

Eine reduzierte Expression von IRF4 erhöht die Antigenempfindlichkeit und funktionelle Persistenz von CAR-T-Zellen



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTOGRADES DER
NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.) DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND
VORKLINISCHE MEDIZIN DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von

Dennis Christoph Harrer

aus

Boston, USA

Im Jahr

2025

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am:

22.09.2025

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. Philipp Beckhove, Prof. Dr. Hinrich Abken

Unterschrift:

DANKSAGUNG

Ich möchte Prof. Dr. Hinrich Abken für seinen Rat und seine wissenschaftliche Unterstützung während meiner Doktorarbeit danken. Seine lebenslange Erfahrung auf dem Gebiet der CAR-T-Zellen hat mir unschätzbar wertvolles Wissen und Verständnis vermittelt.

Ich möchte Prof. Dr. Wolfgang Herr für seine stetige Unterstützung auf diesem Weg danken.

Ich möchte meinen Kollegen aus der AG Abken und dem gesamten LIT für die große Hilfe, wissenschaftliche Unterstützung, aber vor allem für das großartige Arbeitsumfeld danken.

Ich möchte Prof. Dr. Philipp Beckhove für sein wissenschaftliches Mentoring während meiner Doktorarbeit danken.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Zelltherapie mit synthetischen Chimären-Antigenrezeptor-T-Zellen (CAR-T-Zellen) konnte bei Patienten mit fortgeschrittenen chemorefraktären hämatologischen Neoplasien langanhaltende Komplettremissionen induzieren. Leider erleiden jedoch mehr als die Hälfte aller behandelten Patienten einen Krankheitsrückfall. Ferner ist bei Patienten mit soliden Tumoren die Wirksamkeit der CAR-T-Zellen bisher begrenzt. Zu den größten Hindernissen für den langfristigen Erfolg der Therapie mit CAR-T-Zellen gehören die funktionelle Erschöpfung der CAR-T-Zellen und die Herunterregulierung von CAR-Zielantigenen auf Tumorzellen. In diesem Zusammenhang wurde der Transkriptionsfaktor Interferon Regulatory Factor 4 (IRF4) zuvor als wichtiger Faktor bei der funktionellen Erschöpfung von T-Zellen identifiziert. Um die Funktionalität von CAR-T-Zellen zu verbessern, haben wir die IRF4-Expression in CEA-spezifischen CAR-T-Zellen mithilfe von Short-Hairpin (sh)-RNA-vermittelter Gen-Interferenz herunterreguliert. Dennoch zeigen die CAR-T-Zellen mit IRF4-Herunterregulierung im Vergleich zu herkömmlichen CAR-T-Zellen die gleiche Zytotoxizität, IFN γ -Sekretion und IL-2-Sekretion. Allerdings offenbarten CAR-T-Zellen mit IRF4-Herunterregulierung in einem repetitiven in-vitro-Antigenstimulationsmodell, das auf BxPC-3-Pankreaskarzinomzellen als Zielzellen basiert, eine verbesserte Tumorzellkontrolle. Mechanistisch gesehen zeigten CAR-T-Zellen mit IRF4-Herunterregulierung eine Hochregulierung von CD27, dessen Expression auf CAR-T-Zellen mit einer verbesserten Funktionalität und gedächtnisähnlichen Eigenschaften in Verbindung gebracht wurde. Schließlich offenbarten CAR-T-Zellen mit IRF4-Herunterregulierung eine verstärkte Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen mit geringer CEA-Expression, was eine Erhöhung der Antigenempfindlichkeit zeigt. Basierend auf unseren Daten nehmen wir an, dass die CAR T-zellen mit Herunterregulierung von IRF4 eine therapeutische Bedeutung erlangen könnten, wenn die Sensitivität gegenüber Tumorzellen mit geringer Antigenlast erhöht und eine hinreichende anti-Tumor Aktivität erzielt werden soll.

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|----|
| DANKSAGUNG | 2 |
| ZUSAMMENFASSUNG | 3 |
| INHALTSVERZEICHNIS..... | 4 |
| ABBILDUNGSVERZEICHNIS..... | 7 |
| TABELLENVERZEICHNIS | 8 |
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | 9 |
| 1 EINLEITUNG | 11 |
| 1.1 Therapie mit Chimären-Antigenrezeptor (CAR) modifizierten-T-Zellen..... | 11 |
| 1.2 Aktuelle Herausforderungen der CAR-T-Zell Therapie | 13 |
| 1.3 Antigensensitivität von CAR-T-Zellen | 15 |
| 1.4 CAR-T-Zell Erschöpfung | 16 |
| 1.5 Potentere CAR-T-Zellen durch shRNA-Interferenz | 17 |
| 1.6 Interferon Regulatory Factor 4 (IRF4)..... | 18 |
| 1.7 CAR-T-Zellen mit kalibrierter IRF4-Expression | 20 |
| 1.8 Ziele | 21 |
| 2 MATERIAL..... | 23 |
| 2.1 Chemikalien und Reagenzien..... | 23 |
| 2.2 Kits..... | 24 |
| 2.3 Zellkulturmedia | 24 |
| 2.4 Puffer | 24 |
| 2.5 Antikörper | 25 |
| 2.5.1 Unkonjugierte Antikörper | 25 |
| 2.5.2 Konjugierte Antikörper..... | 25 |
| 2.6 Zytokine | 26 |
| 2.7 Plasmidvektoren..... | 27 |
| 2.8 Bakterienstämme | 28 |
| 2.9 Zelllinien..... | 28 |
| 2.10 Primäre Zellen..... | 28 |
| 2.11 Software..... | 29 |
| 3 METHODEN..... | 30 |
| 3.1 Bakterien..... | 30 |
| 3.1.1 Bakterienkultur..... | 30 |
| 3.1.2 Transformation von Bakterien..... | 30 |

| | |
|--|----|
| 3.2 Arbeiten mit DNA | 30 |
| 3.2.1 Plasmid-Aufreinigung | 30 |
| 3.2.2 Messung von DNA | 31 |
| 3.3 Zellkultur | 31 |
| 3.3.1 Konditionen | 31 |
| 3.3.2 Passagierung von adhärenenten Zellen | 31 |
| 3.3.3 Auftauen und Einfrieren von Zellen | 31 |
| 3.3.4 Zellzählung | 32 |
| 3.3.5 Isolierung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMZs) | 32 |
| 3.3.6 Transfektion von HEK 293T Zellen | 32 |
| 3.3.7 Retrovirale Transduktion von human T-Zellen | 32 |
| 3.3.8 Durchflusszytometrie (FACS) | 33 |
| 3.3.9 Western Blot | 33 |
| 3.4 Assays | 33 |
| 3.4.1 Zytokinsekretion | 33 |
| 3.4.2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) | 34 |
| 3.4.3 Phycoerythrin QuantiBRITE Antigendichte-Quantifizierungsassay | 34 |
| 3.4.4 CD107a Degranulations Assay | 34 |
| 3.4.5 Zytotoxizitäts Assay | 35 |
| 3.4.6 Repetitiver Stimulations Assay | 35 |
| 4 ERGEBNISSE | 36 |
| 4.1 Entwicklung von CAR-T-Zellen mit reduzierter IRF4-Expression | 36 |
| 4.1.1 T-Zellen zeigen eine Hochregulierung von IRF4 nach Aktivierung | 36 |
| 4.1.2 CAR-T-Zellen ausgestattet mit einer IRF4-spezifischen shRNA weisen eine stabile CAR-Expression auf | 37 |
| 4.1.3 Herunterregulierung der IRF4-Expression in CAR-T-Zellen | 38 |
| 4.2 Die Herunterregulierung von IRF4 hat keinen negativen Einfluss auf die Funktionalität von CAR-T-Zellen | 40 |
| 4.2.1 Zytotoxizität von CAR-T-Zellen mit reduzierter IRF4-Expression | 40 |
| 4.2.2 Zytokinsekretion von CAR-T-Zellen mit reduzierter IRF4-Expression | 40 |
| 4.3 Die Herunterregulierung von IRF4 verbessert die Aktivität von CAR-T-Zellen in einem in vitro- Stress Test unter repetitiven Stimulationsbedingungen | 41 |
| 4.3.1 Eine reduzierte Expression von IRF4 steigert die Tumorkontrolle von CAR-T-Zellen während einer wiederholten Stimulation mit Tumorzellen | 41 |
| 4.3.2 Expression von Markern assoziiert mit funktioneller Erschöpfung von CAR-T-Zellen unter repetitiver Stimulation | 43 |

| | |
|--|----|
| 4.3.3 Charakterisierung der Effektor-Gedächtnis-T-Zell Differenzierung von CAR-T-Zellen unter repetitiver Stimulation | 44 |
| 4.3.4 Expression von kostimulatorischen Markern auf CAR-T-Zellen unter repetitiver Stimulation | 46 |
| 4.3.5 Expression von kostimulatorischen Liganden auf BxPC-3 Zellen | 47 |
| 4.3.6 Eine reduzierte Expression von IRF4 unterhält die Zytotoxizität von CAR-T-Zellen unter repetitiver Stimulation mit Tumorzellen | 48 |
| 4.4 Die Herunterregulierung von IRF4 erhöht die Antigensensitivität von CAR-T-Zellen | 49 |
| 4.4.1 Quantitative Bestimmung der Antigendichte von CEA auf MIA PaCa-2 Zellen..... | 49 |
| 4.4.2 Die Herunterregulierung von IRF4 ermöglicht die Abtötung von Zielen mit geringer Antigendichte | 50 |
| 4.4.3 Die Herunterregulierung von IRF4 ermöglicht eine Zytokinantwort gegen Ziele mit geringer Antigendichte..... | 52 |
| 4.4.4 Die Herunterregulierung von IRF4 erhöht die Expression von Mediatoren des IL-2 Signalweges..... | 53 |
| 4.4.5 Die Herunterregulierung von IRF4 erniedrigt die Schwelle für die antigenspezifische Aktivierung von CAR-T-Zellen | 54 |
| 5 DISKUSSION | 55 |
| 6 ANHANG | 59 |
| 6.1 BW_hFC_CD28_CD3z_mir30_shKanamycin (#2374) | 60 |
| 6.2 BW_hFC_CD28_CD3z_mir30_shIRF4_1 (#2439)..... | 63 |
| 6.3 BW_hFC_CD28_CD3z_mir30_shIRF4_2 (#2440)..... | 66 |
| 7 REFERENZEN | 69 |

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| | |
|--|----|
| Abbildung 1. Schematische Darstellung der CAR-T-Zell Therapie. | 12 |
| Abbildung 2. Schematische Darstellung der Herausforderungen der CAR-T-Zell Therapie. | 14 |
| Abbildung 3. Untransduzierte T-Zellen und CAR-T-Zellen zeigen eine Hochregulierung von IRF4 nach TZR/CD28 Stimulation. | 37 |
| Abbildung 4. CAR-T-Zellen ausgestattet mit einer IRF4-spezifischen shRNA weisen eine gleichermaßen hohe CAR-Expression auf. | 38 |
| Abbildung 5. Reduktion der IRF4-Expression in CAR-T-Zellen. | 39 |
| Abbildung 6. Zytotoxizität von CAR-T-Zellen mit reduzierter IRF4-Expression. | 40 |
| Abbildung 7. Zytokinsekretion von CAR-T-Zellen mit reduzierter IRF4-Expression. | 41 |
| Abbildung 8. Eine reduzierte Expression von IRF4 steigert die Tumorkontrolle von CAR-T-Zellen. . | 42 |
| Abbildung 9. Expression von Markern assoziiert mit funktioneller Erschöpfung von CAR-T-Zellen unter repetitiver Stimulation. | 44 |
| Abbildung 10. Effektor-Gedächtnis-T-Zell Differenzierung von CAR-T-Zellen unter repetitiver Stimulation. | 45 |
| Abbildung 11. Expression von kostimulatorischen Markern auf CAR-T-Zellen unter repetitiver Stimulation. | 46 |
| Abbildung 12. Expression von kostimulatorischen Liganden auf BxPC-3 Zellen. | 47 |
| Abbildung 13. Messung der Degranulation von CAR-T-Zellen nach repetitiver Stimulation. | 48 |
| Abbildung 14. Messung der Antigendichte von CEA auf MIA PaCa-2 Zellen. | 49 |
| Abbildung 15. Messung der Zytotoxizität von CAR-T-Zellen gegen MIA PaCa-2 Zellen. | 51 |
| Abbildung 16. Messung der Zytokinantwort von CAR-T-Zellen gegen MIA PaCa-2 Zellen. | 52 |
| Abbildung 17. Färbung auf Mediatoren des IL-2 Signalweges. | 53 |
| Abbildung 18. Titration der antigenspezifischen Aktivierungsschwelle von CAR-T-Zellen. | 54 |

TABELLENVERZEICHNIS

| | |
|--|-----------|
| Tabelle 1. Vielfältige Funktionen von IRF4 in T-Zellen..... | 20 |
| Tabelle 2. Chemikalien und Reagenzien..... | 23 |
| Tabelle 3. Kits | 24 |
| Tabelle 4. Zellkulturmedien | 24 |
| Tabelle 5. Puffer | 24 |
| Tabelle 6. Unkonjugierte Antikörper..... | 25 |
| Tabelle 7. Konjugierte Antikörper | 25 |
| Tabelle 8. Zytokine | 26 |
| Tabelle 9. Plasmidvektoren..... | 27 |
| Tabelle 10. Bakterienstämme..... | 28 |
| Tabelle 11. Zelllinien | 28 |
| Tabelle 12. Software | 29 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|-------------------------------|---|
| 4-1BB | Mitglied der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie (CD137) |
| 4-1BBL | Ligand von 4-1BB |
| ABTS | 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazolinsulfonsäure) |
| ALL | Akute lymphatische Leukämie |
| Amp | Ampicillin |
| AP-1 | Aktivator Protein-1 |
| APC | Allophycocyanin |
| ATAC | Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing |
| ATCC | American type culture collection |
| BATF | Basic leucine zipper Transkriptionsfaktor |
| BCL-6 | B-Zell-Lymphom 6 |
| BCMA | B-cell maturation antigen, CD269 |
| BLIMP-1 | B-Lymphozyten-induziertes-Reifungsprotein-1 |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| BV421 | Brilliant Violet 421 |
| BV605 | Brilliant Violet 605 |
| CAR | Chimärer Antigenrezeptor |
| CD | Cluster of differentiation |
| CMV | Cytomegalievirus |
| CEA | Carcinoembryonales Antigen |
| CRS | Zytokin-Freisetzungssyndrom |
| CSPG4 | Chondroitinsulfat Proteoglycan-4 |
| DMEM | Dubecco's Modified Eagles Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| E. coli | Escherichia coli |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EMA | European Medicines Agency |
| FACS | Fluorescence-activated cell sorting |
| FCS | Fetales Kälberserum |
| FDA | Food and Drug Administration |
| FITC | Fluorescein Isothiocyanat |
| FL | Follikuläres Lymphom |
| GFP | Grün fluoreszierendes Protein |
| g | Erdbeschleunigung |
| GALV | Gammaretrovirales Hüllprotein |
| H2O_{dd} | Deionisiertes Wasser |
| HEK | Human Embryonic Kidney (Zelllinie) |
| HEPES | 4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl-Ethansulfonsäure |
| HER2 | Human epidermal growth factor receptor 2 |
| HIT | HLA-unabhängiger T-Zellrezeptor |
| HLA | Humanes Leukozytenantigen |
| ICANS | Immuneffektorzell-assoziierte Neurotoxizitätssyndrom |
| IFNγ | Interferon-gamma |

| | |
|----------------------|---|
| Ig | Immunoglobulin |
| IL | Interleukin |
| IRF4 | Interferon-regulatorischem Faktor 4 |
| LAG3 | Lymphocyte-activation gene 3 |
| LAT | Linker for activation of T cells |
| LBCL | Großzelliges Lymphom |
| LFA-1 | Lymphocyte function-associated antigen 1, Adhäsionsmolekül |
| mAK | Monoklonaler Antikörper |
| ML | Mantelzell Lymphom |
| MM | Multiples Myelom |
| MFI | Mean fluorescence intensity |
| MHC | Major histocompatibility complex |
| OD | Optical density |
| p | Phosphorylated |
| PBMC | Peripheral Blood Mononuclear Cell |
| PBS | Phosphate buffer saline |
| PBS-T | Phosphate buffer saline tween |
| PD-1 | Programmed cell death protein 1 |
| PDL | Poly-D-Lysin |
| PE | Phycoerythrin |
| Penstrep | Penicillin Streptomycin Mixtur |
| pH | Lat.: <i>potentia Hydrogenii</i> |
| POD | Peroxidase |
| RASA2 | RAS p21 Protein Activator 2 |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute (Medium) |
| scFv | Single chain fragment variable |
| shRNA | Small hairpin RNA |
| SEM | Standard error of the mean |
| STAT | Signal transducer and activator of transcription |
| TCF-1 | T cell factor-1 |
| TCM | T-Zentrale Gedächtnisstammzellen |
| TIGIT | T-cell immunoreceptor with immunoglobulin and ITIM domains |
| TIM-3 | T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3 |
| TMD | Transmembranomäne |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| TOX | Thymocyte Selection associated High Mobility Group Box) |
| TSCM | T-Gedächtnisstammzelle |
| TZR | T-Zell-Rezeptor |
| U | Unit |
| V_H | Variable Region der schweren Immunoglobulin Kette |
| V_L | Variable Region der leichten Immunoglobulin Kette |
| v/v | Volumenkonzentration (Volumen/Volumen) |
| w/o | Ohne |
| w/v | Massenkonzentration (Gewicht/Volumen) |

1 EINLEITUNG

1.1 Therapie mit Chimären-Antigenrezeptor (CAR) modifizierten-T-Zellen

Die Therapie mit synthetischen Chimären-Antigenrezeptor-T-Zellen (CAR-T-Zellen) hat sich zu einer entscheidenden Säule der modernen Krebsimmuntherapie entwickelt [1]. Im Gegensatz zu einem herkömmlichen T-Zell-Rezeptor ist ein CAR in der Lage, Oberflächenantigene unabhängig von MHC-Molekülen auf Zielzellen zu binden [1]. Nach der CAR-Bindung wird eine Signalkaskade ausgelöst, die zur Aktivierung von CAR-T-Zellen und zur Initiierung von CAR-T-Zell-Effektorfunktionen wie Proliferation, Zytokinsekretion und Abtötung von Zielzellen führt [1]. Bisher werden CAR-T-Zellen meist durch lentivirale oder gammaretrovirale Transduktion von T-Zellen erzeugt (Abbildung 1) [2]. Zusätzlich gibt es alternative Gentransfermethoden wie die nicht-virale Transduktion mit Hilfe des das Dornröschen („Sleeping Beauty“) - Transposonsystem oder die transiente CAR-Expression die Elektroporation CAR-kodierender mRNA [2]. Derzeit stellen autologe T-Zellen, die mittels Lymphapherese aus dem Blut von Patienten gewonnen werden, das primäre Ausgangsmaterial für die CAR-T-Zellproduktion dar [2]. Um die Verfügbarkeit und Zuverlässigkeit der CAR-T-Zellproduktion zu verbessern, wurden präklinische Studien zu universellen CAR-T-Zellen durchgeführt, die aus induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSCs) oder gentechnisch veränderten allogenen T-Zellen erzeugt wurden [3, 4].

Bei einem CAR handelt es sich um einen synthetischen Antigenrezeptor, der aus einem von Antikörpern abgeleiteten extrazellulären "single-chain variable fragment" (scFv) besteht, welches über ein flexibles Scharnier mit der Transmembran-Domäne und den intrazellulären Signaldomänen verbunden ist (Abbildung 1) [1]. Ein scFv besteht aus der variablen Domänen der schweren (VH) und leichten Ketten (VL) eines herkömmlichen Antikörpers, die über ein kurzes flexibles Verbindungsstück („Linker“) in VH-VL- oder VL-VH-Orientierung miteinander verbunden sind [1]. Das flexible Scharnier, das den scFv physikalisch mit der Membran von T-Zellen verbindet, stammt für häufig aus dem extrazellulären Teil des CD28-Moleküls, der Scharnierdomäne des CD8-alpha-Moleküls oder aus der IgG1 konstanten Domänen CH1-3 [1]. Im Allgemeinen umfasst die intrazelluläre Signaldomäne eines CARs die CD3ζ-Kette und eine zusätzliche kostimulatorische Domäne, die für gewöhnlich aus dem intrazellulären Teil von CD28 oder 4-1BB besteht [1]. Während CD28-kostimierte CAR-T-Zellen ein größeres Ausmaß an Effektorfunktionen, eine Neigung zur Glykolyse und eine Fähigkeit zur schnellen Tumorrepression aufweisen, zeichnen sich 4-1BB-kostimierte CAR-T-Zellen durch Gedächtnisdifferenzierung, Fettsäureoxidation und lange funktionelle Persistenz aus [5].

In Anbetracht der hohen Ansprechraten mit einem erheblichen Prozentsatz dauerhafter Komplettremissionen bei Patienten mit verschiedenen austherapierten hämatologischen Malignomen haben sowohl die FDA als auch die EMA den klinischen Einsatz verschiedenen

CAR-T-Zellprodukten genehmigt [2, 5, 6]. Mittlerweile stehen CD19-spezifische CAR-T-Zellen zur Behandlung der akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL), des großzelligen B-Zell-Lymphoms (LBCL), des follikulären Lymphoms (FL) und des Mantelzell-Lymphoms (ML) zur Verfügung [2, 7]. Darüber hinaus haben sich CAR-T-Zellen, die das B-Zell-Reifungsantigen (BCMA) erkennen, zu einer wichtigen therapeutischen Säule bei Patienten mit multiplen Myelom (MM) entwickelt [8, 9]. Schließlich werden derzeit zahlreiche klinische Studien durchgeführt, um die Wirksamkeit von CAR-T-Zellen gegen eine Vielzahl von weiteren hämatologischen Malignomen und soliden Tumoren zu bewerten [10].

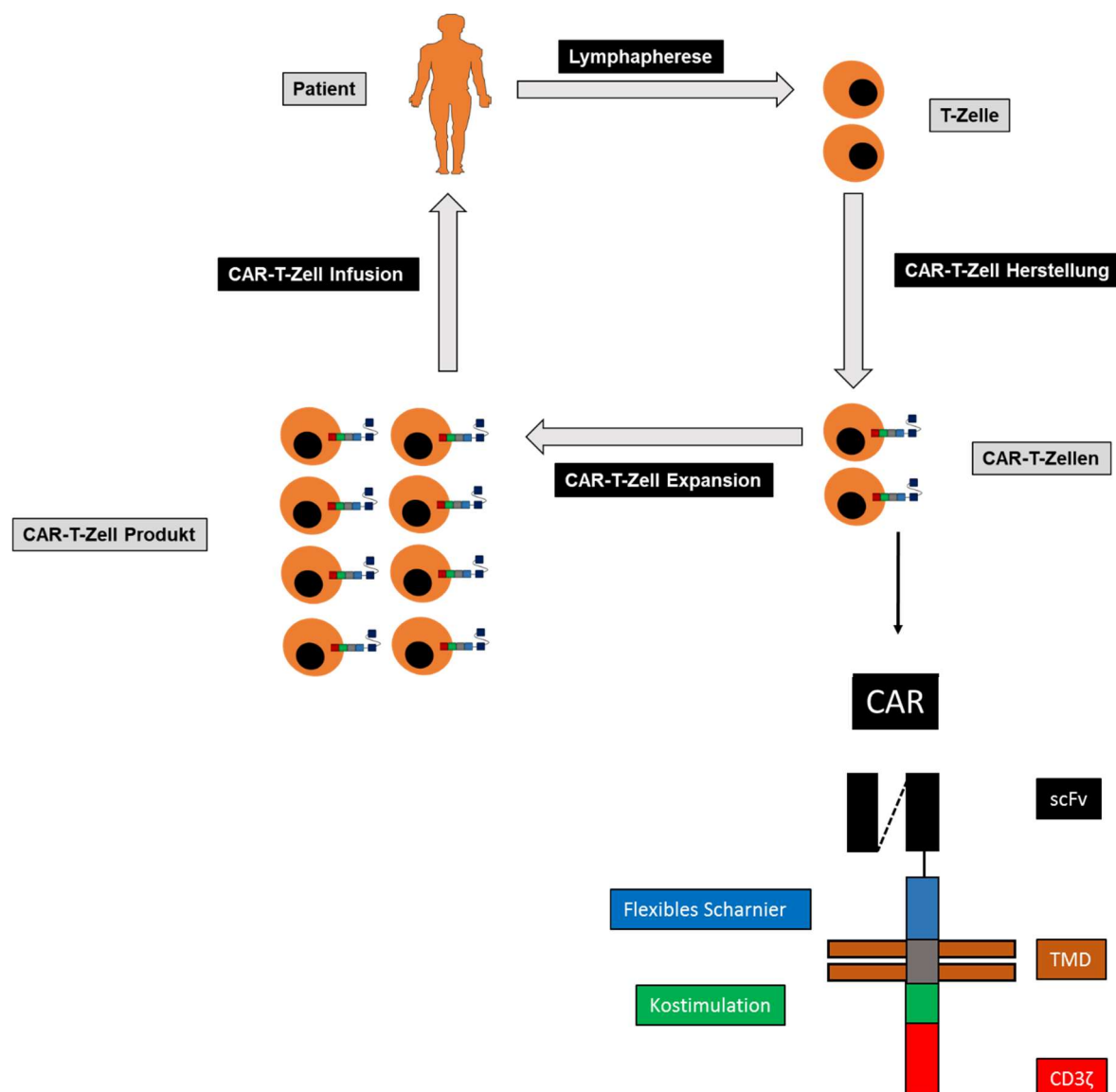


Abbildung 1. Schematische Darstellung der CAR-T-Zell Therapie.

1.2 Aktuelle Herausforderungen der CAR-T-Zell Therapie

Die Evolution der CAR-T-Zelltherapie wurde zunächst durch CD19-spezifische CAR-T-Zellen vorangetrieben, die gegen verschiedene B-Zell Lymphome eingesetzt wurden [11]. CD19 stellt ein nahezu ideales Antigen dar, da die CD19-Expression auf bösartige und nicht-bösartige B-Zellen beschränkt ist [11]. Die Eliminierung der B-Zellen führt häufig zu einer Hypogammaglobulinämie, die durch Immunglobulin-Substitutionstherapie behandelt werden kann, was jedoch eine wiederholte Applikation erfordert [12]. Insgesamt wird ein ideales CAR-T-Zell Zielantigen dadurch definiert, dass seine Expression ausschließlich auf bösartige Zellen oder im Falle von CD19 auf entbehrliche Zelltypen wie B-Zellen beschränkt ist [11]. Insbesondere im Hinblick auf solide Tumoren, wie Bauchspeicheldrüsenkrebs und Brustkrebs, stellt das aktuell sehr überschaubare Repertoire an geeigneten Zielantigenen eine entscheidende Herausforderung für den erfolgreichen Einsatz von CAR-T-Zellen dar [13]. Die meisten bekannten Zielantigene auf soliden Tumoren werden auch von nicht-malignen Zellen exprimiert, wodurch das Risiko schwerwiegender, potenziell tödlicher „On-Target-/Off-Tumor“-Toxizitäten entsteht [14]. Folglich ist das Bestreben, das Arsenal an CAR-T-Zellen, die auf verschiedene, möglichst Tumor-selektive Antigene abzielen, kontinuierlich zu erweitern, von entscheidender Bedeutung für die Etablierung der CAR-T-Zelltherapie bei soliden Tumoren [15].

Ferner beruht ein kritischer Resistenzmechanismus von Tumorzellen gegen den antigenspezifischen Angriff von CAR-T-Zellen auf der Abschaltung oder Herunterregulierung von Zielantigenen [16]. Beispielsweise kommt es bei der CD19-gerichteten CAR-T-Zelltherapie bei einem beträchtlichen Teil dieser Patienten im Rezidiv zu einer aufgehobenen oder stark herunterregulierten CD19 Expression auf den Lymphomzellen [17].

Ein weiteres erhebliches Hindernis für die Wirksamkeit von CAR-T-Zellen wird durch eine T-Zell-intrinsische Dysfunktionalität repräsentiert, die üblicherweise als T-Zell-Erschöpfung bezeichnet wird [18, 19]. Zu den Hauptmerkmalen der T-Zell-Erschöpfung gehören ein terminaler Effektorzell-Phänotyp, die Expression inhibitorischer Rezeptoren (z. B. PD-1, TIM-3, LAG-3, TIGIT und CD39), eine verminderte Proliferationskapazität, eine verminderte Freisetzung inflammatorischer Zytokine (z. B. IL-2 und IFN γ), Stoffwechselstörungen und eine verringerte Zytotoxizität [20, 21]. Zusammenfassend weisen erschöpfte CAR-T-Zellen ein allgemeines Funktionsdefizit auf, das die Grundlage für refraktäre/rezidivierende Tumoren nach einer Behandlung mit CAR-T-Zellen bildet [21]. Die Transkriptionsfaktoren BLIMP-1 und TOX wurden als Schlüsselmediatoren erschöpfungsbedingter Phänotypen in CAR-T-Zellen identifiziert [22, 23]. Dementsprechend zeigten CAR-T-Zellen mit BLIMP-1-Herunterregulierung oder TOX-Herunterregulierung eine geringere Veranlagung zur T-Zell-Erschöpfung, was in einer erhöhten CAR-T-Zell-Proliferation und Zytotoxizität in-vitro sowie in einer überlegenen CAR-T-Zell-Wirksamkeit in murinen Tumormodellen resultierte [24, 25]. Klinisch führt die Erschöpfung der CAR-T-Zellen zu einem Tumorrückfall/-fortschritt durch einen vorzeitigen Verlust der CAR-T-Zellpersistenz oder der CAR-T-Zellfunktionalität [24, 25]. Bei einem Verlust der CAR-T-Zellfunktionalität kommt es trotz der Anwesenheit zirkulierender CAR-T-Zellen zu einem Tumorrückfall. Aktuelle Strategien zur Bewältigung des Problems der

Erschöpfung von CAR-T-Zellen umfassen die Verwendung langlebiger, sich selbst erneuernder, multipotenter T-Gedächtnisstammzellen (TSCMs) [26, 27], die Disruption hemmender Moleküle [4, 28-31], die Koexpression stimulierender Moleküle [32-34] und den Einsatz von Medikamenten wie Dasatinib [35]. Trotz all dieser Maßnahmen stellt die Identifizierung geeigneter Zielantigene für die CAR-T-Zell Therapie und die Bekämpfung der T-Zell-Erschöpfung die wichtigsten Herausforderungen für die Verbesserung der modernen CAR-T-Zelltherapie dar (Abbildung 2) [36, 37]. Durch CAR-T-Zellen hervorgerufenen Toxizitäten wie das Zytokin-Freisetzungssyndrom (CRS) und das Immuneffektorzell-assoziierte Neurotoxizitätssyndrom (ICANS) stellen weitere wichtige Herausforderungen dar, die allerdings in den letzten Jahren durch den Einsatz einer geeigneten Supportivtherapie ausreichend kontrolliert werden konnten [38].

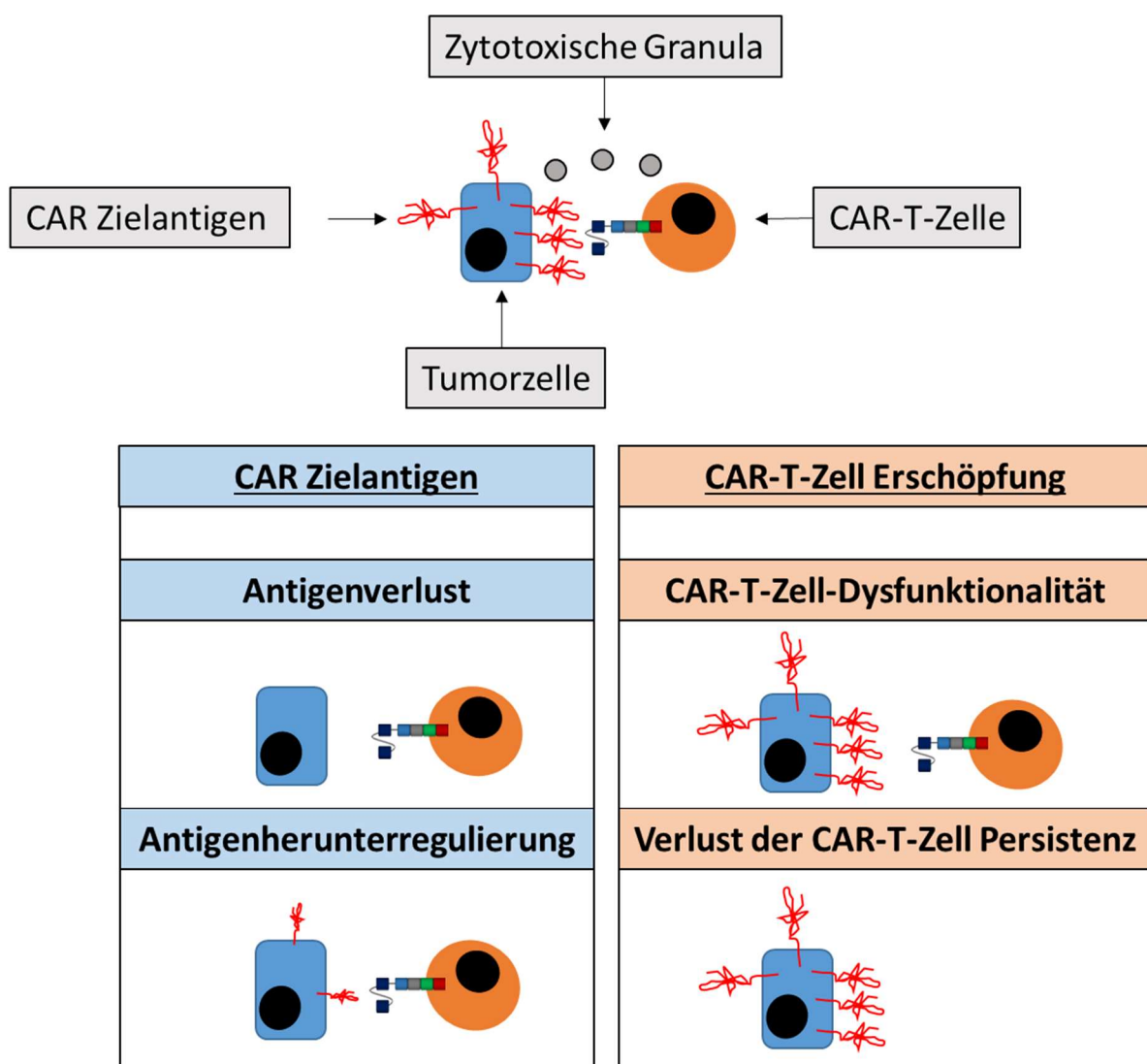


Abbildung 2. Schematische Darstellung der Herausforderungen der CAR-T-Zell Therapie.

1.3 Antgensensitivität der CAR-T-Zellen

In der CAR-T-Zell Therapie bezeichnet der Begriff „Antgensensitivität“ die Aktivierungsschwelle der CAR-T-Zellen als Reaktion auf eine antigenspezifische Stimulation [39]. Mehrere Faktoren tragen zur Antgensensitivität von CAR-T-Zellen bei, beispielsweise die modulare Komposition des CARs [40], die Expression kostimulatorischer Rezeptoren [39] und die Konfiguration des intrazellulären Signalnetzwerks [41]. Was die Komposition des CARs betrifft, so stellt die Affinität des Antigen-spezifischen scFv einen entscheidenden Faktor für die Antgensensitivität von CAR-T-Zellen dar [42]. Folglich weisen CAR-T-Zellen, die mit hochaffinen scFvs ausgestattet sind, eine niedrigere Aktivierungsschwelle auf, was einer erhöhten Antigenempfindlichkeit entspricht [42]. Es wurde gezeigt, dass durch gezielte Mutagenese des scFv die Antgensensitivität von CAR-T-Zellen verbessert werden kann, was folglich zu einer verbesserten Erkennung und Zerstörung Tumorzellen mit geringer Antigendichte führte [42]. Eine Erhöhung der scFv-Affinität könnte jedoch gleichzeitig das Risiko für „On-Target-/Off-Tumor“-Toxizitäten erhöhen, indem ein CAR-T-Zell-Angriff auf nicht-maligne Gewebe ausgelöst wird [14]. Dieser Vorbehalt betrifft insbesondere Tumorantigene mit Expression in gesundem Gewebe, wie CSPG4 [43] oder HER2 [42]. Abgesehen vom scFv beeinflusst auch das flexible Scharnier, das den scFv mit der Transmembrandomäne verbindet, die Antigenempfindlichkeit von CARs [44]. Beispielsweise sind CARs, die ein von CD28 abgeleitetes Scharnier enthalten, empfindlicher gegenüber Antigenen als CARs, die ein von CD8 α abgeleitetes Scharnier verwenden [44]. Kürzlich wurde ein neuartiges CAR-Format veröffentlicht, das durch ein modifiziertes CD8 α -Scharnier charakterisiert ist, das eine intrinsische Resistenz gegenüber einer Spaltung aufweist [45]. CAR-T-Zellen mit diesem neuartigen spaltungsresistenten CAR zeigten in Mausmodellen für akute myeloische Leukämie eine verbesserte Antigenempfindlichkeit, eine verstärkte Amplifikation und eine erhöhte Funktionalität [45].

Im Gegensatz zu herkömmlichen T-Zell-Rezeptoren benötigen CARs eine > 100-fach höhere Antigendichte, um eine T-Zell-Aktivierung auszulösen [39]. Ein möglicher Grund für diesen Unterschied in der Antigenempfindlichkeit ist die Architektur der durch CAR-Aktivierung induzierten Kontaktstelle (Synapse) mit der Zielzelle [39]. Diese unterscheidet sich von der herkömmlichen durch TZR-Aktivierung induzierten immunologischen Synapse [39]. Bisher publizierte Daten deuten darauf hin, dass CARs nicht in der Lage sind, nach der Aktivierung durch entsprechende Zielantigene ausreichend akzessorische Moleküle zu rekrutieren [39]. Während TZRs LFA-1 und CD2 effektiv in die Synapse rekrutieren können, werden diese Adhäsionsmoleküle bei der CAR-gesteuerten Synapsenbildung größtenteils ausgeschlossen [39]. Bemerkenswerterweise konnte die Blockade der CD2- und LFA-1-Wechselwirkung die Unterschiede in der Antigenempfindlichkeit zwischen TZRs und CARs nivellieren [39].

Ein interessanter Ansatz zur Verbesserung des CAR-Designs durch Verknüpfung des scFv mit den konstanten Domänen eines TZR führte zu der Entwicklung von HLA-unabhängigen T-Zell-Rezeptoren (HIT-Rezeptoren) [40]. Diese HIT-Rezeptoren sind in der Lage, Zielzellen zu erkennen, die eine sehr geringe Anzahl von Zielantigenen tragen [40]. Beispielsweise erkennen CD19-spezifische HIT-T-Zellen NALM6-Leukämiezellen bis zu einer Antigendichte

von etwa 20 CD19-Molekülen pro Zelle [40]. Mechanistisch gesehen könnten eine erhöhte Rekrutierung von CD2 und LFA-1 sowie eine möglicherweise verbesserte Rekrutierung des intrazellulären Gerüstproteins LAT die weitaus größere Antigensensitivität von HIT-Rezeptoren im Vergleich zu herkömmlichen CARs erklären [40].

Schließlich kann die Konfiguration des intrazellulären Signalnetzwerks in T-Zellen die Antigenempfindlichkeit erheblich beeinflussen [28]. Kürzlich wurde berichtet, dass die Ausschaltung des RAS-GTPase-aktivierenden Proteins RASA2 die Antigenempfindlichkeit von CAR-T-Zellen erhöht [28]. RASA2 ist ein negativer Regulator der RAS-Signalübertragung und die Ablation der RASA2-Expression erhöhte die Aktivität des MAP-Kinase-Signalwegs [28]. Eine weitere Möglichkeit, die Antigensensitivität von CAR-T-Zellen auf Transkriptionsebene zu steigern, ist die Koexpression des Transkriptionsfaktors c-Jun [41]. Für Glypican-2-spezifische CAR-T-Zellen wurde gezeigt, dass die Koexpression von c-Jun die Sensitivität der CAR T-Zellen gegenüber Neuroblastomzellen erhöht, wobei Glypican-2 in klinisch relevanten Mengen von etwa 5000 Molekülen pro Zelle exprimierten [41].

1.4 CAR-T-Zell Erschöpfung

Der allmähliche Funktionalitätsverlust als Folge der wiederholte Aktivierung von CAR-T-Zellen wird als „Erschöpfung“ der CAR-T-Zellen bezeichnet [20]. Ursprünglich wurde die Erschöpfung von T-Zellen in Mausmodellen, die chronische Virusinfektionen abbilden, beobachtet [23, 46]. Chronische Virusinfektionen dienen als starker Stimulus für eine anhaltende T-Zell-Aktivität [23, 46]. Im Laufe der Zeit kam es in diesen Modellen zu einer Akkumulation von terminal differenzierten Effektor-T-Zellen [23, 46]. Terminal differenzierte Effektorzellen sind durch einen CD45RO-CD62-/CD45RA+CD62L-Phänotyp und eine Expression inhibitorischer Rezeptoren wie PD-1, TIM-3, LAG3, TIGIT und CD39 gekennzeichnet [23, 46]. Bezüglich ihrer Funktionalität weisen erschöpfte T-Zellen in der Regel ausgeprägte Proliferationsdefizite auf, sezernieren geringe Mengen an inflammatorischen Zytokinen und zeigen eine erhöhte Neigung zu Apoptose [20, 23, 46]. Mechanistisch gesehen sind eine Reihe von wichtigen Transkriptionsfaktoren an der Initiierung und Aufrechterhaltung dieser Phänotypen beteiligt [20, 23, 46]. Die Transkriptionsfaktoren T-Zellfaktor 1 (TCF-1) und B-Zell-Lymphom 6 (BCL-6) werden überwiegend in naiven T-Zellen oder Gedächtnis-T-Zellen exprimiert, wobei sie die Differenzierung von Effektorzellen verhindern [23, 46]. Im Gegensatz dazu treibt die Expression von Interferon-regulatorischem Faktor 4 (IRF4) und B-Lymphozyten-induziertem Reifungsprotein 1 (BLIMP1) die Differenzierung zu Effektorzellen voran und induziert letztendlich erschöpfungsbedingte Dysfunktionen [23, 46]. Präklinische Daten haben gezeigt, dass die T-Zell-Erschöpfung durch Überexpression von gedächtnisfördernden Transkriptionsfaktoren (z.B. TCF-1) [47] oder durch die Stummschaltung von erschöpfungsfördernder Transkriptionsfaktoren (z.B. BLIMP1) abgeschwächt werden kann [25]. Bemerkenswerterweise führte die vollständige Blockade der Effektordifferenzierung nicht zu einer verbesserten Gesamtfunktion der T-Zellen, was durch die unzureichende Kontrolle viraler Infektionen in Mausmodellen nach dem Transfer von T-Zellen mit deutlich

aufgehobener Effektdifferenzierung deutlich wurde [23]. Tatsächlich ist die Bildung von T-Zell-Effektoren für die globale T-Zell-Funktionalität von entscheidender Bedeutung [23]. Eine übermäßige T-Zell-Differenzierung gipfelt jedoch in terminalen Effektor-T-Zellen mit verringerter Proliferationskapazität und einer erhöhten Neigung zur funktionellen Erschöpfung [23].

Die tonische Aktivierung von CAR-T-Zellen ohne Antigenbindung des CARs oder endogenen TZRs stellt eine weitere Hauptursache für die Erschöpfung von CAR-T-Zellen dar [20]. An dieser Stelle ist wichtig, dass herkömmliche retrovirale Transduktionsverfahren zu einer zufälligen Integration des Zielvektors in das Genom von T-Zellen und einer anschließenden CAR-Expression unter der Kontrolle viraler oder synthetischer Promotoren führen [48]. Aufgrund der hohen Transgenexpression, die zu einer Fülle von CAR-Molekülen auf der T-Zelloberfläche führt, wird eine Antigen-unabhängige Selbstbindung von CAR-Molekülen ausgelöst [48]. Dadurch kommt es schließlich zu einer tonischen T-Zell-Aktivierung, was wiederum transkriptionelle und phänotypische Veränderungen induziert, die mit der Erschöpfung der CAR-T-Zellen vereinbar sind [48]. Eine prominente Strategie zur Minderung der durch tonische CAR-Signale verursachten T-Zell-Erschöpfung ist die gezielte Insertion des CAR-Transgens in den Locus der T-Zell-Rezeptor-Alpha-Kette [48]. Diese TRAC-CAR-T-Zellen exprimieren den CAR unter dem Promotor der TZR-Alpha-Kette, was eine regulierte CAR-Expression auf niedrigerem Niveau als unter der Kontrolle viraler LTR Elemente sowie eine optimierte CAR-Internalisierung und Re-Expression nach dem Antigenkontakt gewährleistet [48]. Infolgedessen weisen TRAC-CAR-T-Zellen praktisch kein tonisches Signal auf und zeigen nach wiederholtem Antigenkontakt eine deutlich abgemilderte funktionelle Erschöpfung [48].

Insbesondere vor dem Hintergrund der tonischen CAR-Aktivität wurde das Konzept der vorübergehenden Pause („Transient rest“) als weiterer Ansatz untersucht, um der Erschöpfung von CAR-T-Zellen entgegenzuwirken [35]. Eine transiente Abschaltung des CAR-Signals wurde durch den Einsatz des Multikinase-Inhibitors Dasatinib erreicht [35]. Dasatinib ist in der Lage, die CAR-Aktivität auf reversible Weise abzuschalten [35]. Eine durch Dasatinib induzierte vorübergehende Ruhe konnte sowohl den Erwerb erschöpfungsbedingter Merkmale verhindern als auch bona fide erschöpfte CAR-T-Zellen auf transkriptioneller, phänotypischer und funktioneller Ebene in gedächtnisähnliche, voll funktionsfähige CAR-T-Zellen umprogrammieren [35].

1.5 Potentere CAR-T-Zellen durch shRNA-Interferenz

Nach der Identifizierung mehrerer entscheidender Mediatoren, die für die Erschöpfung von CAR-T-Zellen verantwortlich sind, hat die Verbesserung der Funktionalität von CAR-T-Zellen durch die Stummschaltung erschöpfungsassoziiierter Moleküle an Bedeutung gewonnen [49]. Die shRNA-Gen-Silencing-Technik (Short Hair RNA) hat sich als elegantes Werkzeug zur Modulation der Expression definierter Proteine in CAR-T-Zellen erwiesen [50]. Oft wird das shRNA-Konstrukt von demselben Vektor wie der CAR kodiert, was den Herstellungsprozess

der CAR-T-Zellen vereinfacht, da nur eine einzige Transduktion erforderlich ist, um die CAR-Expression und die Gen-Stummschaltung zu ermöglichen [50]. In einer ersten wegweisenden Studie konnten eine erfolgreiche Kombination eines CD19-spezifischen CAR mit einer auf PD-1 gerichteten shRNA demonstriert werden [49]. Nach antigenspezifischer Stimulation mit Tumorzellen war die PD-1-Expression auf CAR-T-Zellen um etwa 50 % reduziert [49]. Zudem zeigten CAR-T-Zellen mit PD-1-Herunterregulierung in-vitro eine erhöhte Proliferation und führten bei tumortragenden Mäusen zu einer besseren Tumorkontrolle [49]. In einer anderen Studie wurde eine gleichzeitige Herunterregulierung von PD-1, LAG3 und Tim-3 in HER2-spezifischen CAR-T-Zellen untersucht [51]. Die shRNA-kodierende Kassette wurde von einem U6-Promotor transkribiert und die für den CAR kodierende Expressionskassette wurde von einem CMV-Promotor kontrolliert [51]. Die Expression aller genannten inhibitorischen Rezeptoren wurden deutlich reduziert. Ferner zeigten CAR-T-Zellen mit reduzierter Expression dieser drei hemmenden Rezeptoren eine erhöhte funktionelle Persistenz und weniger erschöpfte Phänotypen [51]. Abgesehen von inhibitorischen Oberflächenrezeptoren wurde auch die shRNA-vermittelte Herunterregulierung von bestimmten Transkriptionsfaktoren, die an der Erschöpfung von CAR-T-Zellen beteiligt sind, untersucht [24]. CAR-T-Zellen ausgestattet mit zwei shRNAs, die auf die Transkriptionsfaktoren TOX1 und TOX2 abzielen, beide entscheidende Regulatoren der T-Zell-Erschöpfung, zeigten eine stark verminderte TOX-Expression [24]. In syngenem Melanom Mausmodellen übertrafen CAR-T-Zellen mit shRNA-vermitteltem Abbau der TOX-Transkriptionsfaktoren herkömmliche CAR-T-Zellen hinsichtlich der Tumorkontrolle und der Verlängerung des Überlebens [24]. Darüber hinaus bewahrte die TOX-Herunterregulierung die langfristige Funktionalität und wirkte der Induktion von T-Zell-Erschöpfung entgegen [24]. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Herunterregulierung von inhibitorischen Rezeptoren und Transkriptionsfaktoren durch shRNA-Interferenz ein praktikabler und vielversprechender Weg zur Steigerung der Wirksamkeit von CAR-T-Zellen ist.

1.6 Interferon Regulatory Factor 4 (IRF4)

Physiologisch wird die klonale Expansion, Regulation der Effektorfunktionen und Verhinderung der Erschöpfung durch eine Vielzahl von interagierenden Faktoren reguliert. Dabei spielt der Interferon Regulatory Factor 4 (IRF4) Transkriptionsfaktor eine zentrale Rolle in Lymphozyten. IRF4 reguliert eine große Anzahl von Genen, die verschiedene Prozesse der Lymphozytenentwicklung und Lymphozyten-Effektorfunktionen steuern [52]. Darüber hinaus wurde die Expression von IRF4 in myeloischen Zellen wie Makrophagen und dendritischen Zellen nachgewiesen [52]. Im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern der IRF-Familie wird IRF4 nicht durch den Interferon-Signalweg reguliert [52]. In ruhenden Lymphozyten ist die IRF4-Expression gering [52]. Nach Lymphozytenaktivierung steigen die IRF4-Level deutlich an [52]. Über eine N-terminale DNA-Bindungsdomäne ist IRF4 in der Lage, sich mit einer Vielzahl von DNA-Sequenz Motiven zu verbinden [52]. Die DNA-Bindungsdomäne des IRF4 Proteins ist mit einer C-terminalen regulierenden Domäne verbunden, die die Expression von Interferon-stimulierten Genen (ISGs) steuert [52]. Während die DNA-Bindung IRF4 bevorzugt als Homo-

dimer erfolgt, wurden in den letzten Jahren verschiedene Interaktionspartner zur Bildung heterodimerer Komplexe mit IRF4 beschrieben [52]. In Kooperation mit Transkriptionsfaktoren der AP1-Familie, z. B. BATF und c-Jun, kann IRF4 als Heterodimer an (AP1)-IRF-Bindestellen (AICE) binden, um wichtige Transkriptionsprogramme in T-Zellen zu steuern [52]. Physiologisch ist IRF4 vorwiegend an der Differenzierung und Funktionalität von CD8⁺ T-Zellen beteiligt [52]. Insbesondere beeinflusst IRF4 die durch die T-Zell-Aktivierung induzierte klonale Expansionsphase und den Erwerb von Effektorfunktionen [52]. Nach der Stimulation durch den TZR steigt die IRF4-Expression proportional zur T-Zell-Aktivierung an [52]. Anschließend heterodimerisiert IRF4 mit Transkriptionsfaktoren der AP1-Familie, um Transkriptionsprogramme zu initiieren, die für die Ausführung verschiedener Effektorfunktionen verantwortlich sind [52]. Einerseits fördert IRF4 die T-Zell-Expansion, indem es die T-Zell-Proliferation direkt steigert und der Apoptose durch die Suppression proapoptotischer Gene entgegenwirkt [52]. Ferner steuert IRF4 die Expression inflammatorischer Zytokine wie IFN γ [52]. Drittens fördert IRF4 die Zytotoxizität von CD8⁺ T-Zellen [46]. Mechanistisch gesehen beruht der Einfluss von IRF4 auf die Zytotoxizität von T-Zellen teilweise auf der Erhöhung des Expressionsniveaus von BLIMP-1, was wiederum die Expression zytotoxischer Moleküle wie Granzym B steuert [46]. Schließlich verbessert IRF4 den Stoffwechsel von T-Zellen, indem es die aerobe Glykolyse und die Glukoseaufnahme reguliert [52]. Zusammenfassend stellt IRF4 einen wesentlichen Faktor für die T-Zell-Funktionalität dar. Dementsprechend beeinträchtigt eine vollständige Disruption von IRF4 in CD8⁺ T-Zellen die T-Zell-Funktionalität erheblich, wohingegen eine Überexpression von IRF4 die Proliferationskapazität, das Überleben, die Sekretion inflammatorischer Zytokine und die Zytotoxizität von CD8⁺ T-Zellen deutlich erhöht [52]. Allerdings ist die erhöhte proinflammatorische Aktivität mit einer erhöhten Erschöpfung der T-Zellen verbunden.

In den letzten Jahren wurde IRF4 als einer der Hauptverursacher von T-Zell-Erschöpfung identifiziert [46]. Erste Hinweise darauf, dass IRF4 bei der T-Zell-Erschöpfung eine Rolle spielt, wurden aus Mäusen gewonnen, die chronisch mit dem lymphozytären Choriomeningitis-Virus infiziert waren [46]. In diesen Tiermodellen zeigten virusreaktive T-Zellen eine hohe IRF4-Expression [46]. Des Weiteren ging die hohe Expression von IRF4 mit dem Erwerb eines umfassenden Phänotyps der T-Zell Erschöpfung einher, der sich in der Expression inhibitorischer Rezeptoren wie PD-1 und der verringerten Expression gedächtnisassoziierter Regulatoren wie TCF1 widerspiegelte [46]. Wichtig ist, dass eine gezielte Verringerung der IRF4-Expressionsniveaus den erschöpfenden Phänotyp umkehren und eine hochfunktionale Population antigenspezifischer T-Zellen mit einem gedächtnisähnlichen Phänotyp aufrechterhalten konnte [46]. Außerdem wurde eine hohe IRF4-Expression in einem Modell für CAR-T-Zell Erschöpfung beobachtet [20]. In diesem Modell entwickeln CAR-T-Zellen durch die Expression eines CARs mit hohem tonischem Signal schnell Anzeichen einer T-Zell-Erschöpfung [20]. Eine Überexpression des Transkriptionsfaktors c-Jun konnte in diesem Modell die Erschöpfung der T-Zellen verhindern, was teilweise durch die Herunterregulierung von IRF4 und anderen durch IRF4 regulierten erschöpfungsassozierten Genen begründet wurde [20]. Insgesamt deuten neuere Erkenntnisse darauf hin, dass IRF4 eine wichtige Rolle bei der Etablierung und Aufrechterhaltung der T-Zell-Erschöpfung spielt [20]. Daher könnte

die gezielte Kalibrierung der IRF4-Expression nützlich sein, um die Erschöpfung der CAR-T-Zellen zu bekämpfen ohne die Gesamtfunktionalität der CAR-T-Zellen zu beeinträchtigen.

| T-Zell Funktionalität | IRF4 Überexpression | IRF4 Disruption | Mechanismus |
|------------------------------|---|---|--|
| Proliferation | Stärkere Proliferation | Geringere klonale Expansion | IRF4 fördert Proliferation |
| Überleben | Längeres Überleben | Kürzeres Überleben | IRF4 hemmt Apoptose |
| Zytokin Sekretion | Vermehrte Produktion inflammatorischer Zytokine | Geringe Produktion inflammatorischer Zytokine | IRF4 fördert IFN γ Sekretion |
| Zytotoxizität | Stärkere Zytotoxizität | Schwächere Zytotoxizität | Induktion von BLIMP-1 und Granzym B |
| Metabolismus | Stoffwechselaktivierung | Reduzierter Stoffwechsel | IRF4 reguliert aerobe Glycolyse und Glucose Aufnahme |

Tabelle 1. Vielfältige Funktionen von IRF4 in T-Zellen

1.7 CAR-T-Zellen mit kalibrierter IRF4-Expression

In einer kürzlich publizierten Studie wurde die Chromatin Zugänglichkeit stimulierter CAR-T-Zellen auf Einzelzellebene mithilfe von Einzelzell-ATAC-Sequenzierung analysiert [53]. Die Ergebnisse bestätigten, dass IRF4 ein Hauptfaktor für die Erschöpfung von T-Zellen ist [53]. Darüber hinaus konnte die shRNA-vermittelte Herunterregulierung von IRF4 die Funktionalität von CAR-T-Zellen wiederherstellen [53]. CAR-T-Zellen, die mit einer auf IRF4-spezifischen shRNA transduziert wurden, wiesen im Vergleich zu Kontroll-CAR-T-Zellen eine ungefähr 50-prozentige Reduzierung der IRF4-Expression mRNA-Ebene auf [53]. Überraschenderweise hatte die Herunterregulierung von IRF4 keinen Einfluss auf die

Proliferationskapazität von CAR-T-Zellen in vitro [53]. Dennoch verringerte die Herunterregulierung von IRF4 das Expressionsniveau der inhibitorischen Rezeptoren PD-1 und TIM3 [53]. Ferner reduzierte die Herunterregulierung von IRF4 die Expression des erschöpfungsfördernden Transkriptionsfaktors TOX [53]. Im Allgemeinen nimmt IRF4 eine zweiseitige Rolle ein, da es einerseits ein wichtiger Treiber für die T-Zell-Effektorfunktionalität ist und es andererseits einen entscheidenden Treiber für funktionelle Erschöpfung von T-Zellen darstellt [53]. Im Gegensatz zu weniger differenzierten T-Zellen steigerte die Herunterregulierung von IRF4 in terminal erschöpften T-Zellen die Zytotoxizität durch eine Erhöhung der Granzym B Expression [53]. Zudem führte die IRF4-Reduktion zu einer Verschiebung zu einem weniger differenzierten T-Zell Phänotyp [53]. Im Vergleich zu Kontroll-CAR-T-Zellen, die einen Anteil zentraler Gedächtnis-T-Zellen (TCM) von etwa 40 % aufwiesen, erhöhte die IRF4-Herunterregulierung den Anteil zentraler Gedächtnis-T-Zellen auf 60 % [53]. Zentrale Gedächtnis-T-Zellen stellen aufgrund ihrer guten Proliferationsfähigkeit und einer verbesserten funktionellen Persistenz einen erstrebenswerten T-Zell-Subtyp dar [27]. Neben phänotypischen Veränderungen konnte gezeigt werden, dass die Reduktion von IRF4 auch die Funktionalität von CAR-T-Zellen, insbesondere die IFN γ -Sekretion, verbessert [53]. In Mäusen, die mit NALM6-Leukämiezellen inokuliert wurden zeigten CAR-T-Zellen mit IRF4-Herunterregulierung eine überlegene Antitumorwirksamkeit, die im Vergleich zu CAR-T-Zellen mit Wildtyp-IRF4-Expression zu einer stärkeren Tumorregression und einem längeren Überleben führte [53]. Obendrein wiesen CAR-T-Zellen mit reduzierter IRF4-Expression im Vergleich zu Kontroll-CAR-T-Zellen ein geringeres Expressionsniveau von inhibitorischen Rezeptoren wie PD-1 auf [53]. Insgesamt weisen die Daten darauf hin, dass die Herunterregulierung von IRF4 das Potenzial hat, CAR-T-Zellen vor der funktionellen Erschöpfung zu schützen [53].

1.8 Ziele

Zu den entscheidenden Hindernissen für den langfristigen Erfolg von CAR-T-Zellen in der Therapie maligner Tumore gehören die Erschöpfung der CAR-T-Zellen und die Herunterregulierung von CAR-Zielantigenen auf Tumorzellen [2]. Der Transkriptionsfaktor Interferon Regulatory Factor 4 (IRF4) wurde als wichtiger Faktor bei der Erschöpfung von T-Zellen identifiziert [46]. Um die Erschöpfung der T-Zellen in vitro zu analysieren, haben wir ein in-vitro-Stresstestmodell entwickelt [54]. Dieses Modell basiert auf der wiederholten Stimulation von CAR-T-Zellen mit Tumorzellen, um somit die CAR-T-Zellen in die funktionelle Erschöpfung zu treiben [54]. Um CAR-T-Zellen mit reduzierter IRF4-Expression zu erzeugen, haben wir eine neuartige retrovirale Expressionskassette konstruiert, die sowohl für einen CEA-spezifischen CAR als auch für eine shRNA kodiert. Die shRNA ist in eine miRNA30-Umgebung eingebettet ist, damit die Transkription durch den CMV-Promotor innerhalb des LTR erfolgen kann. Um die Funktionalität von CAR-T-Zellen zu verbessern, haben wir die IRF4-Spiegel in CEA-spezifischen CAR-T-Zellen mithilfe von shRNA-Interferenz herunterreguliert.

Abgesehen von der Erschöpfung der T-Zellen stellt die Herunterregulierung von Antigenen eine große Hürde für die CAR-T-Zell Therapie dar. Daher wird auch den Einfluss der IRF4-Herunterregulierung auf die Antigensensitivität von CAR-T-Zellen in dieser Arbeit beleuchtet werden.

Insgesamt lauten die Hypothesen dieser Arbeit:

1. Kann IRF4 in CEA-spezifischen CAR-T-Zellen mittels shRNA-Interferenz herunterreguliert werden?
2. Beeinträchtigt die Herunterregulierung von IRF4 die Funktionalität von CAR-T-Zellen?
3. Wirkt sich die Herunterregulierung von IRF4 auf die Effektivität und funktionelle Erschöpfung während einer wiederholten Stimulation mit Tumorzellen in einem in-vitro-Stresstest aus?
4. Ermöglicht die Herunterregulierung von IRF4 die Abtötung von Zielen mit geringer Antigendichte?

2 MATERIAL

2.1 Chemikalien und Reagenzien

| Chemikalien & Reagenzien | Firma |
|---|---|
| ABTS | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany |
| ABTS Buffer | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany |
| AccuCheck Counting Beads | ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| Ampicillin | Merck/CalBiochem, Darmstadt, Germany |
| Anti-Biotin MicroBeads | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany |
| Bacto Agar | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany |
| BD GolgiStop™ Protein Transport Inhibitor | BD Bioscience, San Jose, CA, USA |
| BSA | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany |
| DMSO | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany |
| eBioscience™ Fixable Viability Dye™ 780 | eBioscience/ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| Ethanol | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany |
| Glycerin | Merck/CalBiochem, Darmstadt, Germany |
| HEPES | GIBCO/ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| Isopropanol | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany |
| MS Columns | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany |
| Pancoll | PAN-Biotech GmbH, Aidenback, Germany |
| PBS 10x | GIBCO/ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| PEIpro® Transfection Reagent | Polyplus transfection, Illkirch, France |
| PenStrep | PAN-Biotech GmbH, Aidenback, Germany |
| Poly-L-Lysine | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Streptavidine-Peroxidase conjugate | Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland |
| Trypan Blue | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany |
| Trypsin/EDTA | PAN-Biotech GmbH, Aidenback, Germany |
| Tween®20 | Merck, Darmstadt, Germany |

Tabelle 2. Chemikalien und Reagenzien

2.2 Kits

| Kits | Firma |
|--|--------------------------------------|
| Cell Proliferation Kit II | Roche Diagnostics, Mannheim, Germany |
| Fixation/Permeabilization Kit | BD Bioscience, San Jose, CA, USA |
| Human TNF- α Standard ABTS ELISA Development Kit | PeproTech, Cranbury, NJ, USA |
| NucleBond® Xtra Midi Kit | Macherey Nagel GmbH, Düren, Germany |
| Transcription Factor Buffer Set | BD Bioscience, San Jose, CA, USA |
| Transcription Factor Phospho Buffer Set | BD Bioscience, San Jose, CA, USA |
| BD Quantibrite™ PE Phycoerythrin Fluorescence Quantitation Kit | BD Bioscience, San Jose, CA, USA |

Tabelle 3. Kits

2.3 Zellkulturmedien

| Medium | Company |
|---|---|
| D-MEM, High Glucose, GlutaMAX™ Zusatz | GIBCO/ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| Hitze-inaktiviertes (HI) FCS (56°C, 30 min) | PAN-Biotech GmbH, Aidenback, Germany |
| RPMI1640 GlutaMAX™ Zusatz | GIBCO/ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA |

Tabelle 4. Zellkulturmedien

2.4 Puffer

| Puffer | Zusammensetzung |
|-------------------------|--|
| Blocking buffer (ELISA) | 1% BSA (w/v), 1x PBS |
| Coating buffer (ELISA) | 0.1M Na ₂ HPO ₄ , pH 9 |
| LB agar | 11 LB medium, 15 g Bacto Agar |
| LB medium | 10 g/l tryptone, 5 g/l yeast extract, 10 g/l NaCl |
| PBS 10x | 1.37 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na ₂ HPO ₄ , 20 mM KH ₂ PO ₄ , ddH ₂ O; pH 7.4 |
| PBS/Tween (PBS-T) | 1x PBS, 0.1% (v/v) Tween®-20 |
| FACS buffer | 1x PBS, 2% (v/v) FBS |
| MACS buffer | 1x PBS, 0.5% (v/v) FBS, 0.4% (v/v) EDTA |

Tabelle 5. Puffer

2.5 Antikörper

2.5.1 Unkonjugierte Antikörper

| Antikörper | Spezies/Isotyp | Firma/Quelle |
|---|----------------|--|
| Anti-human CD3, Klon OKT3 | Mouse IgG2a | Hybridom Zelllinie; CRL-8001, ATCC |
| Anti-human CD28, Klon 15E8 | Mouse IgG1 | Hybridom Zelllinie; (Van Lier et., 1988) |
| Anti-human BW431/26scFv, Klon BW2064/36 | Mouse IgG1 | Hybridom Zelllinie; (Bosslet et al., 1985) |
| Anti-human IRF4, Klon IRF4.3E4 | Rat IgG1 | Biolegend, San Diego, CA, USA |

Tabelle 6. Unkonjugierte Antikörper

2.5.2 Konjugierte Antikörper

| Antibody | Species/Isotype | Conjugate | Company |
|-----------------------------------|------------------------|-------------|---|
| Anti-human CD3 Klon BW264/56 | Mouse IgG2ak | FITC | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany |
| Anti-human CD8 Klon BW135/80 | Mouse IgG2ak | FITC | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany |
| Anti-human CD4 Klon VIT4 | Mouse IgG2ak | APC | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany |
| Anti-human CD25 Klon 4E3 | Mouse IgG2bk | PE | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany |
| Anti-human CD70 Klon REA292 | recombinant human IgG1 | FITC | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany |
| Anti-human CD66abcde Klon TET2 | Mouse IgG2bk | APC Vio770 | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany |
| Anti-human CD27 Klon M-T271 | Mouse IgG1k | PerCP-Cy5.5 | Biolegend, San Diego, CA, USA |
| Anti-human TIGIT Klon A15153G | Mouse IgG2ak | PerCP-Cy5.5 | Biolegend, San Diego, CA, USA |
| Anti-human CD3 Klon OKT3 | Mouse IgG2ak | BV421 | Biolegend, San Diego, CA, USA |
| Anti-human CD86 Klon IT2.2 | Mouse IgG2bk | PerCP-Cy5.5 | Biolegend, San Diego, CA, USA |
| Anti-human 41BBL Klon 5F4 | Mouse IgG1k | PE | Biolegend, San Diego, CA, USA |
| Anti-human CD28 Klon CD28.2 | Mouse IgG1k | PerCP-Cy5.5 | Biolegend, San Diego, CA, USA |
| Anti-human IRF4 Klon IRF4.3E4 | Rat IgG1k | PE | Biolegend, San Diego, CA, USA |

MATERIAL

| | | | |
|---|------------------------------|------------|--|
| Anti-human hIgG F(ab') | Goat F(ab') ₂ IgG | PE | Southern Biotechnology, AL, USA |
| Polyklonal | | | |
| Anti-human hIgG F(ab') | Goat F(ab') ₂ IgG | FITC | Southern Biotechnology, AL, USA |
| Polyklonal | | | |
| Anti-human TIM3 Klon 7D3 | Mouse IgG1k | BV421 | BD Bioscience, San Jose, CA, USA |
| Mouse Anti-STAT5, Klon 47/stat5(pY694) | Mouse IgG1k | BV421 | BD Bioscience, San Jose, CA, USA |
| Anti-human CD62L Klon DREG-56 | Mouse IgG1k | BV421 | BD Bioscience, San Jose, CA, USA |
| Anti-human CD45RO Klon UCHL1 | Mouse IgG2ak | BV605 | BD Bioscience, San Jose, CA, USA |
| Anti-human CD8 Klon RPA-T8 | Mouse IgG1k | BV421 | BD Bioscience, San Jose, CA, USA |
| Anti-human CD80 Klon L307.4 | Mouse C3H | FITC | BD Bioscience, San Jose, CA, USA |
| Anti-human CD137 Klon 4B4-1 | Mouse IgG1k | BV421 | BD Bioscience, San Jose, CA, USA |
| Anti-human CD107a Klon H4A3 | Mouse IgG1k | FITC | BD Bioscience, San Jose, CA, USA |
| Anti-human IL-2, Klon B33.2 | Mouse IgG1 | Biotin | BD Pharmingen™, Hamburg, Germany |
| Anti-human IFN-γ, Klon 42.B3 | Mouse IgG1 | Biotin | BD Pharmingen™, Hamburg, Germany |
| Goat F(ab') ₂ anti-human IgG antibody Polyklonal | Goat F(ab') ₂ IgG | Biotin | Southern Biotechnology, AL, USA |
| Goat Anti-rat IgG1 Polyklonal | Goat IgG | Peroxidase | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| Anti-beta-actin Klon C4 | Mouse IgG1k | Peroxidase | Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA |

Tabelle 7. Konjugierte Antikörper

2.6 Zytokine

| Zytokine | Firma |
|----------------------------|--|
| Proleukin® (IL-2 Standard) | Novartis Pharma GmbH, Basel, Switzerland |

Tabelle 8. Zytokine

2.7 Plasmidvektoren

| ID | Plasmid | Charakteristik/Referenz |
|-------|--|---|
| #392 | pCOLT-GALV | Retroviraler Vektor mit der Expressionskassette des Gibbon-Affen-Leukämievirus-Hüllproteins (GALV env) |
| #393 | pHIT 60 | Retroviraler Vektor, der die Expressionskassette der Proteine gag und pol des Moloney-Maus Leukämievirus (M-MuLV) enthält |
| #2374 | pBullet_BW43126_FC_CD28_CD3z_mir30_shKanamycin | Retroviraler Vektor, der die Expressionskassette für einen CEA-spezifischen CAR BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3ζ und eine shRNA spezifisch für Kanamycin enthält |
| #2439 | pBullet_BW43126_hFC_CD28_CD3z_mir30_shIRF4_1 | Retroviraler Vektor, der die Expressionskassette für einen CEA-spezifischen CAR BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3ζ und eine shRNA spezifisch für IRF4 (TRCN0000433892) enthält |
| #2440 | pBullet_BW43126_hFC_CD28_CD3z_mir30_shIRF4_2 | Retroviraler Vektor, der die Expressionskassette für einen CEA-spezifischen CAR BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3ζ und eine shRNA spezifisch für IRF4 (TRCN0000014764) enthält |
| #1795 | pQCX-eGFP | GFP Expressionsvektor |

Tabelle 9. Plasmidvektoren

2.8 Bakterienstämme

| Bakterienstämme | Beschreibung |
|-----------------|--|
| E.Coli DH5α | F-, end A1, hsd R17 (rk-, mk-) sup E44, thi-1, lambda-, recA1, gyrA96, Φ 80 d lacZ δ M15 |

Tabelle 10. Bakterienstämme

2.9 Zelllinien

| Zelllinie | Eigenschaften | Referenz |
|----------------|---|---------------|
| HEK 293T | Menschliche embryonale Nierenzelllinie 293 (ATCC CRL-3216™), die das große T-Antigen SV40 stabil exprimiert; Neomycin-resistent | |
| BxPC-3 | Humane Pankreaskarzinom-Zelllinie mit hoher CEA-Expression | ATCC CRL-1420 |
| BxPC-3-GFP | BxPC-3 Zelllinie, transduziert mit humanem GFP-Expressionsvektor (#1795) | |
| MIA PaCa-2 | Humane Pankreaskarzinom-Zelllinie mit geringer CEA-Expression | ATCC CRL-1687 |
| MIA PaCa-2-GFP | MIA PaCa-2 Zelllinie, transduziert mit humanem GFP-Expressionsvektor (#1795) | |

Tabelle 11. Zelllinien

2.10 Primäre Zellen

Menschliche mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMZs) wurden aus frischem Blut isoliert, das aus der Blutplättchen- und Leukozytenfraktion einer Blutspende von gesunden Spendern gewonnen wurde. Die Proben wurden vom Universitätsklinikum Regensburg bereitgestellt und genehmigt (Ethik Nr. 21-2224-101).

2.11 Software

| Software | Company |
|-----------------------|------------------------|
| BioRender | BioRender |
| FACS | BD Bioscience |
| FlowJo | FlowJo LLC |
| GraphPad Prism | GraphPad Software, Inc |
| Microsoft Excel | Microsoft |
| Miscrosoft Powerpoint | Microsoft |
| Microsoft Word | Microsoft |
| SnapGene Viewer | SnapGene |

Tabelle 12. Software

3 METHODEN

3.1 Bakterien

Alle Arbeiten mit Bakterien wurden in einem gentechnischen Labor der Sicherheitsstufe S2 durchgeführt.

3.1.1 Bakterienkultur

Escherichia coli (E. coli) DH5 α wurden über Nacht (bei 37 °C und 200 U/min) in flüssigem LB-Medium oder auf einer LB-Platte kultiviert. 100 μ g/ml Ampicillin (Amp) wurden hinzugefügt, um das Wachstum genetisch veränderter Bakterien, die das Amp-Resistenzgen tragen, zu selektieren. Zur Langzeitlagerung wurden 700 μ l Bakterienkultur mit 300 μ l 87 % (v/v) Glycerin gemischt und bei -80 °C gelagert.

3.1.2 Transformation von Bakterien

Kompetente DH5 α -Zellen (gelagert bei -80 °C) wurden auf Eis aufgetaut und 10 ng Plasmid-DNA wurden hinzugefügt. Die Mischung aus Plasmid-DNA und Bakterien wurde für 90 Sekunden auf 42 °C erhitzt und dann zwei Minuten lang auf Eis abgekühlt. Danach wurden die Bakterien in 900 μ l LB-Medium (ohne Antibiotikum) bei 37 °C unter Schütteln bei 200 U/min 60 Minuten lang inkubiert. Die Suspension wurde dann 5 Minuten lang bei 5000 x g zentrifugiert, in 100 μ l resuspendiert und mit einem Plattierungsspatel auf einer LB-Agarplatte mit Ampicillin verteilt und über Nacht bei 37 °C gelagert.

3.2 Arbeiten mit DNA

3.2.1 Plasmid-Aufreinigung

Für die Plasmid-Aufreinigung wurde das „NucleBond® Xtra Midi Kit“ (Macherey Nagel GmbH) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Vor der DNA-Präparation wurden 100 ml Bakteriensuspension hergestellt. Abschließend wurde die isolierte Plasmid-DNA in sterilem H₂O (destilliert) verdünnt und bei -20 °C gelagert.

3.2.2 Messung von DNA

Die DNA-Konzentration wurde spektrophotometrisch mit dem NanoDrop™ 1000-Spektrophotometer (ThermoFisher Scientific) aus 1 µl DNA-Probe gemessen.

3.3 Zellkultur

3.3.1 Konditionen

Zellkulturexperimente wurden in einem Labor der Biosicherheitsstufe S2 unter einer Laminar-Flow-Haube (Klasse II) (HERASAFE 2030i, ThermoFisher Scientific) durchgeführt. Die Zellen wurden in einer feuchten Atmosphäre (95–100 %) mit 5 % oder 10 % (v/v) CO₂ und 37 °C inkubiert. Als Kulturmedien kamen DMEM und RPMI1640 (mit GlutaMAX™, 10 % (v/v) FCS, 1 M HEPES, 10 mg/ml Streptomycin und 10.000 U/ml Penicillin) zum Einsatz.

3.3.2 Passagierung von adhärenenten Zellen

Nach der Entfernung des Mediums wurde Trypsin/EDTA hinzugefügt und die Zellen wurden 5–10 Minuten lang bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen in frischem Zellkulturmedium geerntet und 5 Minuten lang bei 500 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet in frischem Kulturmedium resuspendiert und je nach Wachstumsrate der einzelnen Zelllinie im Verhältnis 1:20 oder 1:40 wieder in eine Zellkulturflasche gegeben.

3.3.3 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Die Zellen wurden in 500 µl Gefriermedium A (60 % FCS + 40 % RPMI 1640) und 500 µl Gefriermedium B (80 % FCS + 20 % DMSO) resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Kryoröhrchen wurden in einen Gefrierschrank mit -80 °C gestellt. Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen in 10 ml Kulturmedium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen 5 Minuten lang bei 300 x g zentrifugiert und in frischem Kulturmedium resuspendiert.

3.3.4 Zellzählung

Die Zellen wurden mit Trypanblau und einer „Neubauer“-Zählkammer (Celeromics) gezählt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde folgende Formel verwendet: Gesamtzahl der Zellen / 4 x (Verdünnung) x 100 x (Volumen) = Gesamtzahl der Zellen.

3.3.5 Isolierung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMZs)

PBMZs wurden aus frischem Blut gesunder Spender mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnen. Der Blutprobe wurde 1x PBS zugesetzt, bevor 25 ml des verdünnten Blutes vorsichtig auf 15 ml Human Pancoll Solution (PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland) übertragen wurden. Danach wurde die Mischung zentrifugiert (2000 U/min mit einer Bremsgeschwindigkeit von 3 bei 20 °C für 20 Minuten). Als nächstes wurden die Lymphozyten gewonnen und dreimal mit 30 ml 1x PBS gewaschen (1400 U/min, 20 °C, 10 Minuten). Isolierte PBMZs wurden kryokonserviert und bei -80 °C gelagert.

3.3.6 Transfektion von HEK 293T Zellen

Die Transfektion von 293T-Zellen erfolgte über das Transfektionsreagenz PEIpro® (Polyplus-Transfektion). Zunächst wurden 293T-Zellen (3×10^6) über Nacht in eine 10-cm-Petrischale ausgesät, die in DMEM (mit 10 % FCS (v/v), 1 M HEPES, 10 mg/ml Streptomycin und 10.000 U/ml Penicillin), kultiviert wurde. Am nächsten Tag wurde die Vektor-DNA (10 µg in 10 µl) mit Helferplasmid-DNA (5 µg in 5 µl pHIT60 und 5 µg in 5 µl pCOLT-GALV) und der Transfektionsreagenzlösung (20 µl) in DMEM (500 µl) gemischt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde der Überstand der 293T-Zellen mit RPMI1640+ GlutaMax™ (mit 1 M HEPES, 10 mg/ml Streptomycin und 10.000 U/ml Penicillin) ausgetauscht. Dann wurde die DNA/Transfektionsreagenzmischung auf die 293T-Zellen getropft. Anschließend wurden die 293T-Zellen über Nacht in einem 5 % (v/v) CO₂-Inkubator bei 37 °C inkubiert.

3.3.7 Retrovirale Transduktion von human T-Zellen

Kryokonservierte PBMZs wurden aufgetaut und am selben Tag mit anti-CD3-mAK (OKT-3), anti-CD28-mAK (15E8) und IL-2 (1000 IU/ml) stimuliert. IL-2 (200 IU/ml) wurde nach der Aktivierung regelmäßig supplementiert (Tage 2, 3 und 4). Die retrovirale Transduktion wurde am Tag +2 und am Tag +3 nach der Aktivierung durchgeführt. T25-Zellkulturflaschen wurden über Nacht bei 4 °C mit 2 ml Poly-L-Lysin (10 µg/ml) beschichtet. Als nächstes wurden die T25-Zellkulturflaschen gespült und frischer retroviraler Überstand in einer Menge von 5 ml pro

Flasche hinzugefügt. Anschließend wurden die T25-Zellkulturflaschen 30 Minuten lang bei 32 °C und $3000 \times g$ zentrifugiert. Abschließend wurden die T-Zellen in 5 ml retroviralem Überstand resuspendiert und 90 Minuten lang bei 32 °C und $1600 \times g$ zentrifugiert. Vier Tage nach der Stimulation wurden die CAR-T-Zellen durch magnetisch aktivierte Zellsortierung (MACS) isoliert, indem sie zuvor mit einem biotinylierten Ziegen-F(ab')₂-Anti-Human-IgG-Antikörper markiert und anschließend auf MS-Säulen unter Verwendung von Anti-Biotin-Mikrobeads aufkonzentriert wurden.

3.3.8 Durchflusszytometrie (FACS)

Für die Färbung von Oberflächenmarkern wurden die Zellen in 50 µl FACS-Puffer mit Antikörpern (siehe Abschnitt „Material“) 15 Minuten lang bei 4 °C inkubiert. Die intrazelluläre Färbung erfolgte durch Fixierung und Permeabilisierung der Zellen mit dem „Transcription Buffer Set“ für 30 Minuten bei 4 °C. Für die STAT5-Färbung wurde das „Transcription Factor Phospho Buffer Set“ verwendet. Die Lebend/Tot-Diskriminierung wurde mit dem Viabilitätsfarbstoff eFluor 780 durchgeführt. Die Gates wurden gemäß Fluoreszenz-Minus-Eins-Kontrollen (FMO) gesetzt. Die Immunfluoreszenz wurde mit einem BD FACSLyric (BD Biosciences) ausgestattet mit FACSuite-Software detektiert. Die Daten wurden mit FlowJo analysiert.

3.3.9 Western Blot

Nach einer 24-stündigen Kokulturperiode mit BxPC-3-Zellen wurden CAR-T-Zellen lysiert (3×10^6 Zellen pro Kondition). Anschließend wurden die Lysate durch SDS-PAGE in 4–12 % (w/v) Bis-Tris-Gelelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Anschließend erfolgte das Blotting die Markierung zuerst mit dem Anti-IRF4-mAK (Verdünnung 1:200) und anschließend mit dem Peroxidase-markierten Anti-Ratten-IgG1-Antikörper (Verdünnung 1:5000). Als nächstes wurden die Membranen abgezogen und der Peroxidase-konjugierten Anti-β-Actin-Antikörper (Verdünnung 1:20.000) aufgetragen. Schließlich wurden die Banden mittels Chemolumineszenz (ChemiDoc Imaging System, BioRad) nachgewiesen.

3.4 Assays

3.4.1 Zytokinsekretion

Tumorzellen wurden in 96-well-Flachbodenplatten ausgesät (1×10^5 Zellen/Well). Am nächsten Tag wurden T-Zellen hinzugefügt (1×10^5 Zellen/Well). Für einige Experimente wurde der monoklonale Antikörper BW2064/36 über Nacht auf 96-Well-Platten anstelle von

Tumorzellen beschichtet. Nach 48-stündiger Inkubation wurden die Kulturüberständen eingefroren und zur anschließenden Analyse von IL-2, TNF und IFN- γ mittels ELISA bei -80 °C gelagert.

3.4.2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die spezifischen Antikörper für IL-2 (1 $\mu\text{g/ml}$ Maus-Anti-Human-IL-2), TNF (1 $\mu\text{g/ml}$ Maus-Anti-Human-TNF) und IFN- γ (1 $\mu\text{g/ml}$ Maus-Anti-Human-IFN- γ) wurden über Nacht bei 4 °C auf MaxiSorp™-Mikrotiterplatten aufgetragen. Anschließend wurden die Platten zunächst mit in 1x PBS gelöstem 1 % (w/v) BSA (200 $\mu\text{l/Well}$) für 2 Stunden inkubiert (Raumtemperatur auf einem Plattenschüttler bei 300 U/min) und dreimal mit PBS-T (200 μl) gewaschen. Als nächstes wurden die Überstände aufgetaut und auf die Platten gegeben (50 $\mu\text{l/Well}$ und Standardproben 100 $\mu\text{l/Well}$). Die Platten wurden 2 Stunden lang bei 300 U/min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Platten viermal mit PBS-T (200 μl) gewaschen und mit den biotinylierten Detektionsantikörpern (1 $\mu\text{g/ml}$ Biotin-Maus-Anti-Human-IL-2, 1 $\mu\text{g/ml}$ Biotin-Maus-Anti-Human-TNF, 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Biotin-Maus-Anti-Human-IFN- γ) in 1% (w/v) BSA in PBS-T (50 $\mu\text{l/Well}$) bei Raumtemperatur auf einem Plattenschüttler bei 300 U/min für 1 Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Platten viermal mit PBS-T (200 $\mu\text{l/Well}$) gewaschen und mit Streptavidin-POD (1:10.000 in 1 % (w/v) BSA in PBS-T, 50 $\mu\text{l/Well}$) für 30 Minuten auf Raumtemperatur bei 300 U/min inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit PBS-T (200 $\mu\text{l/Well}$) wurde ABTS (10 mg/ml in 1 ml ABTS 10x-Puffer und 9 ml ddH₂O, 50 $\mu\text{l/Well}$) zugegeben. Schließlich wurde die Absorption (Absorption 405 nm, 1-Ref. 405 – 490 nm) mit einem Tecan Spark Mikroplatten-Reader gemessen.

3.4.3 Phycoerythrin QuantiBRITE Antigendichte-Quantifizierungsassay

Der QuantiBRITE PE-Assay (LOT: #60550, BD) wurde verwendet, um die Dichte von CEA auf der Oberfläche von Tumorzellen zu bestimmen. CEA wurde mit einem PE-markierten Anti-CEA-Antikörper (siehe Abschnitt Material) angefärbt. Der Assay basiert auf einem vorkalibrierten Standard-Bead-Set. Die Kalibrierung mit PE-markierten beads, die eine bekannte Anzahl an pro bead gebundenen PE-Fluorophormolekülen tragen, kann die Intensität der durch Durchflusszytometrie erhaltenen Fluoreszenzsignale in die Anzahl der Fluorophore übersetzen.

3.4.4 CD107a Degranulations Assay

Tumorzellen wurden über Nacht in Platten in 96-well-Flachbodenplatten ($0,05 \times 10^6$ Zellen pro Well) ausgesät. Am Ende jeder Runde (R1-3) des repetitiven Stimulationsassay wurden T-

Zellen mit BxPC-3-Zellen in der Gegenwart von 1 μ M Monensin und einem FITC-konjugierten anti-CD107a-Antikörper erneut mit Tumorzellen stimuliert. Nach vier Stunden wurden die T-Zellen auf Viabilität (Viabilitätsfarbstoff eFluor 780), CAR (Goat-F(ab')₂-anti-Human-IgG-PE-Antikörper), CD8 (BV421-konjugierter anti-CD8-Antikörper) und CD4 (APC-konjugierter anti-CD4-Antikörper) gefärbt. Anschließend wurde die Degranulation (CD107a⁺-Zellen) mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

3.4.5 Zytotoxizitäts Assay

T-Zellen ($0,125\text{--}10 \times 10^4$ Zellen/Well) wurden für 24 Stunden (in einigen Experimenten für 72 Stunden) in 96-Well-Rundbodenplatten mit Zielzellen (jeweils 1×10^4 Zellen/Well) in dekrementierenden Effektor zu Zielzelle Verhältnissen (1:1, 1:2, 1:4, 1:8) kokultiviert. Anschließend wurde ein XTT-basierter kolorimetrischer Assay unter Verwendung des „Cell Proliferation Kit II“ eingesetzt, um die spezifische Zytotoxizität zu bestimmen. Die Viabilität von Tumorzellen wurde als Mittelwert von sechs Wells bestimmt, die nur Tumorzellen enthielten, abzüglich des mittleren Hintergrundniveaus von Wells, die nur mit Medium gefüllt waren. Die Hintergrundbildung von Formazan aufgrund der Anwesenheit von T-Zellen wurde aus dreifachen Wells berechnet, die T-Zellen in der gleichen Anzahl enthielten wie in den entsprechenden Versuchsbedingungen. Der Prozentsatz lebensfähiger Tumorzellen in wurde anhand der folgenden Formel bestimmt: Lebensfähigkeit (%) = [OD (Versuchsbedingungen – entsprechende Anzahl an T-Zellen)] / [OD (Tumorzellen ohne T-Zellen – Medium)] \times 100. Die entsprechende Zytotoxizität (%) wurde als 100 – Viabilität (%) definiert.

3.4.6 Repetitiver Stimulations Assay

GFP-markierte BxPC-3-Zellen wurden in 12-Well-Platten mit ausgesät ($0,1 \times 10^6$ Zellen pro Well). Am nächsten Tag wurden CAR-T-Zellen ($0,1 \times 10^6$) hinzugefügt. Drei Tage später (Runde 1, R1) wurden die Wells geerntet (anfänglicher Überstand). Nach der Trypsinisierung wurde die Platte mit T-Zellmedium gefüllt und mit dem anfänglichen Überstand gepoolt. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gespült und in 1 ml T-Zellmedium resuspendiert. Danach wurden 100 μ l zur Zellzählung (lebende GFP⁺-Tumorzellen und lebende CD3⁺/CAR⁺ CAR-T-Zellen) über FACS mit Hilfe von „Counting beads“ („CountBright“, ThermoFisher) verwendet. Die restlichen 900 μ l wurden auf eine neue 12-Well-Platte mit $0,1 \times 10^6$ BxPC-3-Zellen gegeben und im Anschluss für vier Tage lang inkubiert (Runde 2, R2). Die Stimulation wurde für Runde 3 (R3) und Runde 4 (R4) wiederholt. Bezüglich der phänotypischen Analysen mittels Durchflusszytometrie wurden unmarkierte BxPC-3-Zellen ausgesät und für drei Runden (R1-R3) repetitiv stimuliert.

4 ERGEBNISSE

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten bereits in dem Journal Frontiers in Immunology publiziert werden:

Harrer DC, Bezler V, Hartley J, Herr W, Abken H. IRF4 downregulation improves sensitivity and endurance of CAR T cell functional capacities. Front Immunol. 2023 May 23;14:1185618. doi: 10.3389/fimmu.2023.1185618. PMID: 37287982; PMCID: PMC10243527.

Die im Folgenden dargelegten Ergebnisse und Abbildungen sind in modifizierter und ergänzter Form aus der entsprechenden Publikation entnommen.

4.1 CAR-T-Zellen mit reduzierter IRF4-Expression

4.1.1 *T-Zellen zeigen eine Hochregulierung von IRF4 nach Aktivierung*

Gegenstand dieser Arbeit ist die Entwicklung von CAR-T-Zellen mit reduzierter IRF4-Expression. Dazu wurde in einem ersten Schritt die IRF4-Expression mittels intrazellulärer IRF4-Färbung und nachfolgender Durchflusszytometrie in T-Zellen vor und nach Stimulation durch den CAR bestimmt. CAR-T-Zellen wurden durch retroviraler Transduktion mit einem CEA-spezifischen CAR der zweiten Generation mit CD28-Kostimulation erzeugt. Nicht transduzierte Zellen wurden lediglich durch Aktivierung der T-Zellen und anschließende Expansion mit IL-2 erzeugt. Es ist bekannt, dass IRF4 durch TCR Aktivierung in konventionellen T-Zellen hochreguliert wird. Allerdings gibt es nur wenige Daten über die IRF4-Expression in CAR-T-Zellen. Untransduzierte T-Zellen und CEA-spezifische CAR-T-Zellen wurden durch ihren TCR mit Hilfe von immobilisiertem anti-CD3-mAK OKT-3 und anti-CD28-mAK 15E8 stimuliert. Durch die agonistischen Antikörper OKT-3 und 15E8 wird eine starke T-Zell Aktivierung erreicht. Die Aktivierung mit OKT-3 und 15E8 wurde zusätzlich zur Aktivierung für die retrovirale Transduktion durchgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die Zellen geerntet und die IRF4-Expression gemessen. Wie in Abbildung 3 dargestellt, zeigt sich nach Stimulation sowohl eine Zunahme der IRF4-Expression in CD8⁺ wie auch in CD4⁺ T-Zellen. Auffallend ist, dass CAR-T-Zellen bereits eine höhere IRF4-Expression vor Stimulation aufweisen als untransduzierte T-Zellen. Zusammenfassend kann konstatiert werden, dass IRF4 in CAR-Zellen nach Stimulation hochreguliert wird.

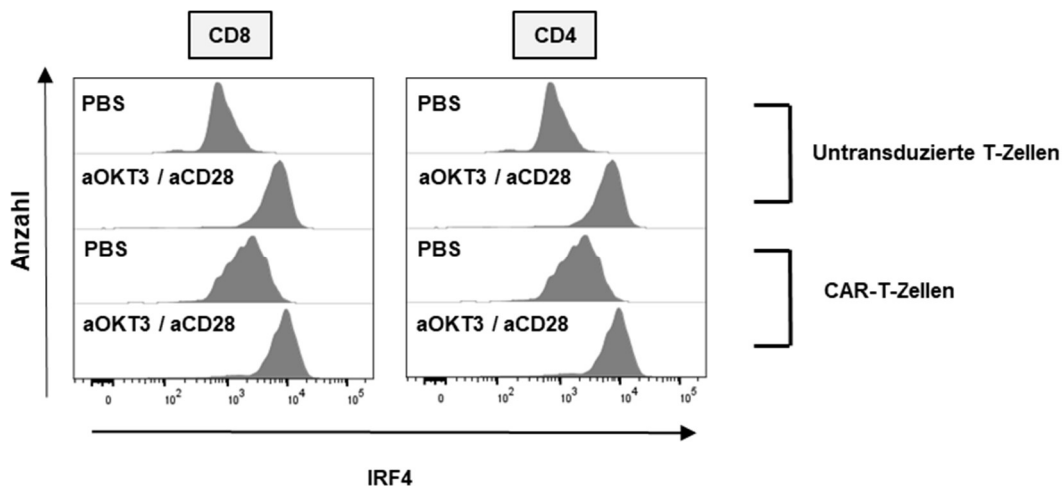


Abbildung 3. Untransduzierte T-Zellen und CAR-T-Zellen zeigen eine Hochregulierung von IRF4 nach TZR/CD28 Stimulation.

T-Zellen wurden durch ihren TCR/CD28 aktiviert und CAR T-Zellen anschließend durch retrovirale Transduktion erzeugt. Untransduzierte Zellen wurden durch Aktivierung und anschließende Expansion mit IL-2 erzeugt, jedoch ohne retrovirale Transduktion. Intrazelluläre Färbung von IRF4 in CD8⁺ (linkes Feld) und CD4⁺ T-Zellen (rechtes Feld) ohne (PBS) oder nach Stimulation mit beschichtetem anti-CD3-mAK OKT-3 (2,5 µg/ml) und anti-CD28-mAK 15E8 (5 µg/ml). Dargestellt ist ein repräsentativer T-Zell Spender von fünf Spendern.

4.1.2 CAR-T-Zellen ausgestattet mit einer IRF4-spezifischen shRNA weisen eine reduzierte IRF-4 Expression bei stabiler CAR-Expression auf

Um CAR-T-Zellen mit reduzierter IRF4-Expression zu erzeugen, haben wir eine retrovirale Expressionskassette entwickelt, die konstitutiv sowohl für einen CEA-spezifischen CAR (CEA-28ζ) als auch für eine IRF4-spezifische shRNA kodiert. Diese ist in eine miRNA30-Umgebung eingebettet, damit die shRNA-Transkription durch den CMV-Promotor innerhalb des LTR (Abbildung 4A) ermöglicht wird. Es wurden initial zwei IRF4-spezifische shRNAs getestet: CEA-28ζ-I1 und CEA-28ζ-I2. Als Kontrollkonstrukt (CEA-28ζ-K) diente ein Vektor, der sowohl für den CEA-spezifischen CAR (CEA-28ζ) kodiert als auch für eine etablierte Kontroll-shRNA, die gegen das im humanen System nicht existenten Kanamycin-Gen gerichtet ist [32]. Nach retroviraler Transduktion zeigten CEA-28ζ-I1-CAR-T-Zellen und CEA-28ζ-I2-CAR-T-Zellen ähnliche CAR-Expressionsniveaus (Abbildung 4B). CEA-28ζ-K-CAR-T-Zellen zeigten eine etwas niedrigere Transduktionsrate (Abbildung 4B). CAR⁺-Zellen wurden durch magnetisch aktivierte Zellsortierung (MACS) angereichert, was bei mehr als 90% CAR⁺-Zellen zu gleichen Anteilen an CAR⁺ Zellen führte. In weiteren Analysen wurden angereicherte CAR-T-Zellpräparate mit gleicher Anzahl CAR T-Zellen verwendet.

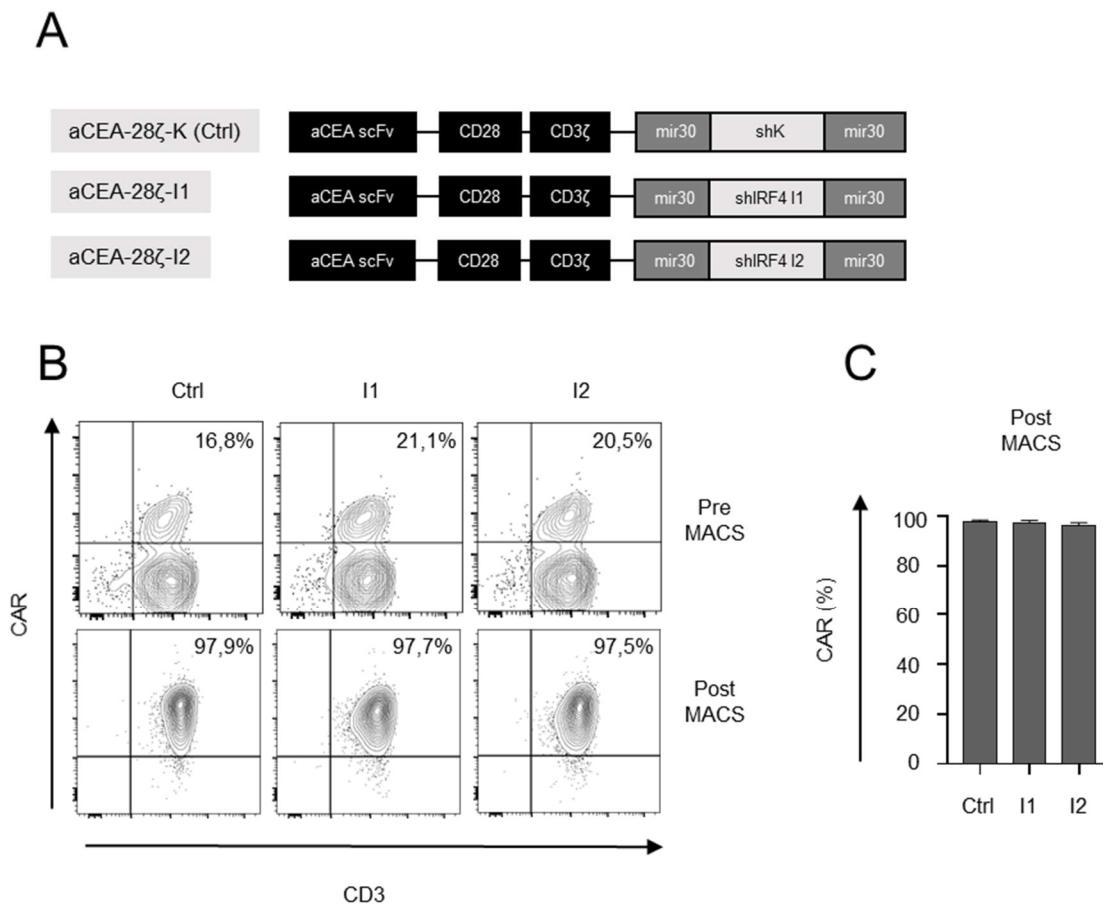


Abbildung 4. CAR-T-Zellen ausgestattet mit einer IRF4-spezifischen shRNA weisen eine gleichermaßen hohe CAR-Expression auf.

(A) Schematische Darstellung der verwendeten CAR-Konstrukten. (B) CAR-Expression in T-Zellen nachgewiesen durch Färbung mit einem Phycoerythrin (PE)-markierten Goat-Anti-IgG-Antikörper vor (obere FACS-plots) und nach (untere FACS-plots) magnetischer Zelltrennung (MACS). Dargestellt ist einer von vier repräsentativen Spendern. (C) Prozentsatz der CAR-exprimierenden Zellen nach MACS-Anreicherung. Die Daten stellen Mittelwerte \pm SEM von vier Spendern dar, p-Werte wurden durch den ungepaarten t-Test berechnet, ns: nicht signifikant.

4.1.3 Herunterregulierung der IRF4-Expression in CAR-T-Zellen

Um die Herunterregulierung von IRF4 in durch die IRF4-spezifische shRNA zu verifizieren, wurde die IRF4-Expression in CEA-spezifischen CAR-T-Zellen über einen Zeitraum von 72 Stunden nach der Co-Kultivierung mit CEA⁺ BxPC-3-Pankreaszellen gemessen. Durch die CAR-Stimulation wurde IRF4 nach vier Stunden sowohl in CD8⁺ als auch in CD4⁺ CAR-T-Zellen hochreguliert, wobei die IRF4-Expression nach 24-48 Stunden einen Höhepunkt erreichte, gefolgt von einem Rückgang auf den Ausgangswert nach 72 Stunden (Abbildung 5A).

Im Vergleich zu Kontroll-CEA-28ζ-K-CAR-T-Zellen mit shRNA irrelevanter Spezifität zeigten die mit der IRF4-spezifischen shRNA transduzierte CAR-T-Zellen zu allen Zeitpunkten eine signifikant verringerte IRF4-Expression. Beide IRF4-shRNA-Konstrukte waren bei der Reduzierung der IRF4-Expression ähnlich wirksam. In weiteren Analysen verwendeten wir das CEA-28ζ-I1-Konstrukt. Zusätzlich wurde die Herunterregulierung von IRF4 24h nach antigenspezifischer Aktivierung in CEA-28ζ-I1 transduzierten T-Zellen durch Western-Blot-Analyse bestätigt (Abbildung 5B). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das retrovirale Ein-Vektor-System eine konstitutiven CAR-Expression zusammen mit der Herunterregulierung von IRF4 durch shRNA ermöglicht, was den Herstellungsprozess von entsprechenden CAR-T-Zell Produkten erleichtert.

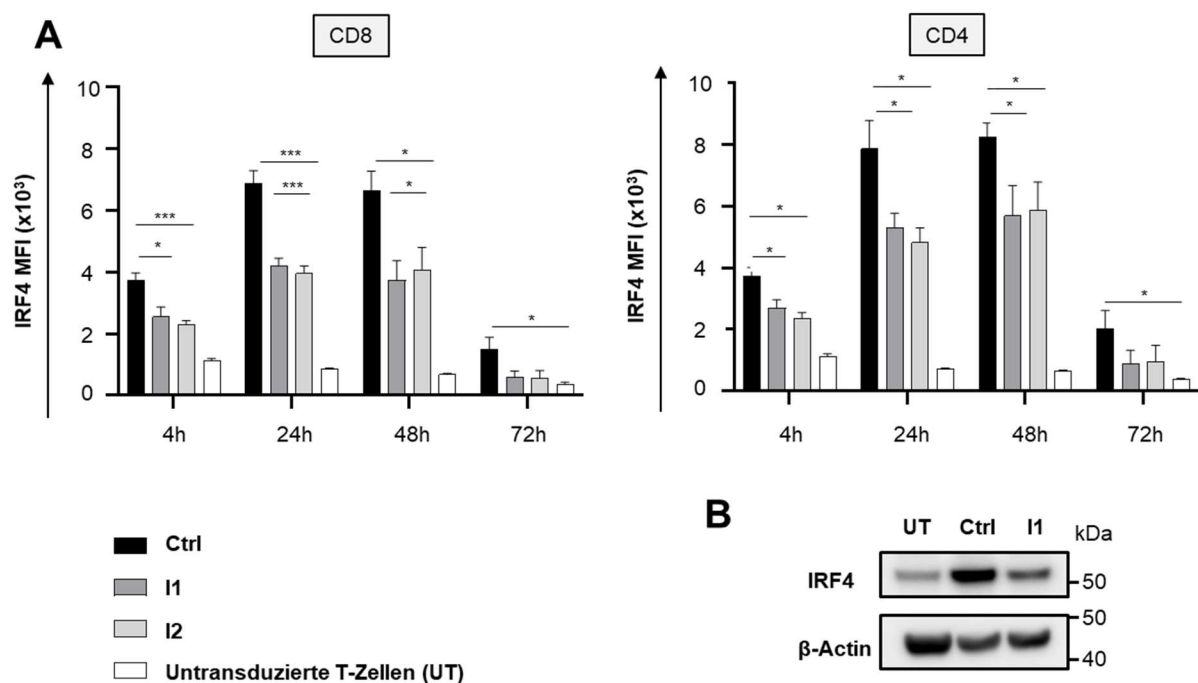


Abbildung 5. Reduktion der IRF4-Expression in CAR-T-Zellen.

(A) Intrazelluläre Färbung von IRF4 nach Stimulation mit CEA⁺ BxPC-3-Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten in CD8⁺ (linkes Diagramm) und CD4⁺ CAR T-Zellen (rechtes Diagramm) mit Hilfe der Durchflußzytometrie. CAR-T-Zellen wurden durch TCR/CD28 Aktivierung von PBMZs und anschließende retrovirale Transduktion erzeugt. Untransduzierte Zellen wurden durch Aktivierung von PBMZs und anschließende Expansion mit IL-2 erzeugt, jedoch ohne retrovirale Transduktion. Die Daten stellen Mittelwerte ± SEM von fünf Spendern dar, die p-Werte wurden durch den ungepaarten t-Test berechnet, * = $p \leq 0,05$, *** = $p \leq 0,001$. **(B)** Western Blot, der die IRF4-Proteinexpression in untransduzierten (UT) T-Zellen, CEA-28ζ-K (Ctrl) CAR T-Zellen und CEA-28ζ-I1 (I1) CAR T-Zellen nach einer 24-stündigen Kokulturperiode mit BxPC-3-Zellen zeigt. Dargestellt ist ein repräsentativer Spender aus einer Gesamtheit von drei Spendern.

4.2 Die Herunterregulierung von IRF4 hat keinen negativen Einfluss auf die Funktionalität der CAR-T-Zellen

4.2.1 Zytotoxizität von CAR-T-Zellen mit reduzierter IRF4-Expression

Als nächstes wurde die Zytotoxizität von CEA-28ζ-I1 CAR-T-Zellen mit herunterreguliertem IRF4 im Vergleich zu Kontroll-CEA-28ζ-K CAR-T-Zellen mit irrelevanter shRNA analysiert. Dazu wurden CAR-T-Zellen zusammen mit CEA⁻ 293T-Zellen und CEA⁺ BxPC-3-Pankreaszellen kultiviert. Die Zytotoxizität wurde nach 24 Stunden mittels XTT-Assay bestimmt. Über verschiedene Effektor-Ziel-Verhältnisse hinweg waren sowohl CEA-28ζ-I1 als auch CEA-28ζ-K gleichermaßen wirksam bei der Abtötung von BxPC-3-Zellen (Abbildung 6A). Ferner wurde keine signifikante Antigen-unabhängige Zytotoxizität gegenüber 293T-Zellen beobachtet (Abbildung 6A). Insgesamt wurde keine Beeinträchtigung der Zytotoxizität von CAR-T-Zellen durch die Herunterregulierung von IRF4 in CAR-T-Zellen beobachtet.

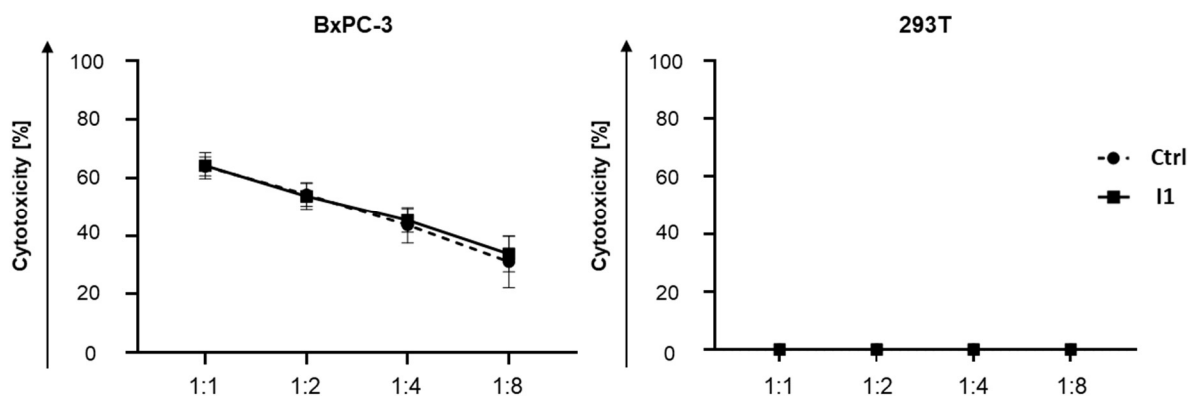


Abbildung 6. Zytotoxizität von CAR-T-Zellen mit reduzierter IRF4-Expression.

Die Zytotoxizität von CEA-28ζ-K (Ctrl) CAR T-Zellen und CEA-28ζ-I1 (I1) CAR T-Zellen nach einer 24-stündigen Ko-Kultur mit CEA⁺ BxPC-3-Zellen (linkes Diagramm) und CEA⁻ 293T-Zellen (rechtes Diagramm) wurde bei den angegebenen Effektor-Ziel-Verhältnissen durch einen XTT-basierten kolorimetrischen Assay gemessen. Die Daten stellen Mittelwerte ± SEM von sechs Spendern dar, die p-Werte wurden durch den ungepaarten t-Test berechnet.

4.2.2 Zytokinsekretion von CAR-T-Zellen mit reduzierter IRF4-Expression

Neben der Zytotoxizität wurde auch die Zytokinsekretion nach einer antigenspezifischen CAR Stimulation mittels ELISA analysiert. Im Anschluss an eine 48-stündige Koinkubation mit BxPC-

3-Zellen sezernierten CEA-28ζ-I1 und CEA-28ζ-K ähnliche Mengen an IFN-γ, IL-2, und TNFα (Abbildung 7). Die Antigen-unabhängige Zytokinsekretion nach Ko-Kultur mit CEA⁻ 293T-Zellen oder ohne Tumorzellen befand sich im Bereich des Messhintergrundes (Abbildung 7). In der Zusammenfassung lässt sich feststellen, dass durch die Herunterregulierung von IRF4 in CAR-T-Zellen keine Beeinträchtigung der Zytokinsekretion der CAR-T-Zellen beobachtet wurde.

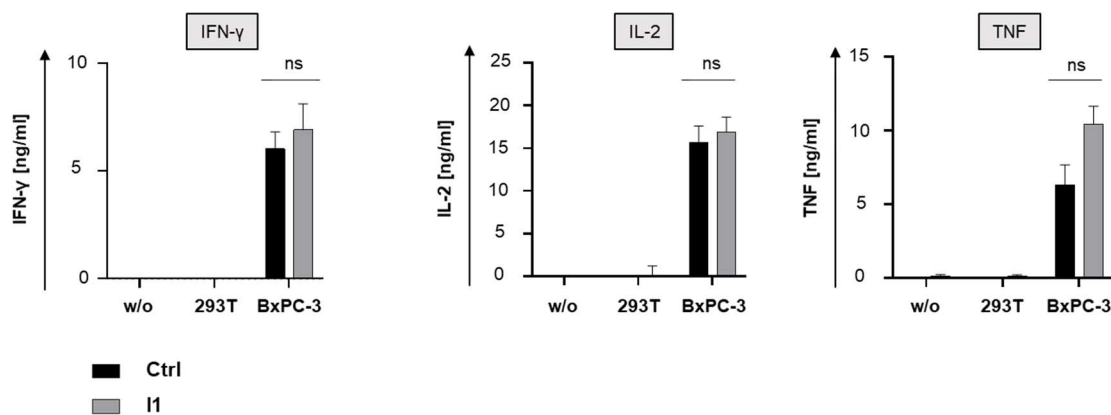


Abbildung 7. Zytokinsekretion von CAR-T-Zellen mit reduzierter IRF4-Expression.

ELISA-basierte Quantifizierung der Zytokinsekretion von CEA-28ζ-K (Ctrl) CAR T-Zellen und CEA-28ζ-I1 (I1) CAR T-Zellen (1×10^5 CAR-T-Zellen) nach einer 48-stündigen Ko-Kultur mit CEA⁺ BxPC-3-Zellen (1×10^5 Zellen), CEA⁻ 293T-Zellen (1×10^5 Zellen) oder ohne Tumorzellen in 200 µl Medium (w/o). Aus den Überständen der Ko-Kultur wurde die Konzentration von IFN-γ (linkes Diagramm), IL-2 (mittleres Diagramm) und TNFα (rechtes Diagramm) bestimmt. Die Daten stellen Mittelwerte \pm SEM von mindestens fünf Spendern dar, die p-Werte wurden durch den ungepaarten t-Test berechnet, ns bedeutet nicht signifikant.

4.3 Die Herunterregulierung von IRF4 verbessert die Aktivität von CAR-T-Zellen unter repetitiven Stimulationsbedingungen

4.3.1 Eine reduzierte Expression von IRF4 steigert die Reduktion der Tumorzellen durch CAR-T-Zellen während wiederholter Stimulation mit Tumorzellen

Das Ziel dieser Arbeit war es, durch Reduktion der IRF4-Expression die Erschöpfung von CAR-T-Zellen als Folge der wiederholten Antigenstimulation langfristig in CAR-T-Zellen zu mildern. Um die CAR-T-Zellen hinsichtlich funktioneller Erschöpfung in-vitro zu charakterisieren, wurde ein in-vitro Stress Test basierend auf der repetitiven Stimulation von CAR-T-Zellen mit CEA⁺ BxPC-3 Zellen benutzt. Konkret wurden die Effektorfunktionen von CAR-T-Zellen während vier aufeinanderfolgenden Stimulationsrunden (Runde 1-4) durch Koinkubation mit

GFP-markierten CEA⁺ BxPC-3-Zellen getestet, wobei jede Runde drei bis vier Tage dauerte. CEA-28ζ-K-CAR-T-Zellen mit physiologischen IRF4-Spiegeln expandierten zunächst innerhalb der ersten Stimulationsrunde. Danach folgte in den weiteren Runden eine Kontraktionsphase (Abbildung 8A). In ähnlicher Weise zeigten CAR-T-Zellen mit reduzierter IRF4-Expression zunächst eine Expansion. Auch hier folgte eine schnelle Kontraktionsphase, die keinen großen Unterschied zu Kontroll-CAR-T-Zellen aufwies. In Bezug auf die anti-Tumorzell Aktivität zeigten sowohl CEA-28ζ-K CAR-T-Zellen als auch CEA-28ζ-I1 CAR-T-Zellen in den ersten beiden Runden eine nahezu vollständige Eliminierung von BxPC-3-Zellen. In den letzten beiden Stimulationsrunden hingegen wurde ein deutlicher Rückgang der Zytotoxizität gegenüber den Krebszellen beobachtet. In der letzten Runde (Runde 4) waren CAR-T-Zellen mit reduzierten IRF4-Spiegeln noch in der Lage, ungefähr die Hälfte der ausgesäten BxPC-3-Zellen zu eliminieren, wohingegen die zytotoxische Kapazität der CEA-28ζ-K Kontroll-CAR-T-Zellen praktisch erloschen war (Abbildung 8A). Ausgehend von einem relativen 1:1 Verhältnis stieg das CD8/CD4-T-Zell-Verhältnis während der wiederholten Antigenstimulation an, d.h. die Anzahl der CD8⁺ T-Zellen nahm gegenüber CD4⁺ Zellen zu (Abbildung 8B). Die Daten zeigen, dass CAR-T-Zellen mit reduzierten IRF4-Expression im Vergleich zu konventionellen CAR-T-Zellen eine verbesserte Tumorzellkontrolle während repetitiver Stimulation aufweisen.

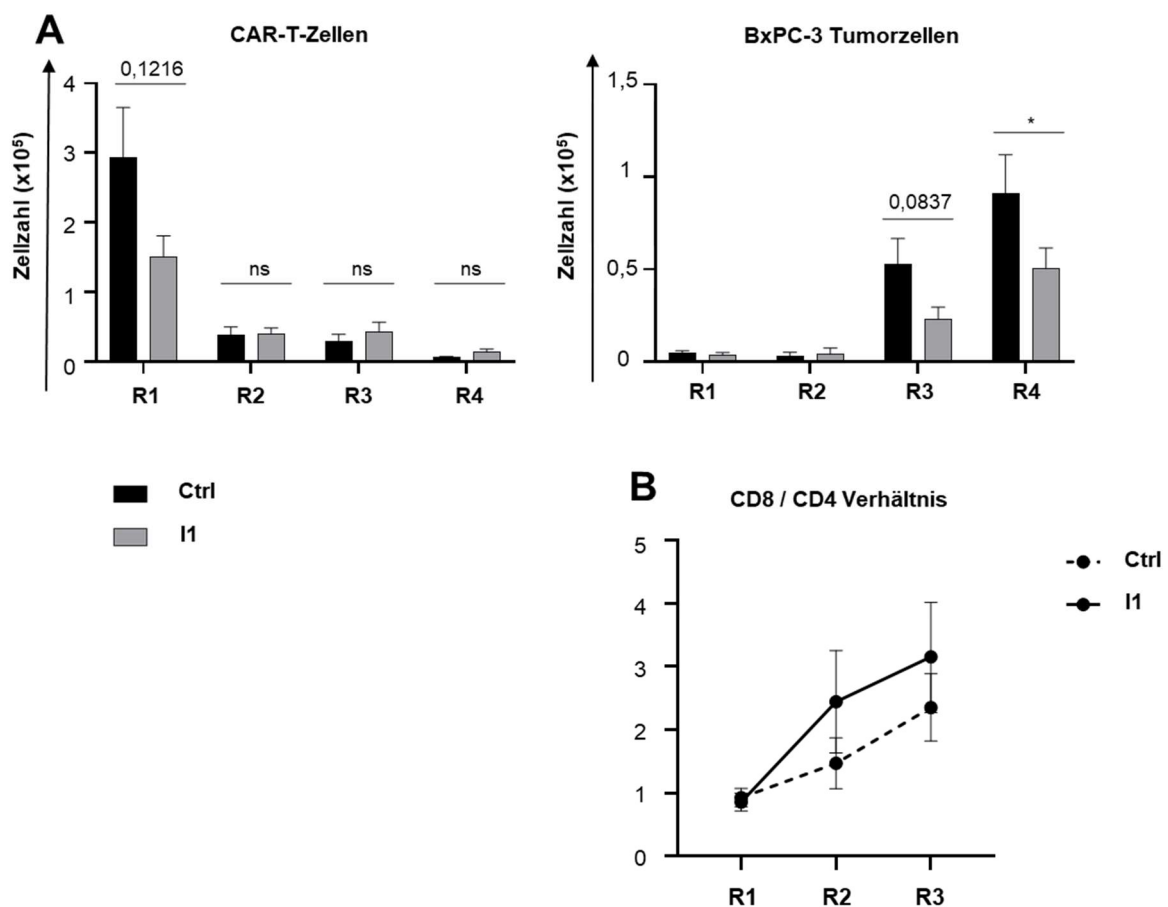


Abbildung 8. Eine reduzierte IRF4 Expression steigert die Tumorzellkontrolle von CAR-T-Zellen.

(A) CEA-28ζ-K (Ctrl) CAR T-Zellen und CEA-28ζ-I1 (I1) CAR T-Zellen (Start mit 1×10^5 CAR-T-Zellen) wurden vier Stimulationsrunden (R1-R4) mit GFP-markierten CEA⁺ BxPC-3-Zellen (1×10^5 Tumorzellen zu Beginn jeder Runde) unterzogen. Am Ende jeder Runde wurden CAR-T-Zellen (lebende CD3⁺ CAR⁺) (linkes Diagramm) und BxPC-3-Zellen (lebende GFP⁺ Zellen) (rechtes Diagramm) mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Die Daten stellen Mittelwerte \pm SEM von sechs Spendern dar, die p-Werte wurden durch den ungepaarten t-Test berechnet, ns bedeutet nicht signifikant und * bedeutet $p \leq 0,05$. **(B)** Phänotypische Analyse von CD8⁺ CAR T-Zellen während der repetitiven Antigenstimulation. CAR-T-Zellen durchliefen drei Runden (R1-R3) repetitiver Stimulation mit unmarkierten BxPC-3-Zellen. Am Ende jeder Runde wurde das CD8/CD4-T-Zell-Verhältnis mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

4.3.2 funktioneller Erschöpfung von CAR-T-Zellen unter repetitiver Stimulation

Um aufzuklären, ob CAR-T-Zellen mit reduzierter IRF4 Expression sich in dem Expressionsprofil von Oberflächenmarkern, die mit funktioneller Erschöpfung assoziiert sind, unterscheiden, erfolgte eine Analyse dieser Marker unter repetitiver Antigenstimulation mittels Durchflusszytometrie. Insgesamt wurden die CAR-T-Zellen in drei Runden (R1-R3) mit BxPC-3-Zellen stimuliert. Am Ende jeder Runde wurde die Expression von PD-1, TIM-3 und TIGIT separat für CD8⁺- und CD4⁺- CAR-T-Zellen erfasst. TIM-3 wurde während der ersten beiden Runden der repetitiven Stimulation in CEA-28ζ-I1 CAR-T-Zellen in einem höheren Ausmaß exprimiert als in CEA-28ζ-K Kontroll-CAR-T-Zellen. Die Hochregulierung von PD-1 und TIGIT war in CEA-28ζ-I1-CAR-T-Zellen und CEA-28ζ-K-Kontroll-CAR-T-Zellen ähnlich (Abbildung 9). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich die Expression von Markern assoziiert mit funktioneller Erschöpfung unter repetitiver Stimulation in CAR-T-Zellen mit reduzierter IRF4 Expression nicht wesentlich von konventionellen CAR-T-Zellen unterschied.

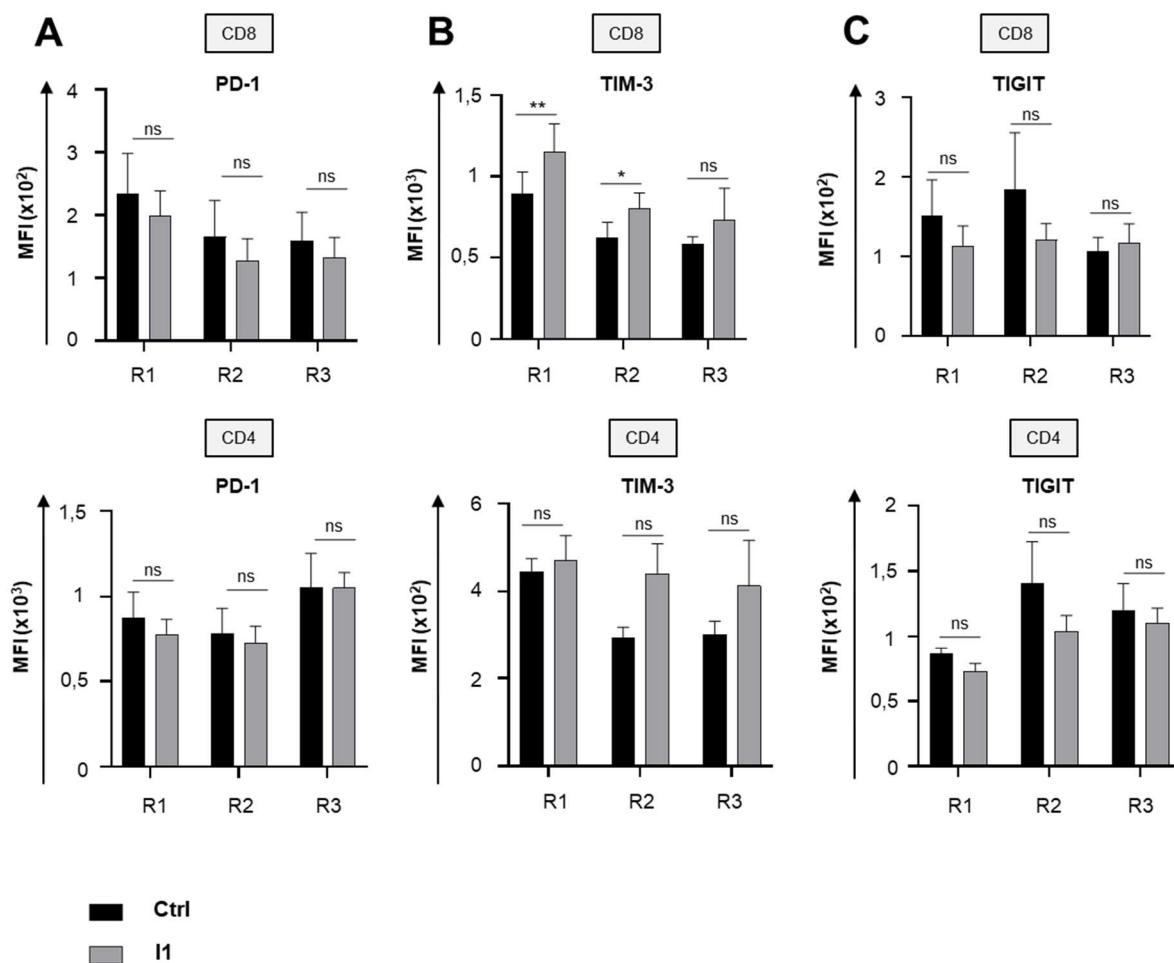


Abbildung 9. Expression von Markern assoziiert mit funktioneller Erschöpfung von CAR-T-Zellen unter repetitiver Stimulation.

Phänotypische Analyse von CEA-28ζ-K (Ctrl) CAR T-Zellen und CEA-28ζ-I1 (I1) CAR T-Zellen unter repetitiver Antigenstimulation. CAR-T-Zellen durchliefen drei Runden (R1-R3) der Antigenstimulation mit BxPC-3-Zellen. Am Ende jeder Runde wurden CAR-T-Zellen auf CD8 oder CD4 gefärbt und hinsichtlich der Expression von PD-1 (A), TIM-3 (B) und TIGIT (C) weiter charakterisiert. Die Daten stellen geometrische Mittelwerte \pm SEM von mindestens vier Spendern dar, p-Werte wurden durch gepaarten t-Test berechnet, ns bedeutet nicht signifikant, * bedeutet $p \leq 0,05$, ** bedeutet $p \leq 0,01$.

4.3.3 Effektor-Gedächtnis-T-Zell Differenzierung von CAR-T-Zellen unter repetitiver Stimulation

Um zu beleuchten, ob CAR-T-Zellen mit reduzierter IRF4 Expression sich in der der Effektor-Gedächtnis-T-Zell Differenzierung unterscheiden, wurde diese nach repetitiver Antigenstimulation mittels Durchflusszytometrie charakterisiert. Insgesamt wurden die CAR-T-Zellen in drei Runden (R1-R3) mit BxPC-3-Zellen stimuliert. Am Ende jeder Runde wurde die Expression von CD62L und CD45RO separat auf CD8⁺- und CD4⁺- CAR-T-Zellen erfasst.

Ausgehend von einer relativ ähnlichen Verteilung von CD45RO⁺/CD62L⁺ zentralen Gedächtnis-T-Zellen und CD45RO⁺/CD62L⁻ Effektor-Gedächtniszellen wechselten sowohl CAR-T-Zellen mit als auch ohne IRF4-Herunterregulierung gleichermaßen während der repetitiven Stimulation von einer zentralen Gedächtnis Differenzierung zu einer Effektor-Gedächtnis Differenzierung (Abbildung 10). CEA-28ζ-I1 CAR-T-Zellen und Kontroll-CAR-T-Zellen unterschieden sich nicht relevant in ihrer Effektor-Gedächtnis-Differenzierung (Abbildung 10).

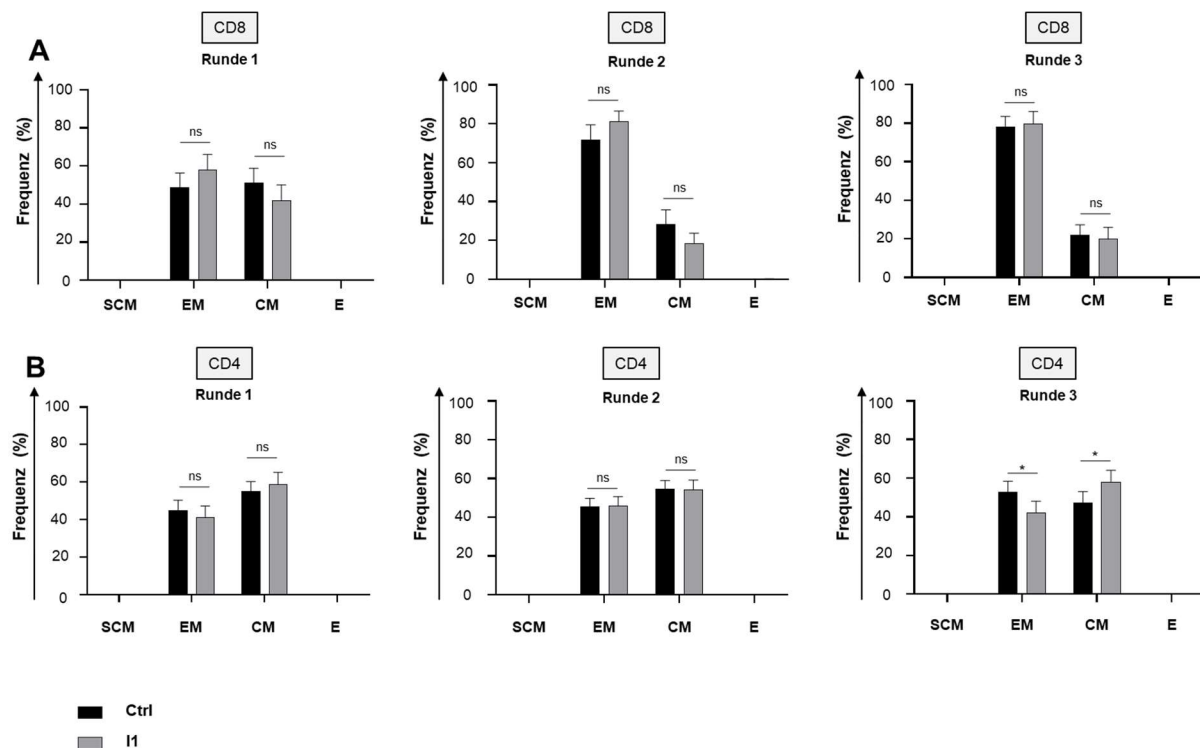


Abbildung 10. Effektor-Gedächtnis-T-Zell Differenzierung von CAR-T-Zellen unter repetitiver Stimulation.

Phänotypische Analyse von CEA-28ζ-K (Ctrl) CAR T-Zellen und CEA-28ζ-I1 (I1) CAR T-Zellen unter repetitiver Antigenstimulation. CAR-T-Zellen durchliefen drei Runden (R1-R3) der Antigenstimulation mit BxPC-3-Zellen. Am Ende jeder Runde wurden CAR-T-Zellen auf CD8 oder CD4 gefärbt und hinsichtlich Effektor-Gedächtnis-T-Zell Differenzierung charakterisiert: SCM = Stammgedächtniszelle (CD45RO⁺ CD62L⁺), EM = Effektor-Gedächtniszelle (CD45RO⁺ CD62L⁻), CM = Zentrale Gedächtniszelle (CD45RO⁺ CD62L⁺), E = Effektor (CD45RO⁻ CD62L⁻). Die Daten stellen geometrische Mittelwerte \pm SEM von mindestens vier Spendern dar, p-Werte wurden durch gepaarten t-Test berechnet, ns, nicht signifikant, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$.

4.3.4 Expression kostimulatorischer Rezeptoren auf CAR-T-Zellen unter repetitiver Stimulation

Am Ende der repetitiven Stimulation (Runde 3) war CD27 wesentlich stärker in CD8⁺ CEA-28ζ-I1 CAR-T-Zellen exprimiert als in Kontroll-CAR-T-Zellen (Abbildung 11). Der Effekt war auf CD8⁺-T-Zellen beschränkt und wurde in CD4⁺-CEA-28ζ-I1 CAR-T-Zellen nicht beobachtet. Interessanterweise zeigen publizierte Daten, dass die Hochregulation von CD27 in CD8⁺ CAR-T-Zellen mit einer verbesserten CAR-T-Zell Funktionalität und anhaltenden Remissionen bei mit CAR-T-Zellen behandelten Patienten assoziiert war [55]. Zusätzlich zu CD27 wurde auch die Expression der kostimulierenden Moleküle CD28 und CD137 unter repetitiver Stimulation gemessen. Sowohl bei den CD8⁺- als auch bei den CD4⁺ CAR-T-Zellen war die Hochregulierung von CD28 zu allen Zeitpunkten in den CEA-28ζ-K-Kontroll-CAR-T-Zellen stärker ausgeprägt als in den CEA-28ζ-I1-CAR-T-Zellen. Während CD137 am Ende der ersten Runde vorwiegend in CD8⁺ CAR-T-Zellen hochreguliert war, zeigten CD4⁺ CEA-28ζ-I1 CAR-T-Zellen am Ende der dritten Runde eine signifikant höhere Expression von CD137 als CEA-28ζ-K Kontroll-CAR-T-Zellen.

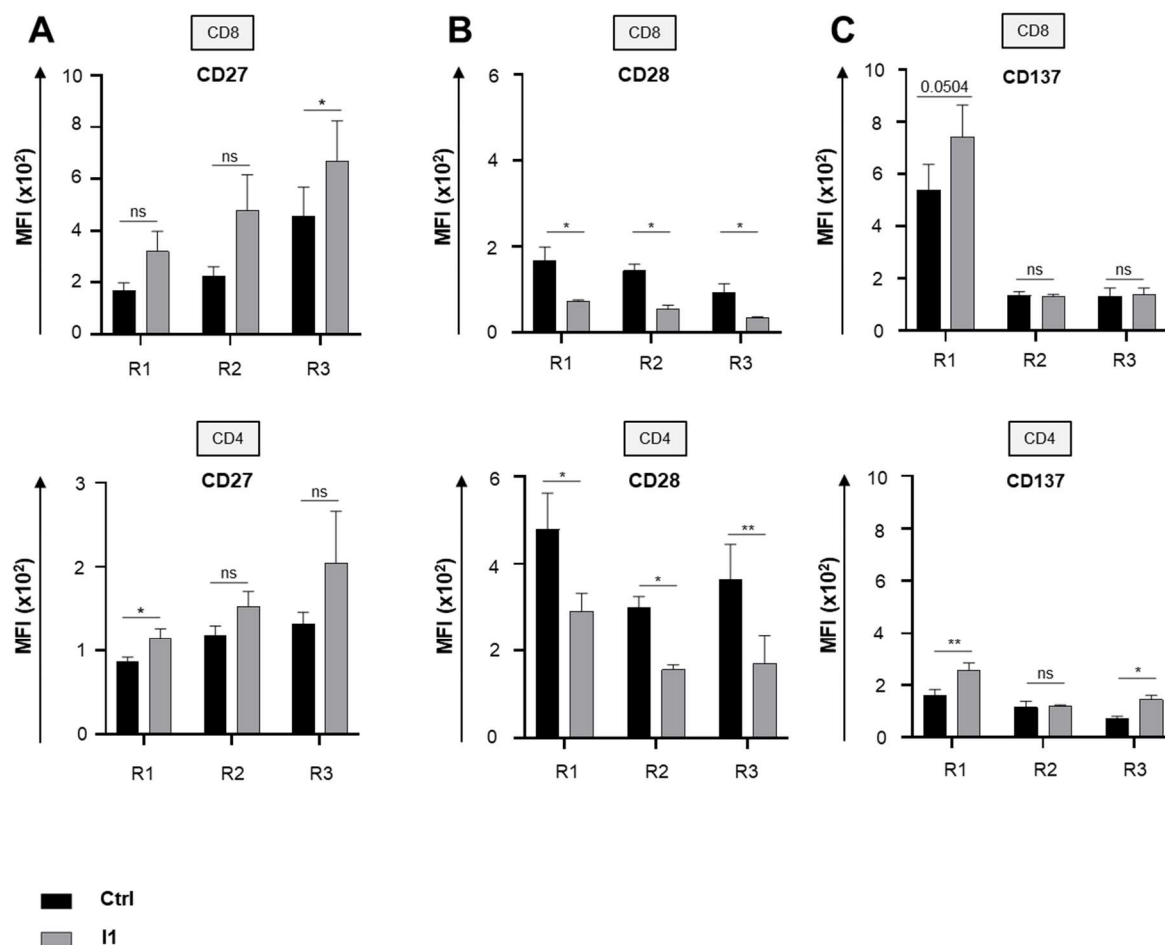


Abbildung 11. Expression von kostimulatorischen Markern auf CAR-T-Zellen unter repetitiver Stimulation.

Phänotypische Analyse von CEA-28ζ-K (Ctrl) CAR T-Zellen und CEA-28ζ-I1 (I1) CAR T-Zellen unter repetitiver Antigenstimulation. CAR-T-Zellen durchliefen drei Runden (R1-R3) der Antigenstimulation mit BxPC-3-Zellen. Am Ende jeder Runde wurden CAR-T-Zellen auf CD8 oder CD4 gefärbt und hinsichtlich Expression von CD27 **(A)**, CD28 **(B)** und CD137 **(C)** analysiert. Die Daten stellen geometrische Mittelwerte \pm SEM von mindestens vier Spendern dar, p-Werte wurden durch gepaarten t-Test berechnet, ns bedeutet nicht signifikant, * bedeutet $p \leq 0,05$, ** bedeutet $p \leq 0,01$.

4.3.5 Expression von kostimulatorischen Liganden auf BxPC-3 Zellen

Um eine mögliche Transaktivierung von CAR-T-Zellen durch die Liganden dieser Rezeptoren während der repetitiven Stimulation durch BxPC-3 Tumorzellen zu untersuchen, wurde die Expression kostimulierender Liganden, z.B. CD70, 41BBL, CD80 und CD86, auf BxPC-3-Tumorzellen mittels Durchflusszytometrie überprüft. Keiner dieser Liganden wurde auf BxPC-3 Zellen mit Hilfe der Durchflußzytometrie nachgewiesen (Abbildung 12). Somit ist, insbesondere für CD27, eine Transaktivierung von CAR-T-Zellen durch BxPC-3 Zellen unwahrscheinlich.

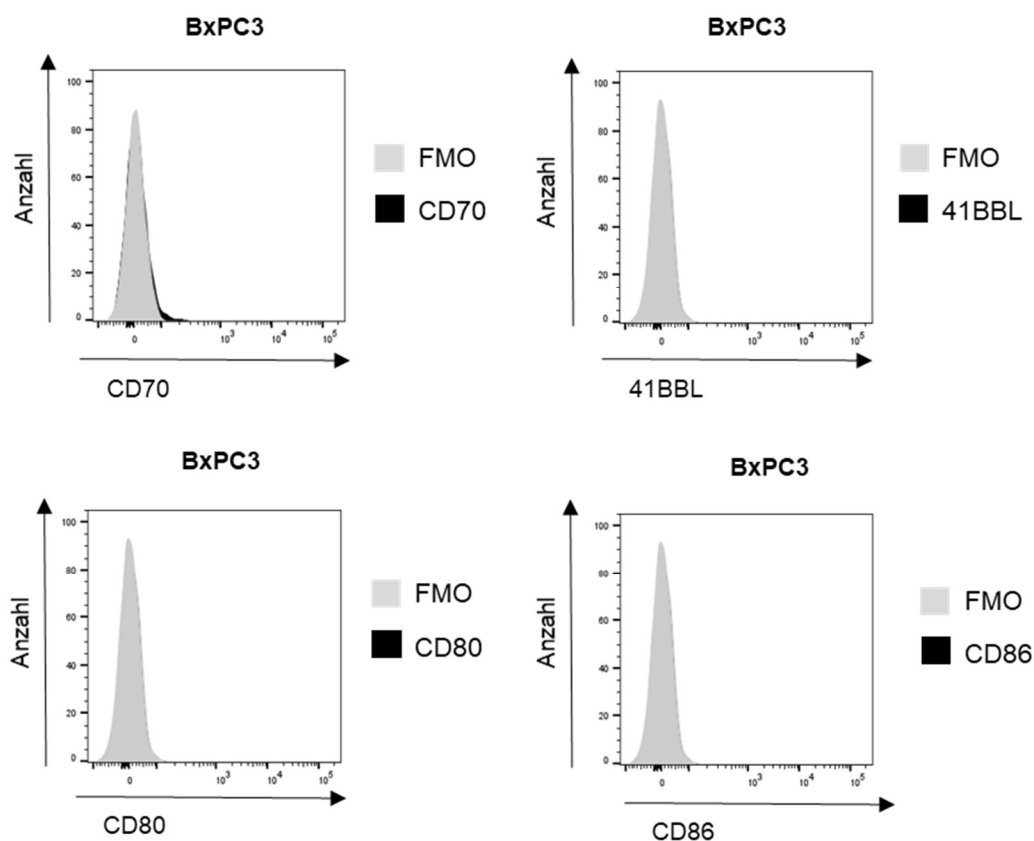


Abbildung 12. Expression von kostimulatorischen Liganden auf BxPC-3 Zellen.

Färbung von BxPC-3 Zellen auf die Expression kostimulatorischer Liganden unter Verwendung eines APC-konjugierten Anti-CD70-Antikörpers, eines PE-konjugierten Anti-41BBL-Antikörpers, eines FITC-konjugierten anti-CD80-Antikörpers und eines PerCPy5.5-konjugierten anti-CD86-Antikörpers. Als Kontrollen wurden Fluoreszenz-Minus-Eins (FMO) verwendet. Dargestellt ist eine repräsentative Färbung aus drei T-Zell Spendern

4.3.6 Eine reduzierte Expression von IRF4 unterhält die Zytotoxizität von CAR-T-Zellen unter repetitiver Stimulation mit Tumorzellen

Um den Mechanismus der verbesserten Funktionalität von CEA-28 ζ -I1-CAR-T-Zellen während repetitiver Stimulation zu untersuchen, wurde die Zytotoxizität der CAR-T-zellen am Ende jeder Runde bestimmt. Dazu diente CD107a als Surrogatparameter für die Zytotoxizität von CAR-T-Zellen. Die Degranulationsfähigkeit wurde separat für CD8⁺-CAR-T-Zellen und CD4⁺-CAR-T-Zellen nach einer kurzfristigen Re-stimulation mit BxPC-3-Zellen am Ende jeder Runde 1-3 (R1-3) bestimmt. Im Durchschnitt nahm die Degranulationskapazität von CAR-T-Zellen während der wiederholten Stimulation ab, wobei sowohl CD8⁺- als auch CD4⁺-CEA-28 ζ -I1 CAR-T-Zellen am Ende der dritten Runde eine höhere Degranulation aufwiesen als CEA-28 ζ -K Kontroll-CAR-T-Zellen (Abbildung 13). Diese Ergebnisse unterstreichen eine Verbesserung der Zytotoxizität von CAR-T-Zellen durch die Herunterregulierung von IRF4.

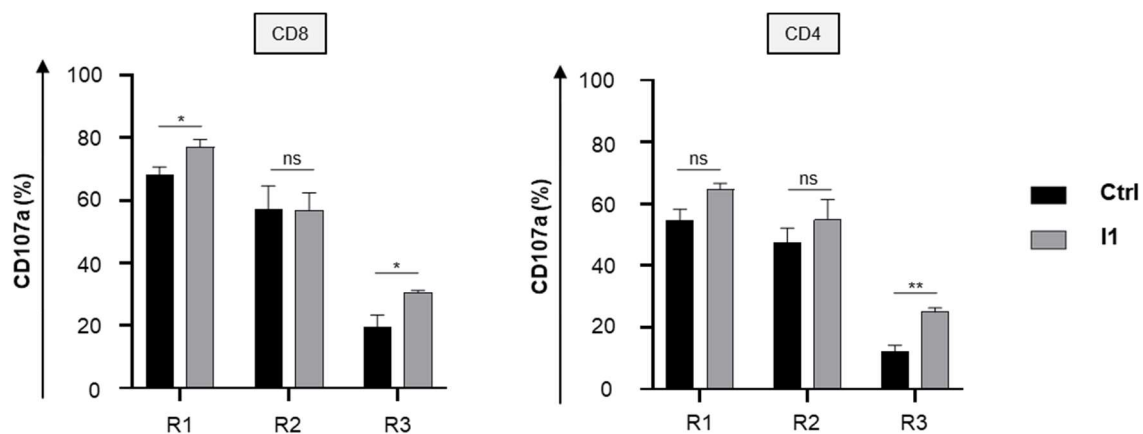


Abbildung 13. Messung der Degranulation von CAR-T-Zellen nach repetitiver Stimulation.

Analyse der Degranulationsfähigkeit von CD8⁺- und CD4⁺-CAR-T-Zellen (CEA-28 ζ -K (Ctrl)) CAR T-Zellen und CEA-28 ζ -I1 (I1) CAR T-Zellen) während repetitiver Stimulation mit BxPC-3-Zellen. Am Ende jeder Runde (R1-3) wurden CAR-T-Zellen mit BxPC-3-Zellen stimuliert. Nach vier Stunden wurde die Oberflächenexpression des Degranulationsmarkers CD107a für CD8⁺- und CD4⁺-CAR-T-Zellen mittels Durchflusszytometrie gemessen. Die Daten stellen Mittelwerte von \pm SEM von vier Spendern dar, die p-Werte wurden durch den ungepaarten t-Test berechnet, ns = nicht signifikant, * = $p \leq 0,05$ und ** = $p \leq 0,01$.

4.4 Die Herunterregulierung von IRF4 erhöht die Antigensensitivität von CAR-T-Zellen

4.4.1 Quantitative Bestimmung der Antigendichte von CEA auf MIA PaCa-2 Zellen

Angesichts der erheblichen Bedeutung der niedriger Antigendichte auf Tumorzellen für das Therapieversagen von CAR-T-Zelle, wurde als nächster Schritt die Auswirkungen der IRF4-Herunterregulierung auf die Sensitivität der CAR T-Zellen für Ziele mit niedriger Antigendichte untersucht. Als Modell wurde die humane Pankreaskarzinom Zelllinie MIA PaCa-2 ausgewählt, die eine sehr geringe Antigendichte für CEA im Vergleich zu BxPC-3 Zellen aufweist. Zunächst wurde die CEA-Expression auf MIA PaCa-2 Zellen mittels Durchflusszytometrie erfasst. Hier zeigte sich, dass MIA PaCa-2 Zellen eine sehr geringe CEA-Expression aufweisen (Abbildung 14A). Um die CEA-Expression quantitativ noch genauer zu erfassen, wurde die Antigendichten mithilfe des QuantiBRITE-Phycoerythrin (PE)-Assays in Verbindung mit einem PE-markierten Anti-CEA-Antikörper durchflusszytometrisch bestimmt. Während BxPC-3 Zellen, die hier als Positivkontrolle fungieren, durchschnittlich eine Antigendichte von 282735 CEA-Moleküle pro Zelle aufwiesen, zeigten MIA PaCa-2 Zellen eine mehr als 100-fach geringere CEA-Expression mit durchschnittlich 602 CEA-Molekülen pro Zelle (Abbildung 14B). Die Zelllinie 293T wurde als Negativkontrolle benutzt. Hier zeigte sich keine CEA-Expression.

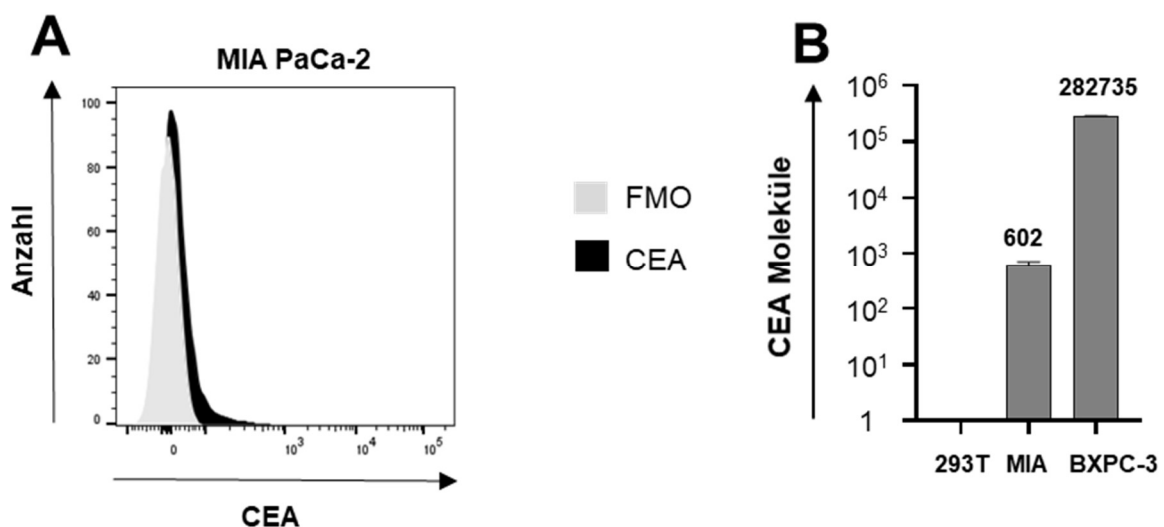


Abbildung 14. Messung der Antigendichte von CEA auf MIA PaCa-2 Zellen.

(A) Färbung von MIA PaCa-2 Zellen auf CEA-Expression unter Verwendung eines APC Vio 770-konjugierten Anti-CEA-Antikörpers. Dargestellt ist eine repräsentative Färbung aus einer Gesamtheit von drei Experimenten. (B) Bestimmung der Antigendichten von CEA auf 293T-Zellen (CEA⁻), MIA PaCa-2 Zellen (CEA^{low}) und BxPC-3 Zellen (CEA^{high}) mit dem QuantiBRITE-Phycoerythrin (PE)-Assay in Verbindung mit einem PE-markierten anti-CEA-Antikörper. Die Bestimmung der Antigendichte erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Die Daten stellen Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten dar.

4.4.2 Die Herunterregulierung von IRF4 ermöglicht die Abtötung von Zielen mit geringer Antigendichte

Unter Verwendung von MIA PaCa-2 Zellen als Modell für Tumorzellen mit einer niedrigen Antigendichte wurde antigenspezifische Zytotoxizität von CEA-28 ζ -I1 CAR-T-Zellen mit CEA-28 ζ -K CAR-T-Zellen in einem FACS-basierten 72-Stunden-Zytotoxizitätsassay verglichen. Dazu wurden GFP-markierte MIA PaCa-2 Zellen mit CAR-T-Zellen im Verhältnis 1 zu 1 kultiviert. Nach 72 Stunden wurde die Anzahl der lebenden GFP⁺ MIA PaCa-2 Zellen und die Anzahl der CAR-T-Zellen (lebende CD3⁺/CAR⁺) mithilfe von counting beads in der Durchflußzytometrie analysiert. Wie in Abbildung 15 zusammengefasst, verstärkte die Herunterregulierung von IRF4 die antigenspezifische Eliminierung von Tumorzellen mit einer geringen Antigendichte, wohingegen CEA-28 ζ -K Kontroll-CAR-T-Zellen keine signifikante Zytotoxizität gegenüber GFP-markierten MIA PaCa-2 Zellen zeigten (Abbildung 15A). Während des Testzeitraums kam es zu keiner wesentlichen Expansion der CAR-T-Zellen und die absoluten CAR-T-Zellzahlen unterschieden sich nicht signifikant (Abbildung 15B). Um die erhöhte Zytotoxizität von CEA-28 ζ -I1 CAR-T-Zellen gegenüber MIA PaCa-2 Zellen weiter zu bestätigen, wurde über 72-Stunden ein XTT-basierter kolorimetrischer Zytotoxizitätsassay unter Verwendung verschiedener Effektor-Ziel-Verhältnisse durchgeführt (Abbildung 15C). In diesem Test wurde keine unspezifische Zytotoxizität gegenüber CEA⁻ 293T-Zellen beobachtet. Dies zeigt, dass es durch die Herunterregulierung von IRF4 zu einem Anstieg der antigenspezifischen, hier CEA-spezifischen, Zytotoxizität kommt, ohne gleichzeitig einen Anstieg der Antigen-unabhängigen Zytotoxizität zu bewirken.

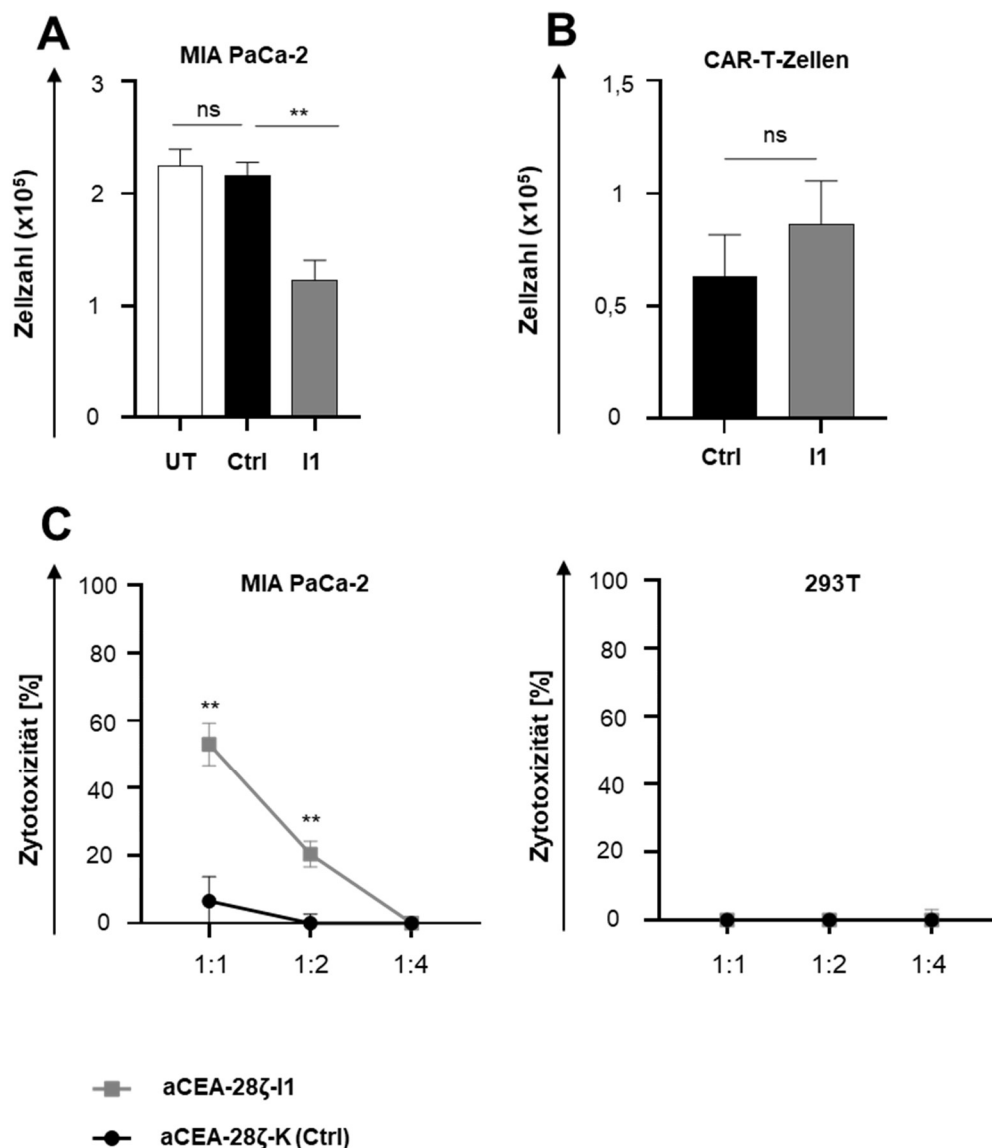


Abbildung 15. Messung der Zytotoxizität von CAR-T-Zellen gegen MIA PaCa-2 Zellen.

(A) CEA-28 ζ -K (Ctrl) CAR T-Zellen und CEA-28 ζ -I1 (I1) CAR T-Zellen (1×10^5 T-Zellen) wurden zusammen mit GFP-markierten CEA^{low} MIA PaCa-2 Zellen (1×10^5 Tumorzellen) kultiviert. Nach drei Tagen wurden MIA PaCa-2 Zellen (lebende GFP⁺-Zellen, linkes Diagramm) und CAR-T-Zellen (lebende CD3⁺/CAR⁺, rechtes Diagramm) mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung von counting beads gezählt. Die Daten stellen Mittelwerte \pm SEM von fünf Spendern dar, p-Werte wurden mit einem ungepaarten t-Test berechnet, ns = nicht signifikant, ** = $p \leq 0,01$. **(B)** Die Zytotoxizität von CAR-T-Zellen wurde nach einer 72-stündigen Kokultur mit MIA PaCa-2 Zellen oder 293T-Zellen (CEA⁻) bei den angegebenen Effektor-Zielzell-Verhältnissen durch einen XTT-basierten kolorimetrischen Assay gemessen. Die Daten stellen Mittelwerte \pm SEM von vier Spendern dar, die p-Werte wurden durch einen ungepaarten t-Test berechnet.

4.4.3 Die Herunterregulierung von IRF4 ermöglicht eine Zytokinantwort gegen Ziele mit geringer Antigendichte

Neben der Zytotoxizität wurde auch die Zytokinantwort gegen Zellen mit geringer Antigendichte untersucht, um zu verstehen, ob die IRF4-Herunterregulierung auch zu einer verbesserten Antigensensitivität bei der Zytokinsekretion führt. Dazu wurden CAR-T-Zellen mit Medium, 293T Zellen und MIA PaCa-2 Zellen inkubiert und nach 48 Stunden die Spiegel von IFN- γ und IL-2 in den Überständen mittels ELISA analysiert. CEA-28 ζ -I1 CAR-T-Zellen mit reduzierten IRF4-Spiegeln sezernierten im Vergleich zu CEA-28 ζ -K Kontroll-CAR-T-Zellen deutlich höhere Mengen an IFN- γ und IL-2 nach Inkubation mit MIA PaCa-2 Zellen (Abbildung 16). Eine erhöhte spontane Freisetzung von Zytokinen in Medium oder gegen 293T Zellen wurde nicht beobachtet. Somit gezeigt werden, dass die Herunterregulierung von IRF4 auch die Antigensensitivität bei der Induktion der pro-inflammatorischen Zytokine erhöht.

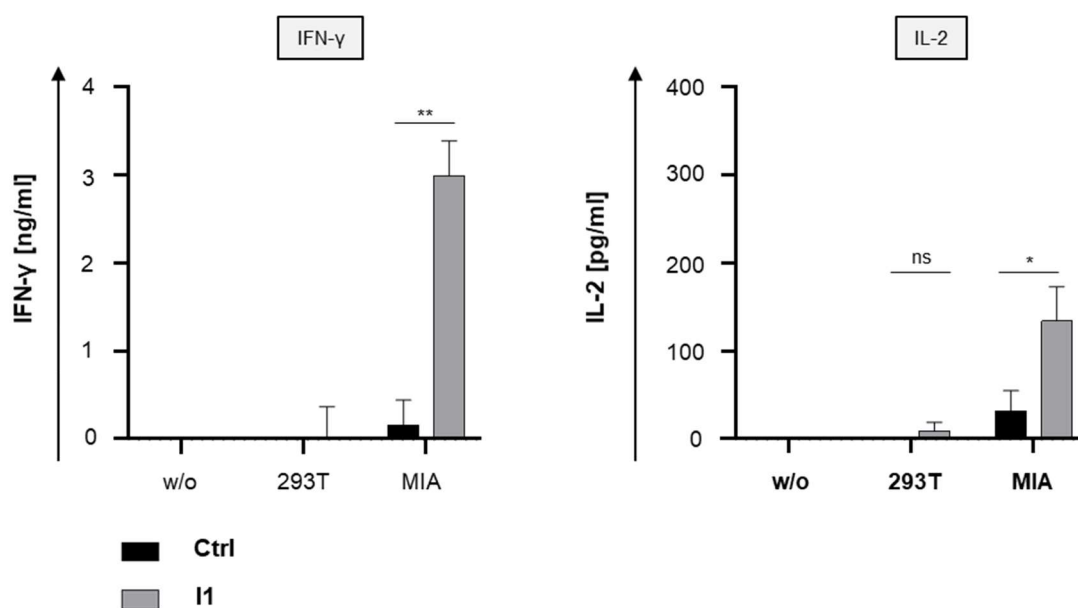


Abbildung 16. Messung der Zytokinantwort von CAR-T-Zellen gegen MIA PaCa-2 Zellen.

Messung von IFN- γ und IL-2 in den Überständen nach einer 48-stündigen Inkubation von CEA-28 ζ -K (Ctrl) CAR T-Zellen und CEA-28 ζ -I1 (I1) CAR T-Zellen (1×10^5 T-Zellen) mit Medium (w/o), 293T-Zellen und MIA-PaCa-2 Zellen mittels ELISA. Die Daten stellen Mittelwerte \pm SEM von drei Spendern dar, p-Werte wurden durch den ungepaarten t-Test berechnet, * = $p \leq 0.05$, ns = nicht signifikant.

4.4.4 Die Herunterregulierung von IRF4 erhöht die Expression von Mediatoren des IL-2 Signalweges

Um den Mechanismus der verbesserten Antigensensitivität zu untersuchen, wurden die Expression von Mediatoren des IL-2 Signalweges bestimmt. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Expression des hochaffinen IL-2 Rezeptors CD25 und die Expression des intrazellulären Mediators Phospho-STAT5 (pSTAT5) in CAR-T-Zellen nach einer dreitägigen Co-Kultur mit MIA-PaCa-2 Zellen gemessen. Es zeigte sich, dass die Expression von CD25 auf CAR-Zellen mit herunterregulierten IRF4 höher war (Abbildung 17A). Darüber hinaus war auch die Expression des von pSTAT5 in CEA-28ζ-I1 CAR-T-Zellen höher als in konventionellen CAR-T-Zellen (Abbildung 17B). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Herunterregulierung von IRF4 zu einer höheren Expression von Mediatoren des IL-2 Signalweges führt, was insgesamt auf ein höheres Maß an Aktivierung als Reaktion auf Zielzellen mit geringer Antigenexpression hindeutet.

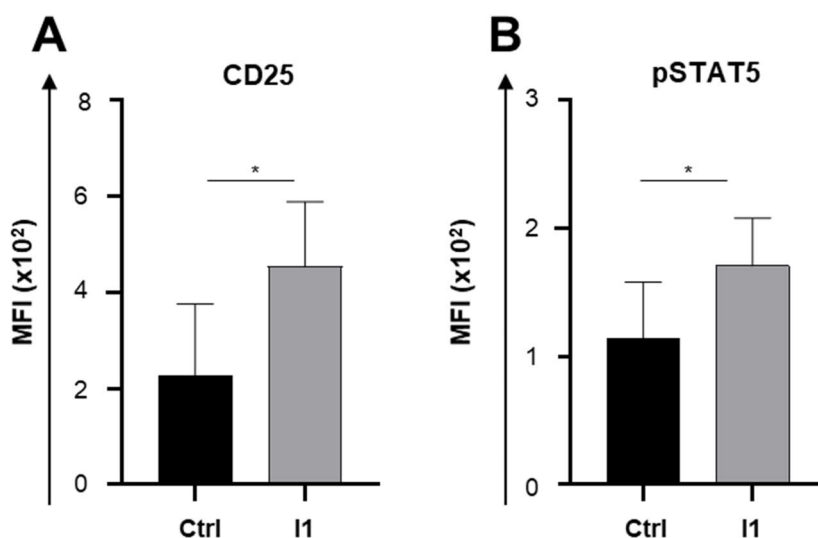


Abbildung 17. Färbung auf Mediatoren des IL-2 Signalweges.

Färbung von CEA-28ζ-K (Ctrl) CAR T-Zellen und CEA-28ζ-I1 (I1) CAR T-Zellen (1×10^5 T-Zellen) auf CD25 (A) und auf pSTAT5 (B) nach drei Tagen Kultur mit MIA-PaCa-2 Zellen. Die Daten stellen geometrische Mittelwerte \pm SEM von drei Spendern dar, p-Werte wurden durch gepaarten t-Test berechnet, ns bedeutet nicht signifikant, * bedeutet $p \leq 0,05$.

4.4.5 Die Herunterregulierung von IRF4 erniedrigt die Schwelle für die antigenspezifische Aktivierung von CAR-T-Zellen

Um herauszufinden, ob die Herunterregulierung von IRF4 generell die Schwelle für eine antigenspezifische Aktivierung von CAR-T-Zellen senkt, wurden CAR-T-Zellen mit abnehmenden Konzentrationen des anti-idiotypischen monoklonalen Antikörpers BW2064/36, der die CEA Bindedomäne des anti-CEA CARs erkennt, stimuliert. Dieser Antikörper diente als Surrogat für eine Stimulation über CEA und ist hilfreich, eine antigenspezifische Stimulation von CAR-T-Zellen ohne die Präsenz von Tumorzellen zu modellieren. Die antigenspezifische Aktivierung von CAR-T-Zellen wurde anhand der Freisetzung von IFN- γ - und IL-2, die nach 48 Stunden im Überstand mittels ELISA gemessen wurde. Während sowohl CEA-28 ζ K-Kontroll-CAR-T-Zellen als auch CEA-28 ζ -I1 CAR-T-Zellen bei hohen Antigenkonzentrationen ähnliche Mengen an Zytokinen sezernierten, setzten CEA-28 ζ -I1 CAR-T-Zellen bei niedrigen Antikörperkonzentrationen deutlich höhere Mengen an Zytokinen frei als Kontroll-CAR-T-Zellen (Abbildung 18). Anhand dieser Daten lässt sich schlussfolgern, dass die Herunterregulierung von IRF4 die Schwelle für die antigenspezifische Aktivierung in CAR-T-Zellen senkt.

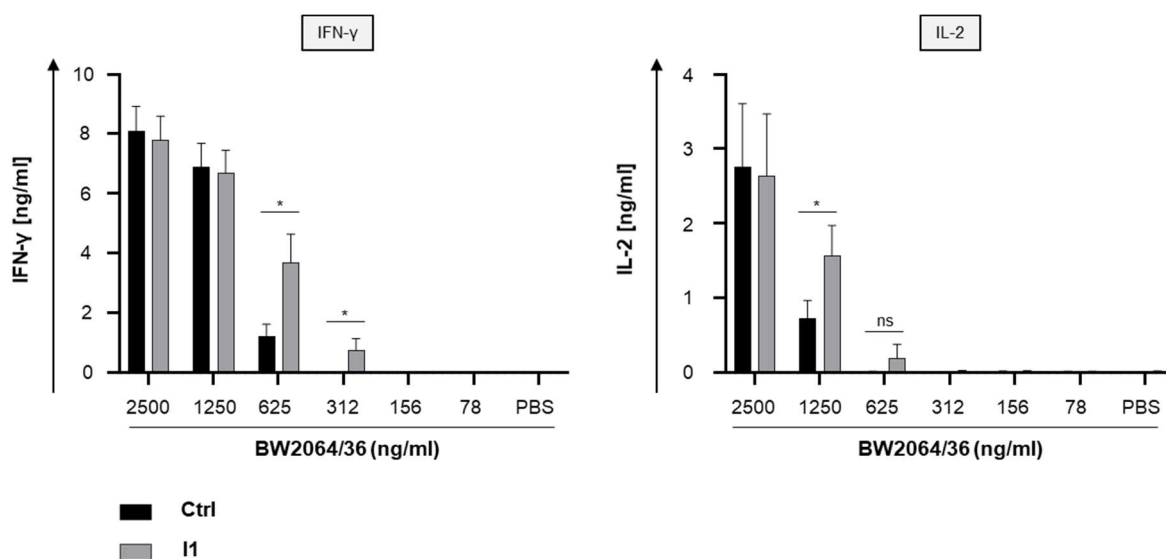


Abbildung 18. Titration der antigenspezifischen Aktivierungsschwelle CAR-T-Zellen.

Quantifizierung von IFN- γ und IL-2 im Überstand nach einer 48-stündigen Stimulation von CEA-28 ζ -K (Ctrl) CAR T-Zellen und CEA-28 ζ -I1 (I1) CAR T-Zellen (1×10^5 T-Zellen) mit dem anti-idiotypischen monoklonalen Antikörper BW2064/36 in den angegebenen Konzentrationen. Die Daten stellen Mittelwerte \pm SEM von acht Spendern dar, p-Werte wurden durch gepaarten t-Test berechnet, * = $p \leq 0,05$.

5 DISKUSSION

Literaturdaten zeigen, dass IRF4 eine entscheidende Rolle bei der Etablierung und Aufrechterhaltung der T-Zell-Erschöpfung während einer chronischen Infektion spielt [46]. Das Ziel dieser Arbeit war es, die Antigen-spezifische Funktionalität von CAR-T-Zellen durch eine Reduktion der IRF4-Expression zu verbessern. Dazu wurde eine IRF4-spezifische shRNA in CAR-T-Zellen exprimiert. Um die Translation in einen GMP-kompatiblen Herstellungsprozess zu erleichtern, haben wir einen retroviralen Vektor entworfen, der sowohl für die IRF4-spezifische shRNA als auch für den CEA-spezifischen CAR kodiert. Dieser Vektor ermöglicht die Transduktion von T-Zellen mit einer ähnlichen Effizienz wie Vektoren mit einer Expressionskassette, die ausschließlich den CAR kodieren.

Die Herunterregulierung von IRF4 durch shRNA hatte keine negativen Auswirkungen auf die Zytotoxizität und die Zytokinsekretion von CAR-T-Zellen. Allerdings zeigten CEA-28ζ-I1 CAR-T-Zellen mit IRF4-Herunterregulierung in einem in-vitro „Stress-Test“ basierend auf einer repetitiven Stimulation mit Tumorzellen eine überlegene Eliminierung von Krebszellen im Vergleich zu herkömmlichen CAR-T-Zellen. Bemerkenswerterweise kam es dabei auf CD8⁺ CEA-28ζ-I1 CAR T-Zellen zu einer verstärkten Expression von CD27. In der Literatur wurde die Expression von CD27-Expression auf CAR-T-Zellen mit einer besseren Funktionalität und einem generell besseren Ansprechen auf die CAR-T-Zell Therapie in Verbindung gebracht [55]. Eine genauere Analyse von Transkriptomdaten zeigte, dass Gene, die bei der Differenzierung in Gedächtnis-T-Zellen beteiligt sind, bei Patienten, die eine vollständige Remission aufwiesen, angereichert waren [55]. Auf der anderen Seite waren Gensignaturen, die bei der Differenzierung in Effektorzellen, bei der Steuerung von Glykolyse, sowie bei der Regulation von Erschöpfung und Apoptose beteiligt sind, bei Patienten ohne Ansprechen auf eine CAR-T-Zell Therapie selektiv hochreguliert [55]. Interessanterweise wurden langanhaltende vollständige Remissionen oft zusammen mit einer erhöhten CD27-Expression auf zirkulierenden CD8⁺-T-Zellen vor der CAR-T-Zell Herstellung beobachtet [55]. Meist ist eine erhöhte CD27 Expression auf T-Zellen mit einer verbesserten Funktionalität, Überlebensfähigkeit, Resistenz gegen Apoptose und einer robusten Bildung von T-Gedächtniszellen vergesellschaftet [56].

Zusammenfassend ist als Ergebnis dieser Arbeit festzustellen, dass eine erhöhte CD27-Expression auf CAR-T-Zellen einen Status erhöhter Funktionalität von CEA-28ζ-I1 CAR-T-Zellen während der wiederholten Antigenstimulation widerspiegeln könnte. Parallel zu der gesteigerten CD27-Expression wurden keine größeren Anzeichen für eine T-Zell Erschöpfung festgestellt, da PD1 und TIGIT nicht verändert waren. Die Expression von TIM-3 nahm nach einem anfänglichen Anstieg in frühen Stimulationsphasen ab.

Ferner führte die Herunterregulierung von IRF4 zu einer verbesserten Antigenempfindlichkeit von CAR-T-Zellen gegenüber Tumorzellen, die das CAR-Antigen tragen. Im Allgemeinen wurde gezeigt, dass die Herunterregulierung von IRF4 in CAR-T-Zellen zu einer Senkung der Schwelle

für die antigenspezifische Aktivierung von CAR-T-Zellen führt. Dies ermöglicht somit das erfolgreiche Erkennen von Tumorzellen mit geringer Antigendichte, die von CAR-T-Zellen mit physiologischer IRF4 Expression nicht erkannt werden.

Auf Basis der in dieser Arbeit erhobenen Daten wird ein erhöhter Aktivierungszustand der CAR-T-Zellen mit IRF4 Herunterregulierung angenommen. Mechanistisch zeigte sich dieser erhöhte Aktivierungszustand durch eine erhöhte Expression von Mediatoren des IL-2 Signalweges wie CD25 und Phospho-STAT5. Dieses fügt sich in das Bild ein, das in einer kürzlich publizierten Arbeit skizziert wurde, dass die Überexpression des Transkriptionsfaktors c-Jun zu einer erhöhten Antigensensitivität von CAR-T-Zellen führt [20]. Die erhöhte Antigensensitivität wurde mit einer durch c-Jun vermittelten Transkriptionsaktivierung von Zielgenen, z.B. IL-2, erklärt [20]. Es wurde gezeigt, dass durch die Überexpression von c-Jun repressive AP1-IRF4-Komplexen aus dem Chromatin von Zielgenen wie IL-2 verdrängt wurden [20]. Diese AP1-IRF4-Komplexe induzieren ein erschöpfungsbezogenes Transkriptionsprogramm, das wiederum die Empfindlichkeit der T-Zellen gegenüber Antigenen verringert [20]. In dieser Arbeit wurde ebenfalls eine erhöhte Aktivität des IL-2-Signalweges als Reaktion auf die Herunterregulierung von IRF4 beobachtet. Diese erhöhte Aktivität des IL-2 Signalweges könnte möglicherweise auch auf eine Verringerung der Chromatin-gebundenen AP-1-IRF4-Komplexe zurückzuführen sein. In der Konsequenz könnte ein verbesserter transkriptioneller Zugang zu wichtigen T-Zell-Effektorgen wie IL-2 wiederum zu einer erhöhten T-Zell-Aktivität führen, die insbesondere unter Bedingungen niedriger Antigendichte greifbar wird. ATAC-Sequenzierungen der Gene des IL-2 Signalweges könnten hierzu weitere Hinweise liefern.

Die Verbesserung der Antigensensitivität von CAR-T-Zellen ist von erheblicher Bedeutung für die klinische Anwendung, da die Immunevasion von Tumorzellen aufgrund einer niedrigen Antigendichte eine der Hauptursachen für Rückfälle nach einer a priori erfolgreichen CAR-T-Zelltherapie ist [57]. Während das Erkennen von Krebszellen mit niedriger Antigendichte hilfreich ist, um einen Tumorrückfall zu vermeiden, besteht andererseits durch die Erhöhung der Antigenempfindlichkeit der CAR-T-Zellen das Risiko für On-Target-/Off-Tumor-Toxizitäten [14]. Daher ist eine sorgfältige Auswahl von Zielantigenen ohne oder mit niedriger Expression auf gesundem Gewebe erforderlich.

Die erhöhte Antigensensitivität und Aktivierbarkeit der CAR T-Zellen könnte das Risiko für klinisch relevante Nebenwirkungen erhöhen. Zwar ist die Zytokinsekretion von konventionellen CAR-T-Zellen und CAR-T-Zellen mit IRF4-Herunterregulierung in dieser Arbeit nicht unterschiedlich, jedoch ist aufgrund des höheren Aktivierungsgrades von CAR-T-Zellen mit IRF4-Herunterregulierung eine erhöhte Wachsamkeit hinsichtlich des Zytokin-Freisetzungssyndroms (CRS) angebracht [58]. Darüber hinaus muss die Sekretion zentraler CRS-Treiber wie IL-6 und IL-1 β in zukünftigen Studien bestimmt werden [58]. Eine weitere potenziell tödliche Nebenwirkung der CAR-T-Zelltherapie ist das Immuneffektorzell-assoziierte Neurotoxizitätssyndrom (ICANS) [59]. Im Gegensatz zu CRS ist die mechanistische Grundlage für das Auftreten von ICANS noch weitgehend unklar und bedarf weiterer Aufklärung [59]. In einer kürzlich durchgeführten Studie, die sich auf Einzelzell-RNA-Sequenzierungsdaten stützte, um eine mögliche „On-Target“-Expression des CAR-Antigens

CD19 außerhalb des Tumors zu identifizieren, stellten Forscher fest, dass eine geringe Expression von CD19 auf Zellen der Blut-Hirn-Schranke einen potenziellen On-Target-Mechanismus für Neurotoxizität bei der auf CD19-gerichteten CAR-T-Zelltherapie darstellen könnte [60]. Vor dem Hintergrund dieser Daten sollten CD19-spezifische CAR-T-Zellen mit erhöhter Antigensensitivität engmaschig auf eine mögliche Neurotoxizität überwacht werden [60]. Dennoch tritt bei der Mehrheit der Patienten, die sich einer CD19-gesteuerten CAR-T-Zelltherapie unterziehen, keine Neurotoxizität auf [58]. Ein wichtiger Faktor hierbei ist, dass die zerebrale CD19-Expression nicht bei allen Patienten einheitlich ist [60].

Im Allgemeinen ist die Auswahl von Zielantigenen ohne oder mit begrenzter Expression auf gesundem Gewebe der wichtigste Schritt ist, um potenziell tödliche On-Target-/Off-Tumor-Toxizitäten zu vermeiden [14]. Trotz aller präklinischer Evaluierung könnten Sicherheitsmechanismen wie Suizid-Gene in CAR T-Zellen zu deren Eliminierung notwendig sein. Der Einsatz von Suizidgenen [61] und die anfängliche Infusion von CAR-T-Zellen mit transienter CAR-Expression [62], z.B. CAR-T-Zellen erzeugt durch RNA-Elektroporation, stellen valide Strategien dar, um potentiellen Toxizitäten entgegenzuwirken. Für die klinische Translation von CAR-T-Zellen mit erhöhter Antigensensitivität ist die Auswahl sicherer Antigene eine entscheidende Voraussetzung. Deshalb sollte die Expression des Zielantigens auf RNA- und Proteinebene gründlich in allen verfügbaren Geweben überprüft werden. Darüber hinaus könnten Tiermodelle mit orthotoper Expression menschlicher Antigene, wie beispielsweise Mäuse, die das menschliche Mesothelin-Protein in der Lunge exprimieren, genutzt werden, um die in-vivo Antigensensitivität von CAR-T-Zellen und somit das Risiko für eine On-Target-Off-Tumor Toxizität zu beurteilen [63].

In einer kürzlich unternommenen Studie erwies sich IRF4 als entscheidender Regulator der Erschöpfung von CAR-T-Zellen nach repetitiver Stimulation mit Krebszellen [53]. Einzelzell-ATAC-Sequenzierungs-Analysen identifizierten regulatorische Netzwerke, die die Erschöpfung von CAR-T-Zellen initiieren und unterhalten [53]. Hierbei wurde IRF4 als einer der potenziell entscheidenden Faktoren identifiziert. Damit übereinstimmend bewirkte die shRNA-vermittelte Hemmung der IRF4-Expression eine Abschwächung der funktionellen Erschöpfung von T-Zellen [53]. Ferner wurde die T-Zell-Differenzierung gehemmt, die CAR-T-Zell-Zytotoxizität verbessert und die therapeutische Aktivität von CAR-T-Zellen in Leukämie Mausmodellen gesteigert [53]. In unserem in-vitro Stress-Test Modell wurde während der repetitiven Stimulation mit Tumorzellen jedoch kein Verlust der funktionellen Kapazitäten oder größere Unterschiede in den Effektor-Gedächtnis-Phänotypen beobachtet. Auch fanden sich hinsichtlich der Expression von Erschöpfungsmarkern mit Ausnahme einer vorübergehenden Hochregulierung von TIM-3 keine signifikanten Unterschiede nach IRF4-Herunterregulierung. Ferner wurden während der repetitiven Stimulation mit Tumorzellen phänotypische Veränderungen durch die Herunterregulierung von IRF4 beobachtet, die sich zwischen CD8⁺- und CD4⁺-CAR-T-Zellen unterschieden. Insbesondere war die Steigerung der Expression von CD27 in CD8⁺-CAR-T-Zellen nach IRF4-Herunterregulierung am höchsten, wohingegen sich die CD27-Expression in CD4⁺ CAR-T-Zellen keinen signifikanten Unterschied zeigte. Es ist bekannt, dass die CD27 Stimulation das Überleben und die Antitumoraktivität

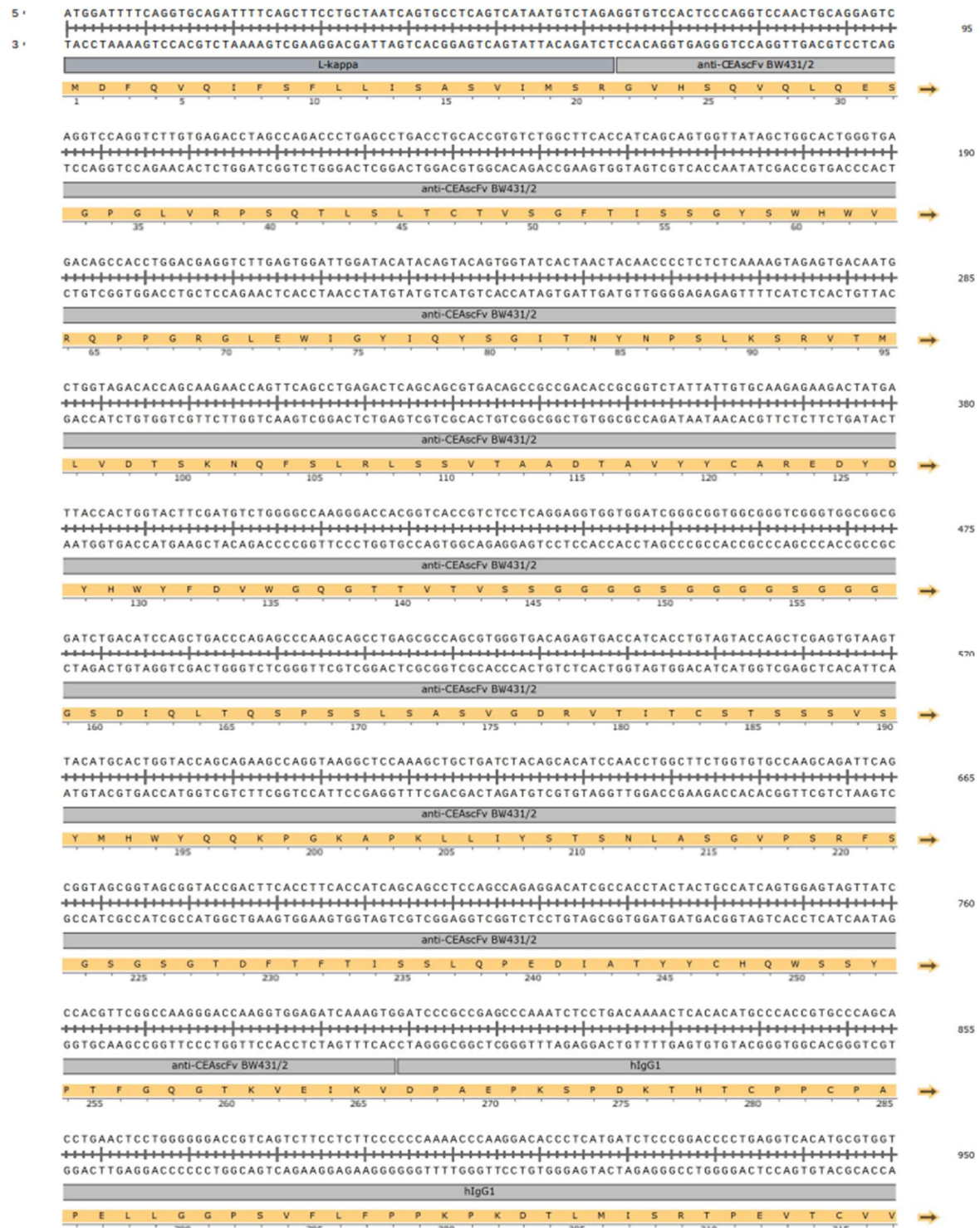
der T-Zellen steigert. In einer früheren Studie, die den Einfluss der IRF4-Herunterregulierung auf die Funktionalität und Expansion von CD8⁺-T-Zellen während akuter Virusinfektionen untersuchte, zeigten CD8⁺-T-Zellen mit erniedrigter IRF4-Expression eine Hochregulierung von CD27, die mit einer überlegenen Funktionalität im Vergleich zu Wildtyp-T-Zellen assoziiert war. Insbesondere für CD8⁺ T-Zellen wurden direkte transkriptionelle Effekte von IRF4 auf die Genexpression von CD27 vermutet. In der vorliegenden Arbeit könnte die bevorzugte Hochregulierung des überlebensfördernden Moleküls CD27 auf CD8⁺ T-Zellen zum Anstieg des CD8/CD4-Verhältnisses während der repetitiven Antigenstimulation beitragen. Die Daten weisen auf eine Rolle von IRF4 als wichtigen Faktor bei der T-Zell-Differenzierung hin. Im Einklang damit wurde eine verzögerte Differenzierung zu Effektorzellen und eine stärkere Erhaltung eines zentralen Gedächtnisphänotyps in CD4⁺ CAR-T-Zellen nach der Herunterregulierung von IRF4 beobachtet. Unerwarteterweise hatte die Herunterregulierung von IRF4 dagegen keinen oder nur einen geringen Einfluss auf die Effektordifferenzierung in CD8⁺-CAR-T-Zellen während der repetitiven Antigenstimulation. Dafür sind möglicherweise noch niedrigere IRF4-Spiegel erforderlich. Im Gegensatz zu CD27 war die Expression von CD28 in CAR-T-Zellen mit IRF4-Herunterregulierung durchweg niedriger und in CD4⁺-CAR-T-Zellen im Verlauf der wiederholten Antigenstimulation im Allgemeinen höher. Die Daten in dieser Arbeit legen nahe, dass CD28 ein weiteres potenzielles Transkriptionsziel von IRF4 ist.

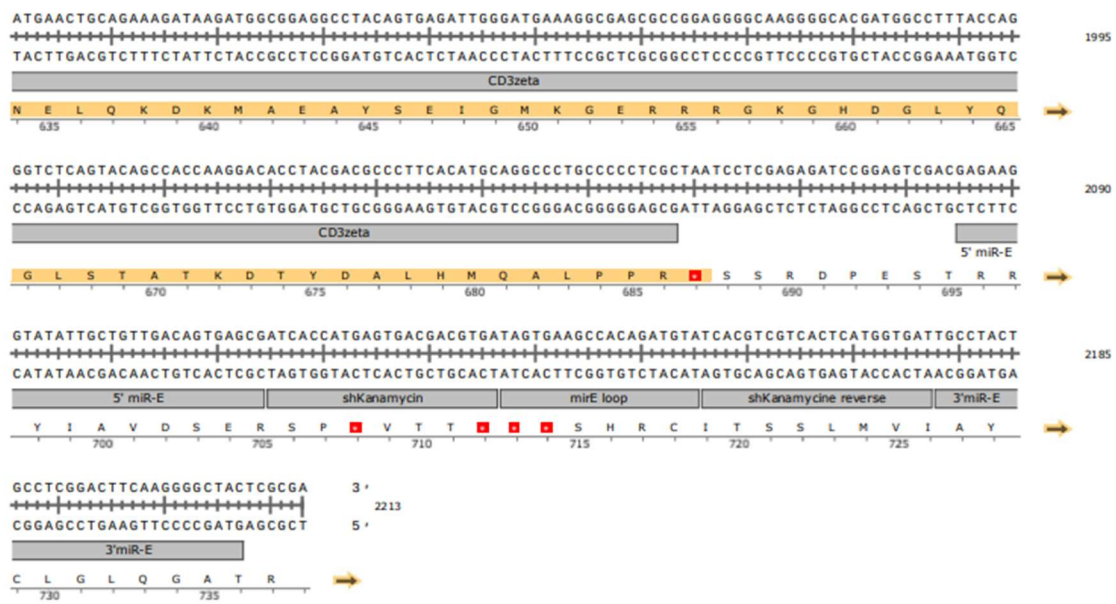
In der Zusammenfassung unterstreichen die hier erhobenen Daten, dass die Herunterregulierung von IRF4 in CAR-T-Zellen ein wirksames Instrument zur Steigerung der Funktionalität und der Antigenempfindlichkeit von CAR-T-Zellen ist. Die Konfiguration der IRF4-spezifischen shRNA zusammen mit der CAR-Expressionskassette als Ein-Vektor-System ermöglicht die effiziente Herstellung von CAR-T-Zellen in einem GMP-konformen Prozess, was eine Translation in die klinische Anwendung erleichtert.

6 ANHANG

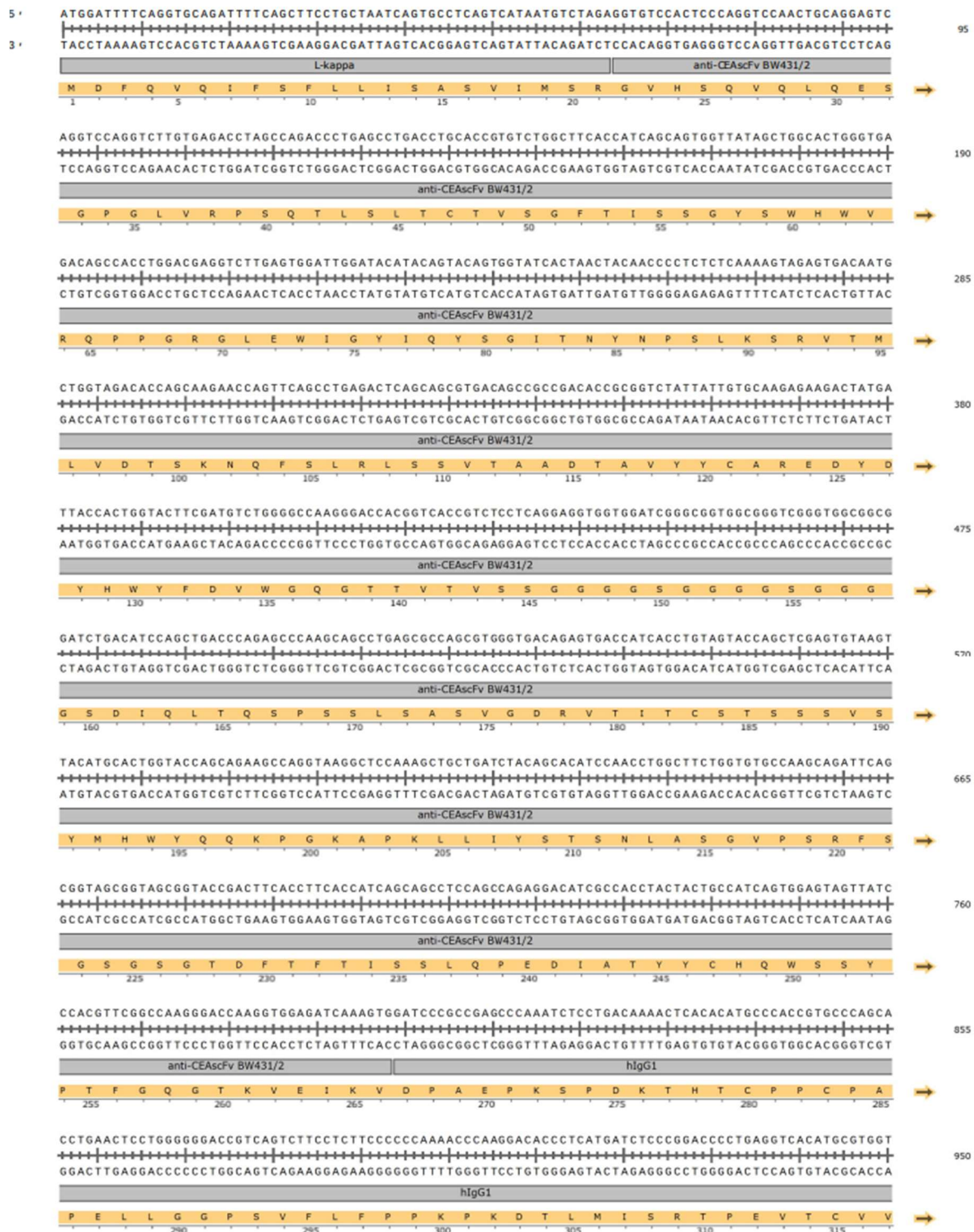
Die DNA- und Aminosäuresequenz jedes in dieser Arbeit verwendeten chimären Antigenrezeptors erstellt mit SnapGene Viewer.

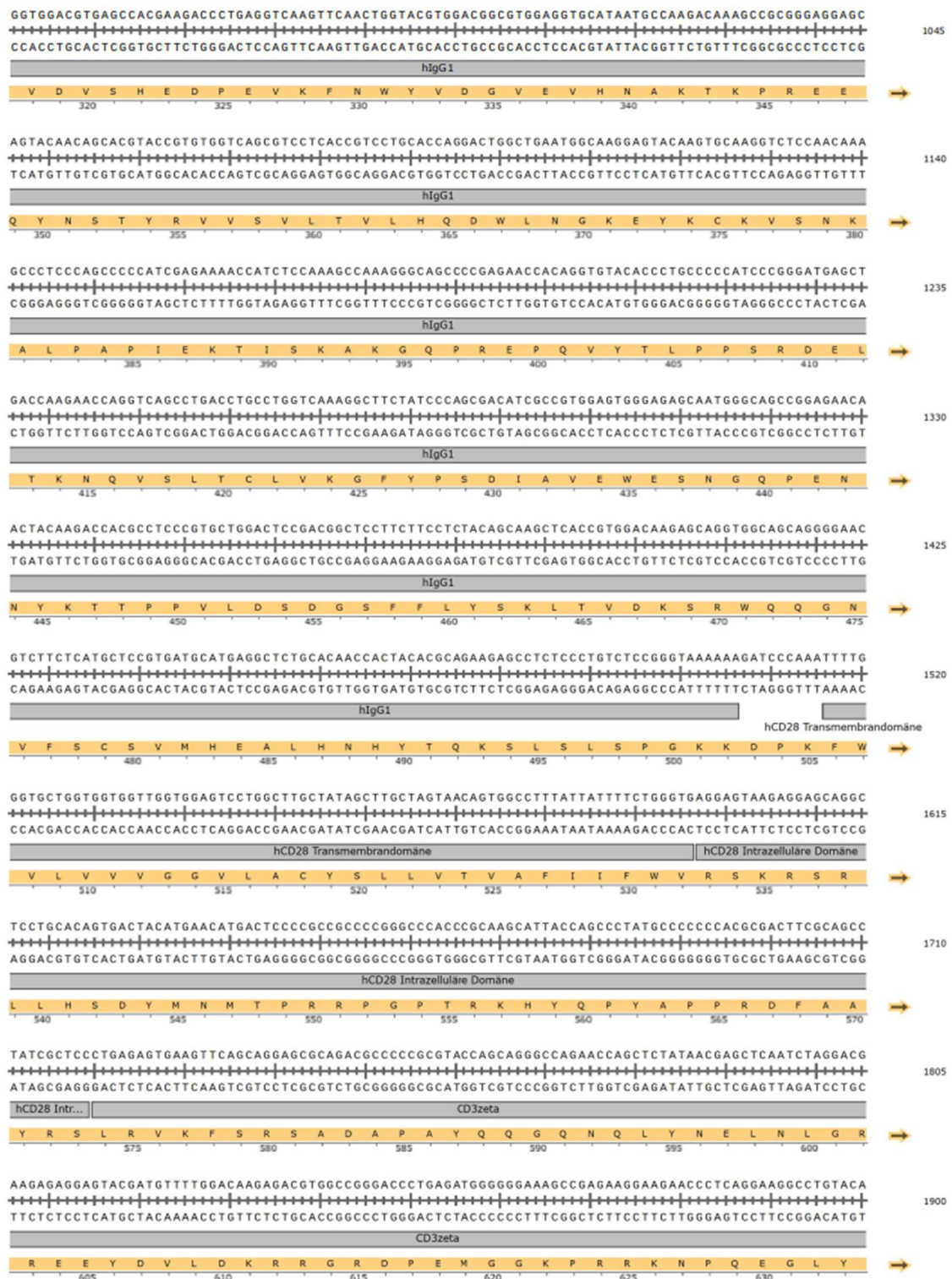
6.1 BW43126_FC_CD28_CD3z_mir30_shKanamycin (#2374)

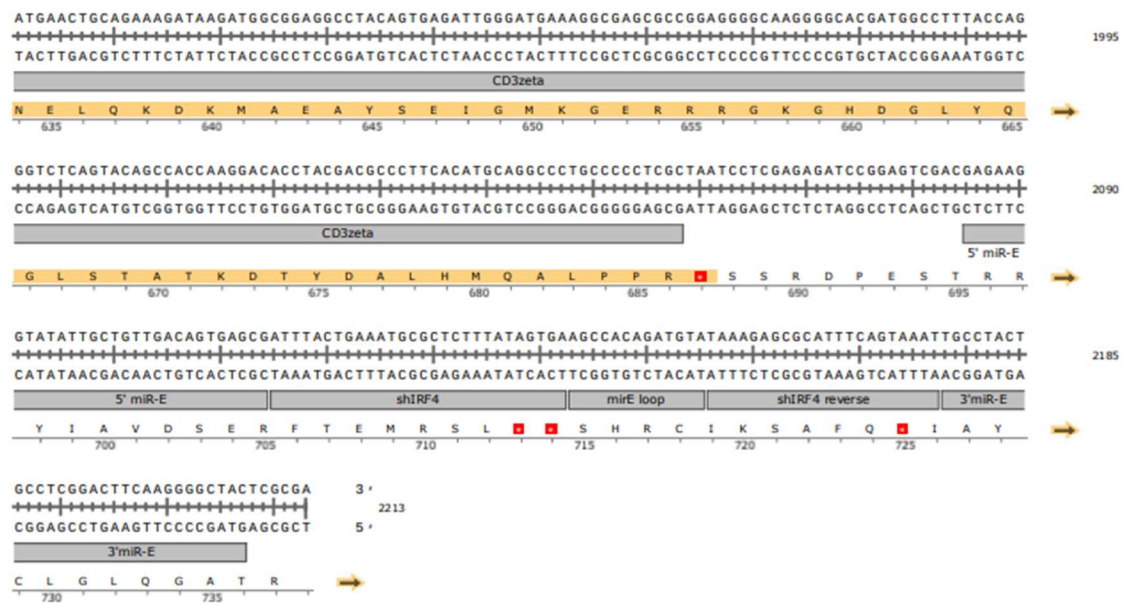




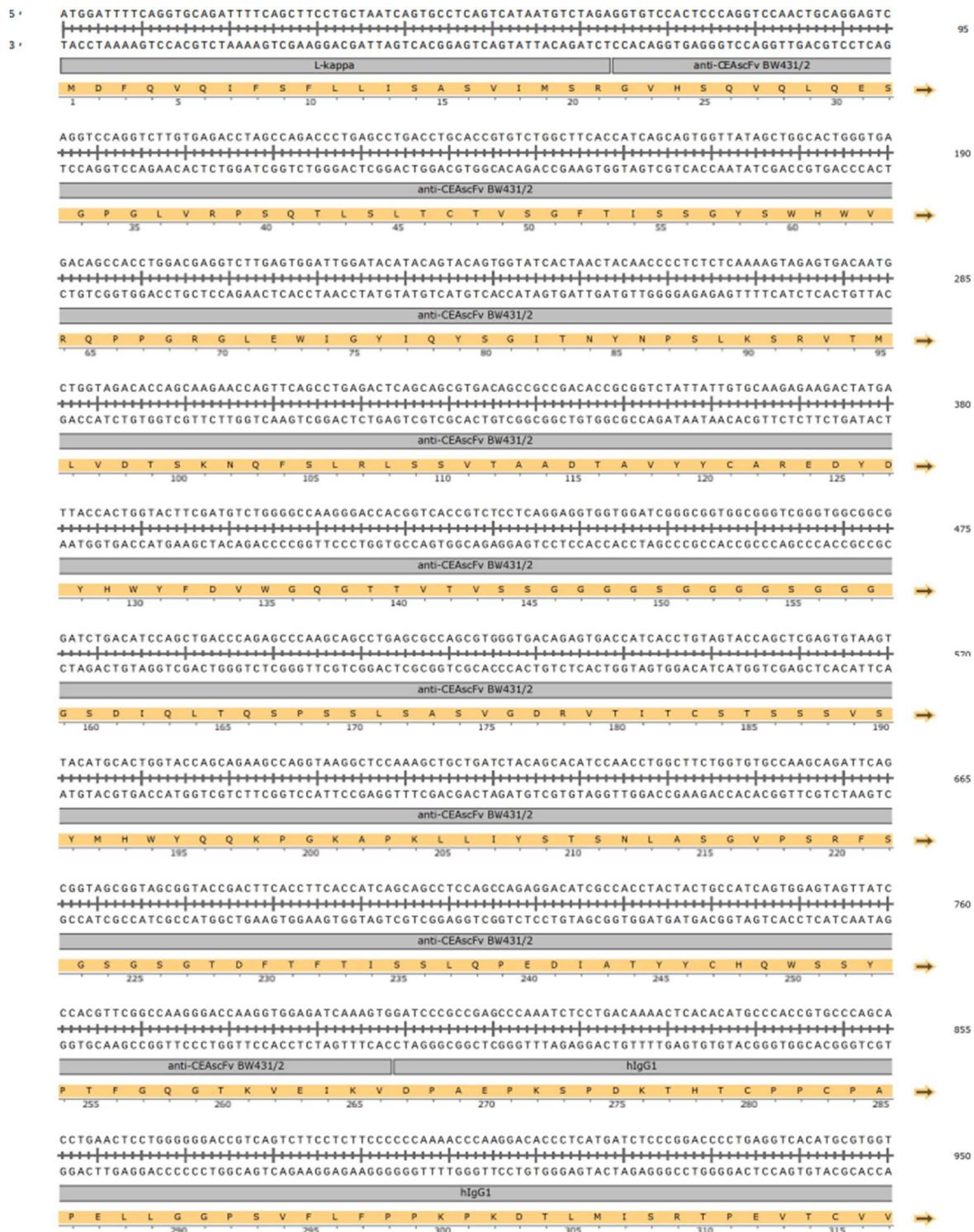
6.2 BW43126_FC_CD28_CD3z_mir30_shIRF4_1 (#2439)

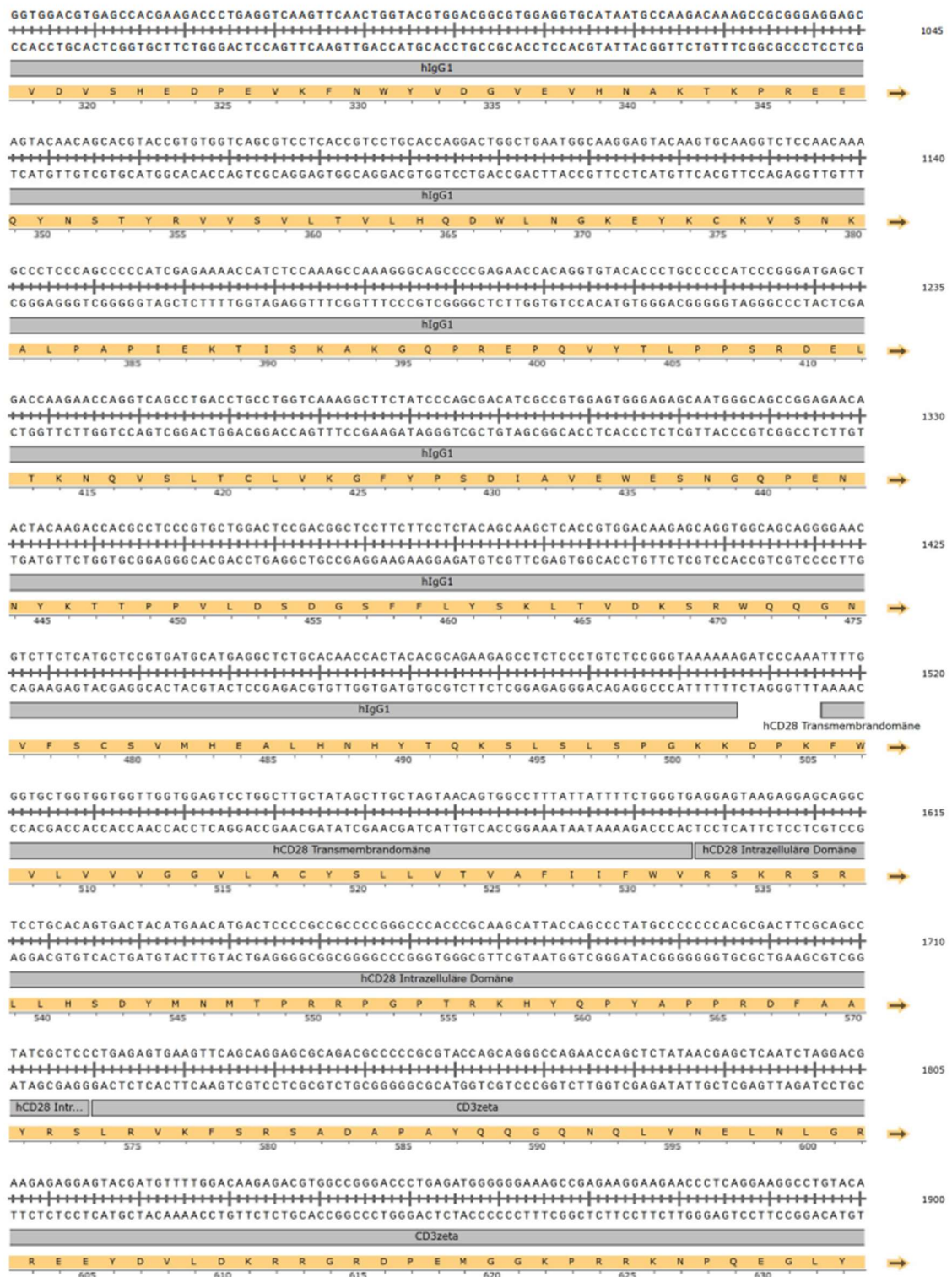


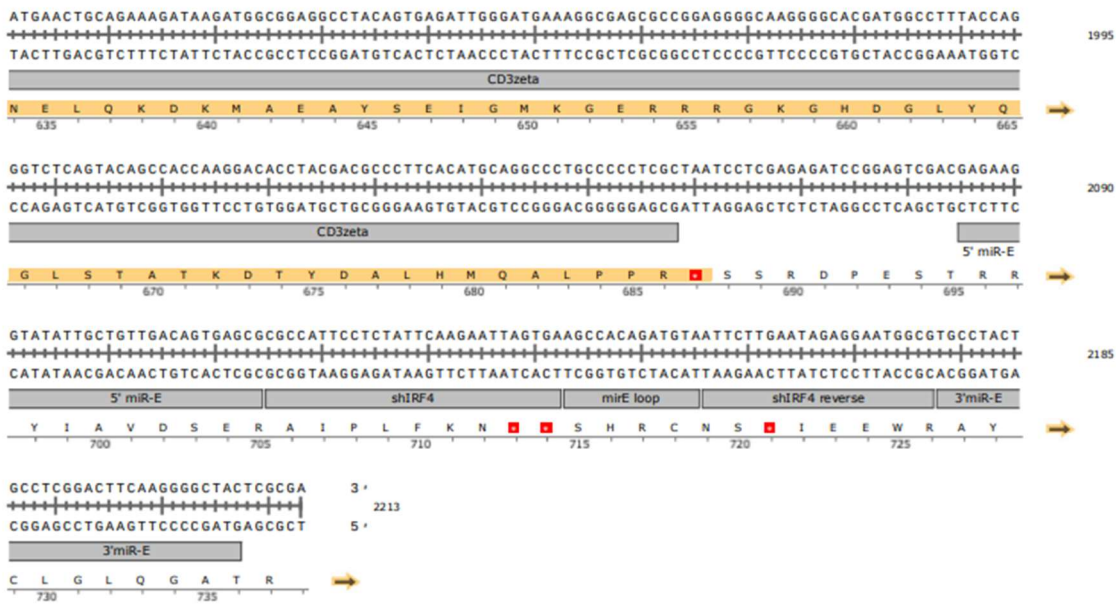




6.3 BW43126_FC_CD28_CD3z_mir30_shIRF4_2 (#2440)







7 REFERENZEN

1. June CH, Sadelain M. Chimeric Antigen Receptor Therapy. *N Engl J Med*. 2018;379:64–73. doi:10.1056/NEJMra1706169.
2. Holzinger A, Abken H. Treatment with Living Drugs: Pharmaceutical Aspects of CAR T Cells. *Pharmacology*. 2022;107:446–63. doi:10.1159/000525052.
3. van der Stegen, Sjoukje J C, Lindenberg PL, Petrovic RM, Xie H, Diop MP, Alexeeva V, et al. Generation of T-cell-receptor-negative CD8 $\alpha\beta$ -positive CAR T cells from T-cell-derived induced pluripotent stem cells. *Nat Biomed Eng*. 2022;6:1284–97. doi:10.1038/s41551-022-00915-0.
4. Stadtmauer EA, Fraietta JA, Davis MM, Cohen AD, Weber KL, Lancaster E, et al. CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer. *Science* 2020. doi:10.1126/science.aba7365.
5. Kawalekar OU, O'Connor RS, Fraietta JA, Guo L, McGettigan SE, Posey AD, JR, et al. Distinct Signaling of Coreceptors Regulates Specific Metabolism Pathways and Impacts Memory Development in CAR T Cells. *Immunity*. 2016;44:380–90. doi:10.1016/j.immuni.2016.01.021.
6. Holzinger A, Abken H. Advances and Challenges of CAR T Cells in Clinical Trials. *Recent Results Cancer Res*. 2020;214:93–128. doi:10.1007/978-3-030-23765-3_3.
7. Subklewe M, Bergwelt-Baildon M von, Humpe A. Chimeric Antigen Receptor T Cells: A Race to Revolutionize Cancer Therapy. *Transfus Med Hemother*. 2019;46:15–24. doi:10.1159/000496870.
8. Mailankody S, Devlin SM, Landa J, Nath K, Diamonte C, Carstens EJ, et al. GPRC5D-Targeted CAR T Cells for Myeloma. *N Engl J Med*. 2022;387:1196–206. doi:10.1056/NEJMoa2209900.
9. Cowan AJ, Pont MJ, Sather BD, Turtle CJ, Till BG, Libby EN3, et al. γ -Secretase inhibitor in combination with BCMA chimeric antigen receptor T-cell immunotherapy for individuals with relapsed or refractory multiple myeloma: a phase 1, first-in-human trial. *Lancet Oncol*. 2023;24:811–22. doi:10.1016/S1470-2045(23)00246-2.
10. Ormhøj M, Abken H, Hadrup SR. Engineering T-cells with chimeric antigen receptors to combat hematological cancers: an update on clinical trials. *Cancer Immunol Immunother*. 2022;71:2301–11. doi:10.1007/s00262-022-03163-y.
11. Globerson Levin A, Rivière I, Eshhar Z, Sadelain M. CAR T cells: Building on the CD19 paradigm. *Eur J Immunol*. 2021;51:2151–63. doi:10.1002/eji.202049064.

12. Kampouri E, Walti CS, Gauthier J, Hill JA. Managing hypogammaglobulinemia in patients treated with CAR-T-cell therapy: key points for clinicians. *Expert Rev Hematol.* 2022;15:305–20. doi:10.1080/17474086.2022.2063833.
13. Harrer DC, Dörrie J, Schaft N. CARs and Drugs: Pharmacological Ways of Boosting CAR-T-Cell Therapy. *Int J Mol Sci* 2023. doi:10.3390/ijms24032342.
14. Morgan RA, Yang JC, Kitano M, Dudley ME, Laurencot CM, Rosenberg SA. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol Ther.* 2010;18:843–51. doi:10.1038/mt.2010.24.
15. Harrer DC, Schenkel C, Berking C, Herr W, Abken H, Dörrie J, Schaft N. Decitabine-Mediated Upregulation of CSPG4 in Ovarian Carcinoma Cells Enables Targeting by CSPG4-Specific CAR-T Cells. *Cancers (Basel)* 2022. doi:10.3390/cancers14205033.
16. Jackson HJ, Brentjens RJ. Overcoming Antigen Escape with CAR T-cell Therapy. *Cancer Discov.* 2015;5:1238–40. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-1275.
17. Spiegel JY, Patel S, Muffly L, Hossain NM, Oak J, Baird JH, et al. CAR T cells with dual targeting of CD19 and CD22 in adult patients with recurrent or refractory B cell malignancies: a phase 1 trial. *Nat Med.* 2021;27:1419–31. doi:10.1038/s41591-021-01436-0.
18. Sterner RC, Sterner RM. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. *Blood Cancer J.* 2021;11:69. doi:10.1038/s41408-021-00459-7.
19. Blank CU, Haining WN, Held W, Hogan PG, Kallies A, Lugli E, et al. Defining 'T cell exhaustion'. *Nat Rev Immunol.* 2019;19:665–74. doi:10.1038/s41577-019-0221-9.
20. Lynn RC, Weber EW, Sotillo E, Gennert D, Xu P, Good Z, et al. c-Jun overexpression in CAR T cells induces exhaustion resistance. *Nature.* 2019;576:293–300. doi:10.1038/s41586-019-1805-z.
21. Thommen DS, Schumacher TN. T Cell Dysfunction in Cancer. *Cancer Cell.* 2018;33:547–62. doi:10.1016/j.ccell.2018.03.012.
22. Khan O, Giles JR, McDonald S, Manne S, Ngiow SF, Patel KP, et al. TOX transcriptionally and epigenetically programs CD8(+) T cell exhaustion. *Nature.* 2019;571:211–8. doi:10.1038/s41586-019-1325-x.
23. Rutishauser RL, Martins GA, Kalachikov S, Chandele A, Parish IA, Meffre E, et al. Transcriptional repressor Blimp-1 promotes CD8(+) T cell terminal differentiation and represses the acquisition of central memory T cell properties. *Immunity.* 2009;31:296–308. doi:10.1016/j.immuni.2009.05.014.
24. Seo H, Chen J, González-Avalos E, Samaniego-Castruita D, Das A, Wang YH, et al. TOX and TOX2 transcription factors cooperate with NR4A transcription factors to impose CD8(+) T cell exhaustion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116:12410–5. doi:10.1073/pnas.1905675116.

25. Yoshikawa T, Wu Z, Inoue S, Kasuya H, Matsushita H, Takahashi Y, et al. Genetic ablation of PRDM1 in antitumor T cells enhances therapeutic efficacy of adoptive immunotherapy. *Blood*. 2022;139:2156–72. doi:10.1182/blood.2021012714.
26. Sabatino M, Hu J, Sommariva M, Gautam S, Fellowes V, Hocker JD, et al. Generation of clinical-grade CD19-specific CAR-modified CD8+ memory stem cells for the treatment of human B-cell malignancies. *Blood*. 2016;128:519–28. doi:10.1182/blood-2015-11-683847.
27. Gattinoni L, Lugli E, Ji Y, Pos Z, Paulos CM, Quigley MF, et al. A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat Med*. 2011;17:1290–7. doi:10.1038/nm.2446.
28. Carnevale J, Shifrut E, Kale N, Nyberg WA, Blaescke F, Chen YY, et al. RASA2 ablation in T cells boosts antigen sensitivity and long-term function. *Nature*. 2022;609:174–82. doi:10.1038/s41586-022-05126-w.
29. Freitas KA, Belk JA, Sotillo E, Quinn PJ, Ramello MC, Malipatlolla M, et al. Enhanced T cell effector activity by targeting the Mediator kinase module. *Science*. 2022;378:eabn5647. doi:10.1126/science.abn5647.
30. Safarzadeh Kozani P, Safarzadeh Kozani P, Ahmadi Najafabadi M, Yousefi F, Mirarefin SMJ, Rahbarizadeh F. Recent Advances in Solid Tumor CAR-T Cell Therapy: Driving Tumor Cells From Hero to Zero? *Front Immunol*. 2022;13:795164. doi:10.3389/fimmu.2022.795164.
31. Zhang Y, Zhang X, Cheng C, Mu W, Liu X, Li N, et al. CRISPR-Cas9 mediated LAG-3 disruption in CAR-T cells. *Front Med*. 2017;11:554–62. doi:10.1007/s11684-017-0543-6.
32. Zhao Z, Condomines M, van der Stegen, Sjoukje J C, Perna F, Kloss CC, Gunset G, et al. Structural Design of Engineered Costimulation Determines Tumor Rejection Kinetics and Persistence of CAR T Cells. *Cancer Cell*. 2015;28:415–28. doi:10.1016/j.ccell.2015.09.004.
33. Feucht J, Sun J, Eyquem J, Ho Y-J, Zhao Z, Leibold J, et al. Calibration of CAR activation potential directs alternative T cell fates and therapeutic potency. *Nat Med*. 2019;25:82–8. doi:10.1038/s41591-018-0290-5.
34. Blaescke F, Ortner E, Stenger D, Mahdawi J, Apfelbeck A, Habjan N, et al. Design and Evaluation of TIM-3-CD28 Checkpoint Fusion Proteins to Improve Anti-CD19 CAR T-Cell Function. *Front Immunol*. 2022;13:845499. doi:10.3389/fimmu.2022.845499.
35. Weber EW, Parker KR, Sotillo E, Lynn RC, Anbunathan H, Lattin J, et al. Transient rest restores functionality in exhausted CAR-T cells through epigenetic remodeling. *Science* 2021. doi:10.1126/science.aba1786.
36. Zhu X, Li Q, Zhu X. Mechanisms of CAR T cell exhaustion and current counteraction strategies. *Front Cell Dev Biol*. 2022;10:1034257. doi:10.3389/fcell.2022.1034257.
37. Labanieh L, Mackall CL. CAR immune cells: design principles, resistance and the next generation. *Nature*. 2023;614:635–48. doi:10.1038/s41586-023-05707-3.

38. Morris EC, Neelapu SS, Giavridis T, Sadelain M. Cytokine release syndrome and associated neurotoxicity in cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2022;22:85–96. doi:10.1038/s41577-021-00547-6.
39. Burton J, Siller-Farfán JA, Pettmann J, Salzer B, Kutuzov M, van der Merwe, P Anton, Dushek O. Inefficient exploitation of accessory receptors reduces the sensitivity of chimeric antigen receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2023;120:e2216352120. doi:10.1073/pnas.2216352120.
40. Mansilla-Soto J, Eyquem J, Haubner S, Hamieh M, Feucht J, Paillon N, et al. HLA-independent T cell receptors for targeting tumors with low antigen density. *Nat Med.* 2022;28:345–52. doi:10.1038/s41591-021-01621-1.
41. Heitzeneder S, Bosse KR, Zhu Z, Zhelev D, Majzner RG, Radosevich MT, et al. GPC2-CAR T cells tuned for low antigen density mediate potent activity against neuroblastoma without toxicity. *Cancer Cell.* 2022;40:53-69.e9. doi:10.1016/j.ccell.2021.12.005.
42. Chmielewski M, Hombach A, Heuser C, Adams GP, Abken H. T cell activation by antibody-like immunoreceptors: increase in affinity of the single-chain fragment domain above threshold does not increase T cell activation against antigen-positive target cells but decreases selectivity. *J Immunol.* 2004;173:7647–53. doi:10.4049/jimmunol.173.12.7647.
43. Harrer DC, Dörrie J, Schaft N. CSPG4 as Target for CAR-T-Cell Therapy of Various Tumor Entities-Merits and Challenges. *Int J Mol Sci* 2019. doi:10.3390/ijms20235942.
44. Fujiwara K, Tsunei A, Kusabuka H, Ogaki E, Tachibana M, Okada N. Hinge and Transmembrane Domains of Chimeric Antigen Receptor Regulate Receptor Expression and Signaling Threshold. *Cells* 2020. doi:10.3390/cells9051182.
45. Leick MB, Silva H, Scarfò I, Larson R, Choi BD, Bouffard AA, et al. Non-cleavable hinge enhances avidity and expansion of CAR-T cells for acute myeloid leukemia. *Cancer Cell.* 2022;40:494-508.e5. doi:10.1016/j.ccell.2022.04.001.
46. Man K, Gabriel SS, Liao Y, Gloury R, Preston S, Henstridge DC, et al. Transcription Factor IRF4 Promotes CD8(+) T Cell Exhaustion and Limits the Development of Memory-like T Cells during Chronic Infection. *Immunity.* 2017;47:1129-1141.e5. doi:10.1016/j.immuni.2017.11.021.
47. Lu H, Wang H, Yan L, Shao H, Zhang W, Shen H, et al. Overexpression of early T cell differentiation-specific transcription factors transforms the terminally differentiated effector T cells into less differentiated state. *Cell Immunol.* 2020;353:104118. doi:10.1016/j.cellimm.2020.104118.
48. Eyquem J, Mansilla-Soto J, Giavridis T, van der Stegen, Sjoukje J C, Hamieh M, Cunanan KM, et al. Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection. *Nature.* 2017;543:113–7. doi:10.1038/nature21405.

49. Zhou J-E, Yu J, Wang Y, Wang H, Wang J, Wang Y, et al. ShRNA-mediated silencing of PD-1 augments the efficacy of chimeric antigen receptor T cells on subcutaneous prostate and leukemia xenograft. *Biomed Pharmacother.* 2021;137:111339. doi:10.1016/j.biopha.2021.111339.
50. Urak R, Gittins B, Soemardy C, Grepo N, Goldberg L, Maker M, et al. Evaluation of the Elements of Short Hairpin RNAs in Developing shRNA-Containing CAR T Cells. *Cancers (Basel)* 2023. doi:10.3390/cancers15102848.
51. Zou F, Lu L, Liu J, Xia B, Zhang W, Hu Q, et al. Engineered triple inhibitory receptor resistance improves anti-tumor CAR-T cell performance via CD56. *Nat Commun.* 2019;10:4109. doi:10.1038/s41467-019-11893-4.
52. Lu J, Liang T, Li P, Yin Q. Regulatory effects of IRF4 on immune cells in the tumor microenvironment. *Front Immunol.* 2023;14:1086803. doi:10.3389/fimmu.2023.1086803.
53. Jiang P, Zhang Z, Hu Y, Liang Z, Han Y, Li X, et al. Single-cell ATAC-seq maps the comprehensive and dynamic chromatin accessibility landscape of CAR-T cell dysfunction. *Leukemia.* 2022;36:2656–68. doi:10.1038/s41375-022-01676-0.
54. Harrer DC, Schenkel C, Bezler V, Kaljanac M, Hartley J, Barden M, et al. CAR Triggered Release of Type-1 Interferon Limits CAR T-Cell Activities by an Artificial Negative Autocrine Loop. *Cells* 2022. doi:10.3390/cells11233839.
55. Fraietta JA, Lacey SF, Orlando EJ, Pruteanu-Malinici I, Gohil M, Lundh S, et al. Determinants of response and resistance to CD19 chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Nat Med.* 2018;24:563–71. doi:10.1038/s41591-018-0010-1.
56. Song D-G, Powell DJ. Pro-survival signaling via CD27 costimulation drives effective CAR T-cell therapy. *Oncoimmunology.* 2012;1:547–9. doi:10.4161/onci.19458.
57. Spiegel JY, Patel S, Muffly L, Hossain NM, Oak J, Baird JH, et al. CAR T cells with dual targeting of CD19 and CD22 in adult patients with recurrent or refractory B cell malignancies: a phase 1 trial. *Nat Med.* 2021;27:1419–31. doi:10.1038/s41591-021-01436-0.
58. Brudno JN, Kochenderfer JN. Toxicities of chimeric antigen receptor T cells: recognition and management. *Blood.* 2016;127:3321–30. doi:10.1182/blood-2016-04-703751.
59. Sterner RC, Sterner RM. Immune effector cell associated neurotoxicity syndrome in chimeric antigen receptor-T cell therapy. *Front Immunol.* 2022;13:879608. doi:10.3389/fimmu.2022.879608.
60. Parker KR, Migliorini D, Perkey E, Yost KE, Bhaduri A, Bagga P, et al. Single-Cell Analyses Identify Brain Mural Cells Expressing CD19 as Potential Off-Tumor Targets for CAR-T Immunotherapies. *Cell.* 2020;183:126-142.e17. doi:10.1016/j.cell.2020.08.022.

61. Amatya C, Pegues MA, Lam N, Vanasse D, Geldres C, Choi S, et al. Development of CAR T Cells Expressing a Suicide Gene Plus a Chimeric Antigen Receptor Targeting Signaling Lymphocytic-Activation Molecule F7. *Mol Ther.* 2021;29:702–17. doi:10.1016/j.ymthe.2020.10.008.
62. Harrer DC, Simon B, Fujii S-I, Shimizu K, Uslu U, Schuler G, et al. RNA-transfection of γ/δ T cells with a chimeric antigen receptor or an α/β T-cell receptor: a safer alternative to genetically engineered α/β T cells for the immunotherapy of melanoma. *BMC Cancer.* 2017;17:551. doi:10.1186/s12885-017-3539-3.
63. Uslu U, Da T, Assenmacher C-A, Scholler J, Young RM, Tchou J, June CH. Chimeric antigen receptor T cells as adjuvant therapy for unresectable adenocarcinoma. *Sci Adv.* 2023;9:eade2526. doi:10.1126/sciadv.ade2526.