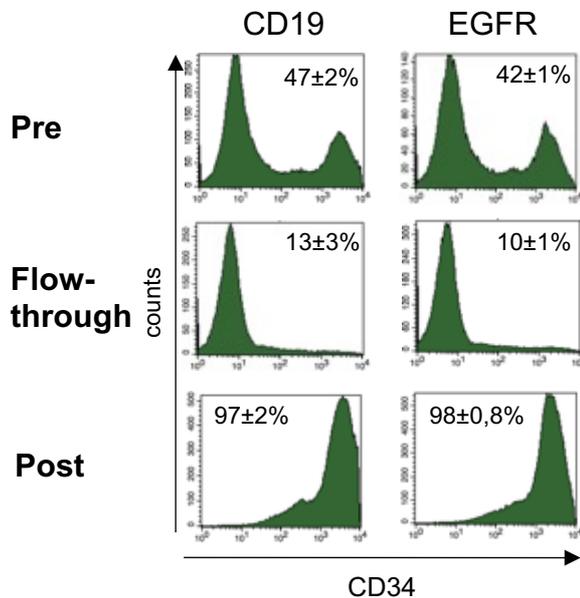


Abbildung 2: **Aufreinigung von CAR positiven T-Zellen.** Durchflusszytometrische Analyse der Aufreinigungsschritte des MACS Systems. Die transduzierten T-Zellen wurden vor der Nutzung des MACS Systems (pre), sowie der Durchfluss (flow-through) und nach MACS (post) per Eluat gesammelt. Alle Konstrukte wurden mit CD34 Microbeads getrennt. Die CAR Expression in Prozent (x-Achse) ist gegen die relative gezählte Zellzahl (y-Achse) aufgetragen. Die Zahlen je oben im Diagramm geben den Mittelwert der CAR positiven T-Zellen sowie die Standardabweichung in Prozent an.

4.1.2 Zytotoxizitätsassay

Die Zytotoxizitätsassays wurden analog zur Expression der Zielantigene mit einer IMDM Kontrolle durchgeführt. Für jedes Experiment wurden als Negativkontrollen untransduzierte T-Zellen genutzt (*no virus*) sowie CD19-CARs, da T-Zellen dieses Antigen nicht exprimieren. Insgesamt zeigt sich bei allen Zelllinien und Bedingungen die stärkste Lyse bei einem Verhältnis von 3:1 von Effektor zu Zielzellen. Durch ein niedrigeres Verhältnis flachen die Kurven im Verlauf ab.

Zur Etablierung des Cetuximab CAR Konstruktes wurde dieses zunächst auf Zelllinien mit verschiedener Antigenexpression von EGFR getestet. Hierbei zeigt sich unabhängig von den Entitäten der Tumorzellen eine Lyse bereits bei niedriger Antigendichte von EGFR, beispielsweise bei Cal27, RT112 oder Kyse510. Bei A2780 besteht nur eine minimale Expression, dies korreliert mit einer nur sehr schwach ausgeprägten Zytotoxizität durch EGFR-CAR T-Zellen von etwa 10 %. Eine höhere Antigendichte weist die Ovarialkarzinomlinie Hey auf, hier zeigt sich eine starke Lyse von über 90 % durch den EGFR-CAR (siehe Abbildung 3). Im Anschluss wurden die Experimente auf HNSCC Tumorzelllinien wiederholt, hier zeigte sich bereits bei geringer EGFR Expression eine Lyse von circa 60 % der Zellen durch das EGFR-CAR Konstrukt, dies wird auf ein Niveau von annähernd 100 % bei hoher Expression angehoben (siehe Abbildung 4).

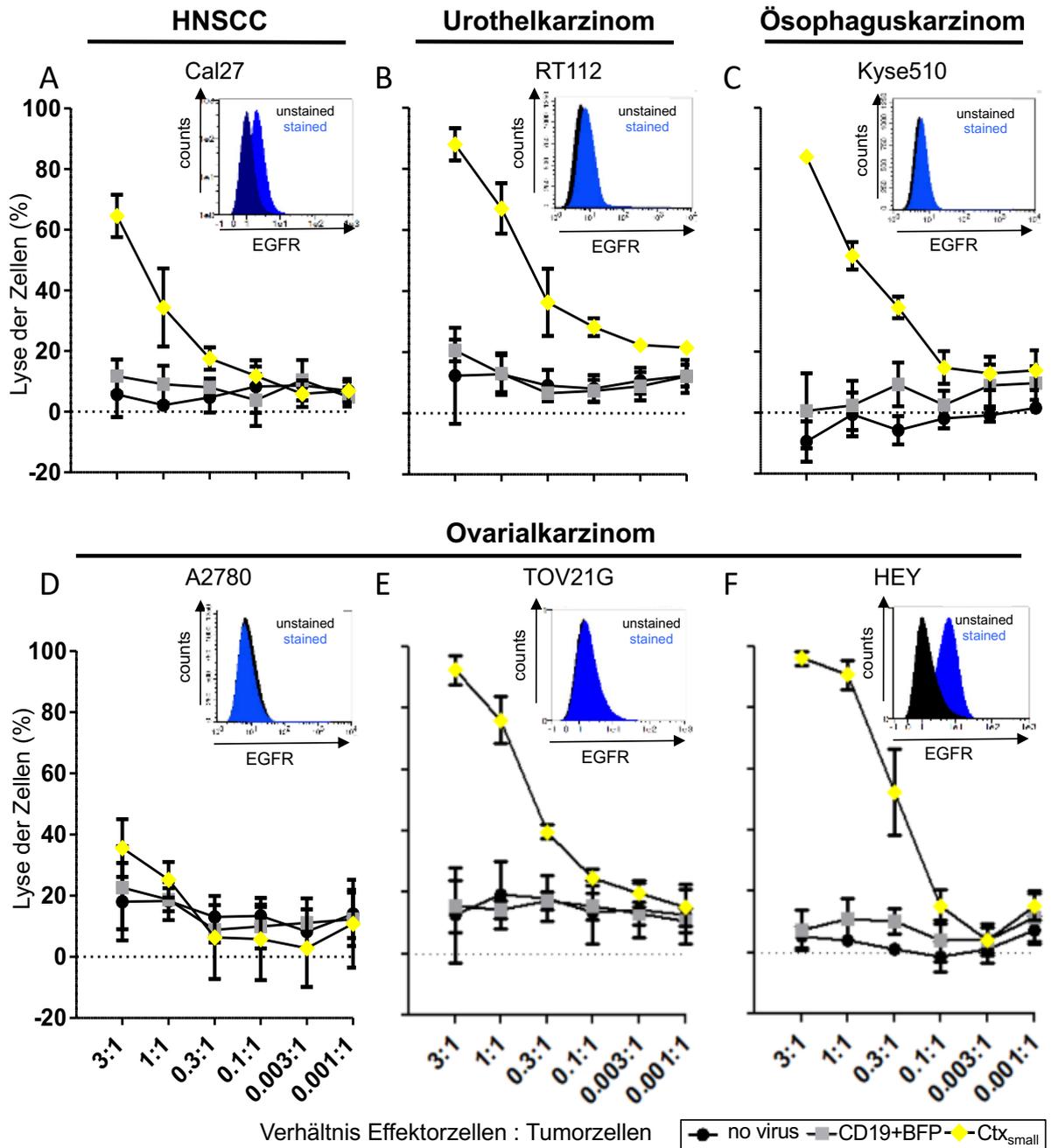


Abbildung 3: Zytotoxizität des EGFR CAR Konstruktes Ctx_{small} auf Zelllinien verschiedener Entitäten. Die Zielantigenexpression ist als Histogramm dargestellt: die Antigenexpression (x-Achse) ist gegen die relative gezählte Zellzahl (y-Achse) aufgetragen. Die schwarzen Balken zeigen die ungefärbten Proben, die blauen Balken die mittels Antikörper gefärbten Proben. In den Diagrammen ist die Lyse der Zellen in Prozent (y-Achse) gegen die verschiedenen Effektor:Tumorzellen Verhältnisse (3:1 – 0,01:1) (x-Achse) aufgetragen. Die Negativkontrollen sind untransduzierte, naive T-Zellen (schwarz) sowie CD19-transduzierte T-Zellen (hellgrau). Die Cetuximab *small* CAR T-Zellen in gelb mit einer Raute. Die entsprechende Legende ist unter der Gesamtabbildung dargestellt. (n=4)

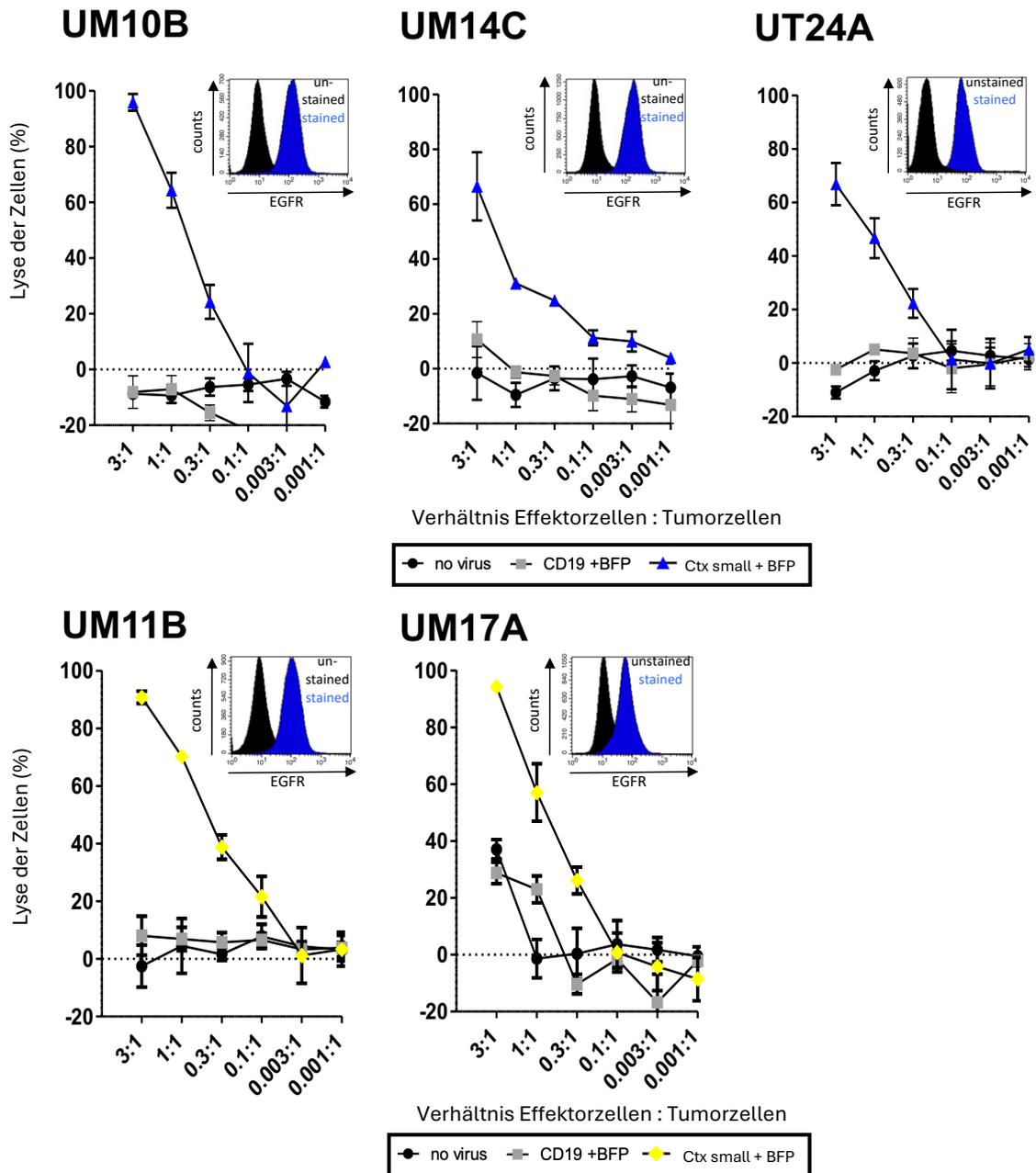


Abbildung 4: Zytotoxizität des EGFR CAR Konstruktes Ctx_{small} auf HNSCC (UM10B, UM14C, UT24A, UM11B, UM17A). Die Zielantigenexpression ist als Histogramm dargestellt: die Antigenexpression (x-Achse) ist gegen die relative gezählte Zellzahl (y-Achse) aufgetragen. Die schwarzen Balken zeigen die ungefärbten Proben, die blauen Balken die mittels Antikörper gefärbten Proben. In den Diagrammen ist die Lyse der Zellen in Prozent (y-Achse) gegen die verschiedenen Effektor:Tumorzellen Verhältnisse (3:1 – 0,01:1) (x-Achse) aufgetragen. Die Negativkontrollen sind untransduzierte, naive T-Zellen (schwarz) sowie CD19-transduzierte T-Zellen (hellgrau). Die Cetuximab *small* CAR T-Zellen sind im oberen Teil in blau und im unteren Teil in gelb mit einer Raute dargestellt. Die entsprechende Legende ist unter der Gesamtabbildung dargestellt (n=4)

4.2 Epigenetische Einflüsse auf die CAR Toxizität

Epigenetische Einflüsse könnten einen Einfluss auf die CAR T-Zell Aktivität haben. Um dies zu untersuchen, wurden verschiedene HNSCC-Zelllinien mit den epigenetisch wirksamen Substanzen Romidepsin und Decitabine vorinkubiert, um danach einem Zytotoxizität analog zu den vorherigen Versuchen zugeführt zu werden. Romidepsin ist ein Inhibitor der Histon-Deacetylasen (HDACi) und verhindert somit eine Modifikation von Histonen in Form einer Deacetylierung. Dadurch kommt es zu epigenetischen Veränderungen, welche sich potenziell positiv auf eine Immuntherapie auswirken können. Decitabine ist ein DNA-Methyltransferase Inhibitor (DNMTi) und reduziert die Methylierungsrate von Genen. Für beide Substanzen war vor der Durchführung der Hauptversuche eine Dosisfindung für HNSCC erforderlich.

4.2.1 Dosisfindung Romidepsin

Zur Dosisfindung der Behandlung mit Romidepsin wurden die Zellen ausgesät und jeweils mit 0,2, 0,3, 0,5, 0,75, 1 und 3 nM Romidepsin einmalig behandelt. Nach 72 h wurde mittels MTT Assay die Viabilität der Zellen und der IC50-Wert bestimmt (n=3). Abbildung 5 zeigt, dass mit zunehmender Konzentration von Romidepsin die Lyse der Zellen zunimmt. Ebenfalls ersichtlich ist die Konzentration, bei der 50 % der Zellen abgetötet werden, die IC50. Hierbei fanden sich drei Zelllinien mit niedrigen IC-50 Werten: UM11B, UM14C, UT24A, sodass diese Zelllinien geclustert wurden. Ebenfalls eine Gruppe bildeten die Zelllinien UT33, UM74A und UM104, die etwas höhere IC50 Werte aufwiesen (siehe Abbildung 5). In Anlehnung an Vorversuche des kooperierenden Labors der Urologie wurde die Behandlungsdosis auf den IC50-Wert der Zelllinien festgesetzt. Somit wurden die Linien UM11B, UM14C und UT24A mit 0,3 nM Romidepsin behandelt und die Linien UT33, UM74A und UM104 mit 1 nM Romidepsin (siehe Tabelle 14).

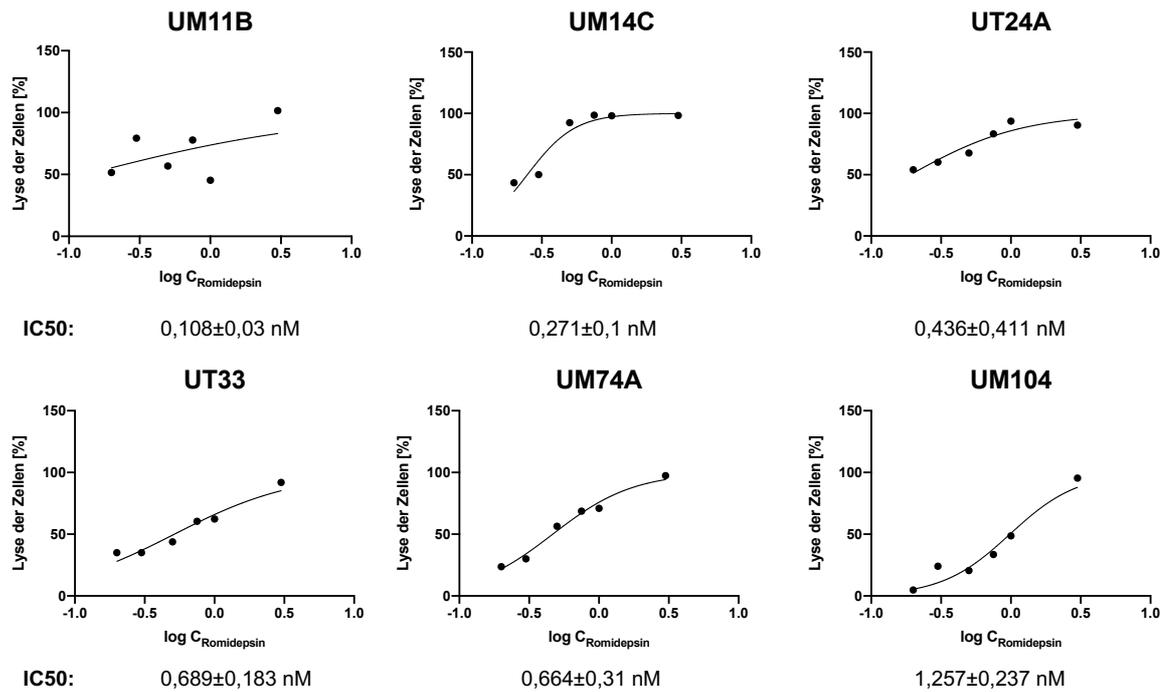


Abbildung 5: **Dosiswirkungskurve von HNSCC Zelllinien nach Behandlung mit Romidepsin.** Die Lyse der Zellen in Prozent (y-Achse) ist gegen die logarithmische Konzentration von Romidepsin (x-Achse) aufgetragen. Die Zahlen unterhalb des jeweiligen Diagramms geben den Mittelwert des IC50 Wert in nM an, sowie die Standardabweichung (n=3).

Tabelle 10: **Behandlungsschema Romidepsin**

0,3 nM	1 nM
UM11B	UT33
UM14C	UM74A
UT24A	UM104

4.2.2 Dosisfindung Decitabine

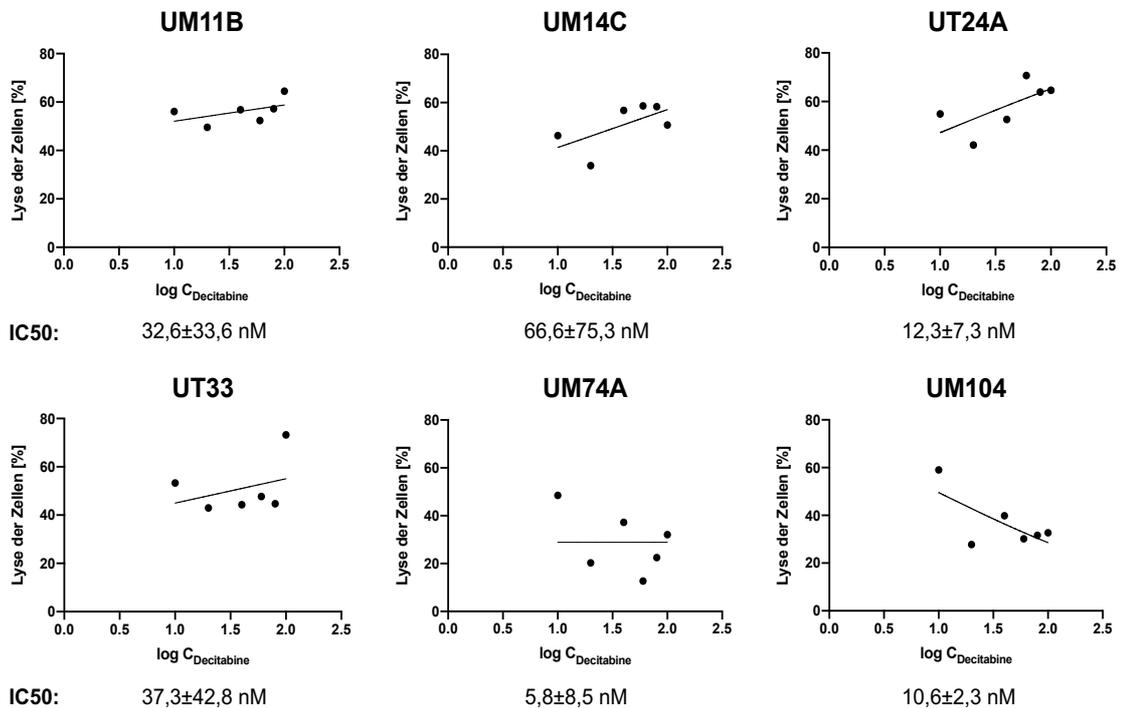


Abbildung 6: **Dosiswirkungskurve von HNSCC Zelllinien nach Behandlung mit Decitabine.** Die Lyse der Zellen in Prozent (y-Achse) ist gegen die logarithmische Konzentration von Decitabine (x-Achse) aufgetragen. Die Zahlen unterhalb des jeweiligen Diagramms geben den Mittelwert des IC50 Wert in nM an, sowie die Standardabweichung (n=3).

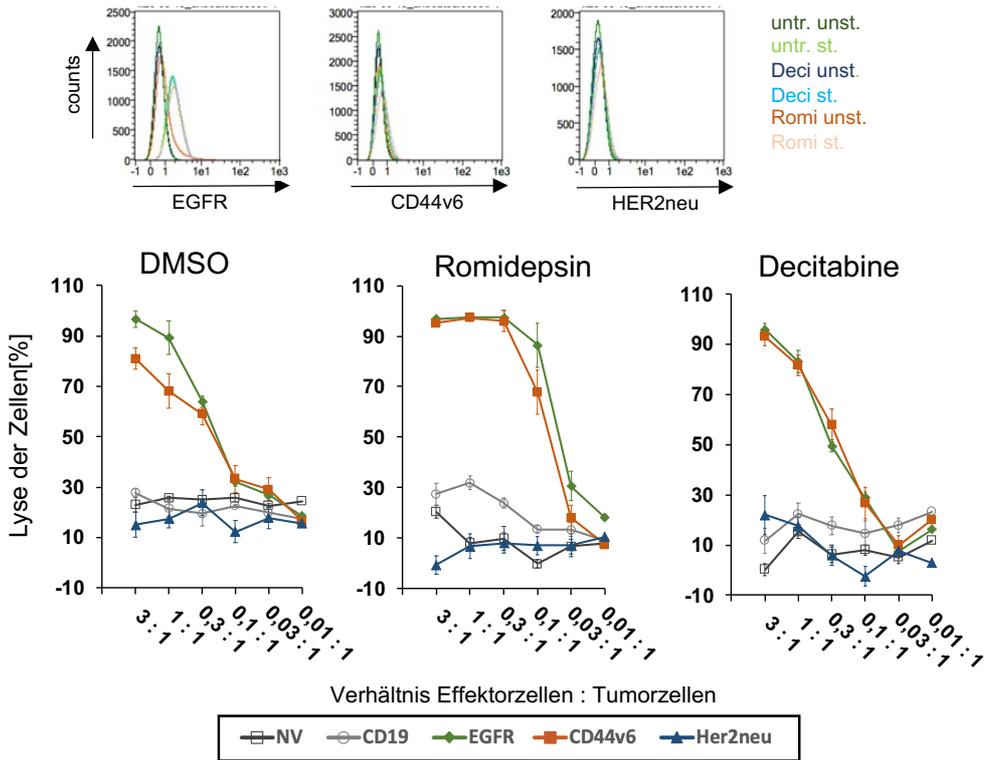
Für die Dosisfindung zur Behandlung mit Decitabine wurde in der Literatur nach bereits verwendeten und erprobten Dosen gesucht, da hierfür keine Vorversuche aus dem kooperierendem Labor der Urologie für die HNSCC Tumorzelllinien vorlagen [56]. Die Zelllinien wurden jeweils mit einer Dosis von 10, 20, 40, 60, 80 und 100 nM Decitabine behandelt und 72 h später wurde mittels MTT Assay die Viabilität sowie die IC50 bestimmt (n=3). In Abbildung 6 sind die Dosiswirkungskurven dargestellt. Es zeigten sich innerhalb der Zelllinien sowie an den unterschiedlichen Messtagen starke Unterschiede bezüglich des IC50. Aufgrund der starken Schwankungen und hohen Zytotoxizität der Substanz Decitabine, ist dieses Experiment ungeeignet, um Rückschlüsse auf die Behandlungsdosis zu ziehen. Um eine effiziente Dosis festzusetzen, wurde daher nach Austausch mit dem kooperierenden Labor des Instituts für Pharmazeutische und Medizinische Chemie die Behandlungsdosis für Decitabine auf 2 nM gesetzt, was zelllinienübergreifend einem gemessenen IC5-20 entspricht. Bei

Behandlungen mit einer Dosis äquivalent zum IC50 Wert, waren die Zellen nicht mehr anheftbar und somit für diese Experiment ungeeignet.

4.2.3 Zytotoxizitätsassay

Nach Vorinkubation der Zellen mit Romidepsin oder Decitabine (siehe Material und Methoden) wurden die Zytotoxizitätsassays analog zu den unter 4.1.2 beschriebenen Versuchen durchgeführt. Als Kontrolle wurde ein Versuch mit DMSO durchgeführt. Außerdem wurden neben dem gegen EGFR-Rezeptor gerichteten CAR (entsprechend dem Ctx_{small} CAR) weitere im Labor bereits etablierte CARs gegen CD44v6 und HER2neu verwendet. Hierdurch sollte die Effizienz epigenetischer Vorbehandlung bei CAR T-Zelltherapie mit varianten Zielantigenen untersucht werden. Für jedes Experiment wurden als Negativkontrollen untransduzierte T-Zellen genutzt (*no virus*) sowie CD19-CARs, da T-Zellen dieses Antigen nicht exprimieren. Insgesamt zeigt sich bei allen Zelllinien und Bedingungen die stärkste Lyse bei dem höchsten CAR T-Zell-Verhältnis, sprich bei einem Verhältnis von 3:1 von Effektor zu Zielzellen. Im Verlauf der Verdünnungsschritte flachen die Kurven ab.

UM74A



UM14C

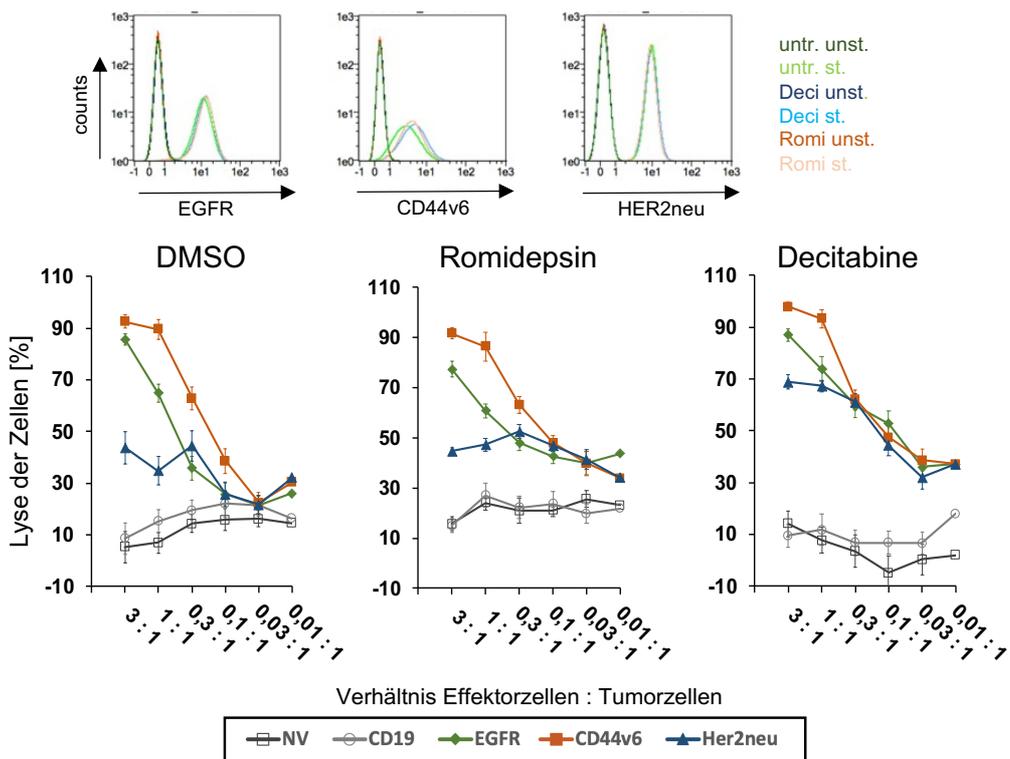
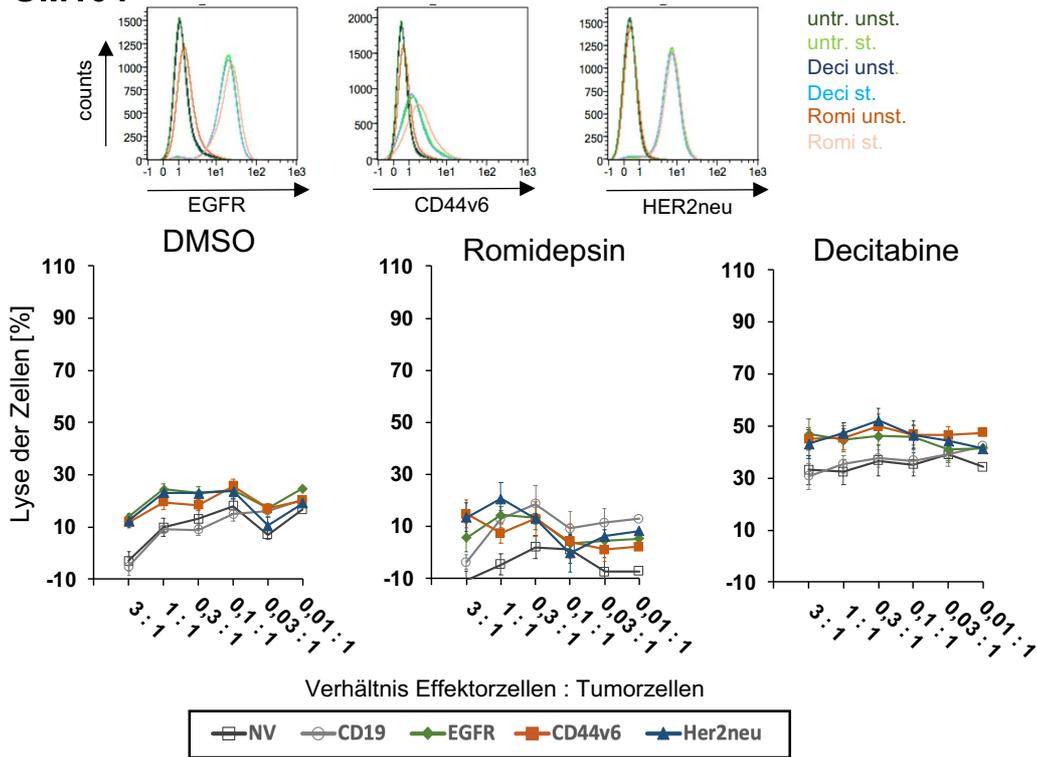


Abbildung 7: Zytotoxizität verschiedener CAR Konstrukte auf den HNSCC Zelllinien UM74A und UM14C. Die Zielantigenexpression vor und nach Behandlung mit Romidepsin oder Decitabine ist als Histogramm dargestellt: die Antigenexpression (x-Achse) ist gegen die relative gezählte Zellzahl (y-Achse)

aufgetragen. Die dunklen Linien zeigen die ungefärbten Proben, die hellen Linien die mittels Antikörper gefärbten Proben. Die grünen Linien zeigen die unbehandelten Zellen, die blauen Linien die mit Decitabine behandelten Zellen und die roten Linien die mit Romidepsin behandelten Zellen. In den Diagrammen ist die Lyse der Zellen in Prozent (y-Achse) gegen die verschiedenen Effektor:Tumorzellen Verhältnisse (3:1 – 0,01:1) (x-Achse) aufgetragen. Pro Zelllinie ist die Kontrolle mit DMSO sowie die Zellen nach Behandlung mit Romidepsin und Decitabine dargestellt. Die Negativkontrollen sind untransduzierte, naive T-Zellen (dunkelgrau) sowie CD19-transduzierte T-Zellen (hellgrau). Die unterschiedlichen CAR T-Zellen sind wie folgt markiert: EGFR CAR T-Zellen in grün mit einer Raute, CD44v6 CAR T-Zellen in rot mit einem Viereck, HER2/neu CAR T-Zellen in blau mit einem Dreieck. Die entsprechende Legende ist unter der Gesamtabbildung dargestellt. (n=4)

In Abbildung 7 sind die Zytotoxizitätsassay für die Zelllinien UM74A und UM14C dargestellt. Die Histogramme zeigen die Expression der Zielantigene EGFR, CD44v6 und HER2/neu vor Behandlung sowie nach Behandlung mit Romidepsin oder Decitabine. Hierbei zeigen die grünen Linien die unbehandelten Zellen, die blaue Linien Zellen nach Decitabine Behandlung und die roten Linien Zellen nach Romidepsin Behandlung. Die dunklen Linien sind die ungefärbten Kontrollen, die hellen Linien die Antikörper-gefärbten Proben. Die Behandlungen mit Decitabine oder Romidepsin bei beiden Zelllinien zeigen keine Veränderung der Antigendichte aller Zielantigene. So bleibt die Antigendichte aller Zielantigene bei UM74A für alle drei Zielantigene mit und ohne Vorbehandlung auf einem sehr niedrigen Niveau. UM14C zeigt eine hohe Expression von EGFR und HER2/neu sowie eine niedrigere Expression von CD44v6. Dies ändert sich für alle drei Antigene nach Vorbehandlung nicht. Bei Linie UM74A ist im Zytotoxizitätsassay erkennbar, dass die Lyse durch den CD44v6 CAR nach Behandlung mit Romidepsin in höheren Maße, in etwas geringeren Maße aber auch bei der Behandlung mit Decitabine ansteigt. Eine vergleichbare Steigerung der Tumorzelllyse ist bei Koinkubation EGFR CAR T-Zellen nach Romidepsin Behandlung erkennbar, jedoch nicht nach der Behandlung mit Decitabine. Einen ähnlichen Trend zeigt sich bei UM14C: hier flacht die grüne Kurve der Tumorzelllyse durch EGFR CAR T-Zellen nach Behandlung mit Romidepsin langsamer ab, sodass noch bei einer Verdünnung von 0,3:1 eine Lyse von 50 % erkennbar ist. Nach Decitabine Behandlung steigt die Lyse durch den HER2/neu CAR T-Zellen auf bis zu 70 % an. Außerdem ist auch hier eine flachere Kurve der Tumorzelllyse durch EGFR CAR T-Zellen erkennbar (siehe Abbildung 7).

UM104



UT33

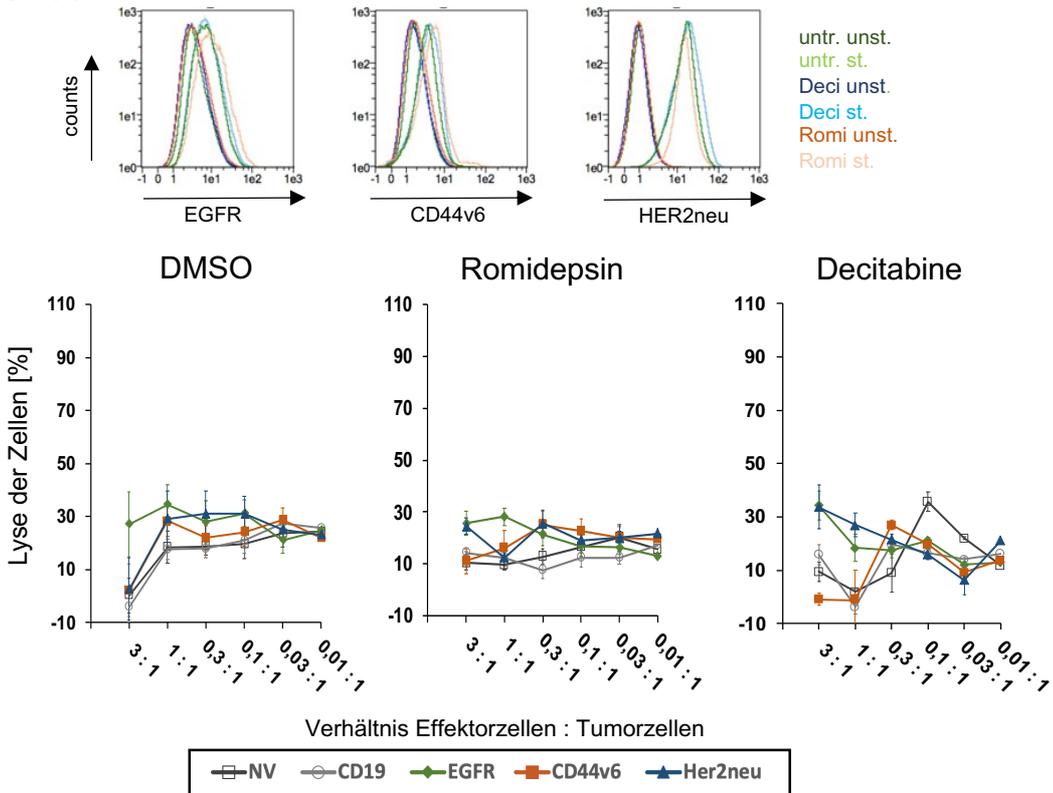
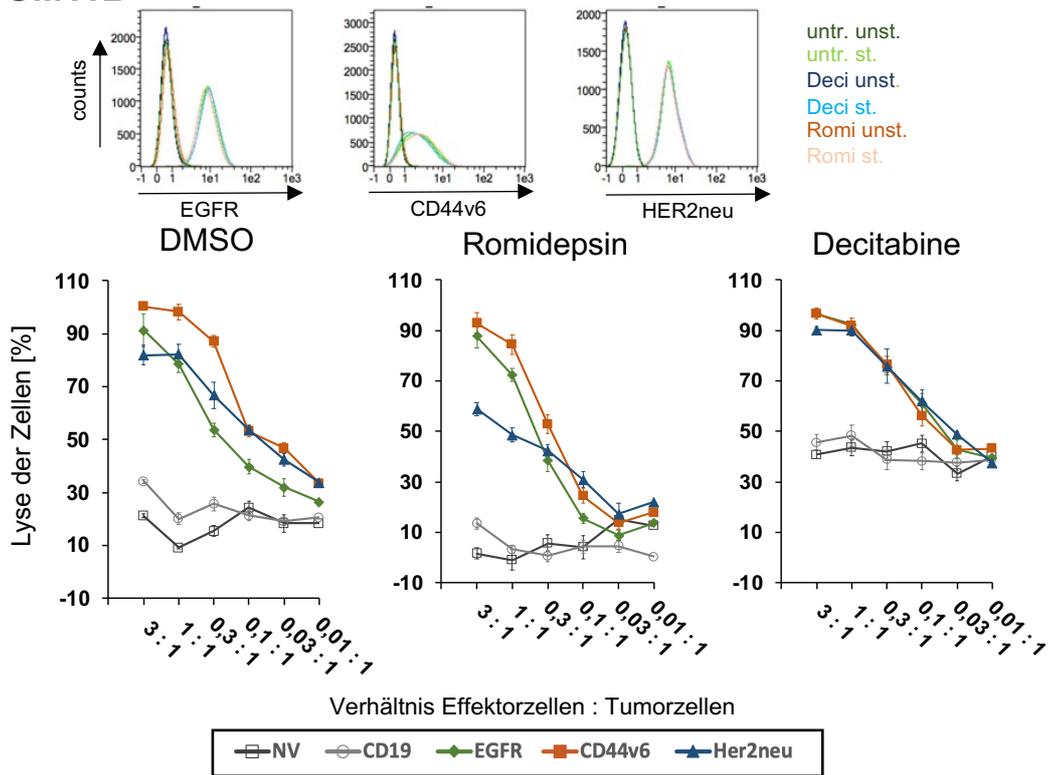


Abbildung 8: Zytotoxizität verschiedener CAR Konstrukte auf den HNSCC Zelllinien UM104 und UT33. Die Zielantigenexpression vor und nach Behandlung mit Romidepsin oder Decitabine ist als Histogramm dargestellt: die Antigenexpression (x-Achse) ist gegen die relative gezählte Zellzahl (y-Achse)

aufgetragen. Die dunklen Linien zeigen die ungefärbten Proben, die hellen Linien die mittels Antikörper gefärbten Proben. Die grünen Linien zeigen die unbehandelten Zellen, die blauen Linien die mit Decitabine behandelten Zellen und die roten Linien die mit Romidepsin behandelten Zellen. In den Diagrammen ist die Lyse der Zellen in Prozent (y-Achse) gegen die verschiedenen Effektor:Tumorzellen Verhältnisse (3:1 – 0,01:1) (x-Achse) aufgetragen. Pro Zelllinie ist die Kontrolle mit DMSO sowie die Zellen nach Behandlung mit Romidepsin und Decitabine dargestellt. Die Negativkontrollen sind untransduzierte, naive T-Zellen (dunkelgrau) sowie CD19-transduzierte T-Zellen (hellgrau). Die unterschiedlichen CAR T-Zellen sind wie folgt markiert: EGFR in grün mit einer Raute, CD44v6 in rot mit einem Viereck, HER2/neu in blau mit einem Dreieck. Die entsprechende Legende ist unter der Gesamtabbildung dargestellt. (n=4)

Bei den Linien UM104 und UT33 zeigen sich teils hohe Antigendichten auf den Zellen vor sowie nach der Behandlung. So wird HER2/neu auf beiden Zelllinien stark exprimiert, EGFR wird ebenfalls stark auf UM104 exprimiert. Ebenfalls zeigen beide Diagramme eine niedrige Expression von CD44v6. Eine unterschiedliche Expression zeigt sich bei UM104 nach Behandlung mit Romidepsin: das Zielantigen CD44v6 zeigt eine geringgradig höhere Antigendichte. Ebenso ist eine leicht erhöhte Antigendichte des Antigens CD44v6 bei UT33 nach Behandlung mit Romidepsin erkennbar. Trotz der varianten Antigendichten kommt es in den Zytotoxizitätsassays jedoch zu keiner Lyse der Tumorzellen durch die spezifischen CARs für EGFR, CD44v6 oder Her2neu im Vergleich zu den Kontrollen. Auch die Vorbehandlung mit Romidepsin und Decitabine hat keinerlei zusätzlichen Effekt. Die Kurven der Zytotoxizitätsassays für die Koinkubation der Tumorzellen mit CAR T-Zell gegen EGFR, CD44v6 und HER2/neu mit und ohne epigenetische Vorbehandlung verlaufen parallel zu den Negativ-Kontrollen (siehe Abbildung 8).

UM11B



UT24A

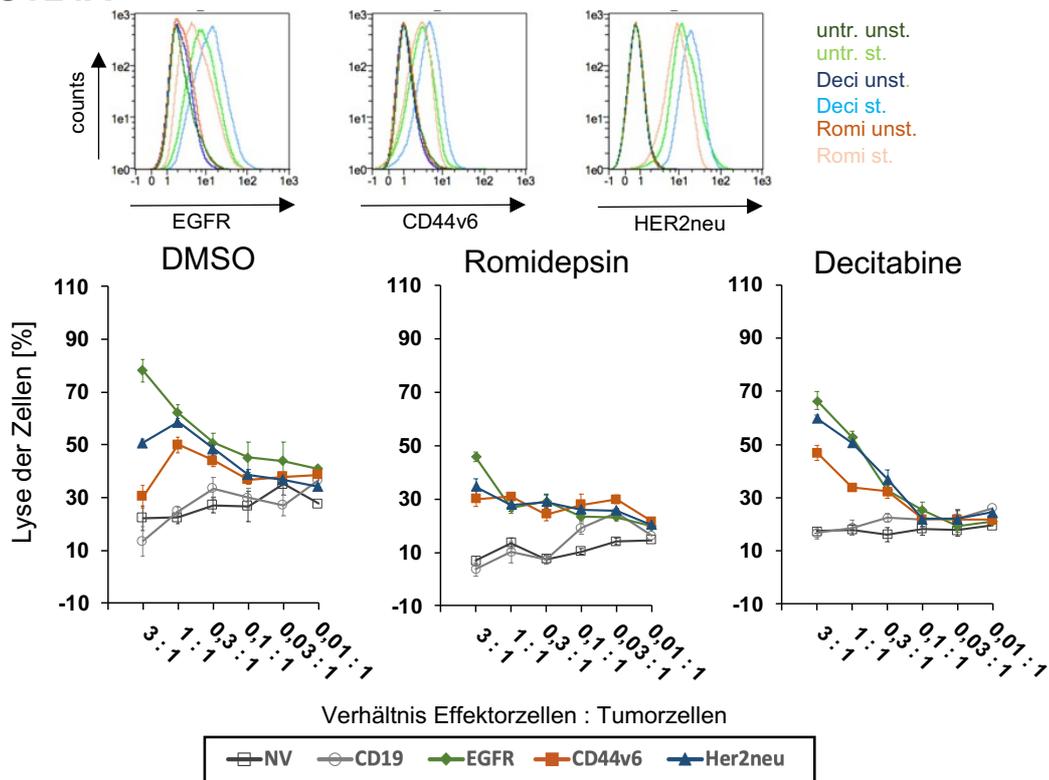


Abbildung 9: Zytotoxizität verschiedener CAR Konstrukte auf den Zelllinien HNSCC UM11B und UT24A. Die Zielantigenexpression vor und nach Behandlung mit Romidepsin oder Decitabine ist als Histogramm dargestellt: die Antigenexpression (x-Achse) ist gegen die relative gezählte Zellzahl (y-Achse)

aufgetragen. Die dunklen Linien zeigen die ungefärbten Proben, die hellen Linien die mittels Antikörper gefärbten Proben. Die grünen Linien zeigen die unbehandelten Zellen, die blauen Linien die mit Decitabine behandelten Zellen und die roten Linien die mit Romidepsin behandelten Zellen. In den Diagrammen ist die Lyse der Zellen in Prozent (y-Achse) gegen die verschiedenen Effektor:Tumorzellen Verhältnisse (3:1 – 0,01:1) (x-Achse) aufgetragen. Pro Zelllinie ist die Kontrolle mit DMSO sowie die Zellen nach Behandlung mit Romidepsin und Decitabine dargestellt. Die Negativkontrollen sind untransduzierte, naive T-Zellen (dunkelgrau) sowie CD19-transduzierte T-Zellen (hellgrau). Die unterschiedlichen CAR T-Zellen sind wie folgt markiert: EGFR in grün mit einer Raute, CD44v6 in rot mit einem Viereck, HER2/neu in blau mit einem Dreieck. Die entsprechende Legende ist unter der Gesamtabbildung dargestellt. (n=4)

Ein anderer Trend ist bei den Zelllinien UM11B und UT24A erkennbar. UM11B zeigt die gleiche Antigenexpression vor und nach Behandlung: eine mittlere Expression von EGFR sowie HER2/neu und eine niedrige Antigendichte von CD44v6. Bei UT24A steigt nach Decitabine Behandlung die Dichte von EGFR und HER2/neu leicht an. In der DMSO Kontrolle von UT24A zeigen die Tumorzellen nach Inkubation mit EGFR - oder HER2/neu CAR T-Zellen eine mittlere (HER2/neu: 50% Lyse bei 3:1 Effektor:Tumorzell Verhältnis) bis hohe (EGFR: 80% Lyse bei 3:1 Effektor:Tumorzell Verhältnis) Lyse, nach Behandlung mit Romidepsin wird diese bei beiden Antigenen abgeschwächt (HER2/neu: 30% Lyse bei 3:1 Effektor:Tumorzell Verhältnis; EGFR: 50% Lyse bei 3:1 Effektor:Tumorzell Verhältnis). CD44v6 CAR T-Zellen lysieren UT24A-Tumorzellen weniger stark und es kommt durch Romidepsin- oder Decitabine Behandlung zu keiner wesentlichen Veränderung der Zytotoxizität. Bei der HNSCC-Tumorzelllinien UM11B kommt es durch alle drei CAR T-Zellen in der DMSO-Kontrolle zu einer guten Tumorzelllyse (CD44v6: 100% Lyse bei 3:1 Effektor:Tumorzell Verhältnis; HER2/neu: 80% Lyse bei 3:1 Effektor:Tumorzell Verhältnis; EGFR: 90% Lyse bei 3:1 Effektor:Tumorzell Verhältnis). Bei Linie UM11B kommt es nach Romidepsin Behandlung zu einer niedrigeren Lyse durch HER2/neu CAR T-Zellen auf ein nur noch mittleres Niveau von 60 % bei 3:1 Effektor:Tumorzell Verhältnis. Nach Behandlung mit Decitabine nimmt das Grundniveau der Zytotoxizität bei UM11B zu, welches sich in erhöhten Werten für die Negativkontrollen widerspiegelt, Dies spricht für eine grundsätzliche Zellschädigung durch Decitabine (siehe Abbildung 9).

4.3 Effekt von Cisplatin-Resistenz auf die Zytotoxizität

Cisplatin ist einer der wichtigsten Eckpfeiler einer Chemotherapie bei vielen Entitäten von Plattenepithelkarzinomen. Es ist ebenfalls aufgrund einer hohen Prävalenz von Cisplatin-resistenten Tumoren des Kopf- und Halsbereiches von großem Interesse, die Auswirkungen auf die Zytotoxizität einer CAR T-Zell Therapie zu beobachten, da hiermit bei Versagen einer herkömmlichen Chemotherapie mitunter eine neue potenzielle Therapieoption etabliert werden könnte. Die für diese Experimente genutzten Zelllinien wurden im kooperierenden Labor des Instituts für Pharmazeutische und Medizinische Chemie über einen langen Zeitraum intermittierend Cisplatin ausgesetzt, bis sie eine Resistenz der Substanz gegenüber erworben haben. Da dieser Aspekt bei der Behandlung nahezu aller Plattenepithelkarzinome eine Rolle spielt, wurden Zelllinien verschiedener Entitäten von Plattenepithelkarzinomen untersucht: Urothelkarzinom, Ovarialkarzinom sowie Tumore des HNO-Bereiches inklusive einer Linie eines Ösophagus Karzinoms.

4.3.1 Expression der Zielantigene

Alle Zelllinien wurden in einer Cisplatin-sensitiven und resistenten Variante zur Verfügung gestellt. Für alle Zelllinien-Pärchen wurde analog zu den vorherigen Experimenten die Expression der Zielantigene EGFR, CD44v6 und Her2neu durch Fluoreszenzzytometrie dargestellt. Anschließend wurden eine Zytotoxizitätsassays nach Koinkubation der Tumorzellen mit gegen EGFR, CD44v6 oder Her2neu gerichteten CAR T-Zellen analysiert.

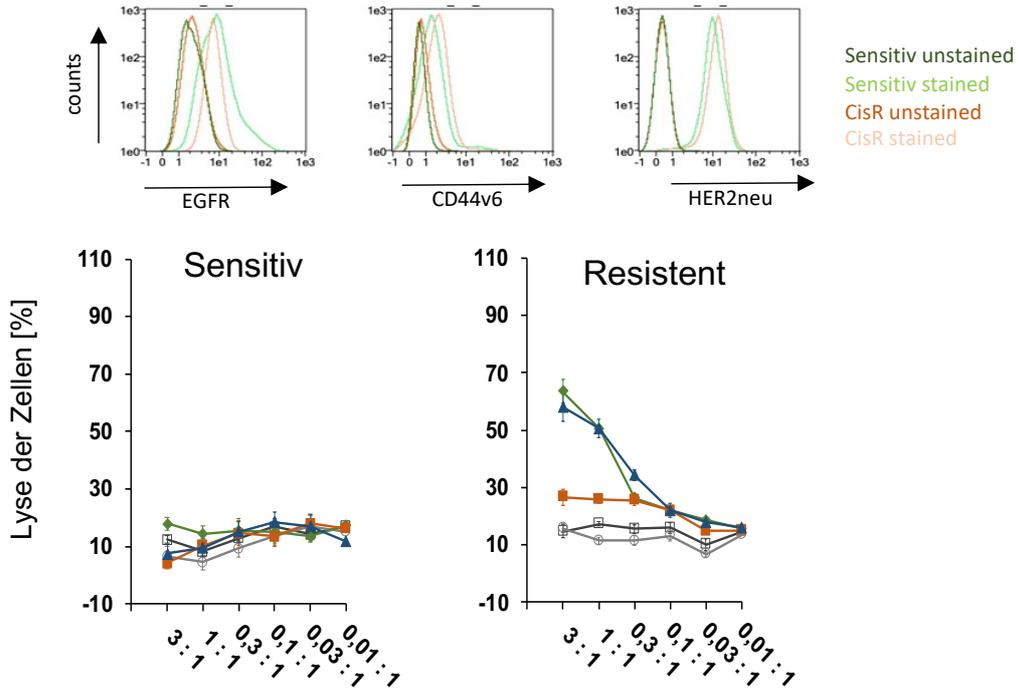
4.3.2 Zytotoxizitätsassay

Als Kontrolle für die Cisplatin-resistenten Zelllinien wurde die jeweilige Cisplatin-sensitive Zelllinie genutzt. Für jedes Experiment wurden als Negativkontrollen untransduzierte T-Zellen genutzt (*no virus*) sowie CD19-CAR T-Zellen, da die Zielzellen aus soliden Karzinomen dieses Antigen nicht exprimieren. Insgesamt wurden so 10 Pärchen aus den folgenden Zelllinien untersucht: A2780, RT112, Cal27, Kyse510, J82,

Hey, CAO3, OV90, TOV21G und TOV112D. Die Histogramme spiegeln die Expression der Antigene wider. Die grünen Linien zeigen die sensitive, die roten die resistente Variante. Die jeweils dunklere Linie zeigt die ungefärbte Kontrolle und die helle Linie die Antikörper-gefärbte Probe.

In Abbildung 10 sind die beiden Urothelkarzinomlinien J82 und RT112 gezeigt. J82 zeigt bereits als sensitive Variante eine hohe Expression von EGFR und HER2/neu, durch die Resistenz kommt es ausschließlich zu einer leichten Zunahme der Antigendichte von CD44v6. J82 wird in der sensitiven Variante von keiner der drei CAR T-Zellen lysiert. Es zeigt sich eine deutliche Zunahme der Zytotoxizität von EGFR und HER2/neu bei der resistenten Zelllinie J82 (HER2/neu und EGFR: ca. 60% Lyse bei 3:1 Effektor:Tumorzell Verhältnis) und eine dezente Zunahme der Tumorzellyse bei Koinkubation mit den CD44v6 CAR T-Zellen (CD44v6: ca.30% Lyse bei 3:1 Effektor:Tumorzell Verhältnis). Bei RT112 ist erkennbar, dass die Antigenexpression bei der sensitiven und resistenten Variante annähernd gleichbleibt. Für CD44v6 zeigt sich eine niedrige, für EGFR eine mittlere und für HER2/neu eine hohe Antigendichte. Die Lyse durch die CAR T-Zellen bleibt bei allen Konstrukten auf dem gleichen, hohen Niveau bei sensitiver und resistenter Linie (CD44v6, EGFR, HER2/neu: je ca. 90% Lyse bei 3:1 Effektor:Tumorzell Verhältnis).

J82



RT112

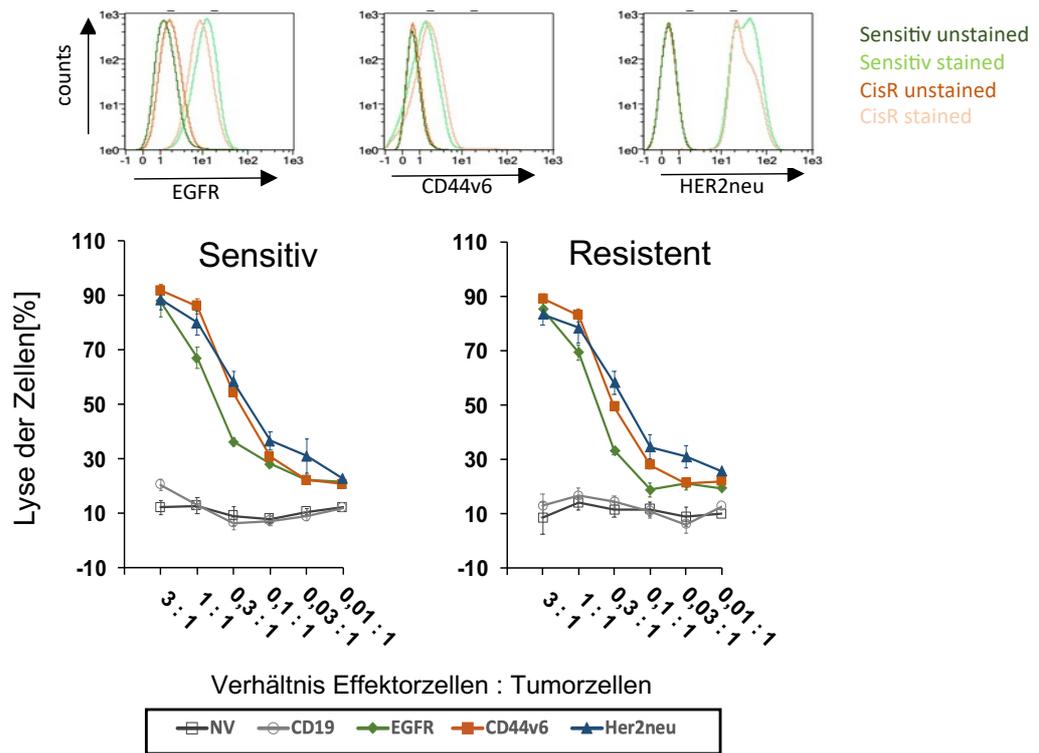
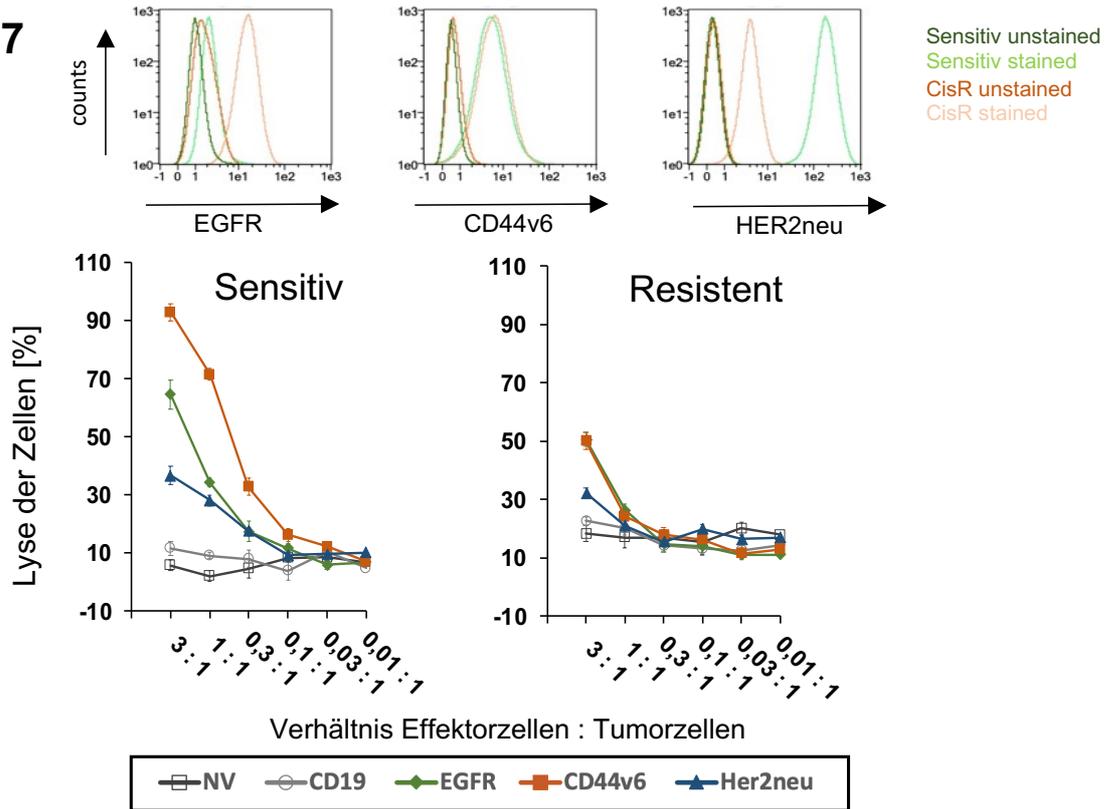


Abbildung 10: Zytotoxizität verschiedener CAR Konstrukten auf den Cisplatin-sensitiven und Cisplatin-resistenten Zelllinien J82 und RT112. Die EGFR Expression wurde mittels EGFR-PE, HER2/neu Expression mittels HER2/neu-APC-Vio und CD44v6 Expression mittels CD44v6-PE-Vio bestimmt. In den Histogrammen ist die Antigenexpression (x-Achse) gegen die relative gezählte Zellzahl (y-Achse) aufgetragen. Die dunklen Linien zeigen die ungefärbten Proben, die hellen Linien die mittels Antikörper gefärbten Proben. Die grünen Linien zeigen die Cisplatin-sensitiven Zellen, die roten Linien

die Cisplatin-resistenten Zellen. In den Graphen ist die Lyse der Zellen in Prozent (y-Achse) gegen die verschiedenen Effektor:Tumorzellen Verhältnisse (3:1 – 0,01:1) (x-Achse) aufgetragen. Pro Zelllinie ist die sensitive und die resistente Variante dargestellt. Die Negativkontrollen sind untransduzierte, naive T-Zellen (dunkelgrau) sowie CD19-transduzierte T-Zellen (hellgrau). Die unterschiedlichen CAR T-Zellen sind wie folgt markiert: EGFR in grün mit einer Raute, CD44v6 in rot mit einem Viereck, HER2/neu in blau mit einem Dreieck. Die entsprechende Legende ist unter der Gesamtabbildung dargestellt. (n=4)

Cal27 und Kyse510 bilden in dieser Versuchsreihe die Zelllinien des HNO-Bereiches ab. Bei Cal27 zeigt die sensitive Variante eine niedrige Expression von EGFR, eine mittlere von CD44v6 und eine hohe Antigendichte von HER2/neu. Die resistente Variante führt zu einer erhöhten Antigendichte von EGFR und einer Verringerung der Dichte von HER2/neu, während CD44v6 sein Niveau hält. Die sensitive Cal 27 wird durch CD44v6 CAR T-Zellen sehr gut lysiert (CD44v6: 90% Lyse bei 3:1 Effektor:Tumorzell Verhältnis), durch EGFR-CAR T-Zellen etwas weniger effizient jedoch immer noch mit ca. 70% Lyse bei 3:1 Effektor:Tumorzell Verhältnis Lyse bei 3:1. Her2/neu CAR T-Zellen lysieren Cal27 mit ca. 40% Lyse bei 3:1 Effektor:Tumorzell Verhältnis, also noch ein wenig ineffizienter. Im Zytotoxizitätsassay zeigt sich insgesamt eine Verschlechterung der Zytotoxizität bei Koinkubation mit allen CAR Konstrukten durch die Cisplatin-Resistenzentwicklung (Abbildung 11), am deutlichsten ist der Effekt jedoch bei Koinkubation mit EGFR- und CD44v6 CAR T-Zellen, bei dem es je nur noch zu einer ca. 50% Lyse bei 3:1 Effektor:Tumorzell Verhältnis kommt. Beim Pärchen Kyse510 zeigt sich eine mittlere Antigendichte von EGFR und CD44v6 sowie eine hohe Expression von HER2/neu. Nach Resistenzbildung nimmt die Antigendichte von CD44v6 und HER2/neu leicht ab. Die Lyse der Tumorzellen durch die CAR T-Zellen ist jedoch für alle CAR T-Zellvarianten (CD44v6, EGFR, HER2/neu) in beiden Zelllinien-Varianten, sensitiv und resistent, gleichbleibend auf einem hohen Niveau von bis zu 90% Lyse bei 3:1 Effektor:Tumorzell Verhältnis.

Cal27



Kyse510

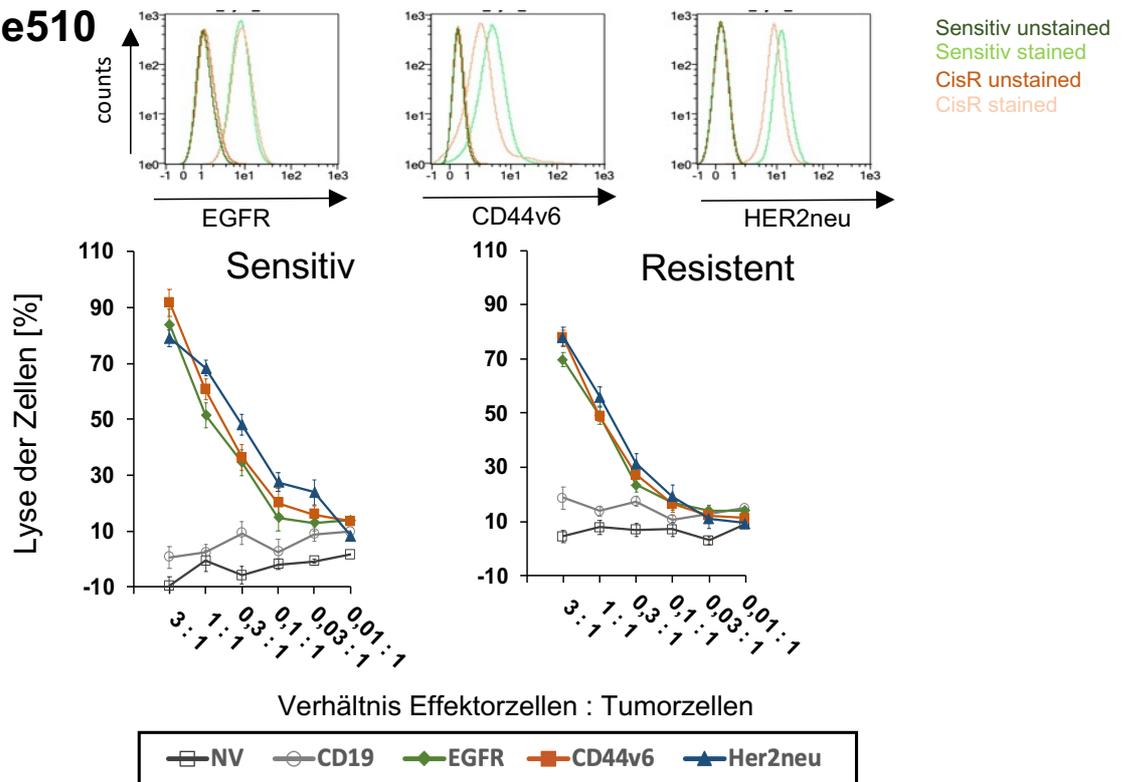


Abbildung 11: Zytotoxizität verschiedener CAR Konstrukten auf den Cisplatin-sensitiven und Cisplatin-resistenten Zelllinien Cal27 und Kyse510. Die EGFR Expression wurde mittels EGFR-PE, HER2/neu Expression mittels HER2/neu-APC-Vio und CD44v6 Expression mittels CD44v6-PE-Vio

bestimmt. In den Histogrammen ist die Antigenexpression (x-Achse) gegen die relative gezählte Zellzahl (y-Achse) aufgetragen. Die dunklen Linien zeigen die ungefärbten Proben, die hellen Linien die mittels Antikörper gefärbten Proben. Die grünen Linien zeigen die Cisplatin-sensitiven Zellen, die roten Linien die Cisplatin-resistenten Zellen. In den Graphen ist die Lyse der Zellen in Prozent (y-Achse) gegen die verschiedenen Effektor:Tumorzellen Verhältnisse (3:1 – 0,01:1) (x-Achse) aufgetragen. Pro Zelllinie ist die sensitive und die resistente Variante dargestellt. Die Negativkontrollen sind untransduzierte, naive T-Zellen (dunkelgrau) sowie CD19-transduzierte T-Zellen (hellgrau). Die unterschiedlichen CAR T-Zellen sind wie folgt markiert: EGFR in grün mit einer Raute, CD44v6 in rot mit einem Viereck, HER2/neu in blau mit einem Dreieck. Die entsprechende Legende ist unter der Gesamtabbildung dargestellt. (n=4)

Für das Ovarialkarzinom standen uns die Zelllinien TOV112D, TOV21G, Hey, CAOV3, A2780 und OV90 je in einer Cisplatin sensitiven und Cisplatin-resistenten Form zur Verfügung. Sensitive TOV112D Zellen exprimieren EGFR und CD44v6 geringfügig jedoch HER2/neu gut, resistente TOV112D Zellen exprimieren keines der Antigene gut. Eine Tumorzellyse ist bei Koinkubation mit HER2/neu CAR T-Zellen bis zu 60% Lyse bei 3:1 Effektor:Tumorzell Verhältnis vorhanden und bis zu 30% Lyse bei 3:1 Effektor:Tumorzell Verhältnis bei Koinkubation mit EGFR-CAR T-Zellen. Cisplatin-resistente TOV112D Zellen werden bei Koinkubation mit keiner der CAR T-Zellen Varianten lytisch. Sensitive TOV21G-Zellen exprimieren alle drei Antigene gut. Die resistente Form exprimiert CD44v6 und HER2/neu etwas schlechter. Hierzu passt, dass die sensiblen TOV21G Zellen durch alle drei CAR-T-Zell Varianten sehr gut lysiert werden (70-90% Lyse bei 3:1 Effektor:Tumorzell Verhältnis). Die resistenten TOV21G-Zellen werden durch alle drei CAR T-Zell Varianten immer noch lysiert, jedoch in geringerem Maße (EGFR: 80% Lyse bei 3:1 Effektor:Tumorzell Verhältnis; HER2/neu: 60% Lyse bei 3:1 Effektor:Tumorzell Verhältnis; CD44v6: 40% Lyse bei 3:1 Effektor:Tumorzell Verhältnis). Sowohl die sensible als auch die resistente Form der OV90 Zellen exprimieren EGFR geringfügig, CD44v6 wenig und HER2/neu gut. Die Tumorzellyse der sensitiven OV90 Zellen liegt bei Koinkubation mit allen drei CAR T-Zell Varianten bei ca. 50% Lyse bei 3:1 Effektor:Tumorzell Verhältnis. Bei den resistenten OV90 Zellen kommt es nur noch durch HER2/neu CAR T-Zellen zu einer geringen Lyse (30% Lyse bei 3:1 Effektor:Tumorzell Verhältnis). Insofern konnte Verschlechterung der Tumorzellyse durch die Resistenz gegen Cisplatin bei den Ovarialkarzinomzellpärchen TOV112D, TOV21G und OV90 dargestellt werden. TOV21G zeigt eine niedrigere Antigenichte von CD44v6 und HER2/neu durch die Cisplatin-Resistenz. Dies spiegelt sich in der Effektivität der Lyse Aktivität der CAR T-

Zellen gegen die Tumorzellen wider: beide CARs zeigen eine niedrigere Lyse-Rate durch die Resistenz.

Die Expression der Zielantigene EGFR und CD44v6 ist auf der Zelllinie A2780 sehr gering und gleichbleibend bei der sensitiven sowie der resistenten Variante. Lediglich HER2/neu weist eine mittlere Dichte auf und diese nimmt durch die Resistenz weiterhin zu. Auch dies spiegelt sich im Zytotoxizitätsassay wider, da die Lyse der Tumorzellen durch die Inkubation mit den gegen HER2/neu gerichteten CAR T-Zellen (blauer Graph) in der sensitiven Zelllinie bei 70 % liegt und in der resistenten Zelllinie einen Anstieg bis auf 90 % erfährt. Die anderen CAR T-Zellen führen zu keiner Lyse der A2780 Tumorzellen. CAOv3 zeigt in der sensitiven und resistenten Form eine hohe Antigendichte für EGFR und HER2/neu sowie eine moderate Antigendichte für CD44v6. Bei CAOv3 zeigt sich in der sensiblen und resistenten Variante bei Inkubation mit EGFR-CAR T-Zellen eine gute Lyse von ca. 70% Lyse bei 3:1 Effektor:Tumorzell Verhältnis. Für die Koinkubation mit CD44v6 oder HER2/neu CAR T-Zellen liegt die Tumorzelllyse bei ca. 90% Lyse bei 3:1 Effektor:Tumorzell Verhältnis sowohl in sensiblen als auch in resistenten CAOv3 Zellen, tendenziell erscheint in Zusammenschau aller Effektor:Tumorzellverhältnisse nach der Resistenz für CD44v6 CAR T-Zellen etwas erhöht. Die Zelllinien Hey zeigt in der sensitiven Form eine moderate Expression von EGFR, eine sehr geringe Expression für CD44v6 sowie eine hohe Expression für Her2neu. Bei Resistenzentwicklung verringert sich die Antigendichte für EGFR, während die Antigendichte für CD44v6 etwas steigt und die Antigendichte für HER2/neu gleich hoch verbleibt. Die Zytotoxizität ist für alle drei CAR T-Zell Varianten bei sensitiven Hey Zellen sehr hoch (EGFR und HER2/neu: 100% Lyse bei 3:1 Effektor:Tumorzell Verhältnis, CD44v6: 90% Lyse bei 3:1 Effektor:Tumorzell Verhältnis). Die Zytotoxizität der CAR T-Zellen gegen EGFR und HER2/neu bleibt in der resistenten Zelllinie gleich, wohingegen, die Zytotoxizität gegen CD44v6 abnimmt (CD44v6: ca. 79% Lyse bei 3:1 Effektor:Tumorzell Verhältnis) (siehe Abbildung 12).

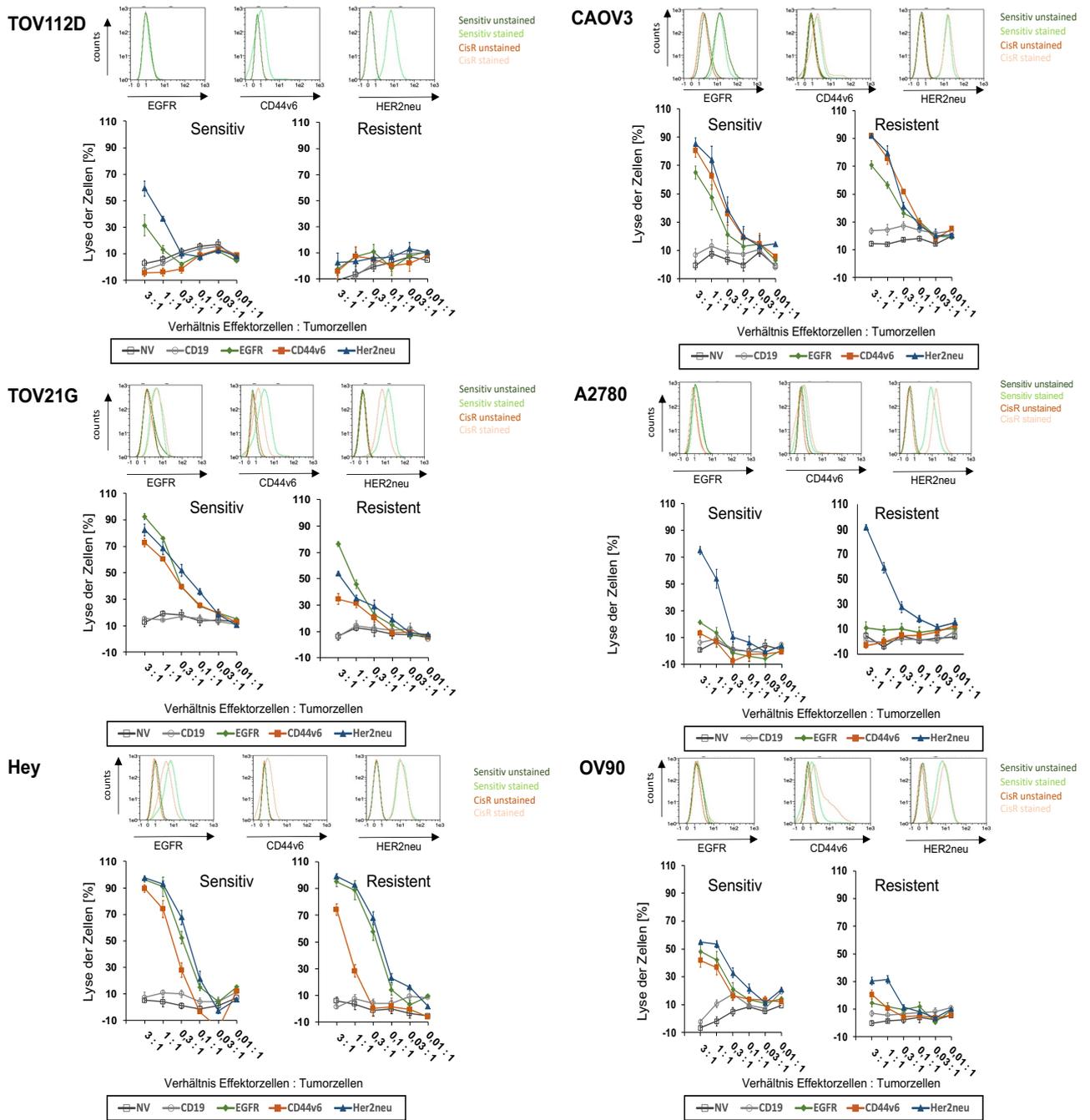


Abbildung 12: Zytotoxizität verschiedener CAR Konstrukten auf den Cisplatin-resistenten Zelllinien TOV112D, TOV21G, Hey, CAO3, A2780 und OV90. EGFR Expression wurde mittels EGFR-PE, HER2/neu Expression mittels HER2/neu-APC-Vio und CD44v6 Expression mittels CD44v6-PE-Vio bestimmt. In den Histogrammen ist die Antigenexpression (x-Achse) gegen die relative gezählte Zellzahl (y-Achse) aufgetragen. Hierbei zeigen die dunklen Linien die ungefärbten Proben, die hellen Linien die mittels Antikörper gefärbten Proben. Die grünen Linien zeigen die Cisplatin-sensitiven Zellen, die roten Linien die Cisplatin-resistenten Zellen. In den Graphen ist die Lyse der Zellen in Prozent (y-Achse) gegen die verschiedenen Effektor:Tumorzellen Verhältnisse (3:1 – 0,01:1) (x-Achse) aufgetragen. Pro Zelllinie ist die sensitive und die resistente Variante dargestellt. Die Negativkontrollen sind untransduzierte, naive

T-Zellen (dunkelgrau) sowie CD19-transduzierte T-Zellen (hellgrau). Die unterschiedlichen CAR T-Zellen sind wie folgt markiert: EGFR in grün mit einer Raute, CD44v6 in rot mit einem Viereck, HER2/neu in blau mit einem Dreieck. Die entsprechende Legende ist unter der Gesamtabbildung dargestellt. (n=4)

4.4. Etablierung eines EpCAM-CAR

Eine Problematik der CAR T-Zelltherapie ist die Definition der Zielantigene, die sehr variant auf den Zielzellen exprimiert sind. Insofern ist es sinnvoll für diese inhomogenen soliden Karzinome mehrere Antigene als therapeutische Zielstrukturen der CAR T-Zelltherapie zu definieren. Nach Sichtung von Literatur, stellte sich EpCAM als häufiges Oberflächenmolekül auf Tumoren des Kopf- und Halsbereiches heraus [57] und wurde daher als Zielantigen für ein neues CAR-Konstrukt ausgewählt .

4.4.1 Expression von EpCAM auf HNSCC

Zum Screening von EpCAM als potenziellem neuen Zielantigen, wurde es mit dem Antikörper EpCAM-APC-Vio per FACS der Antigenstatus von EpCAM auf verschiedenen Tumorzelllinien analysiert (Abbildung 13). Hierbei zeigte sich in varianter Dichte eine EpCAM-Expression in circa 70 % der untersuchten Linien und deshalb wurde EpCAM als geeignetes Zielantigen in soliden Karzinomen definiert. Beispielhaft weist UM11B eine hohe, UM14C eine mittlere und UT24A eine sehr geringe Antigendichte auf, daher wurde diese Zelllinien für weitere Experimente ausgesucht und ein CAR Konstrukt gegen EpCAM wurde etabliert.

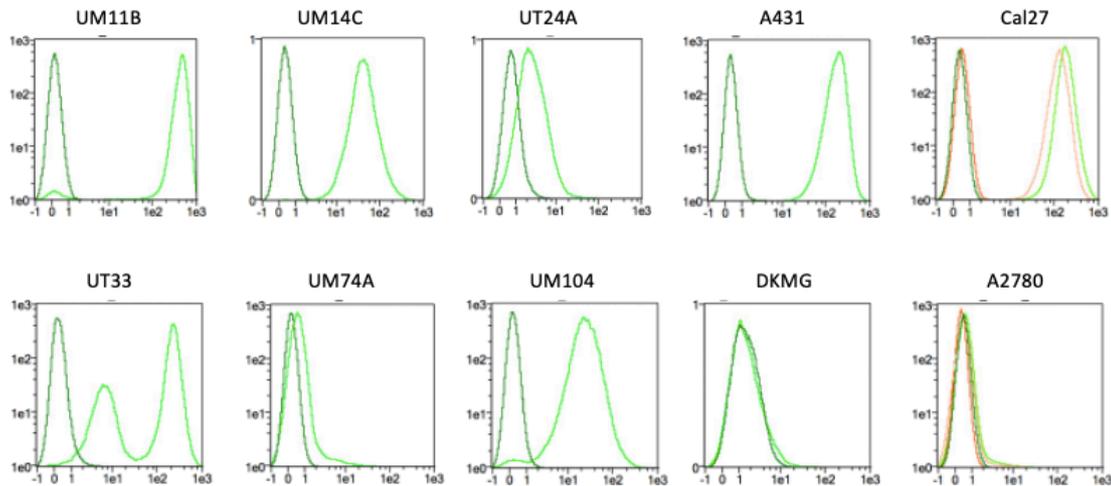


Abbildung 13: **Expression von EpCam auf Zelllinien verschiedener Entitäten.** Die Expression von EpCAM wurde mit dem EpCAM-APC-Vio Antikörper in der Fluoreszenzzytometrie (FACS) bestimmt. Die Antigenexpression ist als Anstieg der medianen Fluoreszenzintensität (MFI) dargestellt. In den Histogrammen ist die Antigenexpression (x-Achse) gegen die relative gezählte Zellzahl (y-Achse) aufgetragen. Hierbei zeigen die dunklen Linien die ungefärbten Proben, die hellen Linien die mittels Antikörper gefärbten Proben.

4.4.2 Klonierungsstrategie

Nach Identifizierung von EpCAM als geeignetes Zielantigen, wurden zwei verschiedene *single chains* in den CAR Vektor kloniert. Beide scFv EpCAM CAR-Sequenzen wurden aus Patenten abgeleitet; die EpCAM1464 aus WO 2010/142990 A1 und EpCAM317 aus WO 2017/023704 A1. Zur Klonierung wurden die zwei ausgewählten, codonoptimierten *single chains* EpCAM317 und EpCAM1464 zunächst mittels den Enzymen *RsrII* und *MfeI* in den pMK_RQ_J.R12c6CD2828z Vektor und im Anschluss über *RsrII* und *NotI* in den lentiviralen Vektor p2CL21BFPT2AJ.Her2neuc6CD2828z eingefügt (siehe Abbildung 14). Hieraus ergaben sich die finalen Vektoren p2CL21BFPT2AJ.EpCAM317c6CD2828z und p2CL21BFPT2AJ.EpCAM1464c6CD2828z. Im Zwischen- als auch im endgültigen Vektor wurde die DNA sequenziert, um ein korrektes Einbringen der Ziel-DNA zu bestätigen.

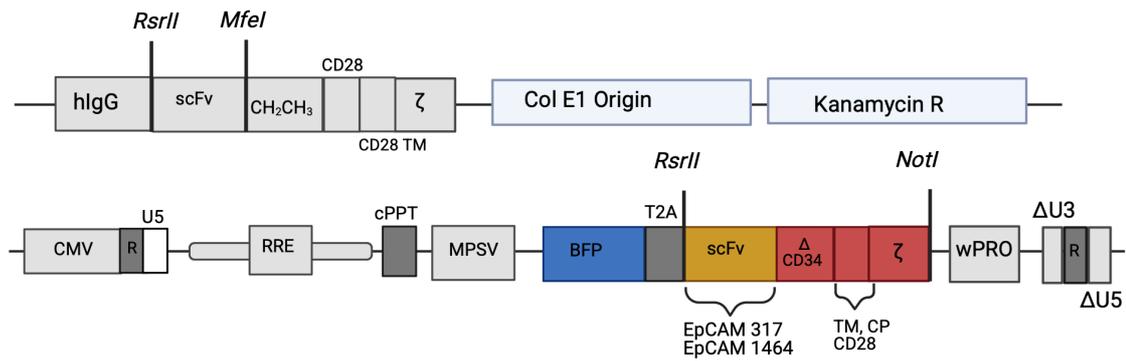


Abbildung 14: **Design des EpCAM CAR.** Die genutzten *single chains* wurden zunächst mit den Enzymen *RsrII* und *MfeI* in den pMK_RQ_J.R12c6CD2828z Vektor und anschließend in den lentiviralen Vektor p2CL21BFPT2AJ.Her2neuc6CD2828z mittels den Enzymen *RsrII* und *NotI* kloniert.

4.4.3 Funktionelle Austestung des EpCAM Konstruktes

Wie zuvor in Kapitel 4.1.1 beschrieben, wurden auch die EpCAM Konstrukte mittels des MACS Systems aufgereinigt und die CAR positiven T-Zellen selektiert. Für das Konstrukt EpCAM1464 zeigte sich eine Transduktionseffizienz von 33 % und für EpCAM317 eine Transduktionseffizienz von 70 % (siehe Abbildung 15). Nach Aufreinigung wurde auch hier mit einer Reinheit von 99 % positiven CAR T-Zellen weitergearbeitet (n=2).

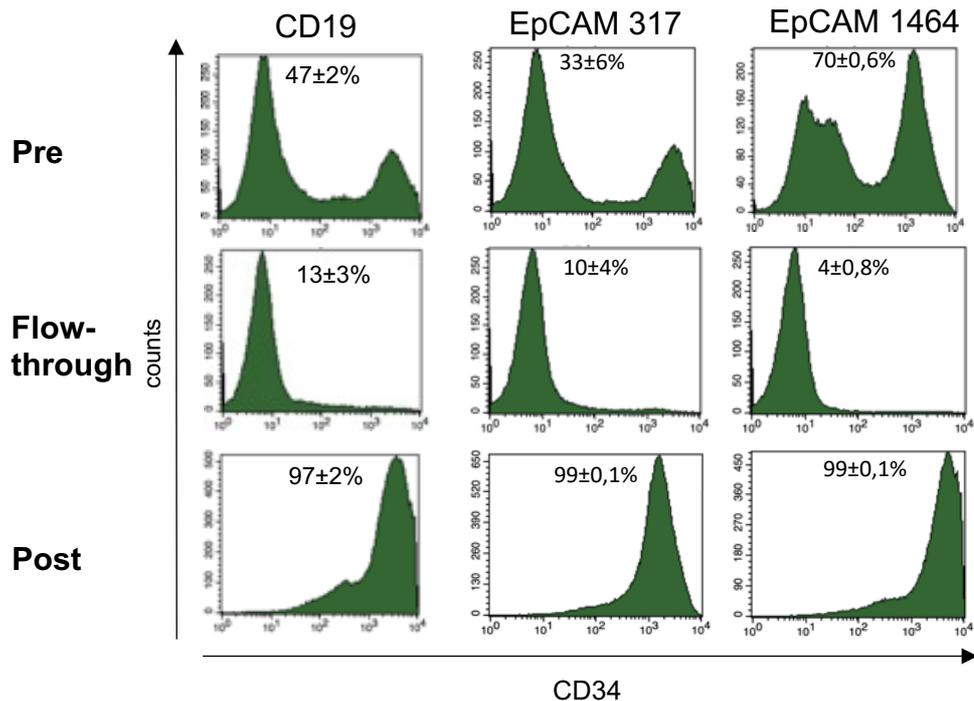


Abbildung 15: **Aufreinigung von EpCAM317 und EpCAM1464-CAR positiven T-Zellen sowie der Kontrolle mit CD19.** Durchflusszytometrische Analyse der Aufreinigungsschritte des MACS Systems. Die transduzierten T-Zellen wurden vor der Nutzung des MACS Systems (pre), sowie der Durchfluss (flow-through) und nach MACS (post) das Eluat gesammelt. Alle Konstrukte wurden mit CD34 Microbeads getrennt. Die CAR Expression in Prozent (x-Achse) ist gegen die relative gezählte Zellzahl (y-Achse) aufgetragen. Die Zahlen geben den Mittelwert der CAR positiven T-Zellen jeweils für CD19, EpCAM317 und EpCAM1464 sowie die Standardabweichung in Prozent an. (n=2)

Für beide Konstrukte des EpCAM CAR wurden CAR T-Zellen mit den unterschiedlichen *single chains* in einem Zytotoxizitätsassay mit den Zelllinien UM11B, UM14C und UM24A inkubiert und die Tumorzelllyse gemessen (EpCAM317: n=2; EpCAM1464: n=5). Für jedes Experiment wurden als Negativkontrollen untransduzierte T-Zellen genutzt (*no virus*) sowie CD19-CAR T-Zellen, da verwendeten Tumor-Zellen dieses Antigen nicht exprimieren. Für UM11B mit hoher EpCAM-Antigenexpression, zeigt sich eine starke Lyse von 90 % bei 3:1 Effektor:Tumorzell Verhältnis durch beide gegen EpCAM gerichteten CAR T-Zell Varianten. Die Kurven für beide Konstrukte verlaufen parallel. Bei mittlerer EpCAM Expression wie es bei der Zelllinie UM14C vorliegt, zeigt sich eine mittelgradige Lyse der Tumorzellen von 75 % Lyse bei 3:1 Effektor:Tumorzell Verhältnis durch beide getesteten CAR T-Zellvarianten. Bei der Zelllinie UT24A zeigt sich keine Tumorzelllyse durch Inkubation mit den beiden EpCAM CAR T-Zellen (siehe Abbildung 16). Zusammenfassend kann gesagt werden,

dass bei hoher und mittlerer Dichte des EpCAM Antigens auf den Tumorzellen CAR T-Zellen mit beiden EpCAM Konstrukten gut lysiert werden können, bei einer niedrigen EpCAM-Expression auf den Tumorzellen ist die Tumorzelllyse ineffizient.

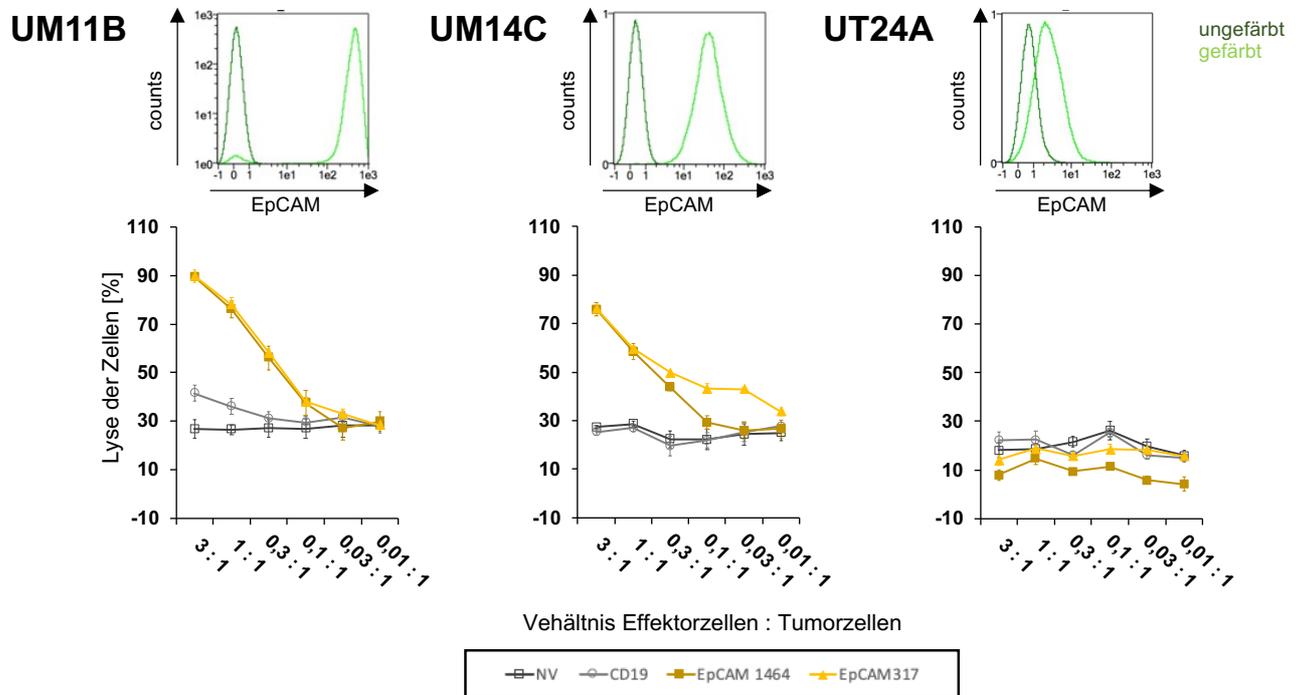


Abbildung 16: **Zytotoxizität der EpCAM CAR Konstrukte.** Obere Histogramme: Die EpCAM Expression wurde im Zytotoxizitätsassay mit dem Antikörper EpCAM-APC-Vio bestimmt. Die Antigenexpression ist als Anstieg der medianen Fluoreszenzintensität (MFI) auf der x-Achse im Histogramm dargestellt, auf der y-Achse ist die Zellzahl dargestellt. Untere Diagramme: Die Lyse der Zellen in Prozent (y-Achse) ist gegen die verschiedenen Effektor:Tumorzellen Verhältnisse (3:1 – 0,01:1) (x-Achse) aufgetragen. Die Negativkontrollen sind untransduzierte, naive T-Zellen (dunkelgrau) sowie CD19-transduzierte T-Zellen (hellgrau). Die CAR T-Zellen mit den unterschiedlichen EpCAM-Konstrukten sind wie folgt markiert: EpCAM 1464 in dunkelgelb mit einem Viereck, EpCAM 317 in hellgelb mit einem Dreieck. Die entsprechende Legende ist unter der Gesamtabbildung dargestellt. (n=2 für EpCAM317, n=5 für EpCAM1464).

5 Diskussion

Aufgrund der zunehmenden Resistenz und Therapieversagen klassischer Regime bei Plattenepithelkarzinomen ist ein neuer therapeutischer Ansatz die Immuntherapie. Hier haben in der neusten Entwicklung die Checkpointinhibitoren gegen PD-L1 in der 1st- und 2nd-Line Therapie des Kopf-Hals-Karzinoms die gängigen Therapiekonzepte ergänzt. Vorreiter war jedoch bereits Cetuximab, ein gegen den EGFR-Rezeptor gerichteter Antikörper, der sowohl in der Kombinationstherapie als auch als Monotherapie zum Einsatz kommt [9]. Als Weiterentwicklung der antikörperbasierten Therapie wurde in dieser Arbeit ein anti-EGFR-CAR auf Grundlage des Antikörpers Cetuximab mit verschiedenen Plattenepithelkarzinomlinien genutzt. Viele Plattenepithelkarzinome, besonders aus dem Kopf-Hals-Bereich zeigen eine hohe Expression von EGFR auf ihrer Oberfläche, daher scheint es ein geeignetes Zielantigen darzustellen. Es gibt jedoch Unterschiede in der Antigendichte für EGFR bei Plattenepithelkarzinomen sowohl innerhalb einer Entität als auch zwischen verschiedenen Tumorarten, die wir in unseren Versuchen in den Zelllinien gut darstellen konnten. Bei Untersuchung der Zytotoxizität unserer gegen EGFR gerichteten CAR T-Zellen, zeigte sich bereits eine Lyse von Tumorzellen, die nur eine geringe Antigendichte von EGFR aufwiesen. Bei deutlich erhöhter Antigenexpression nimmt die Lyse also nur unproportional zu. Dies trifft innerhalb einer Entität als auch Lokalisations-übergreifend zu.

Als weitere Neuentwicklung in der zellulär basierten Immuntherapie wurde anlässlich der ansteigenden Relevanz von epigenetischer Modulation in der Therapie hämatologischer Erkrankungen und Tumoren der Effekt nach Hinzugabe von modifizierenden Substanzen hinsichtlich der CAR T-Zell-Zytotoxizität auf verschiedenen HNSCC Zelllinien untersucht. Hierbei haben sich drei Gruppen identifizieren lassen: eine verbesserte, gleichbleibende oder verminderte Lyse durch die CAR T-Zellen nach Inkubation mit den epigenetisch wirkenden Substanzen Romidepsin und Decitabine. Die Behandlung mit Romidepsin und Decitabine führte in einigen Fällen zu einer Veränderung der Antigendichte in beide Richtungen. Die Expression der Zielantigene korreliert dabei nicht zwangsläufig mit der Veränderung der Zytotoxizität. Ein einheitliches Muster konnte nicht erkannt werden, hier scheint jede Zelllinie gesondert betrachtet werden zu müssen.

Da einer der wichtigsten Grundpfeiler der Therapie von Plattenepithelkarzinomen aufgrund von immer häufiger auftretenden Resistenz gegenüber dem vielfach eingesetzten Chemotherapeutikum Cisplatin zeigt, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, eben diesen Effekt einer Cisplatinresistenz zu untersuchen. Da dieses Phänomen auf vielen unterschiedlichen Entitäten vorkommt, wurden neben HNSCC Zelllinien auch Ovar- und Urothel-Zelllinien untersucht. Die Experimente zeigen analog zu denen der epigenetischen Modulation auch drei Trends: eine verbesserte, gleichbleibende oder verminderte Lyse der Cisplatin-resistenten Zelllinien. Dieser Trend korreliert weder direkt mit der Tumorentität noch mit der Antigendichte, welche durch den Einfluss von Cisplatin in einigen Zelllinien verändert wurde. Insofern ist auch hier kein einheitlicher Trend vorhanden und jede Zelllinie muss gesondert betrachtet werden.

In Hinblick auf Weiterentwicklung der Immuntherapie und Identifikation neuer potenzieller Zielantigene für zelluläre Therapien wurde als neues, potenzielles Zielantigen einer CAR T-Zell Therapie nach Literaturrecherche EpCAM ausgesucht, da es auf einer Vielzahl von Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches exprimiert wird. Nach Klonierung zwei verschiedener EpCAM CAR Konstrukte wurden diese erfolgreich auf drei Zelllinien mit jeweils hoher, mittlerer und sehr niedriger Antigendichte etabliert. Hierbei zeigte sich eine hohe Zytotoxizität beider CAR-Konstrukte bei hoher Antigendichte, was die Sensitivität der Konstrukte bestätigt. Bei mittlerer Expression zeigt sich eine mittlere Zytotoxizität und bei minimaler Expression zeigt sich keine Lyse der Tumorzellen durch die CARs. Dies spricht für eine hohe Spezifität der CARs, da sie keine unspezifische Lyse unabhängig vom Zielantigen zeigen. Im Folgenden müssten die neuen Konstrukte auf weiteren Tumorzelllinien getestet werden, um diese Ergebnisse weitergehend zu bestätigen. Neben HNSCC Zelllinien wäre es auch hier wichtig andere Tumorentitäten zu untersuchen, um einen Entitäten-übergreifenden und -unabhängigen Effekt darstellen zu können bei bereits gezeigter Entitäten übergreifender Expression von EpCAM.

5.1 Zielantigene von CARs

Ein häufiger Angriffspunkt der zielgerichteten Tumorthherapie ist der *epidermal growth factor receptor* (EGFR). Der EGF-Rezeptor ist eine Rezeptorproteinkinase und gehört zur Familie der ErbB-Rezeptoren, welche allesamt ein Zellwachstum stimulieren. Dies geschieht über verschiedene intrazelluläre Signalwege, unter anderem den ras/Raf-1/MAPK Weg oder auch über Pi3Kinase/Akt/mTOR [58]. Der Rezeptor ist physiologischerweise auf vielen verschiedenen Zelltypen exprimiert, besonders hoch ist er in Hautzellen exprimiert [20]. Auf Tumorzellen verschiedener Entitäten, beispielsweise Plattenepithelkarzinome des HNO-Bereiches, Brust-, Blasen- und Prostatakrebs, wird häufig eine Überexpression von EGFR beobachtet und kann daher als Onkogen charakterisiert werden [59], [60]. Diese Überexpression geht zumeist auf verschiedene Mutationen der Exons 19 und 21 zurück [61]. Aufgrund seiner Überexpression auf Tumorzellen dessen eignet sich EGFR als Angriffspunkt für eine Immuntherapie bei verschiedenen Tumorentitäten mit den folgenden bereits zugelassene Substanzen: Inhibitoren der EGFR-Tyrosinkinase, unter anderem Gefitinib beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom sowie EGFR-bindende monoklonale Antikörper wie Cetuximab und Panitumumab beim kolorektalen Karzinom [61]. Beide pharmakologischen Klassen hemmen die Signalweiterleitung, entweder durch Verhinderung der Dimerisierung des Rezeptors selbst oder durch Hemmung der Tyrosinkinasen nach Aktivierung des EGF-Rezeptors. Der monoklonale Antikörper Cetuximab wurde in die Therapie von HNO-Tumoren aufgenommen, nachdem es in einer Phase III Studie (NCT00004227) einen Überlebensvorteil in Kombination mit Bestrahlung zeigte [62], [63]. Anzumerken ist jedoch, dass es bei der Anwendung von EGFR zielgerichteten Therapien zu verschiedenen Nebenwirkungen kommt, u.a. Hautreaktionen wie Ausschläge, Juckreiz, sowie systemische Auswirkungen wie Fieber und Kopfschmerzen [64], [65]. Diese unerwünschten Wirkungen sind unter anderem darauf zurückzuführen, dass EGFR auch in gesunden Körperzellen und Hautzellen exprimiert wird. Diese sich ebenfalls schnell teilenden Zellen werden daher auch Ziel des anti-EGFR Antikörpers und somit geschädigt. Daher wäre besonders bei diesem Zielantigen eine andere Applikation der CAR Therapie angebracht um systemische Nebenwirkungen so gering wie möglich zu halten: hier wäre unter anderem eine direkte Applikation ins Tumorgewebe denkbar, sodass die veränderten T-Zellen direkt am

Wirkungsort wären und aufgrund dessen weniger systemische Nebenwirkungen nach sich ziehen würden.

Es sind weitere Mutationen des überexprimierten EGFR bekannt, welche vor allem auf tumorösen Zellen zu finden sind. Eine Variante ist EGFRvIII: es wurde bislang nicht auf gesunden Zellen gefunden, jedoch auf Tumorzellen verschiedener Entitäten wie der Lunge, Brust und Ovarien. Die Variante III des EGF-Rezeptors ist auf eine Deletion der Exons 2-7 zurückzuführen [59]. Aufgrund dieser Spezifität auf Tumorzellen, stellt sich EGFRvIII als ein potenzieller Angriffspunkt für eine zielgerichtete Therapie dar, mutmaßlich ohne schwere systemische Nebenwirkungen, wie es beim physiologischen EGF-Rezeptor zu sehen ist. Diese Variante ist ebenfalls auf Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches nachweisbar [59]. Tumorzellen, welche EGFRvIII exprimieren, zeigen eine erhöhte Proliferationsrate und sind häufig mit Resistenzen gegenüber den klassischen Therapieregimen assoziiert: *in vitro* zeigen EGFRvIII positive Tumorzellen weniger Apoptose nach Cisplatin Behandlung als Tumorzellen mit Wildtyp EGFR [59]. Bis zu 30% der Glioblastome zeigen die mutierte Variante des EGF-Rezeptors und daher gibt es für diese Tumorart bereits mehrere Ansätze, um dort gezielt anzugreifen. Eine Möglichkeit gezielt die Variante zu erkennen und zu töten, bieten spezifische CARs. *In vitro* und *in vivo* wurden EGFRvIII-CARs an Glioblastom Zelllinien sowie in Mauslinien eingebracht und zeigten jeweils spezifische Lyse der Zellen und eine Tumorreduktion in den Mausmodellen [66], [67]. Ähnliche Ergebnisse konnten an Tumorzellen der Lunge gezeigt werden, bei denen die EGFRvIII-CARs spezifisch die Tumorzellen töten [68]. Interessant ist hierbei die in Mausmodellen gesehene niedrige Rate an unerwünschten Nebenwirkungen: im Vergleich zum EGFR-basierten Cetuximab zeigte sich beim EGFRvIII CAR im Mausmodell weniger Hautreaktionen [66] – diese Ergebnisse decken sich mit der Erwartung durch die Spezifität von EGFRvIII auf Tumorzellen weniger unerwünschte, systemische Wirkungen zu erzielen. Es gibt bereits klinische Studien mit EGFRvIII CARs T-Zellen bei Patienten mit Glioblastomen, welche in Phase I (NCT02209376) eine relative Sicherheit des Präparates zeigen. Es wurden keinerlei schwere Nebenwirkungen gemeldet, wie beispielsweise ein Zytokinsturm, der häufig nach adoptiver Immuntherapie ausgelöst wird. Des Weiteren konnte keinerlei Kreuzreaktionen zum Wildtyp EGFR gefunden werden und somit keine dafür klassischen Hautreaktionen [69]. Jedoch zeigen sich auch hier die bekannten Probleme der CAR T-Zell Therapie *in vivo*: neben der Heterogenität der Expression des Antigens müssen die

CAR T-Zellen zunächst in das Gehirn, zu ihrem Wirkort, gelangen. Dort angekommen treffen sie auf ein Immunzell-feindliches Milieu, in dem ein Überleben und sich teilen schwierig ist [69]. Zusammenfassend gibt es erfolgsversprechende Optionen um EGFRvIII als tumorspezifisches Antigen als Angriffspunkt für neue Therapieansätze zu nutzen. Profitieren würden hierbei nicht nur Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren, sondern unter anderem auch Patienten mit Glioblastomen, welche eine schlechte Prognose und relativ kurze mediane Überlebenszeiten aufweisen.

Aus der gleichen Rezeptor-Familie wie EGFR stammt HER2, auch bekannt als ERBB2, als weiterer Vertreter der Wachstumsrezeptoren. Auch HER2 wird in vielen soliden Tumoren überexprimiert, beispielsweise in Mamma-, Lungen- und Ösophaguskarzinomen. Daher eignet es sich ebenfalls als Zielantigen für eine zellbasierte Immuntherapie [60], [70]. Im klinischen Einsatz sind bereits antikörperbasierte Therapien gegen HER2 gerichtet, unter anderem als monoklonaler Antikörper Trastuzumab. In unserem Labor wurden bereits gegen HER2/neu gerichtete CAR T-Zellen entwickelt, die in dieser Arbeit zum Einsatz kamen.

Ein weiteres wichtiges Oberflächenprotein, welches Zell-Zell-Kontakte, vor allem in Epithelien vermittelt, ist EpCAM [71]. In Bezug auf Tumoren, ist es auf vielen verschiedenen soliden Tumorgeweben nachzuweisen, unter anderem in Prostata-, Leber-, Ösophagus-, kolorektalen Karzinomen und Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches [71]. In einer Analyse von Went et. al konnte gezeigt werden, dass EpCAM auf vielen soliden Tumorgeweben nachgewiesen werden kann, vor allem solchen aus epitheliale Ursprung [71]. Somit erfüllt es das Kriterium einer hohen Antigenexpression auf Tumorzellen, um für eine potenzielle Immuntherapie in Frage zu kommen. In gesunden Körperzellen ist EpCAM vor allem intrazellulär zu finden, während es bei Tumorzellen auf der Oberfläche lokalisiert ist [72]. Daher kommt die Annahme zustande, dass EpCAM antikörperbasierte-Therapien gezielter zu den tumorösen EpCAM Moleküle gelangen und daher weniger systemische Nebenwirkungen zu erwarten sind [71], [72].

EpCAM ist jedoch nicht nur auf den Oberflächen von Tumoren zu finden, es wurde auch als Biomarker für zirkulierende Tumorzellen (*circulating tumor cells*, CTCs) und Tumorstammzellen (*cancer stem cells*, CSCs) identifiziert [73]. CTCs sind mögliche Vorboten einer potenziellen Metastasierung, da sie sich vom Primärtumor abkoppeln und entweder in der Blutbahn zirkulieren oder andere Gewebe infiltrieren [73]. CSCs sind

ähnlich wie physiologische Körperstammzellen in der Lage sich annähernd immortal zu teilen und regenerieren. Dabei zeigen sie oft eine Resistenz gegenüber klassischen Tumorthérapien wie Chemotherapie und Bestrahlung [74].

Einige Ansätze einer EpCAM basierten Immuntherapie untersuchten die Wirkung von monoklonalen Antikörpern. Edrecolomab war der erste anti-EpCAM monoklonale Antikörper, welcher für kolorektale Karzinome eingesetzt werden sollte. Jedoch stellten sich in klinischen Studien keine Verbesserung der Therapie, im Sinne einer verlängerten Lebensdauer, dar, sodass es zu keinem Einsatz kam [75]. Zhang et. al untersuchten eine EpCAM CAR basierte Therapiemöglichkeit für kolorektale Karzinome *in vitro*. Hierbei zeigte sich Entitäten übergreifend eine hohe Zytotoxizität des EpCAM CARs bei Tumoren der Lunge, des Kolons und der Brust, welche auch im Mausmodell validiert werden konnte [73]. Neben der Lyse der Tumorzellen, kommt es außerdem zu einer Zytokinfreisetzung von Interferon γ und TNF α . Ein Ansatzpunkt, weswegen eine CAR-basierte Therapie erfolgreicher sein könnte als eine Therapie mit monoklonalen Antikörpern ist, dass ein CAR Konstrukt viele weitere kostimulatorische Einheiten wie CD28, CD27, OX-40 und/oder 4-1BB mit sich bringt. Dadurch kommt es zu einer höheren Zytokinproduktion und einer Verbesserung der autologen T-Zell basierten Immunantwort [73]. Diese Daten verdeutlichen, dass eine Therapie mit EpCAM CARs nicht nur eine potenzielle Option für Tumore des Kopf-Hals-Bereiches ist, sondern auch für weitere solide, vor allem epithelial-entsprungene, Tumoren. Es bedarf weiteren Experimenten mit verschiedenen Entitäten, um diese potenzielle Behandlungsoption weiter zu erforschen.

Ebenfalls untersucht wurde CD44 – ein Hyaluronsäurerezeptor, welcher assoziiert ist mit Tumorwachstum und -metastasierung. Es gibt verschiedene Spleißvarianten, welche sich durch eine verschiedene Anzahl von beinhalteten Exons unterscheiden. CD44v6 ist eine dieser Spleißvarianten und translatiert das Exon 11, das in der Wildtypvariante nicht exprimiert wird. Es ist im gesunden Gewebe auf (Schleim-)Haut und Monozyten vorzufinden. Überexprimiert wird CD44v6 in verschiedenen malignen Tumoren, unter anderem Plattenepithelkarzinome wie HNSCC, Haut- und Lungenkrebs. Es gibt Hinweise, dass eine erhöhte Expression von CD44v6 mit einer Progression und Metastasierung vergesellschaftet ist. Daher wurde es Gegenstand der Forschung und

kommt aktuell in klinischen Studien zum Einsatz, in denen eine potenzielle Therapie unter anderem für akute myeloische Leukämien oder HNSCC gesucht wird [76].

5.2 Cisplatin-Resistenz zeigt heterogene Trends auf die Zytotoxizität von CAR T-Zellen

Viele Tumore *in vivo* entwickeln im Laufe der Chemotherapie mit Cisplatin eine Resistenz dem Therapeutikum gegenüber. Dieses Phänomen wird nicht nur bei Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches gesehen, sondern auch bei anderen Entitäten, wie unter anderem Urothel- und Ovar-Karzinomen [77]. Die Resistenz gegenüber Cisplatin und zumeist auch einer Kreuzresistenz gegenüber anderen Substanzen wie Carboplatin, basiert grundlegend auf einer intrazellulären Inferenz der zytotoxischen Wirkung von Cisplatin, sodass es zur Inhibition der Apoptose kommt [1]. Die genauen Mechanismen dafür sind vielfältig: zum einen kann es zu einem reduzierten intrazellulären Spiegel von Cisplatin kommen, entweder durch eine verminderte Aufnahme oder durch einen erhöhten Transport aus der Zelle, beispielsweise durch eine Effluxpumpe. Im Zusammenhang einer Resistenz gegenüber Cisplatin, ist hier vor allem MRP2 (*multidrug resistance-associated protein 2*) von Bedeutung, da resistente Zellen eine erhöhte Expression des Proteins aufweisen [78]. Cisplatin kann außerdem durch eine Erhöhung von Glutathion und anderen Thiol-haltigen Molekülen inaktiviert werden, da es in Folge nicht mehr mit der DNA interagieren kann. In Ovarialkarzinomen wurde eine erhöhte Glutathionmenge nach chronischer Exposition von Cisplatin nachgewiesen und mit dessen Resistenz korreliert [1]. Manche Tumorzellen erhöhen die Aktivität von DNA-Reparatursystemen: unter anderem finden sich erhöhte Aktivität der Topoisomerase II und der Nukleotid-Exzisionsreparatur in resistenten Zellen [1]. Ebenfalls scheint eine erhöhte Expression von HER2/neu in resistenten Tumorzellen vorhanden zu sein [2]. Ein weiterer Mechanismus, der vor allem für Tumore des Kopf-Hals-Bereiches von Bedeutung ist, ist die Dysfunktion von p53. Die Aktivierung des Wildtyp p53 ist wichtig für die Funktion von Cisplatin und die Induktion von Apoptose. Bei Mutationen und *loss of function*, kann es zu einer Inhibition der Apoptose kommen und dadurch zu einer Resistenzentwicklung [1], [2]. Viele Tumoren des Kopf-Hals-

Bereiches zeigen eine Mutation von p53, was mitunter zu der hohen Prävalenz der Cisplatin-Resistenz führt [79].

Die therapeutischen Alternativen bei einer Resistenz gegenüber Cisplatin sind zumeist jedoch spärlich, da besonders bei HNO-Tumoren nur bestimmte Chemotherapeutika eine kurative Behandlungsoption bieten. Eine mögliche neue Option für diese therapierefraktären Tumoren könnte es sein, eine Therapie zu entwickeln, die sich die Cisplatin-Resistenz zu Nutze macht. Die Resistenz gegenüber Cisplatin wird durch vielfältige Mechanismen ausgelöst, unter anderem durch verschiedene Mutationen, welche zu unterschiedlichen Proteinexpressionen führen könnten [77]. Neben der Antigendichte des Zielantigens, spielen bei der Zytotoxizität von CAR T-Zellen noch weitere Komponenten eine Rolle: wie die Expression von Tumor-suppressiven oder -schützenden Proteinen und andere *immune escape* Phänomene [80].

Die Cisplatin-Resistenz zeigte unterschiedliche Effekte auf die Zytotoxizität von CAR T-Zellen (siehe Abbildung 17). Diese Effekte sind weder mit der Antigendichte noch mit der Tumorentität kausal korrelierbar. Beispielsweise zeigt sich innerhalb der untersuchten Gruppe von Ovarialkarzinomen in der Mehrzahl eine Verschlechterung der Lyse der CAR T-Zellen bei Vorliegen einer Cisplatinresistenz, jedoch zeigt sich bei den Zelllinien Hey und A2780 eine gesteigerte Lyse. So stellt sich die Frage, welche weiteren Faktoren für ein Ansprechen der CAR T-Zellen in diesem Milieu verantwortlich sind. Bestandteil weiterer Forschung sollte daher weitere Untersuchungen bezüglich der Expression anderer Oberflächenproteine sein, die für das Ansprechen einer Chemotherapie und einer Immuntherapie wichtig sind.

	Urothelkarzinom		Ovarialkarzinom						HNSCC	
Zell -linie	RT112	J82	Hey	A2780	CAOV	TOV21G	OV90alt	TOV112D	Kyse 510	Cal27
Änderung der Lyse durch Cisplatin Resistenz	=	↑	↑	↑	=	↓	↓	↓	=	↓

Abbildung 17: Schematische Darstellung der Änderung der Lyse durch CAR T-Zellen auf Cisplatin resistenten Zelllinien verschiedener Entitäten.

Aufgrund des beobachteten Phänomens, wäre auch eine simultane Behandlung mit Cisplatin und CAR T-Zellen eine weitere mögliche Therapieoption. So kann man in einem Cisplatin-sensitiven Stadium des Tumors eine unterstützende Maßnahme mittels der CAR T-Zellen anbieten, um eine insgesamt höhere Zytotoxizität zu erreichen. Han et. al zeigten einen positiven Effekt einer Kombinationstherapie von anti-CD133 CAR T-Zellen und Cisplatin bei Magenkarzinomen [81]. Hierbei zeigten sich *in vitro* positive Effekte bezüglich der Zytotoxizität der CAR T-Zellen bei gleichzeitiger Chemotherapie mit Cisplatin. Die Tumorzellen zeigten eine erhöhte Expression von CD133, was wiederum zu einer erhöhten Lyse durch die CARs führte. Die Experimente wurden auf ein Mausmodell ausgeweitet, in dem sich dieser positive Effekt einer Kombinationstherapie ebenfalls zeigte [81]. Jedoch ist anzumerken, dass sich diese Daten nur auf drei primäre Tumoren von Patienten beziehen und eine größere Kohorte von Tumorzelllinien notwendig wäre, um die Ergebnisse zu validieren. Um diesen Therapieversuch auf Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches im klinischen Einsatz zu übertragen, müsste es jedoch zunächst eine Zielstruktur geben, welche weniger unerwünschte Wirkungen unter CAR Therapie mit sich zieht.

5.3 Einfluss von epigenetischen Modulatoren

Aufgrund dieser Probleme in der bislang Cisplatin-basierten Therapie von soliden Tumoren benötigt es weitere therapeutische Ansätze. Einen forschungsintensiven Impuls bietet die Epigenetik. Hierrunter fällt unter anderem die DNA-Methylierung: dies ist ein Prozess, welcher die Chromatin Verpackung und die Expression von Genen kontrolliert. Tumoren nutzen dieses Phänomen, um Tumorsuppressorgene weniger zu exprimieren [38]. Als *hallmark of cancer* können sie so proliferative Signale verstärken und Suppressoren ausschalten, auch um dem Immunsystem zu entkommen [82]. Epigenetische Modulatoren sind in der Lage, in den Prozess der DNA Methylierung und -Acetylierung einzugreifen und diesen Prozess zu verhindern.

Decitabine, ein Vertreter der DNMTi, wird anstelle von Cytosin in die DNA eingebaut und kann folgend in die DNA eingebettet werden oder Addukte bilden. Die Effekte von Decitabine können in direkte und indirekte eingeteilt werden: direkte sind solche Effekte, bei denen die Einbettung der Substanz zu einer aktiven Veränderung der

Methylierung und Expression des Zielproteins führt. Indirekte Effekte sind solche, in denen ein Vorläufer- oder Helferprotein verändert exprimiert wird und darauffolgend das Zielantigen passiv verändert reguliert wird. Die am häufigsten vorkommenden und untersuchten direkten Effekte sind Promotor-Demethylierungen. Zu den indirekten Funktionen zählen die Histon-Modifikationen: hierbei kann es durch Acetylierung und Methylierung zur Aktivierung oder auch Repression von H3 Histonen kommen [40]. Über diesen indirekten Weg werden im Verlauf andere Gene reaktiviert und gewisse Proteine mehr exprimiert. So konnte eine erhöhte ICAM-1 Expression in endothelialen Tumorzellen nach Gabe von Decitabine gemessen werden. Weitere veränderte Proteine sind: COX-2, MMP-1, CDKN2D [40]. Anzumerken ist jedoch, dass die Effekte von DNMTi unterschiedlich je nach Dosis und auch Ursprung des Zielgewebes beziehungsweise des Tumors ist. Eine Runterregulierung des Proteins MDM2 kann zu einer erhöhten Bindung von p53 an seinen Promotor führen - dies ist wiederum mit einem erhöhten DNA-Schaden assoziiert und somit tumorrepressiv. Dieses Phänomen konnte allerdings nur bei Tumoren mit Wildtyp p53 nachgewiesen werden und nicht bei fehlendem oder mutiertem p53 [40]. Da Tumore des Kopf-Hals-Bereiches jedoch häufig eine p53 Mutation aufweisen, wäre dies ein Mechanismus von Decitabine, welcher nicht auf diese Art von Malignom übertragen werden könnte.

Wichtig für den therapeutischen Nutzen ist anzuführen, dass die DNA-modulierenden Effekte vor allem bei niedrigen Dosen (*low-dose*) von Decitabine vorzufinden sind. Bei höheren Dosen nimmt der zytotoxische Effekt durch eine Behinderung der DNA Polymerase zu [40]. Für therapeutische Anwendung werden daher *low-dose* Konzentrationen benutzt [40], [83]. Demzufolge wurden für diese Experimente Dosen von Decitabine genutzt, die dem IC50-IC20 der jeweiligen Zielzellen entsprachen, um möglichst isoliert den epigenetisch modulierenden Effekt zu beurteilen. In den Messungen der toxischen Dosis kam es jedoch zu deutlichen Tagesschwankungen innerhalb der Messpunkte, was dafürspricht, dass die Zellen nicht immer gleich empfindlich gegenüber Decitabine sind. Vorstellbar wäre beispielsweise eine Abhängigkeit der Empfindlichkeit von ihrem Status im Zellzyklus. Diese Hypothese entspricht der von Al-Salihi et. al, dass der primäre Effekt von Decitabine, die Inhibition der DNMT1, zellzyklusunabhängig ist, jedoch der Effekt der DNA Methylierung vor allem in der S-Phase des Zellzyklus stattfindet [84].

Ein möglicher therapeutischer Einsatz für epigenetische Modulatoren ist die Kombinationstherapie mit anderen, bereits etablierten Tumorthapeutika. DNMTi und HDACi können *cancer testis antigens* (CTA) hochregulieren. CTA sind Antigene, die normalerweise nur in Keim- und Embryonalzellen exprimiert werden und in normalen somatischen Zellen stummgeschaltet werden [83]. In Tumorzellen können diese entweder auch stummgeschaltet sein oder abnormal hoch exprimiert werden [83]. Da diese Antigene also eher als fremd vom Körper angesehen werden und normalerweise nicht auf gesunden Zellen exprimiert werden, handeln sie sich um ein optimales Ziel für Immuntherapie. Vorstellbar wäre eine Vorbehandlung mit HDACi oder DNMTi zur Hochregulierung von CTA in Tumorzellen und darauffolgend eine gezielte Immuntherapie, beispielsweise mit monoklonalen Antikörpern, um spezifisch die Tumorzellen zu eliminieren [83]. Einige Experimente zeigen einen positiven Effekt einer Kombinationstherapie von *low-dose* Decitabine und einem anti-CTLA4 Antikörper in verschiedenen Tumorzelllinien *in vitro* [85]. In Lungenkarzinomlinien und Leukämiezellen konnte ebenfalls eine erhöhte PD-1 und PD-L1 Expression nach Behandlung mit Decitabine festgestellt werden. Dabei scheint die erhöhte Expression auch mit einer verbesserten Antwort auf anti-PD-1 Therapien assoziiert zu sein [83]. Daher wäre es eine weitere, interessante Option epigenetische Modulatoren und Immuncheckpoint-Inhibitoren gemeinsam einzusetzen. Da bei Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches bereits Checkpoint Inhibitoren wie Pembrolizumab zugelassen sind, wäre es interessant mit weiterer Forschung zu überprüfen, ob die Wirksamkeit dieser Medikamente noch weiter verbessert werden könnte.

In vitro scheinen jedoch nicht alle Zellen sensitiv auf epigenetische Substanzen zu reagieren. In den durchgeführten Experimenten zeigten sich die Zelllinien UM104 und UT33 resistent gegenüber einer Lyse mittels Romidepsin. Newbold et. al beschreiben ein ähnliches Phänomen bei Lymphomen: sie identifizierten Romidepsin-sensitive und resistente Zelllinien und fanden unterschiedliche Expressionen von Bcl-X_L. So korreliert in ihren Experimenten eine erhöhte Bcl-X_L Expression mit einer Resistenz gegenüber Romidepsin [86]. Bezüglich der hier genutzten HNSCC Zelllinien wäre es interessant, ähnliche Expressionsprofile zu etablieren, um bestimmte Marker auffindig zu machen, die Aufschluss darüber geben, ob eine Therapie mit Romidepsin Erfolg bringend wäre. Anzumerken ist bezüglich der Experimente dieser Arbeit jedoch, dass die Zelllinien UM104 und UT33 grundsätzlich keine Lyse durch die CAR T-Zellen erfahren, trotz

hoher Antigenexpression, weder unbehandelt noch nach Behandlung mit Decitabine. Daher kommt die Annahme zustande, dass bereits im unbehandelten Zustand Mutationen oder Veränderungen vorliegen, die zu einer Resistenz gegenüber solchen epigenetischen Modulatoren führen.

Eine singuläre Therapie mit Romidepsin bei Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen wurde in einer klinischen Phase II Studie durchgeführt: hier bekamen 14 vorbehandelte Patienten ausschließlich Romidepsin als Infusion. Es zeigten sich bei zwei Patienten eine stabile Situation, jedoch bei 9 Patienten eine Progression der Erkrankung. In den biopsierten Tumorproben zeigte sich immunhistochemisch eine erhöhte Expression von p21 nach Infusion von Romidepsin sowie gleichbleibende oder erniedrigte Ki-67 Werte, was für ein Ansprechen der Tumorzellen auf das Romidepsin spricht, jedoch konnte keine eindeutige klinische Korrelation ausfindig gemacht werden. Insgesamt wurde aus dieser klinischen Studie deutlich, dass Romidepsin wichtige, tumorrepressive Eigenschaften aufweist, jedoch als singuläre Therapie ungeeignet ist [31]. Weitere Phase II Studien von metastasierenden Tumoren, zeigen ähnliche Ergebnisse [87], [88]. In diesen Studien zeigen die Patienten außerdem teils starke Nebenwirkungen wie Übelkeit/Erbrechen, Fatigue und hämatologische Auswirkungen wie Thrombozytopenien [31], [87]. Gegenstand weiterer Forschung sollte eine Kombinationstherapie von HDACi wie Romidepsin mit anderen, etablierten Therapiemethoden wie Chemo- oder Strahlentherapie sein. Ebenfalls interessant wäre eine gezielte, tumor-nahe Applikation anzustreben, anstelle einer systemischen Gabe um ungewünschte Nebenwirkungen so gering wie möglich zu halten.

Ein weiterer Vertreter der HDACi, Vorinostat, ist seit 2006 zugelassen für die Monotherapie von progressivem oder rezidiviertem kutanem T-Zell-Lymphom. Vorinostat zeigt eine bessere Verträglichkeit, jedoch treten auch hier unerwünschte Wirkungen wie Übelkeit und Erbrechen sowie Fatigue auf [89]. Aufgrund der vielversprechenden Wirkung gibt es viele Phase II Studien für solide Tumoren mit Vorinostat. In einer Phase II Studie mit Patienten mit HNSCC zeigte sich, dass die meisten Patienten trotz guter Verträglichkeit einen Progress ihrer Grunderkrankung unter Monotherapie mit Vorinostat zeigten [90]. Auch hier sollte die Wichtigkeit einer möglichen Kombinationstherapie von epigenetischen Modulatoren mit weiteren, bereits bekannten Therapieoptionen erwähnt werden.

5.4 Ausblick

Weiterhin ist Bestandteil der Forschung, wie zellbasierten Therapieoptionen mit CARs *in vivo* und besonders bei soliden Tumoren am effizientesten klinisch umzusetzen sind. Bereits heutzutage gibt es neue Ideen, um eine Therapie mit CAR T-Zellen weiterzuentwickeln, um ein bestmögliches Therapieansprechen zu initiieren. Dabei werden unter anderem körpereigene Signalwege genutzt. Das Immunsystem verfügt physiologischerweise über verschiedene regulierende Signalwege, um die Stärke einer Immunantwort anzupassen und somit unter anderem einer Autoimmunität entgegenzuwirken. Beispielsweise wird der *programmed cell death protein 1* (PD-1) auf Immunzellen, vor allem auf T-Zellen, und sein Ligand, *programmed cell death 1 ligand 1* (PD-L1), auf unterschiedlichen Geweben exprimiert. Wenn sie aneinanderbinden, kommt es zur Hemmung der T-Zell-Proliferation und somit zur Immunsuppression. Viele Tumore nutzen diese Signalwege für sich, sodass ein immunfeindliches Milieu entsteht, welches zum weiteren Tumorwachstum und -erhalt beiträgt. Häufig zeigen Tumore beispielsweise eine Überexpression von PD-L1. Daher ist ein weiterer neuer Therapieansatz für verschiedene Arten von soliden Tumoren der Einsatz von Immuncheckpoint Inhibitoren. Das sind Substanzen, welche die immunsuppressiven Signale, welche Tumoren für sich nutzen, wiederum blockieren, sodass es wieder zu einer erhöhten Bereitschaft und Wirkung des Immunsystems am Ort des Tumors kommt [91]. Vertreter dieser Substanzklasse sind monoklonale Antikörper gegen CTLA4, PD-1 und PD-L1. Sie sind zugelassen bei diversen Tumorentitäten, sowohl bei soliden Tumoren als auch bei hämatologischen Malignomen. Pembrolizumab, ein PD-1 Antikörper, ist für die Therapie bei Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen zugelassen – als *second line* Therapie bei einem Rezidiv oder auch als *first line* Therapie in Kombination mit Chemotherapie [91].

Aufgrund der erschwerten Implementation von CAR T-Zellen in soliden Tumoren im Vergleich zu hämatoonkologischen Erkrankungen, ist eine Kombination von CAR T-Zellen mit Immuncheckpoint Inhibitoren ein weiterer Ansatz, um die Effizienz der einzelnen Therapien zu steigern. Bereits 2013 veröffentlichten John et al. Experimente, bei denen sie eine Kombination von PD-1 Antikörpern und CARs gegen HER2/neu gerichtet *in vitro* und im Mausmodell genutzt haben. Hierbei zeigte sich eine verbesserte Aktivierung und Proliferation von anti-HER2-Zellen und eine Wachstumshemmung von

HER2 positiven Tumoren. Des Weiteren wurde eine Reduktion von immunsuppressiven myeloiden Suppressorzellen (MDSCs) beschrieben. Insgesamt konnte also ein weniger immunfeindliches Milieu sowie eine verbesserte Zytotoxizität der CARs nachgewiesen werden [92]. Ein weiterer Effekt der Kombination beider Strategien ist die erhöhte Anzahl von T-Gedächtniszellen, welche nach Applikation von CAR T-Zellen mit Immuncheckpointinhibitor vom Körper gebildet werden und einen langfristigeren Antitumoreffekt nach sich ziehen [93]. Zur Zeit gibt es mehrere klinische Studien, welche eine Kombination von CARs und Immuncheckpoint Inhibitoren an verschiedenen Tumorentitäten untersuchen [91].

Eine andere Strategie besteht darin, die CARs selbst mit *scFv* der jeweiligen Antikörper auszustatten, welche dann vor Ort im Tumormilieu sezerniert werden können. Rafiq et al. zeigten, dass PD-L1 sezernierende CAR T-Zellen im Mausmodell mit Peritonealkarzinose und metastasiertem Ovarialkarzinom, ein längeres Überleben verursachen konnten als nur die klassischen CARs. Ebenfalls zeigten sie, dass sie sezernierten *scFv* nur dort nachgewiesen wurden, wo sie initial appliziert wurden und sie nicht systemisch verteilt wurden [94]. Dies könnte im Patienten hilfreich sein, um potenzielle systemische Nebenwirkungen und Autoimmunität abzuschwächen. Ebenfalls denkbar ist eine Vorgehensweise, bei denen die Checkpoints in den CAR T-Zellen gezielt ausgeschaltet werden. Dieses als *knock-out* bezeichnete Prinzip, beruht darauf, dass per *CRISPR/Cas9* gezielt Information bestimmter Gene ausgeschnitten werden kann, sodass das dazugehörige Protein nicht exprimiert werden kann. Rupp et al. generierten CARs mit einem *knock-out* gegen PD-1, um den Effekt auf PD-L1 positive Leukämiezellen zu untersuchen. Hierbei zeigte sich eine deutlich erhöhte Antitumor-Aktivität durch die CAR T-Zellen, welche PD-1 nicht mehr exprimierten, sowie ein längeres Überleben im Mausmodell [95]. Wie bereits zuvor beschrieben, sind diese Effekte jedoch nicht exakt auf solide Tumore übertragbar. In soliden Tumoren scheint eine Vorbehandlung des immunsuppressiven Milieus durch Zytokin-Priming eine Verbesserung der Zytotoxizität zu bewirken, beispielsweise durch vorherige Applikation von IL-7 und IL-15 [96].

Ein weiterer neuer Ansatzpunkt sind sogenannte Tandem-CARs: das sind CAR T-Zellen, die gegen zwei verschiedene Antigene gerichtet sind. Die Aktivierung der CARs erfolgt bereits, wenn eins der beiden Zielantigene gebunden wird. Dieser Ansatz ist unter anderem aus der Heterogenität der Antigenexpression von soliden Tumoren

entstanden. Beispielsweise kann somit durch Infusion einer Art von CAR T-Zellen nicht nur EGFR positive Zellen erfasst werden, sondern auch solche, die kein EGFR jedoch ein anderes Zielmolekül wie HER2/neu exprimieren. Klinische Studien, beispielsweise von Yang et. al. zeigen nicht nur eine gute Antitumoraktivität *in vitro* und in Tiermodellen, sondern auch, dass eine geringere Dosierung der T-Zellen möglich ist für die gleiche Antitumoraktivität [97]. Dies könnte wiederum potenziell bedeutsame systemische Nebenwirkungen eines Zielantigens verringern.

Zusammenfassend bedarf es in diesem Feld trotz der bislang weitreichenden und diskutierten Ansätze weitere Forschung, um eine potenzielle neue Therapieoption für Patienten, die auf konventionelle Optionen schlecht reagieren, zu entwickeln. Realistisch ist eine Kombination verschiedener Therapieansätze um eine zugeschnittene und wirkungsvolle Therapie für solide Tumoren, im besonderen Plattenepithelkarzinome, zu etablieren.

6 Literatur- und Quellenverzeichnis

- [1] Z. H. Siddik, „Cisplatin: Mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance“, *Oncogene*, Bd. 22, Nr. 47 REV. ISS. 6, S. 7265–7279, Okt. 2003, doi: 10.1038/SJ.ONC.1206933.
- [2] L. Galluzzi u. a., „Molecular mechanisms of cisplatin resistance“, 12. April 2012, *Oncogene*. doi: 10.1038/onc.2011.384.
- [3] P. Ranganath, L. Einhorn, und C. Albany, „Management of Chemotherapy Induced Nausea and Vomiting in Patients on Multiday Cisplatin Based Combination Chemotherapy“, 2015, doi: 10.1155/2015/943618.
- [4] G. L u. a., „Molecular mechanisms of cisplatin resistance“, *Oncogene*, Bd. 31, Nr. 15, S. 1869–1883, Apr. 2012, doi: 10.1038/ONC.2011.384.
- [5] J. D. McDermott und D. W. Bowles, „Epidemiology of Head and Neck Squamous Cell Carcinomas: Impact on Staging and Prevention Strategies“, *Curr Treat Options Oncol*, Bd. 20, Nr. 5, S. 43, Mai 2019, doi: 10.1007/s11864-019-0650-5.
- [6] C. Fitzmaurice u. a., „Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study Global Burden“, 1. April 2017, *American Medical Association*. doi: 10.1001/jamaoncol.2016.5688.
- [7] E. Du u. a., „Long-term Survival in Head and Neck Cancer: Impact of Site, Stage, Smoking, and Human Papillomavirus Status HHS Public Access“, *Laryngoscope*, Bd. 129, Nr. 11, S. 2506–2513, 2019, doi: 10.1002/lary.27807.
- [8] D. E. Johnson, B. Burtneß, C. R. Leemans, V. W. Y. Lui, J. E. Bauman, und J. R. Grandis, „Head and neck squamous cell carcinoma“, 1. Dezember 2020, *Nature Research*. doi: 10.1038/s41572-020-00224-3.
- [9] N. Kitamura, S. Sento, Y. Yoshizawa, E. Sasabe, Y. Kudo, und T. Yamamoto, „Current trends and future prospects of molecular targeted therapy in head and neck squamous cell carcinoma“, 1. Januar 2021, *MDPI AG*. doi: 10.3390/ijms22010240.
- [10] A. Pennathur, M. K. Gibson, B. A. Jobe, und J. D. Luketich, „Oesophageal carcinoma“, *The Lancet*, Bd. 381, Nr. 9864, S. 400–412, Feb. 2013, doi: 10.1016/S0140-6736(12)
- [11] Z. Yang, J. Liao, K. J. Cullen, und H. Dan, „Inhibition of IKK β /NF- κ B signaling pathway to improve Dasatinib efficacy in suppression of cisplatin-resistant head and neck squamous cell carcinoma.“, *Cell Death Discov*, Bd. 6, Nr. 1, S. 36, Dez. 2020, doi: 10.1038/s41420-020-0270-7.
- [12] E. M. Gosepath u. a., „Acquired cisplatin resistance in the head-neck cancer cell line Cal27 is associated with decreased DKK1 expression and can partially be reversed by overexpression of DKK1“, *Int J Cancer*, Bd. 123, Nr. 9, S. 2013–2019, Nov. 2008, doi: 10.1002/ijc.23721.
- [13] N. Kitamura, S. Sento, Y. Yoshizawa, E. Sasabe, Y. Kudo, und T. Yamamoto, „Current trends and future prospects of molecular targeted therapy in head and neck squamous cell carcinoma“, 1. Januar 2021, *MDPI AG*. doi: 10.3390/ijms22010240.
- [14] B. Burtneß u. a., „Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study“, *The*

- Lancet*, Bd. 394, Nr. 10212, S. 1915–1928, Nov. 2019, doi: 10.1016/S0140-6736(19)32591-7.
- [15] J. D. Schoenfeld *u. a.*, „Neoadjuvant Nivolumab or Nivolumab Plus Ipilimumab in Untreated Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma A Phase 2 Open-Label Randomized Clinical Trial“, *JAMA Oncol*, Bd. 6, Nr. 10, S. 1563–1570, 2020, doi: 10.1001/jamaoncol.2020.2955.
- [16] P. André *u. a.*, „Anti-NKG2A mAb Is a Checkpoint Inhibitor that Promotes Anti-tumor Immunity by Unleashing Both T and NK Cells“, *Cell*, Bd. 175, Nr. 7, S. 1731-1743.e13, Dez. 2018, doi: 10.1016/j.cell.2018.10.014.
- [17] V. Sibaud *u. a.*, „Dermatological adverse events with taxane chemotherapy“, 1. September 2016, *John Libbey Eurotext*. doi: 10.1684/ejd.2016.2833.
- [18] K.-M. Plachouri, E. Vryzaki, und S. Georgiou, „Cutaneous Adverse Events of Immune Checkpoint Inhibitors: A Summarized Overview“, *Curr Drug Saf*, Bd. 14, Nr. 1, S. 14–20, 2019, doi: 10.2174/1574886313666180730114309.
- [19] M. Sadelain, R. Brentjens, und I. Rivière, „The basic principles of chimeric antigen receptor design“, April 2013. doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0548.
- [20] H. R. Mirzaei, A. Rodriguez, J. Shepphird, C. E. Brown, und B. Badie, „Chimeric antigen receptors T cell therapy in solid tumor: Challenges and clinical applications“, 22. Dezember 2017, *Frontiers Media S.A.* doi: 10.3389/fimmu.2017.01850.
- [21] J. Li, W. Li, K. Huang, Y. Zhang, G. Kupfer, und Q. Zhao, „Chimeric antigen receptor T cell (CAR-T) immunotherapy for solid tumors: Lessons learned and strategies for moving forward“, *J Hematol Oncol*, Bd. 11, Nr. 1, 2018, doi: 10.1186/s13045-018-0568-6.
- [22] Y. Kagoya *u. a.*, „A novel chimeric antigen receptor containing a JAK-STAT signaling domain mediates superior antitumor effects Introductory paragraph“, doi: 10.1038/nm.4478.
- [23] F. L. Locke *u. a.*, „Long-term safety and activity of axicabtagene ciloleucel in refractory large B-cell lymphoma (ZUMA-1): a single-arm, multicentre, phase 1–2 trial“, *Lancet Oncol*, Bd. 20, Nr. 1, S. 31–42, 2019, doi: 10.1016/S1470-2045(18)30864-7.Long-term.
- [24] H. Chung, H. Jung, J.-Y. Noh, und A. Bartolazzi, „Emerging Approaches for Solid Tumor Treatment Using CAR-T Cell Therapy“, *Int J Mol Sci*, Bd. 22, Nr. 12126, 2021, doi: 10.3390/ijms222212126.
- [25] C. H. June und M. Sadelain, „Chimeric antigen receptor therapy“, *New England Journal of Medicine*, Bd. 379, Nr. 1, S. 64–73, 2018, doi: 10.1056/NEJMra1706169.
- [26] G. Garrido *u. a.*, „Bivalent binding by intermediate affinity of nimotuzumab: A contribution to explain antibody clinical profile“, *Cancer Biol Ther*, Bd. 373, Nr. 4, S. 373–382, 2011, doi: 10.4161/cbt.11.4.14097.
- [27] M. L. Schubert *u. a.*, „Side-effect management of chimeric antigen receptor (CAR) T-cell therapy“, *Ann Oncol*, Bd. 32, Nr. 1, S. 34–48, Jan. 2021, doi: 10.1016/J.ANNONC.2020.10.478.
- [28] M. Pan *u. a.*, „EpCAM ectodomain EpEX is a ligand of EGFR that counteracts EGF-mediated epithelial-mesenchymal transition through modulation of phospho-ERK1/2 in head and neck cancers“, 2018, doi: 10.1371/journal.pbio.2006624.
- [29] K. Watanabe, S. Kuramitsu, A. D. Posey, und C. H. June, „Expanding the therapeutic window for CAR T cell therapy in solid tumors: The knowns and

- unknowns of CAR T cell biology“, 26. Oktober 2018, *Frontiers Media S.A.* doi: 10.3389/fimmu.2018.02486.
- [30] K. Newick, S. O’Brien, E. Moon, und S. M. Albelda, „CAR T Cell Therapy for Solid Tumors“, *Annu Rev Med*, Bd. 68, Nr. 1, S. 139–152, Jan. 2017, doi: 10.1146/annurev-med-062315-120245.
- [31] M. Haigentz *u. a.*, „Phase II trial of the histone deacetylase inhibitor romidepsin in patients with recurrent/metastatic head and neck cancer“, *Oral Oncol*, Bd. 48, Nr. 12, S. 1281–1288, Dez. 2012, doi: 10.1016/j.oraloncology.2012.05.024.
- [32] C. L. Miranda Furtado, M. C. Dos Santos Luciano, R. Da Silva Santos, G. P. Furtado, M. O. Moraes, und C. Pessoa, „Epidrugs: targeting epigenetic marks in cancer treatment“, *Epigenetics*, Bd. 14, Nr. 12, S. 1164, Dez. 2019, doi: 10.1080/15592294.2019.1640546.
- [33] R. L. Bennett und J. D. Licht, „Targeting Epigenetics in Cancer“, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, Bd. 58, S. 187–207, Jan. 2018, doi: 10.1146/ANNUREV-PHARMTOX-010716-105106.
- [34] H. H. Chang, C. P. Chiang, H. C. Hung, C. Y. Lin, Y. T. Deng, und M. Y. P. Kuo, „Histone deacetylase 2 expression predicts poorer prognosis in oral cancer patients“, *Oral Oncol*, Bd. 45, Nr. 7, S. 610–614, Juli 2009, doi: 10.1016/j.oraloncology.2008.08.011.
- [35] A. C. West und R. W. Johnstone, „New and emerging HDAC inhibitors for cancer treatment“, 2. Januar 2014. doi: 10.1172/JCI69738.
- [36] P. Yu *u. a.*, „Augmented efficacy with the combination of blockade of the Notch-1 pathway, bortezomib and romidepsin in a murine MT-1 adult T-cell leukemia model“, *Leukemia*, Bd. 29, Nr. 3, S. 556–566, März 2015, doi: 10.1038/leu.2014.241.
- [37] W. J. Sun *u. a.*, „Romidepsin induces G2/M phase arrest via Erk/cdc25C/cdc2/cyclinB pathway and apoptosis induction through JNK/c-Jun/caspase3 pathway in hepatocellular carcinoma cells“, *Biochem Pharmacol*, Bd. 127, S. 90–100, März 2017, doi: 10.1016/j.bcp.2016.12.008.
- [38] J. Nie, L. Liu, X. Li, und W. Han, „Decitabine, a new star in epigenetic therapy: The clinical application and biological mechanism in solid tumors“, 1. November 2014, *Elsevier Ireland Ltd.* doi: 10.1016/j.canlet.2014.08.010.
- [39] W. J. Poh, C. P. P. Wee, und Z. Gao, „DNA methyltransferase activity assays: Advances and challenges“, 2016, *Ivyspring International Publisher.* doi: 10.7150/thno.13438.
- [40] R. S. Seelan, P. Mukhopadhyay, M. M. Pisano, und R. M. Greene, „Effects of 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine) on gene expression“, 3. April 2018, *Taylor and Francis Ltd.* doi: 10.1080/03602532.2018.1437446.
- [41] R. M. Glasspool *u. a.*, „A randomised, phase II trial of the DNA-hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in combination with carboplatin vs carboplatin alone in patients with recurrent, partially platinum-sensitive ovarian cancer“, *Br J Cancer*, Bd. 110, Nr. 8, S. 1923–1929, Apr. 2014, doi: 10.1038/bjc.2014.116.
- [42] C. T. Viet, D. Dang, S. Achdjian, Y. Ye, S. G. Katz, und B. L. Schmidt, „Decitabine rescues cisplatin resistance in head and neck squamous cell carcinoma e112880“, *PLoS One*, Bd. 9, Nr. 11, Nov. 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0112880.
- [43] H. Mochizuki, J. P. Schwartz, K. Tanaka, R. O. Brady, und J. Reiser, „High-titer human immunodeficiency virus type 1-based vector systems for gene delivery

- into nondividing cells“, *J Virol*, Bd. 72, Nr. 11, S. 8873–8883, Nov. 1998, doi: 10.1128/JVI.72.11.8873-8883.1998.
- [44] T. Pietschmann, M. Heinkelein, M. Heldmann, H. Zentgraf, A. Rethwilm, und D. Lindemann, „Foamy virus capsids require the cognate envelope protein for particle export“, *J Virol*, Bd. 73, Nr. 4, S. 2613–2621, Apr. 1999, doi: 10.1128/JVI.73.4.2613-2621.1999.
- [45] A. A. Stepanenko und V. V. Dmitrenko, „HEK293 in cell biology and cancer research: phenotype, karyotype, tumorigenicity, and stress-induced genome-phenotype evolution“, *Gene*, Bd. 569, Nr. 2, S. 182–190, Sep. 2015, doi: 10.1016/J.GENE.2015.05.065.
- [46] T. K. Hoffmann *u. a.*, „Alterations in the p53 pathway and their association with radio- and chemosensitivity in head and neck squamous cell carcinoma“, *Oral Oncol*, Bd. 44, Nr. 12, S. 1100–1109, Dez. 2008, doi: 10.1016/J.ORALONCOLOGY.2008.02.006.
- [47] C. R. Bradford, S. E. Zacks, E. J. Androphy, L. Gregoire, W. D. Lancaster, und T. E. Carey, „Human papillomavirus DNA sequences in cell lines derived from head and neck squamous cell carcinomas“, *Otolaryngol Head Neck Surg*, Bd. 104, Nr. 3, S. 303–310, 1991, doi: 10.1177/019459989110400304.
- [48] H. M. Walline *u. a.*, „Integration of High-Risk Human Papillomavirus into Cellular Cancer-Related Genes in Head and Neck Cancer Cell Lines“, *Head Neck*, Bd. 39, Nr. 5, S. 840, Mai 2017, doi: 10.1002/HED.24729.
- [49] J. Gioanni *u. a.*, „Characterization of a new surface epitope specific for human epithelial cells defined by a monoclonal antibody and application to tumor diagnosis - PubMed“, *Cancer Res*, Nr. 47(16), S. 4417–4424, Aug. 1987, Zugegriffen: 25. März 2025. [Online]. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2440566/>
- [50] Y. Shimada, M. Imamura, T. Wagata, N. Yamaguchi, und T. Tobe, „Characterization of 21 newly established esophageal cancer cell lines - PubMed“, *Cancer*, Bd. 69(2), S. 277–284, Jan. 1992, Zugegriffen: 25. März 2025. [Online]. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1728357/>
- [51] C. J. Marshall, L. M. Franks, und A. W. Carbonell, „Markers of neoplastic transformation in epithelial cell lines derived from human carcinomas“, *J Natl Cancer Inst*, Bd. 58, Nr. 6, S. 1743–1751, 1977, doi: 10.1093/JNCI/58.6.1743.
- [52] J. Fogh, J. M. Fogh, und T. Orfeo, „One Hundred and Twenty-Seven Cultured Human Tumor Cell Lines Producing Tumors in Nude Mice“, *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, Bd. 59, Nr. 1, S. 221–226, Juli 1977, doi: 10.1093/JNCI/59.1.221.
- [53] R. Buick, R. Pullano, und J. Trent, „Comparative properties of five human ovarian adenocarcinoma cell lines - PubMed“, *Cancer Res*, Nr. 45(8), S. 3668–3876, Aug. 1985, Zugegriffen: 25. März 2025. [Online]. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4016745/>
- [54] T. Tsuruo, T. Hamilton, K. Louie, B. Behrens, R. Young, und R. Ozols, „Collateral susceptibility of adriamycin-, melphalan- and cisplatin-resistant human ovarian tumor cells to bleomycin - PubMed“, *Jpn J Cancer Res*, Nr. 77(9), Sep. 1986, Zugegriffen: 25. März 2025. [Online]. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2429947/>
- [55] D. Provencher *u. a.*, „Characterization of four novel epithelial ovarian cancer cell lines - PubMed“, *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, Nr. 36(6), S. 357–361, Juni 2000, Zugegriffen: 25. März 2025. [Online]. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10949993/>

- [56] C. R. Leemans, B. J. M. Braakhuis, und R. H. Brakenhoff, „The molecular biology of head and neck cancer“, *Nat Rev Cancer*, Bd. 11, Nr. 1, S. 9–22, Jan. 2011, doi: 10.1038/NRC2982.
- [57] M. Pan u. a., „EpCAM ectodomain EpEX is a ligand of EGFR that counteracts EGF-mediated epithelial-mesenchymal transition through modulation of phospho-ERK1/2 in head and neck cancers“, *PLoS Biol*, Bd. 16, Nr. 9, Sep. 2018, doi: 10.1371/journal.pbio.2006624.
- [58] A. W. Burgess, „EGFR family: Structure physiology signalling and therapeutic target“, *Growth Factors*, Bd. 26, Nr. 5, S. 263–274, 2008, doi: 10.1080/08977190802312844.
- [59] J. C. Sok u. a., „Mutant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII) contributes to head and neck cancer growth and resistance to EGFR targeting.“, *Clin Cancer Res*, Bd. 12, Nr. 17, S. 5064–73, Sep. 2006, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0913.
- [60] Y. Yarden und M. X. Sliwkowski, „Untangling the ErbB signalling network“, *Nat Rev Mol Cell Biol*, Bd. 2, Nr. 2, S. 127–137, Feb. 2001, doi: 10.1038/35052073.
- [61] D. A. Sabbah, R. Hajjo, und K. Sweidan, „Review on Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Structure, Signaling Pathways, Interactions, and Recent Updates of EGFR Inhibitors“, *Curr Top Med Chem*, Bd. 20, Nr. 10, S. 815–834, 2020, doi: 10.2174/1568026620666200303123102.
- [62] J. A. Bonner u. a., „Radiotherapy plus Cetuximab for Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck“, *New England Journal of Medicine*, Bd. 354, Nr. 6, S. 567–578, Feb. 2006, doi: 10.1056/NEJMoa053422.
- [63] S. Wheeler u. a., „Tumor epidermal growth factor receptor and EGFR PY1068 are independent prognostic indicators for head and neck squamous cell carcinoma.“, *Clin Cancer Res*, Bd. 18, Nr. 8, S. 2278–89, Apr. 2012, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1593.
- [64] B. Homey u. a., „Escalating therapy of cutaneous side effects of EGFR inhibitors: Experience of German reference centers“, *JDDG - Journal of the German Society of Dermatology*, Bd. 10, Nr. 8, S. 559–562, 2012, doi: 10.1111/j.1610-0387.2012.07948.x.
- [65] C. Haist u. a., „Engineering a single-chain variable fragment of cetuximab for CAR T-cell therapy against head and neck squamous cell carcinomas“, *Oral Oncol*, Bd. 129, Nr. August 2021, S. 105867, 2022, doi: 10.1016/j.oraloncology.2022.105867.
- [66] L. A. Johnson u. a., „Rational development and characterization of humanized anti-EGFR variant III chimeric antigen receptor T cells for glioblastoma“, *Sci Transl Med*, Bd. 7, Nr. 275, Feb. 2015, doi: 10.1126/SCITRANSLMED.AAA4963.
- [67] S. S. Bullain u. a., „Genetically engineered T cells to target EGFRvIII expressing glioblastoma“, *J Neurooncol*, Bd. 94, Nr. 3, S. 373–382, 2009, doi: 10.1007/s11060-009-9889-1.
- [68] Z. Zhang u. a., „Chimeric antigen receptor T cell targeting EGFRvIII for metastatic lung cancer therapy.“, *Front Med*, Bd. 13, Nr. 1, S. 57–68, Feb. 2019, doi: 10.1007/s11684-019-0683-y.
- [69] D. M. O’Rourke u. a., „A single dose of peripherally infused EGFRvIII-directed CAR T cells mediates antigen loss and induces adaptive resistance in patients with recurrent glioblastoma“, *Sci Transl Med*, Bd. 9, Nr. 399, Juli 2017, doi: 10.1126/

- [70] C. H. June, R. S. O'Connor, O. U. Kawalekar, S. Ghassemi, und M. C. Milone, „CAR T cell immunotherapy for human cancer“, *Science (1979)*, Bd. 359, Nr. 6382, S. 1361–1365, 2018, doi: 10.1126/science.aar6711.
- [71] P. T. Went *u. a.*, „Frequent EpCam protein expression in human carcinomas“, *Hum Pathol*, Bd. 35, Nr. 1, S. 122–128, Jan. 2004, doi: 10.1016/J.HUMPATH.2003.08.026.
- [72] M. Munz, P. A. Baeuerle, und O. Gires, „The Emerging Role of EpCAM in Cancer and Stem Cell Signaling“, *Cancer Res*, Bd. 69, Nr. 14, S. 5627–5629, Juli 2009, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0654.
- [73] B. L. Zhang *u. a.*, „Preclinical Evaluation of Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells Specific to Epithelial Cell Adhesion Molecule for Treating Colorectal Cancer“, *Hum Gene Ther*, Bd. 30, Nr. 4, S. 402–412, Apr. 2019, doi: 10.1089/HUM.2018.229.
- [74] K. Schulze *u. a.*, „Presence of EpCAM-positive circulating tumor cells as biomarker for systemic disease strongly correlates to survival in patients with hepatocellular carcinoma“, *Int J Cancer*, Bd. 133, Nr. 9, S. 2165–2171, Nov. 2013, doi: 10.1002/IJC.28230.
- [75] C. J. Punt *u. a.*, „Edrecolomab alone or in combination with fluorouracil and folinic acid in the adjuvant treatment of stage III colon cancer: a randomised study“, *The Lancet*, Bd. 360, Nr. 9334, S. 671–677, Aug. 2002, doi: 10.1016/S0140-6736(02)09836-7.
- [76] H. Corinna *u. a.*, „CD44v6-targeted CAR T-cells specifically eliminate CD44 isoform 6 expressing head/neck squamous cell carcinoma cells“, *Oral Oncol*, Bd. accepted, Nr. December 2020, S. 105259, 2021, doi: 10.1016/j.oraloncology.2021.105259.
- [77] M. A. Skowron *u. a.*, „Distinctive mutational spectrum and karyotype disruption in long-term cisplatin-treated urothelial carcinoma cell lines“, *Sci Rep*, Bd. 9, Nr. 14476, 2019, doi: 10.1038/s41598-019-50891-w.
- [78] M. Kool *u. a.*, „Analysis of Expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, Homologues of the Multidrug Resistance-associated Protein Gene (MRP1), in Human Cancer Cell Lines“, *Cancer Res*, Bd. 57, Nr. 16, 1997.
- [79] R. Castilho, C. Squarize, und L. Almeida, „Epigenetic Modifications and Head and Neck Cancer: Implications for Tumor Progression and Resistance to Therapy“, *Int J Mol Sci*, Bd. 18, Nr. 7, S. 1506, Juli 2017, doi: 10.3390/ijms18071506.
- [80] H. M. Knochelmann, A. S. Smith, C. J. Dwyer, M. M. Wyatt, S. Mehrotra, und C. M. Paulos, „CAR T Cells in Solid Tumors: Blueprints for Building Effective Therapies“, 2018, *NLM (Medline)*. doi: 10.3389/fimmu.2018.01740.
- [81] Y. Han, B. Sun, H. Cai, und Y. Xuan, „Simultaneously target of normal and stem cells-like gastric cancer cells via cisplatin and anti-CD133 CAR-T combination therapy“, *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2021, doi: 10.1007/s00262-021-02891-x.
- [82] D. Hanahan und R. A. Weinberg, „Hallmarks of cancer: the next generation“, *Cell*, Bd. 144, Nr. 5, S. 646–674, März 2011, doi: 10.1016/J.CELL.2011.02.013.
- [83] K. B. Chiappinelli, C. A. Zahnow, N. Ahuja, und S. B. Baylin, „Combining Epigenetic and Immunotherapy to Combat Cancer“, *Cancer Res*, Bd. 76, Nr. 7, S. 1683–1689, Apr. 2016, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-2125.
- [84] M. Al-Salihi, M. Yu, D. M. Burnett, A. Alexander, W. Samlowski, und F. A. Fitzpatrick, „The depletion of DNA methyltransferase-1 and the epigenetic effects of 5-aza-2'deoxyctidine (decitabine) are differentially regulated by cell

- cycle progression“, *Epigenetics*, Bd. 6, Nr. 8, S. 1021–1028, 2011, doi: 10.4161/EPI.6.8.16064.
- [85] K. B. Chiappinelli, P. L. Strissel, A. Desrichard, T. A. Chan, S. B. Baylin, und R. Strick, „Inhibiting DNA Methylation Causes an Interferon Response in Cancer via dsRNA Including Endogenous Retroviruses“, *Cell*, Bd. 162, Nr. 5, S. 974–986, Aug. 2015, doi: 10.1016/J.CELL.2015.07.011.
- [86] A. Newbold, R. K. Lindemann, L. A. Cluse, K. F. Whitecross, A. E. Dear, und R. W. Johnstone, „Characterisation of the novel apoptotic and therapeutic activities of the histone deacetylase inhibitor romidepsin“, *Mol Cancer Ther*, Bd. 7, Nr. 5, S. 1066–79, 2008, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-07-2256.
- [87] R. P. Whitehead u. a., „Phase II Trial of Depsipeptide (NSC-630176) in Previously Treated Colorectal Cancer Patients with Advanced Disease: A Southwest Oncology Group Study (S0336)“, *Invest New Drugs*, Bd. 27, S. 469–475, 2009, doi: 10.1007/s10637-008-9190-8.
- [88] L. R. Molife u. a., „Phase II, two-stage, single-arm trial of the histone deacetylase inhibitor (HDACi) romidepsin in metastatic castration-resistant prostate cancer (CRPC)“, *Annals of oncology*, Bd. 21, Nr. 1, S. 109–113, Juli 2010, doi: 10.1093/ANNONC/MDP270.
- [89] D. Siegel u. a., „Vorinostat in solid and hematologic malignancies“, *J Hematol Oncol*, 2009, doi: 10.1186/1756-8722-2-31.
- [90] G. R. Blumenschein u. a., „Phase II trial of the histone deacetylase inhibitor vorinostat (Zolinza, suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) in patients with recurrent and/or metastatic head and neck cancer“, *Invest New Drugs*, Bd. 26, Nr. 1, S. 81–87, Feb. 2008, doi: 10.1007/S10637-007-9075-2.
- [91] F. Huemer u. a., „Combination Strategies for Immune-Checkpoint Blockade and Response Prediction by Artificial Intelligence“, *Int J Mol Sci*, Bd. 21, Nr. 8, Apr. 2020, doi: 10.3390/IJMS21082856.
- [92] L. B. John u. a., „Anti-PD-1 antibody therapy potently enhances the eradication of established tumors by gene-modified T cells“, *Clinical Cancer Research*, Bd. 19, Nr. 20, S. 5636–5646, Okt. 2013, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0458.
- [93] C. Chen u. a., „Construction of PD1/CD28 chimeric-switch receptor enhances anti-tumor ability of c-Met CAR-T in gastric cancer“, *Oncology*, Bd. 10, Nr. 1, 2021, doi: 10.1080/2162402X.2021.1901434.
- [94] S. Rafiq u. a., „Targeted delivery of a PD-1-blocking scFv by CAR-T cells enhances anti-tumor efficacy in vivo“, *Nat Biotechnol*, Bd. 36, Nr. 9, S. 847–858, Okt. 2018, doi: 10.1038/NBT.4195.
- [95] L. J. Rupp u. a., „CRISPR/Cas9-mediated PD-1 disruption enhances anti-tumor efficacy of human chimeric antigen receptor T cells“, *Sci Rep*, Bd. 7, Nr. 1, Dez. 2017, doi: 10.1038/S41598-017-00462-8.
- [96] L. Giuffrida u. a., „IL-15 Preconditioning Augments CAR T Cell Responses to Checkpoint Blockade for Improved Treatment of Solid Tumors“, *Molecular Therapy*, Bd. 28, Nr. 11, S. 2379–2393, Nov. 2020, doi: 10.1016/J.YMTHE.2020.07.018.
- [97] M. Yang u. a., „Tandem CAR-T cells targeting CD70 and B7-H3 exhibit potent preclinical activity against multiple solid tumors“, *Theranostics*, Bd. 10, Nr. 17, S. 7622, 2020, doi: 10.7150/THNO.43991.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Evolution von CAR-Generationen..	6
Abbildung 2: Aufreinigung von CAR positiven T-Zellen.....	29
Abbildung 3: Zytotoxizität des EGFR CAR Konstruktes Ctx _{small} auf Zelllinien verschiedener Entitäten.....	31
Abbildung 4: Zytotoxizität des EGFR CAR Konstruktes Ctx _{small} auf HNSCC (UM10B, UM14C, UT24A, UM11B, UM17A)	32
Abbildung 5: Dosiswirkungskurve von HNSCC Zelllinien nach Behandlung mit Romidepsin	34
Abbildung 6: Dosiswirkungskurve von HNSCC Zelllinien nach Behandlung mit Decitabine	35
Abbildung 7: Zytotoxizität verschiedener CAR Konstrukte auf den HNSCC Zelllinien UM74A und UM14C.....	37
Abbildung 8: Zytotoxizität verschiedener CAR Konstrukte auf den HNSCC Zelllinien UM104 und UT33.....	39
Abbildung 9: Zytotoxizität verschiedener CAR Konstrukte auf den Zelllinien HNSCC UM11B und UT24A.	41
Abbildung 10: Zytotoxizität verschiedener CAR Konstrukten auf den Cisplatin- sensitiven und Cisplatin-resistenten Zelllinien J82 und RT112.	45
Abbildung 11: Zytotoxizität verschiedener CAR Konstrukten auf den Cisplatin- sensitiven und Cisplatin-resistenten Zelllinien Cal27 und Kyse510.....	47
Abbildung 12: Zytotoxizität verschiedener CAR Konstrukten auf den Cisplatin- resistenten Zelllinien TOV112D, TOV21G, Hey, CAO3, A2780 und OV90.....	50
Abbildung 13: Expression von EpCam auf Zelllinien verschiedener Entitäten.	52
Abbildung 14: Design des EpCAM CAR.....	53
Abbildung 15: Aufreinigung von EpCAM317 und EpCAM1464-CAR positiven T- Zellen sowie der Kontrolle mit CD19.....	54
Abbildung 16: Zytotoxizität der EpCAM CAR Konstrukte.....	55

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Kits und Längenstandard	12
Tabelle 2: Plasmide und Vektoren.....	13
Tabelle 3: Zelllinien.....	15
Tabelle 4: Antikörper.....	16
Tabelle 5: Lösungen/Puffer	16
Tabelle 6: Epigenetische Inhibitoren	18
Tabelle 7: Geräte.....	18
Tabelle 8: Software.....	18
Tabelle 9: Inkubationsanweisung Antikörper FACS.....	27
Tabelle 10: Behandlungsschema Romidepsin	34

8 Danksagung

Vielen Dank an Herrn Prof. Jörg Schipper zur Aufnahme als Doktorandin in seine Klinik. Ebenfalls danke ich Herrn Prof. Martin Wagenmann zur Bereitstellung seines Forschungslabores.

Ein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Kathrin Scheckenbach für die langjährige Betreuung. Ebenso gilt mein Dank der gesamten Arbeitsgruppe des Forschungslabores der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde für die Aufnahme in ihr Team, für die Vermittlung dieses spannenden Projektes und Unterstützung über die gesamte Zeit meiner Promotion. Ich danke dem Forschungslabor der Urologie für die Zusammenarbeit sowie Frau Dr. Carolin König für die schönen Versuche, die wir zusammen gemeistert haben.

Herrn Prof. Matthias Kassack danke ich, dass neben einer Kooperation unserer Arbeitsgruppen mit neuen Forschungsansätzen für meine Arbeit ebenfalls eine wertvolle Zweitbetreuung entstanden ist.

Ich bedanke mich bei allen Blutspendern, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Zuletzt möchte ich besonders meiner Familie danken, der diese Dissertation gewidmet ist. Meine Eltern Sabine und Norbert, mein Bruder Joshua und meine Großeltern gaben mir die Voraussetzungen um es hierhin zu schaffen und haben mich auf jedem Stück meines Weges uneingeschränkt unterstützt. Vielen Dank, dass ihr womöglich noch mehr Stolz empfindet als ich.