

Aus der

Medizinische Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin II

(Schwerpunkt: Hämatologie, Onkologie, klinische Immunologie,
Rheumatologie)

**Auswirkung von Zellkulturbedingungen und Reaktivierung
auf die Funktion von CAR-T-Zellen in vitro**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Lazarus, Juliane Rita

2023

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. M. R. Müller
2. Berichterstatter: Professor Dr. P. J. Lang

Tag der Disputation: 20.12.2022

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	3
1.1 Aktuelle Entwicklungen	3
1.2 T-Lymphozyten	3
1.2.1 Differenzierung der Thymozyten	4
1.2.2 Subpopulationen der T-Zellen	7
1.3 Aufbau des T-Zell-Rezeptor-Komplexes	12
1.4 Aufbau eines chimären Antigenrezeptors (CAR)	16
1.5 Zielsetzung	17
2 Material und Methoden	18
2.1 Material	18
2.1.1 Verbrauchsmaterialien	18
2.1.2 Reagenzien und Chemikalien	19
2.1.3 DNA	20
2.1.4 Enzyme und Puffer	20
2.1.5 Zellkultur	21
2.1.6 Antikörper	22
2.1.7 Geräte und Zubehör	23
2.1.8 Kits	24
2.1.9 Wissenschaftliche Software	24
2.2 Methoden	25
2.2.1 Klonierung	25
2.2.1.1 Herstellung des „Rückgrats“	25
2.2.1.2 Austausch der Promotoren	27
2.2.1.3 Gel-Elektrophorese	28
2.2.1.4 Geextraktion	28
2.2.1.5 Polymerase-Ketten-Reaktion	29
2.2.1.6 InFusion	31
2.2.1.7 Klassische Klonierung mit DNA-Ligase	32
2.2.2 Bakterien und Plasmide	33

2.2.2.1	Transformation	33
2.2.2.2	Vermehrung der Bakterien	33
2.2.2.3	Plasmidisolierung	33
2.2.2.4	Analytische Spaltung durch Restriktionsenzyme.....	34
2.2.3	Virusproduktion	35
2.2.3.1	Zellkultur der Tumorzelllinien	35
2.2.3.2	Zellzählung.....	36
2.2.3.3	Herstellung der Viruspartikel	37
2.2.3.5	Virusquantifizierung mit qRT-PCR	39
2.2.4	Zellkultur der T-Lymphozyten	39
2.2.4.1	Gewinnung von mononukleären Zellen	39
2.2.4.2	Aktivierung der T-Zellen	40
2.2.4.3	Infektion der T-Zellen	41
2.2.4.4	Zellkultur der T-Lymphozyten.....	41
2.2.4.5	Reaktivierung	41
2.2.4.6	Selektion mit Puromycin.....	42
2.2.5	Durchflusszytometrie	42
2.2.5.1	Färbung extrazellulärer Antigene	42
2.2.5.1	Färbung des intrazellulären Antigens FoxP3.....	43
2.2.6	Quantifizierung der Tumolyse	44
3	Ergebnisse	46
3.1	Zellproliferation in verschiedenen Kulturmedien und Interleukinen	46
3.1.1	Wachstum in verschiedenen Kulturmedien.....	46
3.1.2	Zellproliferation bei verschiedenen Interleukinkonzentrationen	47
3.2	Transduktionseffizienz.....	49
3.2.1	Verwendete Subpopulationen bei der Durchflusszytometrie	49
3.2.2	Vergleich von Negativkontrolle und Isotypkontrolle	50
3.2.3	Transduktionseffizienz in Abhängigkeit von der Dauer des Virus- kontaktes	50
3.2.4	Übersicht über die Transduktion mit verschiedenen Transfer- plasmiden	51
3.2.5	Erreichte Transduktionseffizienzen	51
3.3	Virusquantifizierung und Transduktionseffizienz	53
3.3.1	Virusquantifizierung mit qRT-PCR	53
3.3.2	Transduktionseffizienz in Abhängigkeit von der Virusmenge.....	53

3.4	Fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie.....	54
3.4.1	Population von CD4- und CD8-positiven Zellen.....	54
3.4.2	Aktivierung	55
3.4.2.1	Aktivierungsmarker CD45 RA und CD45 R0	55
3.4.2.2	Dynamik der Aktivierungsmarker CD25 und CD69	56
3.4.3	Eigenfluoreszenz und Stabilität des Gentransfers	57
3.4.4	Regulatorische T-Zellen.....	59
3.4.4.1	Regulatorische T-Zellen in Abhängigkeit der Zytokine	59
3.4.4.2	FoxP3 in CD4-positiven Zellen nach Reaktivierung	60
3.4.5	Selektion mit Puromycin	61
3.4.5.1	Vergleich verschiedener Puromycin-Konzentrationen.....	61
3.4.5.2	Puromycin-Selektion für Europium-Release-Assay.....	62
3.4.5.3	Überleben der Puromycin-Selektion.....	63
3.4.6	HER2/neu-Expression der Tumorzelllinien	63
3.5	Klonierung	65
3.5.1	Klassische Klonierung mit DNA-Ligase	65
3.5.2	Klonierung mit dem InFusion-Verfahren	66
3.6	Europium-Release-Assay.....	73
3.6.1	Tumorlyse abhängig vom Zeitpunkt der Reaktivierung	73
3.6.2	Tumorlyse abhängig von der Zelllinie	74
4	Diskussion	76
4.1	Wahl der Bausteine für die DNA-Sequenz	76
4.1.1	Aufbau des chimären Antigenrezeptors	76
4.1.2	Promotoren	79
4.2	Vergleich der Klonierungsmethoden	80
4.3	Vergleich der Kulturmedien	81
4.3.1	Humanserum	81
4.3.2	Vergleich unterschiedlicher Konzentrationen von IL-2.....	83
4.3.3	Vergleich der verschiedenen Zytokine	83
4.4	Aktivierung und Reaktivierung.....	85
4.4.1	Anergie, T-Zell-Erschöpfung und Activation-Induced Cell Death	85
4.4.2	Aktivierung	88
4.4.3	Reaktivierung	88
4.4.4	Expression der Aktivierungsmarker	90
4.4.5	Expression von FoxP3	90
4.5	Selektion mit Puromycin.....	91

4.6	Transduktion mit retroviralen Vektoren	91
4.7	Zytotoxische Aktivität.....	93
4.8	Unerwünschte Arzneimittelwirkungen und Gefahren	95
4.9	Fazit und Ausblick	100
4.9.1	Fazit.....	100
4.9.2	Bedeutung der CAR-T-Zell-Therapie	102
5	Zusammenfassung.....	104
6	Literaturverzeichnis	106
6.1	Literaturverzeichnis in Reihenfolge der Verweisnummern	106
6.2	Literaturverzeichnis in alphabetischer Reihenfolge	138
7	Erklärung zum Eigenanteil	170
8	Danksagung.....	171

Abbildungsverzeichnis

Abb.1: T-Zell-Rezeptor-Komplex	12
Abb.2: Aufbau eines chimären Antigenrezeptors.....	16
Abb.3: Plasmid pLVX-EF1 α -AcGFP1-N1.....	26
Abb.4: Schema der DNA-Sequenz des chimären Antigenrezeptors mit der Bezeichnung der Proteine und der BamHI-Schnittstellen.....	26
Abb.5: Nukleinsäure-Sequenz des chimären Antigenrezeptors.....	27
Abb.6: Linearisiertes Plasmid und einzufügende Zielsequenz nach PCR	30
Abb.7: Prinzip der PCR mit Verlängerung der Zielsequenz um 15 bp	30
Abb.8: Plasmide pRRL.PPT.SF.i2GFP und pEX-K4-CAR mit Schnittstellen der Restriktionsenzyme	32
Abb.9: Wachstum in verschiedenen Kulturmedien mit Zusatz von Humanserum	46
Abb.10: Wachstum in Kulturmedium mit und ohne Zusatz von Humanserum .	47
Abb.11: Wachstum in verschiedenen Kulturmedien ohne Humanserum	47
Abb.12: Zellproliferation bei unterschiedlichen IL-2-Konzentrationen.....	48
Abb.13: Zellproliferation bei unterschiedlichen Interleukinen	48
Abb.14: Auswahl der Lymphozytenpopulation aus den mononukleären Zellen.....	49
Abb.15: Auswahl von Einzelzellen aus der Lymphozytenpopulation	49
Abb.16: Vergleich von Negativ- und Isotypkontrolle	50
Abb.17: Transduktionseffizienz und Dauer der Virus-Cokultur	51
Abb.18: Übersicht über die Transduktion mit einem lentiviralen Vektor, hergestellt mit verschiedenen Transferplasmiden	52
Abb.19: Transduktionseffizienz nach viraler Verdünnungsreihe	54
Abb.20: Abfall des CD4/CD8-Quotienten und Verschwinden der doppelt negativen Zellen	54
Abb.21: Vergleich Größe (FSC) und Granularität (SSC) der PBMC an Tag 3 .	55
Abb.22: Anteil der CD3-positiven Zellen in der Lymphozytenpopulation an Tag 3	56
Abb.23: Subpopulationen der CD3-positiven Zellen	56
Abb.24: Dynamik der Aktivierungsmarker CD25 und CD69	57
Abb.25: Eigenfluoreszenz und ihre Auswirkung auf die Messung der Transduktionseffizienz.....	58
Abb.26: Einfluss der Reaktivierung auf die Eigenfluoreszenz.....	58
Abb.27: Stabile Expression des chimären Antigen-Rezeptors.....	59

Abb.28: Anteil der FoxP3-positiven regulatorischen T-Zellen an den CD4-positiven Zellen.....	59
Abb.29: FoxP3-positive Zellen in der CD4-T-Zell-Population	60
Abb.30: Beispiel für Bilder aus der fluoreszenzbasierten Durchflusszytometrie bei intrazellulärer FoxP3-Färbung	60
Abb.31: Expression von CAR durch T-Zellen vor Puromycin-Selektion.....	61
Abb.32: Anreicherung von CAR-T-Zellen durch Puromycin-Selektion.....	62
Abb.33: Expression von HER2/neu durch die verschiedenen Tumorzelllinien	64
Abb.34: Restriktionsverdau von pEX-K4-CAR und pRRL.PPT.SF.i2GFP	65
Abb.35: Analytische Spaltung (klassische Klonierung).....	65
Abb.36: Analytische Spaltung (klassische Klonierung).....	66
Abb.37: Restriktionsverdau von pLVX-EF1 α -AcGFP1-N zum Erhalt des Vektorrückgrats ohne und mit Puromycinresistenz	67
Abb.38: Restriktionsverdau für SFFV-Promotor.....	67
Abb.39: PCR-Produkte der CAR-Sequenz nach Elektrophorese für Versuch ohne und mit Erhalt der Puromycinresistenz	68
Abb.40: Erwartete Klonierungsprodukte: Plasmid pLVX-EF1 α -CAR und Plasmid pLVX-EF1 α -CAR-PuroR mit Schnittstellen der Restriktionsenzyme.....	68
Abb.41: Analytische Spaltung von zwei Negativkontrollen und sechs Proben zur Bestätigung des Plasmids pLVX-EF1 α -CAR.....	69
Abb.42: Analytische Spaltung zur Bestätigung des Plasmids pLVX-EF1 α -CAR-PuroR	70
Abb.43: Restriktionsverdau von pLVX-EF1 α -CAR und pLVX-EF1 α -CAR-PuroR	70
Abb.44: PCR-Produkte der SFFV-Promotor-Sequenz nach Elektrophorese ...	71
Abb.45: Erwartete Klonierungsprodukte: Plasmid pLVX-SFFV-CAR und Plasmid pLVX-SFFV-CAR-PuroR mit Schnittstellen der Restriktionsenzyme.....	71
Abb.46: Analytische Spaltung zur Bestätigung des Plasmids pLVX-SFFV-CAR.....	72
Abb.47: Analytische Spaltung zur Bestätigung des Plasmids pLVX-SFFV-CAR-PuroR	72
Abb.48: Tumorlyse von BT474-Zellen durch CAR-T-Zellen.....	73
Abb.49: Tumorlyse von MCF7-Zellen durch CAR-T-Zellen	74
Abb.50: Tumorlyse verschiedener Karzinomzelllinien durch CAR-T-Zellen.....	75

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Plasmide und Restriktionsenzyme zur analytischen Spaltung	35
Tabelle 2: CAR-Expression und Anzahl der Zellen nach Puromycin-Selektion	61

Abkürzungsverzeichnis

4-1BB	CD137
AcGFP1	<i>human-codon-optimized Aequorea coerulea green fluorescent protein</i>
AICD	<i>activation-induced cell death</i>
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
ARDS	<i>acute respiratory distress syndrome</i>
BCL2	Protein „ <i>B-cell lymphoma 2</i> “
bp	Basenpaare
BT474	Zelllinie des HER2/neu-positiven dukalen Mammakarzinoms
CAR	chimärer Antigenrezeptor
Caspase	<i>cysteiny-l-aspartate specific protease</i>
CDxx	<i>cluster of differentiation</i>
CLL	Chronische Lymphatische Leukämie
CMV	humanes Cytomegalievirus
CTLA4	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
CXCR	<i>C-X-C chemokine receptor</i>
DLBCL	<i>diffuse large B-cell lymphoma</i> (Diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DN	doppelt negativ
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF1 α	<i>human elongation factor 1 alpha</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FAS	Rezeptor aus der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fetales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FoxP3	<i>forkhead box P3</i>

FSC	<i>forward scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
FYN	eine Tyrosinkinase der SRC-Familie, kodiert auf dem FYN-Gen
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung [g]
GD2	<i>Disialogangliosid 2</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
HEK293T	Zelllinie des Humanen embryonalen Nierenzellkarzinoms (<i>human embryotic kidney carcinoma</i>)
HER2/neu	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
ICOS	<i>inducible T-cell costimulator</i>
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
kb	Kilobasenpaare (1000 Basenpaare)
LAG3	Protein, kodierendes Gen <i>lymphocyte-activation gene 3</i>
LAT	<i>linker for activation of T cells</i>
LCK	<i>lymphocyte-specific protein tyrosine kinase</i>
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LFA1	<i>lymphocyte function-associated antigen 1</i>
LSM	Lymphozytenseparationsmedium
LTR	<i>long terminal repeat</i>
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
MCF7	Zelllinie des HER2/neu-positiven Adenokarzinoms der Mamma
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
NFAT	<i>nuclear factor of activated T cells</i>
NFκB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NY-ESO-1	<i>New York esophageal squamous cell carcinoma-1</i>
OX40	CD134
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i> (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Ketten-Reaktion)
PD1	<i>programmed cell death protein 1</i>
PD-L1	<i>programmed cell death ligand 1</i>

Abkürzungsverzeichnis

PGK	Phosphoglyceratkinase-1
pMHC	Komplex aus Peptid und MHC
P/S	Penicillin und Streptomycin
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RPMI-Medium	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
ROR1	<i>receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1</i>
RT	Raumtemperatur
scFv	<i>single chain variable fragment</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i> (Standardfehler des Mittelwertes)
SRC-Kinase	eine Tyrosinkinase (SRC stammt von <i>sarcoma</i>)
Selbst-pMHC	Komplex aus Selbst-Peptid und MHC
SFFV	<i>spleen focus-forming virus</i>
SSC	<i>side scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
T _{CM}	<i>central memory T cells</i> (zentrale Gedächtnis-T-Zellen)
TCR	<i>T cell receptor</i> (T-Zell-Rezeptor)
T _{EM}	<i>effector memory T cells</i> (Effektor-Gedächtnis-T-Zellen)
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TH-Zellen	T-Helfer-Zellen
TIM3	<i>T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3</i>
TM	Transmembrandomäne
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TRAF2	<i>TNF receptor-associated factor 2</i>
T _{REG}	regulatorische T-Zellen
T _{SCM}	<i>T memory stem cells</i> (T-Gedächtnis-Stammzellen)
V _H	variable Domäne der schweren Kette
V _L	variable Domäne der leichten Kette
VSVg	Glykoprotein des <i>vesicular stomatitis virus</i>
V _α	variable Domäne der α-Kette des T-Zell-Rezeptors
V _β	variable Domäne der β-Kette des T-Zell-Rezeptors
ZAP70	<i>Zeta-chain-associated protein kinase 70</i>

1 Einleitung

1.1 Aktuelle Entwicklungen

Im Juni 2018 empfahl die European Medicines Agency (EMA) die Zulassung von zwei Therapien, *Tisagenlecleucel* und *Axicabtagene ciloleucel*, für die Behandlung von CD19-positiven Formen der Akuten Lymphatischen Leukämie (ALL) bzw. des Diffus-großzelligen B-Zell-Lymphoms (DLBCL)¹. Diese sind die ersten zugelassenen Vertreter der sogenannten CAR-T-Zell-Therapie, bei der T-Zellen des Patienten genetisch so verändert werden, dass sie einen chimären Antigenrezeptor (CAR) exprimieren, um Oberflächenantigene maligner Zellen zu erkennen und dadurch eine gegen diese malignen Zellen gerichtete Immunantwort hervorzurufen.

Die ersten Versuche mit CAR-T-Zellen wurden bereits 1989 veröffentlicht². Für die ersten klinischen Versuche am Menschen wurden in einer Phase-1-Studie 18 Patienten mit verschiedenen B-Zell-Malignomen behandelt, die nach einer Stammzelltransplantation ein Rezidiv erlitten hatten. Vier Patienten waren 2006 zum Zeitpunkt der Veröffentlichung der Ergebnisse³ für 10-52 Monate in kompletter Remission.

Aktuell sind mehr als 400 klinische Studien auf ClinicalTrials.gov verzeichnet (Stand 01/2021), die meisten davon zur Behandlung von malignen hämatologischen Erkrankungen. Jedoch ist eine Verschiebung hin zu soliden Tumoren erkennbar. Bisher fanden die meisten klinischen Studien in den USA statt, zuletzt startete China die meisten Studien.

1.2 T-Lymphozyten

Zu den Aufgaben des Immunsystems gehören unter anderem die Abwehr von Fremdkörpern und Mikroorganismen sowie die Zerstörung von fehlerhaften körpereigenen Zellen.

T-Lymphozyten sind Teil des spezifischen, erworbenen Immunsystems, spielen aber auch eine zentrale Rolle in der Koordination der gesamten Abwehr.

Die Vorläufer der T-Zellen werden im Knochenmark gebildet, wobei sie wie B-Lymphozyten und angeborene lymphatische Zellen (*innate lymphoid cells*, ILC) von der gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzelle (*common lymphoid progenitor*, CLP) abstammen.⁴ Lymphatische Vorläuferzellen – die genaue Subpopulation ist noch nicht endgültig identifiziert⁵ – gelangen in den Thymus, wo der entscheidende Teil ihrer Differenzierung zur T-Zelle stattfindet. Die für diese Arbeit wichtigsten Produkte sind die naiven T-Zellen mit $\alpha\beta$ -Rezeptor und die regulatorischen T-Zellen. Auf die übrigen T-Zell-Populationen wie iNKT-Zellen (*invariant natural killer T cells*) oder die in Haut und Schleimhäuten vorkommenden, immunregulatorisch⁶ wirkenden T-Zellen mit $\gamma\delta$ -Rezeptor soll hier nicht näher eingegangen werden.

1.2.1 Differenzierung der Thymozyten

Durch Interaktion mit Thymusepithelzellen werden Signalwege gestartet, die die Gen- und Proteinexpression der T-Vorläuferzellen, während der Reifung im Thymus Thymozyten genannt, verändern und diese auf die T-Zell-Reihe festlegen. Die vorhandenen Rezeptoren und Transkriptionsfaktoren beeinflusst die Signalübertragung und die Genexpression, wodurch wiederum die Proteinexpression gesteuert wird.⁷

Die verschiedenen Entwicklungsstufen sind also gekennzeichnet durch die Expression verschiedener Oberflächenproteine wie CD44 und CD25 sowie CD4 und CD8 und die genetischen Umlagerungen von V-, D- und J-Segmenten in den Genen der β -Kette und V- und J-Segmenten in den Genen der α -Kette.^{8,9} Diese Umlagerungen resultieren in einer Vielfalt von unterschiedlichen variablen Regionen des T-Zell-Rezeptors, welche für die Antigenerkennung entscheidend sind.¹⁰

Während der ersten Entwicklungsstufen exprimieren die Zellen zwar T-Zell-Marker wie CD2, aber weder CD4 noch CD8.¹¹ Sie werden deshalb als doppelt negative (DN) Zellen bezeichnet.

Zunächst müssen doppelt negative Thymozyten auf Überlebenssignale reagieren können, also auf Zytokine wie Interleukin-7.¹²

Dazu kommen Genumlagerungen im Bereich der β -, γ - und δ -Ketten des T-Zell-Rezeptors (TCR).⁷ Zwei T-Zell-Linien – $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ – entstehen. Die Komplexbildung von CD3, der initialen α -Kette und der β -Kette führt zu Umlagerungen der α -Kette, weiteren Umlagerungen der β -Kette und der Expression von CD4 und CD8.⁷ ⁸ Diese doppelt positiven Zellen sind in der Lage, den $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptor zu exprimieren.⁸ Die Umlagerungen im α -Locus dauern so lange an, bis die Zelle entweder die positive Selektion besteht oder durch die fehlenden Überlebenssignale abstirbt.⁸

Positive und negative Selektion nach der Affinitätshypothese

Nur etwa 2,1% der doppelt positiven T-Zellen überleben sowohl die positive als auch die negative Selektion und gelangen anschließend in die Peripherie.¹³ Die Selektionsschritte werden ermöglicht durch die Interaktion mit den *Major Histocompatibility Complex* (MHC)-Molekülen der Thymusepithelzellen und der Stromazellen.¹⁴

Nur wenige der entstandenen T-Zell-Rezeptoren der doppelt positiven Zellen binden mit ausreichender Affinität den Komplex aus Selbst-Peptid und MHC.¹³ ¹⁴ Die Thymozyten bekommen durch diese Interaktion Überlebenssignale sowie Signale, die die genetische Rekombination beeinflussen; die übrigen erfahren keine Überlebenssignale und sterben aufgrund dieses „Neglects“.⁹ ¹⁵ Diesen Vorgang bezeichnet man als positive Selektion.

Die so selektierten Zellen werden schließlich durch Beenden der Expression eines Corezeptors zu einfach positiven CD4+- oder CD8+-T-Zellen. Die Thymozyten, deren T-Zell-Rezeptor ein an MHC Klasse II gebundenes Peptid erkennt, exprimieren CD4.¹⁶ Dagegen besitzen CD8+-T-Zellen einen auf MHC Klasse I spezialisierten T-Zell-Rezeptor.¹⁷ Unklar ist bisher, ob aufgrund des Einflusses des Corezeptors auf die Signaltransduktion die Abschaltung des jeweils anderen Corezeptors gezielt gesteuert wird, oder ob zufällig die Expression von CD4 oder CD8 beendet wird und die Zellen, deren TCR nicht zu ihrem Corezeptor passt, ausselektiert werden.⁸

Überlappend beginnt die negative Selektion.¹⁸ Ziel dieser Entwicklungsstufe ist die Eliminierung von autoreaktiven Zellen.⁹ Haben die T-Zell-Rezeptoren eine zu hohe Affinität an den Komplex von körpereigenen Proteinen und MHC auf den Oberflächen der Thymusepithelzellen oder der dendritischen Zellen, werden diese unreifen Zellen durch Apoptose entfernt.¹⁹ Dieser Vorgang wird als klonale Deletion bezeichnet.

Einige Subpopulationen allerdings überleben die negative Selektion trotz einer hohen Affinität ihres T-Zell-Rezeptors an ein Selbst-Antigen.¹⁹ Dies trifft unter anderem auf einen Teil der regulatorischen T-Zellen zu.¹⁵ Sie zeichnen sich durch eine hohe Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 (*forkhead box P3*) aus²⁰; der genaue Mechanismus dieser Agonistenselektion ist Gegenstand der Forschung²¹, aber die Entwicklung zu regulatorischen T-Zellen setzt eine gewisse Reifungsstufe voraus^{14 15}. Autoreaktive doppelt positive Thymozyten, die die negative Selektion überleben, differenzieren zu intestinal intraepithelialen Lymphozyten (IEL), während regulatorische T-Zellen erst in einem späteren Entwicklungsstadium aus einfach positiven T-Zellen entstehen.¹⁴

Bestehen die Thymozyten die beiden Selektionsmechanismen, werden sie als naive T-Zellen in die Peripherie entlassen und zirkulieren im Blut oder wandern in sekundäre lymphatische Organe wie Lymphknoten oder Milz.⁹

Die niedrige Affinität des T-Zell-Rezeptors für körpereigene pMHC (an MHC gebundenes Protein) führt dazu, dass die Zellen in der Peripherie Überlebenssignale empfangen.²² Eine niedrighschwellige Aktivierung ist außerdem Voraussetzung für die T-Zell-Antwort.²² Allerdings führt die Bindung eines pMHC mit niedriger Affinität an einen TCR in Thymozyten zu einem stärkeren Aktivierungssignal als in reifen T-Zellen,²³ der Grund hierfür sind Unterschiede in der Proteinexpression zwischen reifen und unreifen Zellen^{24 25 26}.

Priming der T-Zellen

Diese antigenpräsentierenden Zellen präsentieren Bruchstücke von potenziellen Krankheitserregern an MHC gebunden auf der Zelloberfläche. Naive T-Zellen binden zunächst vorübergehend an jede ihnen begegnende

antigenpräsentierende Zelle^{27 28}. Diese Bindung wird unter anderem durch LFA1²⁹ (*lymphocyte function-associated antigen 1*) vermittelt.

„Passt“ der T-Zell-Rezeptor einer naiven T-Zelle zu einem präsentierten Antigen, wird diese Zelle aktiviert, und durch eine Konformationsänderung wird die Affinität von LFA1 erhöht³⁰. Die Bindung des Corezeptors CD4 oder CD8 scheint die Verbindung der Zellen weiter zu stabilisieren.³¹ Außerdem werden zur Aktivierung der naiven T-Zelle weitere Signale benötigt³², das heißt costimulierende Rezeptoren auf der T-Zell-Oberfläche werden durch die entsprechenden Liganden auf der antigenpräsentierenden Zelle aktiviert; einer der wichtigsten ist CD28³³. Das Priming der naiven Zelle wird durch eine hyporeagible Phase beendet, in der die T-Zellen nach Aktivierung vorübergehend keine Reaktion bei erneutem Kontakt mit einer antigenpräsentierenden Zelle oder selbst mit dem spezifischen Antigen zeigen; stattdessen proliferieren die Zellen.³⁴

Bei der Entwicklung der naive T-Zellen zu Effektorzellen wie T-Helferzellen, zytotoxischen T-Zellen oder regulatorischen T-Zellen, und T-Gedächtnis-Zellen spielen Zytokine^{35 36} und Modifikationen auf DNA-Ebene³⁷ eine wichtige Rolle.

1.2.2 Subpopulationen der T-Zellen

Aufgaben des erworbenen Immunsystems sind die gezielte Bekämpfung von Pathogenen und die Bildung eines Immungedächtnisses, um die Immunantwort beim zweiten Antigenkontakt sehr schnell initiieren zu können.

Im folgenden Abschnitt werden die wichtigsten Subpopulationen der T-Zellen kurz charakterisiert.

CD4-positive Zellen

Die CD4-positiven T-Helferzellen sind verantwortlich für die Koordination einer Immunantwort, indem sie durch Signale – in erster Linie durch Zytokinfreisetzung – verschiedene andere Immunzellen wie B-Lymphozyten und Makrophagen aktivieren. Die Aktivierung kann zwar unter Umständen auch durch T-Zell-unabhängige Wege induziert werden³⁸, aber die meisten B-Zellen benötigen die „T-Zell-Hilfe“ für Aktivierung und Differenzierung³⁹.

1 Einleitung

1.2 T-Lymphozyten

Die T-Helferzellen gliedern sich in TH1-, TH2-, TH9-, TH17-, TH22-Zellen und folliculäre T-Helferzellen. Eine weitere CD4-positive T-Zell-Population sind die regulatorischen T-Zellen.

Die TH1-Zellen sind für die Bekämpfung von intrazellulären Pathogenen wie Viren^{40 41}, Protozoen⁴² oder Bakterien⁴³ verantwortlich, die Makrophagen überleben oder diese infizieren. Exprimiert ein solcher Makrophage das spezifische Antigen auf MHC II, wird er durch das von der TH1-Zelle produzierte Interferon- γ (IFN- γ) weiter aktiviert, um die aufgenommenen Pathogene doch noch zu eliminieren.^{44 45} Auf dieselbe Weise scheint die TH1-Anti-Tumor-Aktivität zu funktionieren.⁴⁶ Außerdem bewirken sie den Isotypenwechsel zu IgG2a bei B-Zellen⁴⁷; weitere synthetisierte Zytokine neben Interferon- γ sind Interleukin-2 (IL-2) und Tumornekrosefaktor- α (TNF α)⁴⁸.

Die TH2-Zellen sind gegen extrazelluläre Parasiten gerichtet. Um die eosinophilen Granulozyten und die Mastzellen zu stimulieren, produzieren sie unter anderem IL-4⁴⁹, IL-5⁵⁰ und IL-13⁵¹. Des Weiteren sind sie für die Unterstützung des Isotypenwechsels zu IgE wichtig^{47 48}.

Die 2008 erstmals beschriebenen TH9-Zellen^{52 53} spielen eine Rolle bei der Bekämpfung von Parasiten⁵⁴ und soliden Tumoren^{55 56} sowie Autoimmunerkrankungen⁵⁷ wie chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Ob das Verhalten der TH9-Zellen eine Anti-Tumoraktivität zeigt oder das Tumorwachstum begünstigt, scheint von der Tumorzelllinie abzuhängen.⁵⁸

Kurz darauf wurden 2009 die TH22-Zellen als eigene Subpopulation charakterisiert.⁵⁹ Die überwiegend in der Haut lokalisierten Zellen sind die Hauptproduzenten⁶⁰ von IL-22, können aber auch IL-10 oder TNF α synthetisieren.⁶¹ Sie spielen somit eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der Epithelzellen in Haut und Schleimhäuten, welche dann antimikrobielle Peptide synthetisieren und somit eine Barriere gegen eindringende Pathogene bilden.^{62 63 64}

Die Aufgabe der TH17-Zellen ist die Unterstützung der Immunreaktionen, welche gegen extrazelluläre Bakterien⁶⁵ oder Pilze⁶⁶ gerichtet sind. Im Verbund mit TH1-

1 Einleitung

1.2 T-Lymphozyten

Zellen sind sie außerdem an der Immunreaktion gegen intrazelluläre Bakterien beteiligt⁶⁷. Benannt sind sie nach dem von ihnen synthetisierten Zytokin IL-17⁶⁸. Sie verstärken die antimikrobielle Aktivität der neutrophilen Granulozyten⁶⁹ und bewirken den Isotypenwechsel hin zur Produktion von IgG2a- und IgG3-Antikörpern⁷⁰.

Die Funktionen der TFH-Zellen sind die Unterstützung der Bildung eines Keimzentrums, der B-Zell-Differenzierung und dem damit verbundenen Isotypenwechsel der Antikörper unabhängig von Typ der Immunreaktion. Dies geschieht durch die Expression von costimulatorischen Rezeptoren wie ICOS⁷¹ oder den Zytokinen IL-4⁷², IL-10⁷³ und IL-21⁷⁴. Die Unterstützung der B-Zell-Differenzierung durch diese T-Lymphozyten-Population resultiert in der Produktion von hochaffinen Antikörpern^{75 76}. Der Wirkort dieser Zellen sind die Lymphfollikel^{77 78}, in welchen sie aufgrund der Expression des Chemokinrezeptors CXCR5 gelangen⁷⁹.

Die regulatorischen T-Zellen (T_{REG}) begrenzen die Immunreaktion der anderen Immunzellen und verhindern somit Autoimmunreaktionen. Außerdem fördern T_{REG} die Gewebeheilung⁸⁰, tragen in der Schwangerschaft zur immunologischen Toleranz des kindlichen Gewebes bei⁸¹ und haben einen Anteil an metabolischen Prozessen und Erkrankungen wie Diabetes⁸². Bei einem Apoplex werden T_{REG} sowohl protektive Funktionen⁸³ unterstellt als auch ein Anteil an der Entstehung der Erkrankung⁸⁴.

Leider unterdrücken sie neben Autoimmunreaktionen auch die gegen Tumorzellen gerichteten Immunreaktionen⁸⁵; bei vielen Tumorarten ist eine hohe Infiltration von T_{REG} gleichbedeutend mit einer schlechten Prognose⁸⁶.

Sie werden nach ihrem Entstehungsort in im Thymus entstandene tT_{REG}, welche den Thymus als reife funktionsfähige Zellen verlassen⁸⁷, und in der Peripherie aus naiven CD4-positiven Lymphozyten differenzierte pT_{REG} unterteilt⁸⁸. Dies ist keine einheitliche Gruppe. Der Transkriptionsfaktor FoxP3 (*forkhead box P3*) ist für die meisten regulatorischen T-Zellen kennzeichnend und für deren Funktion entscheidend²⁰. Mittlerweile sind aber auch Untergruppen bekannt, die kein FoxP3 synthetisieren^{89 90}. Die regulatorischen T-Zellen sind in der Lage, die

Funktion nahezu aller anderen Immunzellen zu beeinträchtigen⁹¹. Zu diesem Zweck sekretieren sie zum einen Zytokine wie IL-10^{92 93 94}, *Transforming Growth Factor β* (TGF- β)^{95 96} und IL-35⁹⁷, zum anderen induzieren sie Zytolyse durch Serinproteasen wie Granzym B⁹⁸ und unterbrechen proinflammatorische interzelluläre Signalwege durch CD39⁹⁹ oder CD25^{100,101}. Außerdem blockieren sie die Aktivierung von T-Zellen durch dendritische Zellen, indem sie mit Rezeptoren wie CTLA4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) anstelle des homologen Rezeptors CD28 an den Liganden B7 binden¹⁰², und durch PD1 (*programmed cell death protein 1*), dessen Liganden ebenfalls zur B7-Familie gehören^{103,101}.

Es gibt weitere Arten von regulatorischen T-Zellen, zum Beispiel folliculäre regulatorischen T-Zellen, welche CXCR5 exprimieren¹⁰⁴, oder CD8-positive regulatorische T-Zellen¹⁰⁵.

Die Subpopulationen der CD4-Zellen sind allerdings oft nicht so klar abgegrenzt, da die Zellen durchaus über die Fähigkeit der Plastizität verfügen.

So gibt es zum Beispiel Zwischenformen wie die TH17/TH1-Zellen, die sowohl IL-17 als auch IFN- γ synthetisieren.¹⁰⁶ Unter bestimmten Umständen können auch TH22 Interferon- γ sekretieren¹⁰⁷, ein Zytokin, das eigentlich für die TH1-Zellen spezifisch ist. TH17-Zellen können sogar zu regulatorischen T-Zellen umgewandelt werden¹⁰⁸ und umgekehrt¹⁰⁹. Auch die Umwandlung von regulatorischen T-Zellen in folliculäre T-Helferzellen ist möglich.¹¹⁰

Außerdem wirken die für eine Subpopulation spezifischen Zytokine auch auf die anderen CD4-Subpopulationen. Das für TH17 spezifische IL-17 beispielsweise unterstützt die TH1-Differenzierung und damit die Immunantwort gegen intrazelluläre Bakterien wie *Francisella tularensis*¹¹¹.

CD8-positive T-Zellen

Die CD8-positiven T-Zellen töten die mit intrazellulären Pathogenen^{112 113 114} infizierten Zellen im direkten Kontakt ab.

CD8-positive zytotoxische T-Zellen erkennen ihre Zielzelle abhängig von MHC I oder CD1^{115,116}. Die Induktion der Apoptose der Zielzelle geschieht auf drei

verschiedene Arten: durch Exozytose von lytischen Granula, die Perforin, Granzyme und Granulysin enthalten, welche dann in der Zielzelle freigesetzt werden; durch den Signalweg nach Bindung des FAS-Liganden an den FAS-Rezeptor auf der Zielzelle, was auch antigenunabhängig möglich ist; oder durch TNF-TNFR-Interaktion.¹¹⁷

Für die Aktivierung von naiven CD8-positiven T-Zellen und damit für die primäre Immunantwort sind nur bei manchen Mechanismen wie Cross-Priming T-Helfer-Zellen nötig^{118 119 120}. Die Unterschiede zeigen sich allerdings bei der sekundären Immunantwort¹²¹, da die Erhaltung der CD8-Gedächtnis-Zellen abhängig ist von der Anwesenheit von T-Helfer-Zellen¹²².

Ein wichtiger Rezeptor ist dabei der CD40-Rezeptor der CD4-T-Zellen, der an den entsprechenden Liganden auf der Oberfläche der dendritischen Zelle bindet¹²³ und dadurch zur Expression von costimulatorischen Rezeptoren wie B7, dem Rezeptor für CD28, und Zytokinen seitens der dendritischen Zellen führt¹²⁴, welche wiederum für die Aktivierung der CD8-positiven T-Zellen wichtig sind. Für die Differenzierung und Proliferation der CD8-T-Zellen spielt außerdem das v.a. von CD4-T-Zellen synthetisierte IL-2 eine wichtige Rolle^{125 126}.

Die Entwicklung der naiven T-Zelle zur Effektor- oder Gedächtnis-Zelle ist abhängig von den Zytokinen: die Gegenwart von IL-21 fördert die Differenzierung zu Gedächtniszellen¹²⁷, IL-12 dagegen die Bildung von kurzlebigen Effektor-Zellen¹²⁸.

T-Gedächtnis-Zellen

Die T-Gedächtnis-Zellen sind für die „Erinnerung“ des Immunsystems an das Pathogen verantwortlich. Bei einem zweiten Kontakt mit dem spezifischen Antigen, also bei einer erneuten Infektion mit demselben Pathogen, können die Gedächtniszellen schneller zu Effektorzellen differenzieren und proliferieren¹²⁹ und schützen vermehrt Zytokine aus^{130 131}. Zusätzlich rekrutieren sie Zellen des angeborenen Immunsystems¹³².

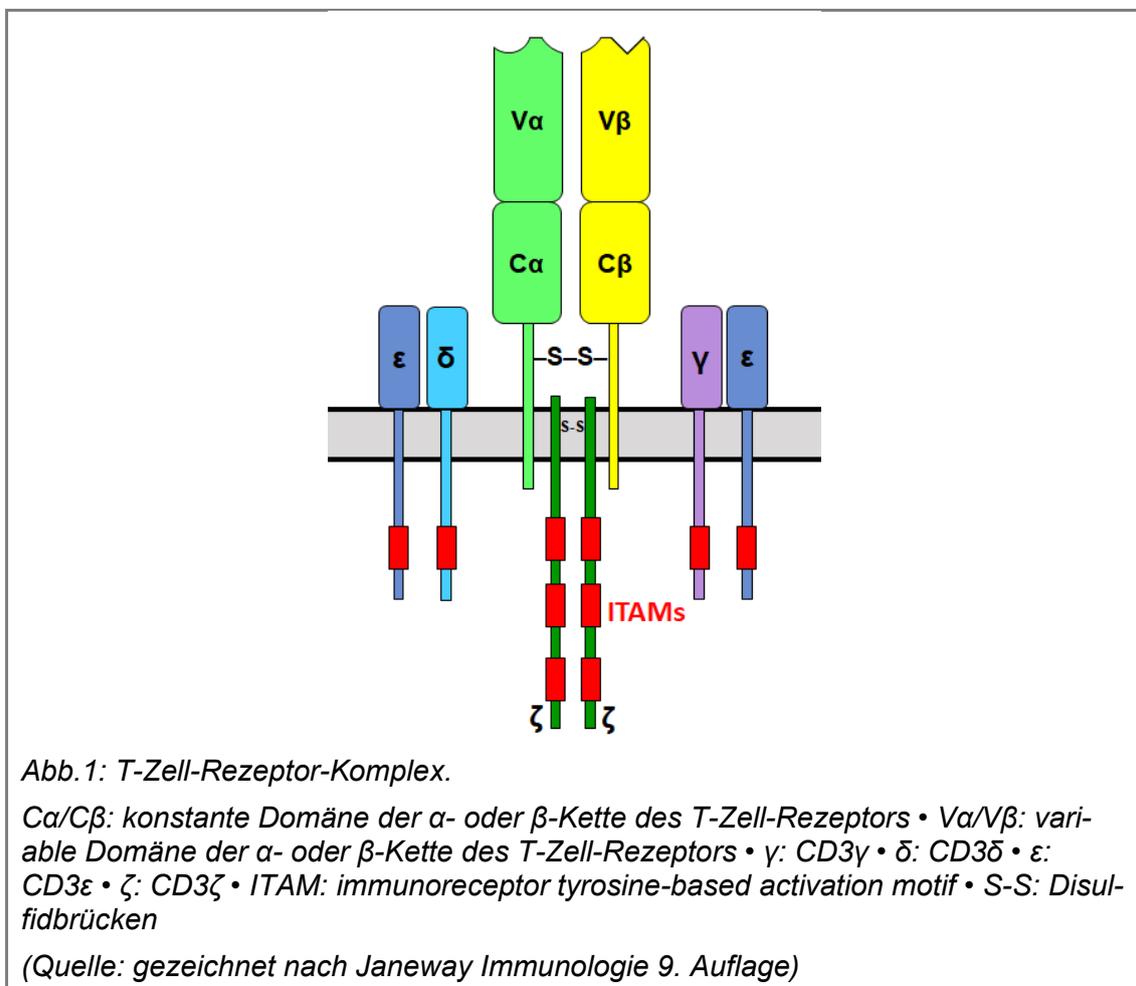
1 Einleitung

1.3 Aufbau des T-Zell-Rezeptor-Komplexes

Im Gegensatz zu naiven T-Zellen können T-Gedächtnis-Zellen auch von Makrophagen und ruhenden B-Zellen aktiviert werden.¹³³ Außerdem benötigen naive T-Zellen neben dem T-Zell-Rezeptor-Signal noch zwei weitere Signale zur Aktivierung: die Costimulation von CD28 und ein drittes Signal in Form von Zytokinen wie IL-12, IL-1¹³⁴ oder Interferonen¹³⁵; Gedächtniszellen dagegen genügt zur Aktivierung das T-Zell-Rezeptor-Signal und IL-2¹³⁶.

Zusammenfassend ermöglichen die T-Gedächtniszellen bei Reinfektion eine schnelle und gezielte Immunantwort, die wesentlich effektiver ist als beim ersten Kontakt¹³².

1.3 Aufbau des T-Zell-Rezeptor-Komplexes



Der T-Zell-Rezeptor (TCR) dient der Erkennung von Antigenen. Diese müssen jedoch an MHC oder MHC-ähnliche Moleküle gebunden sein¹¹⁶, welche auf der

1 Einleitung

1.3 Aufbau des T-Zell-Rezeptor-Komplexes

Oberfläche der Kontaktzelle exprimiert werden. Von T-Zell-Rezeptoren erkannte Antigene sind gewöhnlich Peptide, welche an MHC gebunden sind und von extrazellulären oder intrazellulären Krankheitserregern stammen oder veränderte Proteine bei malignen Zellveränderungen darstellen; allerdings können auch an MHC-ähnliche Moleküle gebundene Lipide¹³⁷ oder Metabolite¹³⁸ von T-Zell-Rezeptoren erkannt werden. Die Diskussion darüber, welche T-Zell-Subpopulationen dazu befähigt sind, dauert an¹³⁹. Im Folgenden soll darauf nicht näher eingegangen werden und die folgenden Abschnitte beschränken sich auf die klassischen Peptidantigene, die auf MHC präsentiert werden.

Es gibt zwei verschiedene Arten des T-Zell-Rezeptors (TCR). Etwa 96% bestehen aus einer α - und einer β -Kette und nur 4% aus einer γ - und einer δ -Kette.¹⁴⁰ Da der $\gamma\delta$ -Rezeptor für diese Arbeit keine Rolle spielt, wird er im weiteren Verlauf ignoriert.

Die Ketten bestehen – ähnlich wie Antikörper – aus einer konstanten und einer variablen Region¹⁴¹, deren Sequenz durch die Genumlagerungen im Thymus von Zelle zu Zelle sehr unterschiedlich sein kann¹⁴²; dazu kommen eine Transmembrandomäne, eine Verbindungsregion zwischen der konstanten Region und Transmembrandomäne und eine intrazelluläre Region.¹⁴³

Die Bandbreite der von der variablen Region potenziell „erkannten“ Antigene wird dadurch erweitert, dass sie nicht streng spezifisch für ein einziges Peptid ist, sondern mit ähnlichen Peptidsequenzen kreuzreagieren kann; je stärker die Bindung, desto wahrscheinlicher ist die Aktivierung der T-Zelle.¹⁴⁴

An dieser Region findet also die Interaktion von T-Zell-Rezeptor und pMHC statt¹⁴⁵, wodurch dann eine Signalkaskade ausgelöst wird. Der T-Zell-Rezeptor selbst besitzt jedoch keine intrazelluläre Signaldomäne.¹⁴⁶

Die α - und β -Kette bilden ein Heterodimer, welches mit dem CD3-Komplex assoziiert, aber nicht kovalent gebunden ist. Dieser besteht aus den Untereinheiten CD3 ζ , CD3 γ , CD3 δ und CD3 ϵ , welche die Heterodimere CD3 $\gamma\epsilon$ und CD3 $\delta\epsilon$ sowie das Homodimer CD3 $\zeta\zeta$ bilden.^{143 147} Diese besitzen ITAMs (*immunoreceptor*

1 Einleitung

1.3 Aufbau des T-Zell-Rezeptor-Komplexes

tyrosine-based activation motifs), also Aminosäure-Sequenzen bestehend aus Tyrosin-x-x-Leucin oder Isoleucin (x steht für eine beliebige Aminosäure), dann 6-8 Aminosäuren und anschließend eine Wiederholung der ersten vier Aminosäuren.¹⁴⁸ ITAMs dienen der Signaltransduktion in verschiedenen Immunrezeptoren und der CD3-Komplex besitzt insgesamt zehn solcher Einheiten.¹⁴⁸

Durch die Interaktion mit dem präsentierten Antigen wird ein Signal gestartet, die Corezeptoren CD4 oder CD8 binden an das jeweilige MHC-Molekül und die aktivierte SRC-Kinase LCK (*lymphocyte-specific protein-tyrosine kinase*) bindet wiederum an die intrazelluläre Domäne des Corezeptors, was dazu führt, dass LCK die ITAMs des CD3-Komplexes phosphoryliert.¹⁴⁹ Alternativ ist auch die Phosphorylierung durch die aktivierte SRC-Kinase FYN möglich.¹⁵⁰

An die phosphorylierten ITAMs der CD3-Untereinheiten bindet wiederum die Tyrosinkinase ZAP70, die dort auch phosphoryliert wird und dann wiederum eine Phosphatgruppe auf ein Transmembranadapterprotein überträgt, was zum Start von Signalkaskaden führt.¹⁵¹ Das vermutlich bedeutendste Transmembranprotein ist LAT (*linker for activation of T cells*)^{151 152}. Vom LAT-Signalkomplex gehen drei wichtige Signalwege aus¹⁵³: (1) der Calcium-Calcineurin-Signalweg bewirkt den Import des Transkriptionsfaktors NFAT (nuclear factor of activated T cells) in den Nukleus, (2) ein Calcineurin-unabhängiger Signalweg, der zu einem Import des Transkriptionsfaktors NFκB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) in den Nukleus führt und (3) die Signalkaskaden mit hintereinander geschalteten MAP-Kinasen (*mitogen-activated protein kinases*), welche unter anderem die Aktivierung mehrere Transkriptionsfaktoren zur Folge haben und das Zytoskelett durch Aktin-Polymerisation beeinflussen.

Zur Aktivierung einer T-Zelle reicht das Signal des T-Zell-Rezeptor-Komplexes nach Antigenerkennung alleine nicht aus, sondern führt sogar zu einer nicht reaktiven, anergen T-Zelle; weitere Signale sind also nötig.^{154 155} Der wichtigste costimulatorische Rezeptor zur Vorbeugung von Anergie ist CD28^{33 156}, welcher mit B7 auf antigenpräsentierenden Zellen interagiert¹⁵⁷. CD28-B7-Interaktion führt zu einer Herabsetzung der Aktivierungsschwelle für die T-Zelle¹⁵⁸ und – in Kombination mit dem TCR-Signal – zu einer verbesserten T-Zell-Aktivierung,

1 Einleitung

1.3 Aufbau des T-Zell-Rezeptor-Komplexes

einem gesteigerten Überleben¹⁵⁹, einer vermehrten Proliferation und Differenzierung, unter anderem durch eine deutlich erhöhte Zytokin-Sekretion¹⁶⁰, v.a. einer erhöhten Sekretion von IL-2^{161 162}, und einer vermehrten Expression des IL-2-Rezeptors.¹⁶³ Zugleich ist das Signal auch wichtig für Entwicklung und Überleben von regulatorischen T-Zellen¹⁶⁴.

Ein Gegenspieler von CD28 ist der ähnlich aufgebaute inhibitorische Rezeptor CTLA4, welcher mit höherer Affinität an B7 bindet¹⁶⁵ und während der T-Zell-Aktivierung hochreguliert wird¹⁶⁶. Während durch Abwesenheit von CD28 induzierte Anergie mit externem IL-2 durchbrochen werden kann¹⁶⁷, gilt das nicht für durch CTLA4 induzierte Anergie¹⁶⁸.

CD28 ermöglicht also eine effektive T-Zell-Antwort und Immunreaktion, startet aber gleichzeitig auch immunsuppressive Mechanismen zur Vorbeugung von Autoimmunität.¹⁶⁹

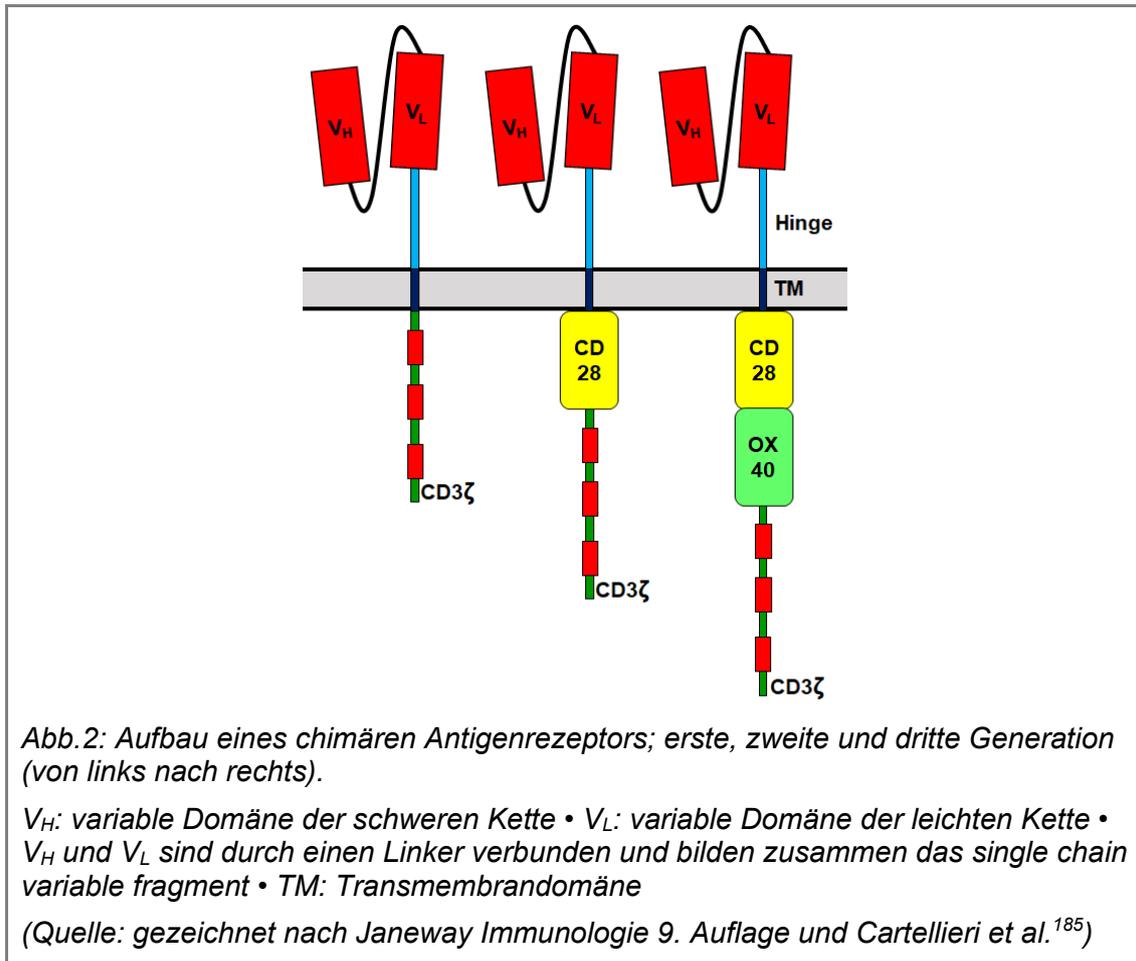
Ein weiterer costimulatorischer Rezeptor ist CD134 (OX40), welcher vorübergehend nach Aktivierung auf T-Zellen exprimiert wird¹⁷⁰. Das Rezeptorsignal ist wichtig für die Proliferation von T-Zellen und deren Differenzierung zu Gedächtniszellen sowie für die primäre CD4-T-Zell-Antwort; es spielt zudem eine Rolle beim Priming von CD8-Zellen gegen manche Erreger.¹⁷¹ Außerdem ist OX40 für das Überleben der T-Zellen wichtig, indem es der Apoptose entgegenwirkt¹⁷², AICD (*activation induced cell death*) verhindert¹⁷³ und sogar Anergie von T-Zellen aufheben kann¹⁷⁴. Aufgrund der Fähigkeiten, sowohl CD4- als auch CD8-positive T-Zellen zu unterstützen sowie regulatorische T-Zellen zu inaktivieren^{175 176}, wird CD134 zunehmend zu einem interessanten Ansatzpunkt für die Tumorthherapie.^{177 178 179}

Die T-Zell-Rezeptor-Signale und costimulatorischen Signale führen zu einer Bandbreite von Effekten, welche eine geregelte/geordnete Immunantwort ermöglichen¹⁸⁰, unter anderem Proliferation¹⁸¹, Fähigkeit zur Migration, Differenzierung¹⁸², Zytokinproduktion¹⁸³ und Effektorfunktionen^{184, 153}

1 Einleitung

1.4 Aufbau eines chimären Antigenrezeptors (CAR)

1.4 Aufbau eines chimären Antigenrezeptors (CAR)



Ein chimärer Antigenrezeptor ist ein künstlicher T-Zell-Rezeptor. Die Basisstruktur besteht aus einer Antigenbindungsdomäne, die den eigentlichen T-Zell-Rezeptor ersetzt, einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Signaldomäne.

Meist besteht die Antigenbindungsdomäne aus der Sequenz eines *single chain variable fragments* (scFv) eines monoklonalen Antikörpers¹⁸⁶. Ausgehend von der Erkennungssequenz des Antikörpers sind die meisten CAR MHC-unabhängig¹⁸⁶, mit wenigen Ausnahmen¹⁸⁷, und können Peptidsequenzen, Kohlenhydrate oder Glykolipide erkennen^{186 188}. Chimäre Antigenrezeptoren stellen einen vielversprechenden Ansatz in der Tumorthherapie dar. Die ersten klinischen Versuche waren jedoch gegen HIV gerichtet¹⁸⁹, wenn auch mit mäßigem Erfolg¹⁹⁰. Bis heute gibt es Ansätze für die Bekämpfung von Viruserkrankungen¹⁹⁰.

Ein Verbindungsstück (*hinge* oder *spacer*) konnektiert das scFv mit der Transmembrandomäne¹⁹¹.

Die intrazelluläre Signaldomäne besteht aus einem oder mehreren Bausteinen, je nach „Generation“ des Rezeptors.¹⁸⁵ Bei einem *first generation* CAR besteht die Signaldomäne aus nur einem Baustein, meist der CD3ζ-Kette. Es wird also das Signal des T-Zell-Rezeptor-Komplexes imitiert.

Für eine effektive Aktivierung der T-Zellen reicht dieses Signal – wie bei der physiologischen Aktivierung über den T-Zell-Rezeptor – oft nicht aus, sondern führt sogar zur Anergie der T-Zelle¹⁹². Um die costimulierenden Signale auch ohne antigenpräsentierende Zellen zu ermöglichen, wurde der künstliche Rezeptor durch Einbau von entsprechenden Domänen modifiziert. Die zweite Generation der CARs besitzt eine solche costimulierende Domäne wie beispielsweise CD28, ein CAR der dritten Generation besitzt zwei solche Domänen, zum Beispiel CD28 und zusätzlich CD134, CD137 oder CD27.¹⁹³

Um die Funktion der CAR-T-Zellen weiter zu verbessern, besitzt die vierte Generation Gen-Sequenzen für Zytokine, die an die CAR-Sequenz gekoppelt sind.¹⁹⁴

¹⁹⁵ ¹⁹⁶

Auch Kontrollmechanismen wurden entwickelt, um die Sicherheit der Therapie zu erhöhen. So können mit dem Einfügen von induzierbarer Caspase-9 in die Konstruktion die CAR-T-Zellen bei einer unvorhergesehenen Komplikation notfalls durch Apoptose „abgeschaltet“ werden.¹⁹⁷

1.5 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, eine Methode für die Forschungsgruppe zu etablieren, mithilfe derer sich CAR-Zellen herstellen lassen. In weiteren Arbeiten kann der Aufbau des Rezeptors dann verändert und die Auswirkungen auf die Funktion des Rezeptors können untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

6-/12-/24-well Zellkulturplatten	BD Biosciences, Franklin Lakes NJ, USA
48-well Zellkulturplatten	Costar® Corning, Tewksbury MA, USA
96-well plate F-/V-/U-Bottom	greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
96-well plate, white	Roche, Rotkreuz, Schweiz
96-well Zellkulturplatten (F-Bottom)	greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Atemmaske FFP3	3M, Saint Paul MN, USA
Countess Slides	Invitrogen, Carlsbad CA, USA
FACS Röhrchen 5 ml	Costar® Corning, Tewksbury MA, USA
FACS Röhrchen 5 ml mit Deckel	Costar® Corning, Tewksbury MA, USA
Fixierpflaster Transpore™	3M, Saint Paul MN, USA
Glasperlen	Merck, Darmstadt
Handschuhe Nitril purple	Kimberly Clark, Dallas TX, USA
Handschuhe Peha soft nitrile	Hartmann, Heidenheim
Impfösen	greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Lenti-X™ GoStix™ Plus	Clontech Takara, Mountain View CA, USA
Parafilm M	Bemis Company, Neenah WI, USA
Petrischale für Zellkultur 100/20 mm	greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Petrischale für Zellkultur 100/20 mm	Falcon® Corning, Corning NY, USA
Pipettenspitzen 10,200,1000, 1250 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen mit Filter 10,100,1000 µl	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Pipette serologisch Advant. 2, 5, 10, 25, 50 ml	Costar® Corning, Tewksbury MA, USA
Reaktionsgefäße 0,2; 1,5; 2,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Skalpell	Braun, Melsungen
Spritze 10, 20 ml	Braun, Melsungen
Stericup Durapore 0,45 µm, 150 ml	Merck Millipore, Billerica MA, USA
Sterilfilter Millex-GP, 0,22 µm, 33 mm	Merck Millipore, Billerica MA, USA
Sterilfilterspitzen	Biozym, Hessisch Oldendorf
Viva-Spin 20	Sartorius, Göttingen
Zellkulturflasche 125 ml (25 cm ²)	Falcon® Corning, Corning NY, USA
Zellkulturflasche 175 ml (75 cm ²)	Falcon® Corning, Corning NY, USA
Zentrifugenröhrchen konisch („Falcon“) 15, 50 ml	BD, Franklin Lakes NJ, USA

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.2 Reagenzien und Chemikalien

Agar-Agar	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Carl Roth, Karlsruhe
Ampicillin-Natriumsalz	Carl Roth, Karlsruhe
CellGro GMP SCGM	Cellgenix, Freiburg
CutSmart Buffer (10x)	New England Biolabs, Ipswich MA, USA
Descosept	Dr. Schumacher, Malsfeld-Beiseförth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	SigmaAldrich, St. Louis MO, USA
DMEM, high glucose, GlutaMAX™ Supplement, pyruvate	Gibco® Life Technologies, Carlsbad CA, USA
Ethanol (99,9%)	Merck, Darmstadt
FACS Clean/Flow/Rinse	BD Biosciences, Franklin Lakes NJ, USA
FCS (Fetales Kälberserum)	Biochrom, Merck, Darmstadt
Gel Loading Dye Purple (6x)	New England Biolabs, Ipswich MA, USA
Humanserum	SigmaAldrich, St. Louis MO, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Carl Roth, Karlsruhe
LB-Medium	Carl Roth, Karlsruhe
Lymphozytenseparationsmedium LSM 1077	PAA, GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK
MACS Running Puffer	MiltenyiBiotech, Bergisch Gladbach
MgCl ₂ 25 mM	Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA
Midori Green Advanced	Nippen Genetics, Tokio, Japan
N-Acetyl-L-cystein	Sigma Aldrich, St. Louis MO, USA
Nuclease-Free Water	Promega, Fitchburg WI, USA
Opti-MEM™	Gibco® Life Technologies, Carlsbad CA, USA
PBS w/o Ca ²⁺ +Mg ²⁺	Sigma Aldrich, St. Louis MO, USA
Penicillin/Streptomycin (P/S)	PAA, GE Healthcare, Chalfont St Giles, GB
Perform	Schülke, Norderstedt
Polybren	Sigma Aldrich, St. Louis MO, USA
Puromycin	Sigma Aldrich, St. Louis MO, USA
RPMI 1640 GlutaMAX-I HEPES	Gibco® Life Technologies, Carlsbad CA, USA
Sterilium Virugard	Bode Chemie, Hamburg
TBE Buffer 10x Ultrapure	Invitrogen, Carlsbad CA, USA
TransIT 2020	VWR, Radnor PA, USA
Trypsin-EDTA	Biochrom (Merck), Darmstadt
Trypanblau	Invitrogen, Carlsbad CA, USA
Ultra Pure Water	Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA
X-Vivo 15	Lonza, Basel, Schweiz

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.3 DNA

2.1.3.1 Plasmide

pRRL.PPT.SF.i2GFP	Labor Schambach, Med. Hochschule Hannover ¹⁹⁸
pCMV-VSV-G	Labor D.Baltimore, California Institute of Technology ¹⁹⁹
pCMV-dR8.91	Labor D.Baltimore, California Institute of Technology ¹⁹⁹
pLVX-EF1 α -AcGFP1-N1	Clontech Takara, Mountain View CA, USA
pEX-K4-CAR	synthetisiert von Eurofins Genomics, Ebersberg

2.1.3.2 Primer

synthetisiert von Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA

InFusion FW L1 MC BstBI

CGAGCTCAAGCTTCGATGGATTTTCAGGTGCAGATCTTCTCCTTTC

InFusion RW L1 End Tth111I

TTGTTCCAGACGCGGTCACCTGGGAGGCAAAGCTTGCATA

InFusion RW L1P NotI End

TCTAGAGTCGCGGCCGCTCACCTGGGAGGCAAAGCTTGCATA

InFusion FW L2 ClaI

AGATCCAGTTTATCGCTGCAGTAACGCCATTTTGCAA

InFusion RW L2 Afel

TCTGAGTCCGGTAGCGCTAGCGATCCGACTCAGTCTGTCCGGAGGACTGG

2.1.3.3 DNA-Leiter

100 bp DNA Ladder

Invitrogen, Carlsbad CA, USA

BenchTop 1 kb DNA Ladder

Promega, Fitchburg WI, USA

2.1.4 Enzyme und Puffer

Afel 10.000 U/ml

New England Biolabs, Ipswich MA, USA

Antarctic Phosphatase 5.000 U/ml
(+ Antarctiv Phosphatase Reaction
Buffer)

New England Biolabs, Ipswich MA, USA

BamHI-HF 20.000 U/ml

New England Biolabs, Ipswich MA, USA

BmtI 10.000 U/ml

New England Biolabs, Ipswich MA, USA

BsrGI-HF 20.000 U/ml

New England Biolabs, Ipswich MA, USA

BstBI 20.000 U/ml

New England Biolabs, Ipswich MA, USA

ClaI 10.000 U/ml

New England Biolabs, Ipswich MA, USA

CutSmart Buffer

New England Biolabs, Ipswich MA, USA

NEB Buffer

New England Biolabs, Ipswich MA, USA

NotI-HF 20.000 U/ml

New England Biolabs, Ipswich MA, USA

PfIF1 10.000 U/ml

New England Biolabs, Ipswich MA, USA

RsrII 5.000 U/ml

New England Biolabs, Ipswich MA, USA

T4 DNA Ligase (+ T4 DNA Ligase Buffer)

New England Biolabs, Ipswich MA, USA

Tth111I 5.000 U/ml

New England Biolabs, Ipswich MA, USA

XmaI 10.000 U/ml

New England Biolabs, Ipswich MA, USA

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.5 Zellkultur

2.1.5.1 Zelllinien

BuffyCoats	von gesunden Blutspendern der Transfusionsmedizin Tübingen	
BT474	HER2/neu-positives duktales Mamma-CA	ATCC, Manassas VA, USA
HEK293T	Human Embryotic Kidney Carcinoma	ATCC, Manassas VA, USA
MCF7	HER2/neu-positives Adeno-CA der Mamma	ATCC, Manassas VA, USA
Stellar™ competent cells	E.coli	Clontech Takara, Mountain View CA, USA

2.1.5.2 Medien

Zellkulturmedien für T-Zellen

X-Vivo + 5% Humanserum	X-Vivo15 + 5% Humanserum + 1% P/S
X-Vivo	X-Vivo15 + 1% P/S
CellGro + 5% Humanserum	CellGro + 5% Humanserum + 10 mM N-Acetylcystein + 1% P/S
CellGro + 10% Humanserum	CellGro + 10% Humanserum + 10 mM N-Acetylcystein + 1% P/S
CellGro	CellGro + 10 mM N-Acetylcystein + 1% P/S
RPMI + 10% Humanserum	RPMI + 10% Humanserum + 1% P/S
RPMI	RPMI + 1% P/S

Zellkulturmedien für Tumorzelllinien

DMEM mit Zusätzen für HEK 293T und MCF7	DMEM + 10% FCS + 1% P/S
RPMI-Medium für BT474	RPMI + 20% FCS + 1% P/S
RPMI-Medium für Europium Release Assay	RPMI + 10% FCS + 1% P/S

Medien für E.coli

Flüssigmedium	25 g LB-Medium-Pulver auf 1 l aqua dest. + 100µg/ml Antibiotikum (entweder Ampicillin oder Kanamycin)
Platte (für 10-15 Platten)	6,25 g LB-Medium-Pulver + 2,5 g Agar-Agar auf 250 ml aqua bidest; in Mikrowelle erhitzt, auf etwa 60°C abkühlen lassen und Zugabe von 100 µg/ml Antibiotikum (entweder Ampicillin oder Kanamycin)
LB-Flüssigmedium ohne Antibiotikum (nur für Transformation)	25 g LB-Medium-Pulver auf 1 l aqua dest.

Sonstige

Einfrriermedium	FCS + 10% DMSO
-----------------	----------------

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.5.3 Zusätze

Interleukin 2 recombinant human protein	Gibco™ Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA
Interleukin 15 2 recombinant human protein	Gibco™ Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA

2.1.6 Antikörper

2.1.6.1 Aktivierung der T-Zellen

CD3/CD28 Dynabeads	Gibco® Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA
--------------------	--

2.1.6.2 FACS-Antikörper

ErbB2 (HER-2) Monoclonal Antibody (2G11), FITC	Mouse / IgG1	eBioscience (Affymetrix), Santa Clara CA, USA
Goat anti-Human IgG Fc Secondary Antibody, PE	Goat / Ig	eBioscience (Affymetrix), Santa Clara CA, USA
CD3 Monoclonal Antibody (SK7), PerCP-eFluor 710	Mouse / IgG1, kappa	eBioscience (Affymetrix), Santa Clara CA, USA
CD4 Monoclonal Antibody (RPA-T4), eFluor 450	Mouse / IgG1, kappa	eBioscience (Affymetrix), Santa Clara CA, USA
CD5 Monoclonal Antibody (L17F12), APC	Mouse / IgG2a, kappa	eBioscience (Affymetrix), Santa Clara CA, USA
CD8 Monoclonal Antibody (RPA-T8), PE-Cyanine7	Mouse / IgG1, kappa	eBioscience (Affymetrix), Santa Clara CA, USA
CD25 Monoclonal Antibody (BC96), PE	Mouse / IgG1, kappa	eBioscience (Affymetrix), Santa Clara CA, USA
CD38 Monoclonal Antibody (HB7), PE	Mouse / IgG1, kappa	eBioscience (Affymetrix), Santa Clara CA, USA
CD45RO Monoclonal Antibody (UCHL1), APC	Mouse / IgG2a, kappa	eBioscience (Affymetrix), Santa Clara CA, USA
CD45RA Monoclonal Antibody (HI100), PE	Mouse / IgG2b, kappa	eBioscience (Affymetrix), Santa Clara CA, USA
CD69 Monoclonal Antibody (FN50), APC-eFluor 780	Mouse / IgG1, kappa	eBioscience (Affymetrix), Santa Clara CA, USA
CD69 Monoclonal Antibody (FN50), PerCP-eFluor 710	Mouse / IgG1	eBioscience (Affymetrix), Santa Clara CA, USA
FOXP3 Monoclonal Antibody (236A/E7), APC (aus: Anti-Human Foxp3 Staining Set APC)	Mouse / IgG1, kappa	eBioscience (Affymetrix), Santa Clara CA, USA
Mouse IgG1 kappa Isotype Control (P3.6.2.8.1), APC	Mouse / IgG1, kappa	eBioscience (Affymetrix), Santa Clara CA, USA

2 Material und Methoden

2.1 Material

Mouse IgG1 kappa Isotype Control (P3.6.2.8.1), PerCP-eFluor 710	Mouse / IgG1, kappa	eBioscience (Affymetrix), Santa Clara CA, USA
Mouse IgG1 kappa Isotype Control, PerCP	Mouse / IgG1, kappa	BD biosciences, Franklin Lakes NJ, USA
Mouse IgG1 kappa Isotype Control (P3.6.2.8.1), PE	Mouse / IgG1, kappa	eBioscience (Affymetrix), Santa Clara CA, USA
Mouse IgG1 kappa Isotype Control (P3.6.2.8.1), eFluor 450	Mouse / IgG1, kappa	eBioscience (Affymetrix), Santa Clara CA, USA
Mouse IgG1 kappa Isotype Control (P3.6.2.8.1), PE-Cy5	Mouse / IgG1, kappa	eBioscience (Affymetrix), Santa Clara CA, USA
Mouse IgG1 kappa Isotype Control (P3.6.2.8.1), FITC	Mouse / IgG1, kappa	eBioscience (Affymetrix), Santa Clara CA, USA
Mouse IgG2b kappa Isotype Control (eBMG2b), PE	Mouse / IgG2b kappa	eBioscience (Affymetrix), Santa Clara CA, USA
Mouse IgG2a kappa Isotype Control (eBM2a), APC	Mouse / IgG2a kappa	eBioscience (Affymetrix), Santa Clara CA, USA

2.1.6.3 Antigen (für Antikörper-Nachweis)

Recombinant Human ErbB2/HER2 Fc Chimera	R&D systems, Minneapolis MN, USA
---	----------------------------------

2.1.7 Geräte und Zubehör

BD FACS Canto II	BD Biosciences, Franklin Lakes NJ, USA
Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Countess™	Invitrogen™ Life technologies, Carlsbad CA, USA
Centrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Centrifuge 5804R	Eppendorf, Hamburg
CO ₂ Incubator MCO-18AIC	Sanyo, Moriguchi, Japan
Eppendorf Research Plus 2,5; 10; 100; 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Gefrierbehälter Mr. Frosty	ThermoScientific by ThermoFisher Scientific, Waltham MA, USA
Gel Caster	Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA
Geldoku E-Box-VX2-1611	Vilber Lourmat, Collégien, Frankreich
Incubated Shaker MAX Q 4450	ThermoScientific by ThermoFisher Scientific, Waltham MA, USA
Inkubator HERA cell	Heraeus, Hanau
Inkubator HERA cell 150	Heraeus, Hanau
Inkubator Heratherm IGS60	ThermoScientific by ThermoFisher Scientific, Waltham MA, USA
Light Cycler LC480	Roche, Basel, Schweiz
Magnetbank DynaMag-15	Thermo Fisher Scientific

2 Material und Methoden

2.1 Material

Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau
Mikroskop HBO 50	Zeiss, Jena
Mikrowelle	LG Electronics, Seoul, Südkorea
Multifuge 3 S-R	Heraeus, Hanau
Multilabel Counter Victor 1420	Perkin Elmer Wallac, Turku, Finnland
NanoDrop (Photometer)	Peqlab, Erlangen
Pipetboy Acu	IntegraBiosciences, Zizers, Schweiz
Schüttelwasserbad GFL 1083	GFL, Hannover
Spannungsgerät PowerPac 300	Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA
Sterilbank HERA safe HS12	Heraeus, Hanau
Sub-Cell GT Cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA
Sub-Cell GT UV-Transparent Gel Tray	Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
UV Solo TS	Biometra, Göttingen
Vacunsafe comfort	Integra Biosciences, Zizers, Schweiz
Waage Kern	Carl Roth, Karlsruhe
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg

2.1.8 Kits

Anti-Human Foxp3 Staining Set APC	eBioscience (Affymetrix), Santa Clara CA, USA
DELFI Cell cytotoxicity kit	PerkinElmer, Waltham MA, USA
InFusion HD Cloning Plus 50 Rxns	Clontech Takara, Mountain View CA, USA
Lenti-X™ qRT-PCR Titration Kit	Clontech Takara, Mountain View CA, USA
QIAprep Spin Miniprep Kit 50 Rxns	Qiagen, Venlo, Niederlande
Plasmid MidiPrep mit Vakuum-Pumpe	Promega, Fitchburg WI, USA
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega, Fitchburg WI, USA

2.1.9 Wissenschaftliche Software

FlowJo_v10.6.1	BD, Franklin Lakes NJ, USA
GraphPad Prism 8.2.1	GraphPad Software, San Diego CA, USA
Serial Cloner 2.6	Serial Basics, http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html
SnapGene Viewer 3.1.2/4.3.8	GSL Biotech LLC, Chicago IL, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Klonierung

Das *lentiviral transfer plasmid* pLVX-EF1 α -AcGFP1-N1 diente in den Klonierungsversuchen als „Rückgrat“, das unter anderem alle zur Replikation nötigen Sequenzen sowie eine Antibiotikaresistenz und die Sequenzen für das Virusgenom besaß. In den Vektor wurde die CAR-Sequenz eingefügt und später der Promotor ausgetauscht.

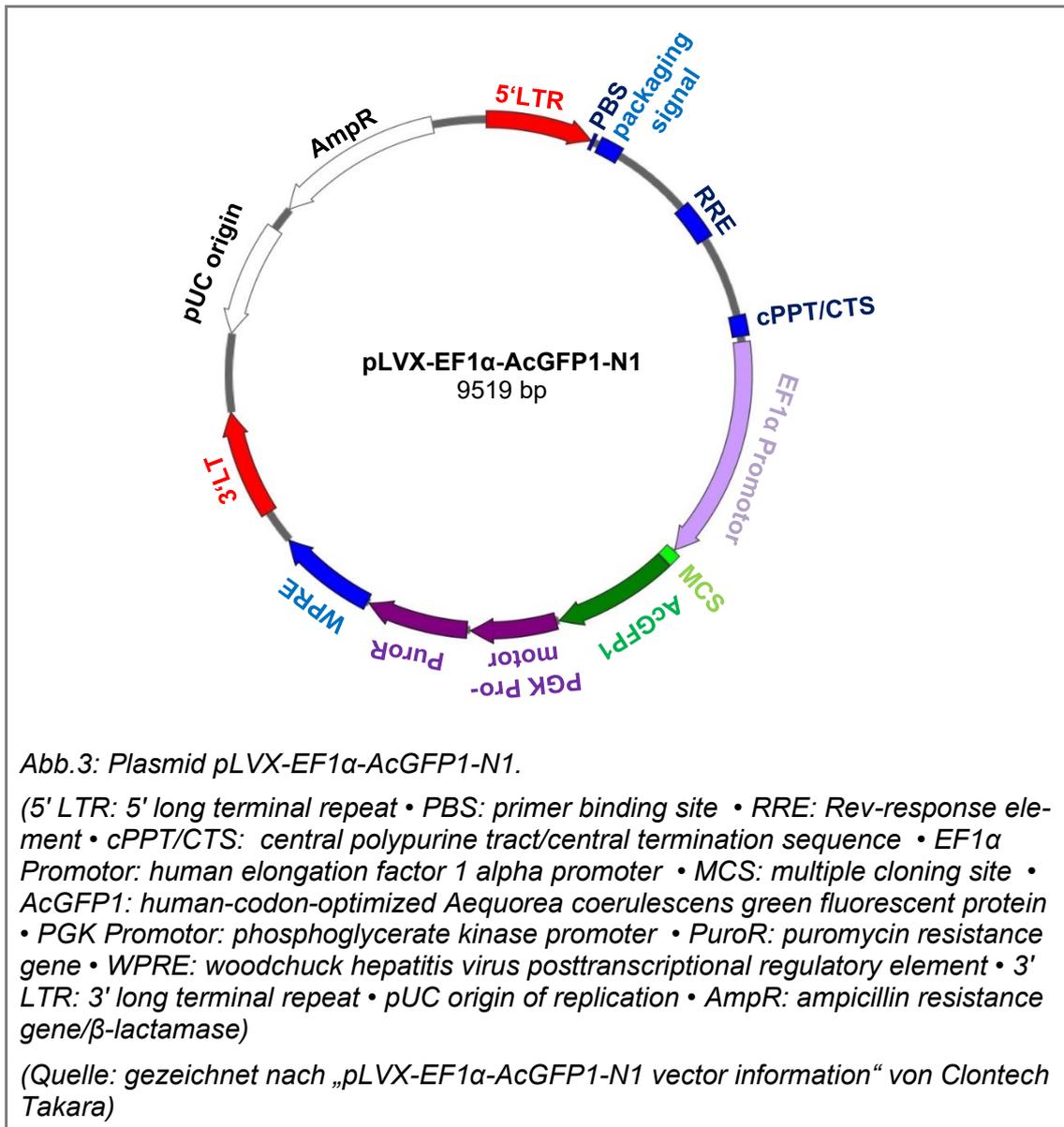
Alle Ansätze für einen Restriktionsverdau umfassten ein Gesamtvolumen von 50 μ l und fanden bis auf wenige – im Verlauf angegebene – Ausnahmen in CutSmart-Puffer statt. Die Menge der Restriktionsendonukleasen betrug entweder 10 units oder 20 units, da je 1 μ l Restriktionsenzym zugegeben wurde; die DNA-Menge betrug 1-2 μ g. Die Temperatur wurde den Herstellerangaben entsprechend gewählt und die Zeit der DNA-Menge angepasst. Die Plasmide wurden durch die Enzyme an spezifischen Sequenzen geschnitten.

2.2.1.1 Herstellung des „Rückgrats“

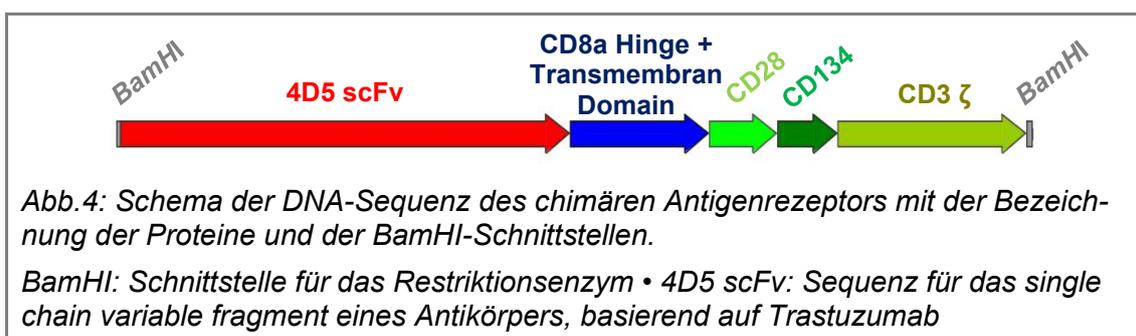
Um eine Interaktion der verschiedenen Proteine in der Zielzelle zu verhindern, wurde sowohl das Gen für die Puromycin-Resistenz als auch das AcGFP1-Gen aus pLVX-EF1 α -AcGFP1-N1 (*Abb.3*) entfernt. Dies geschah mit den Restriktionsenzymen BstBI und Tth111I.

Im Verlauf wurde das Puromycin-Resistenz-Gen sowie der zugehörige PGK-Promotor im Vektor belassen, um die CAR-exprimierenden Zellen anreichern zu können, und nur das AcGFP1-Gen entfernt. Hierfür wurde statt Tth111I das Enzym NotI eingesetzt.

Die Nukleinsäure-Sequenz für den chimären Antigenrezeptor (*Abb.5*) wurde durch Eurofins Genomics synthetisiert und in einen pEX-K4-Vektor mit Kanamycin-Resistenzgen eingebaut. Bezüglich des Aufbaus handelt es sich um einen gegen HER2/neu (*human epidermal growth factor receptor 2*) gerichteten CAR der zweiten Generation (*Abb.4*). Die extrazelluläre Domäne ist im Wesentlichen identisch mit der auf Trastuzumab basierenden Sequenz von



R. Morgan²⁰⁰, ebenso wie die Transmembrandomäne. Bei der intrazellulären Domäne allerdings wurde CD137 durch CD134 ersetzt, was dem Aufbau und der Sequenz von M. Pule²⁰¹ entspricht.



```
GGATCCATGGATTTTCAGGTGCAGATCTTCTCCTTTCTGCTGATATCCGCTAGCGTCA
TTATGTCCCGTGGCGACATCCAGATGACACAGTCCCAAGTAGCCTCAGTGCCTCAG
TTGGTGACCGAGTGACCATCACTTGCAGGGCCTCCAGGACGTGAACACAGCCGTA
GCCTGGTATCAGCAGAAACCCGGCAAAGCTCCTAAACTCCTGATCTACAGTGCGTCA
TTTCTGTATTCCGGGGTGCCTTCAAGATTCTCCGGATCAAGAAGTGGTACCGACTTCA
CCCTGACCATCTCCAGCCTTCAGCCCAGGATTTGCCACCTATTAAGTCCAGCAAC
ACTATACGACGCCTCCAACTTTTGGGCAGGGGACAAAGGTGGAGATTAAGCGCACTG
GCTCTACGAGTGGTAGCGGGAAACCGGGCTCTGGCGAGGGATCTGAGGTACAACTG
GTGGAGAGTGGTGGAGGGCTTGTGCAGCCAGGAGGTAGTCTGCGCCTGTCTTGTGC
AGCATCAGGATTCAACATTAAGGACACTTACATTCACTGGGTTCCGGCAGGCCCTGG
GAAAGGCTTGAATGGGTGGCTCGCATTTATCCTACGAATGGATACACACGGTACGC
CGATTCTGTCAAGGGGAGGTTACCATCTCAGTGATACCTCCAAGAATACCCGCTAT
CTGCAGATGAACTCCCTGCGCGCAGAAGATACCGCTGTCTACTACTGTTCCCGGTGG
GGCGGTGACGGTTCTACGCGATGGATGTTTGGGGCCAAGGCACACTGGTCACTGT
GAGCTCTGCAGCAGCCTTTGTGCCTGTATTTCTCCCGCTAAACCCACTACTACACC
GCTCCAGGCCACCAACCCAGCACCCACCATTGCAAGCCAGCCTCTGTCTCTCAGA
CCAGAAGCTTGTAGACCCGCGAGCCGGAGGAGCGTTACACAAGAGGCCCTCGACTT
TGCCTGCGACATCTACATCTGGGCACCCTGGCGGGGACTTGTGGGGTCTTCTGCT
GTCTCTTGTGATAACCCTGTATTGCAACCACCGAAATCGGAGCAAGCGGTACAGATT
GCTGCATAGCGACTACATGAACATGACACCTCGCAGGCCTGGCCCCACACGGAAGC
ACTACCAGCCCTATGCACCACCGCGCGATTTGCGCGCTTATCGCAGCCGTGATCAAC
GTTTGCCGCCGACGCCATAAGCCTCCAGGAGGAGGATCTTTTCGTACCCCGATAC
AGGAAGAACAGGCCGATGCCACAGCACCCCTCGCTAAAATCAGGGTGAAATTCAGCA
GAAGCGCAGATGCGCCCGCTTACCAACAGGGACAGAATCAGCTGTACAACGAGCTC
AATCTGGGTCCGAGAGAGGAGTACGATGTCTTGGACAAACGAAGGGGCAGAGATCC
CGAAATGGGCGGTAAGCCAAGAAGGAAGAACCCTCAAGAAGGCCTCTACAATGAGCT
TCAGAAGGACAAGATGGCCGAGGCCTATAGCGAGATTGGGATGAAAGGCCGAACGGA
GGCGAGGGAAGGGACATGATGGCCTGTATCAAGGCCTGAGCACTGCCACAAAGGAC
ACATATGACGCCCTGCATATGCAAGCTTTGCCTCCAGGTGAGGATCC
```

Abb.5: Nukleinsäure-Sequenz des chimären Antigenrezeptors.

Die DNA-Sequenz hat eine Länge von 1638 Basenpaaren (bp).

Die für BamHI spezifische Gensequenz an beiden Enden ermöglichte die Isolierung aus dem Vektor mithilfe des Restriktionsenzym.

2.2.1.2 Austausch der Promotoren

Die Sequenz des EF1 α -Promotors wurde später durch die des SFFV-Promotors (Promotor des *spleen focus-forming virus*) ersetzt. Aus dem Plasmid *pRRL.PPT.SF.i2GFP* wurde die Promotor-Sequenz mithilfe der Restriktionsenzyme BmtI und BamHI ausgeschnitten. Die EF1 α -Sequenz wurde aus dem fertigen lentiviralen Transferplasmid, welches bereits die Sequenz für den chimären Antigenrezeptor enthielt, mithilfe der Restriktionsenzyme AfeI und ClaI entfernt.

2.2.1.3 Gel-Elektrophorese

Die Auftrennung der DNA erfolgte in 0,8-1,5% Agarose-Gel, dem Midori-Green zugesetzt war. Bei einer Länge des DNA-Stranges von über 1000 Basenpaaren (bp) betrug die Agarose-Konzentration zwischen 0,8% und 1%, bei kürzeren Strängen 1,5%.

Das Polysaccharid Agarose wurde in einfach konzentrierten TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer) gegeben und in der Mikrowelle kurz aufgekocht. Durch Schwenken der erhitzten Flüssigkeit wurde diese nochmals gemischt und auf etwa 60°C abgekühlt, um den DNA-Farbstoff MidoriGreen zugeben zu können. Die Flüssigkeit wurde anschließend in eine Form gegossen. Beim Abkühlen bildeten sich quervernetzende Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Agarose-Molekülen, so dass ein Gel entstand.

Das Gel wurde in eine Elektrophoresekammer gesetzt und die Kammer mit TBE-Puffer aufgefüllt, bis der Flüssigkeitsspiegel über dem Gel lag. DNA liegt im leicht basischen TBE-Puffer deprotoniert – und damit negativ geladen – vor.

In die Taschen des Agarosegels wurde eine DNA-haltige Lösung gegeben und dann für 90 Minuten eine Spannung von 124 Volt angelegt, die die negativ geladenen DNA-Moleküle zum elektrisch positiven Pol der Kammer zog. Die unterschiedliche Wandergeschwindigkeit der DNA-Moleküle durch das Gel war auf die Molekülgröße, also die Anzahl der Basenpaare, zurückzuführen.

Um die Anzahl der Basenpaare semiquantitativ bestimmen zu können, war zum Vergleich eine Standard-DNA-Leiter mit DNA-Molekülen bekannter Länge nötig.

2.2.1.4 Gelextraktion

Der Fluoreszenzfarbstoff Midori-Green bindet an DNA. Wird der Farbstoff durch ultraviolettes Licht angeregt, absorbiert er die Photonen und Elektronen des Moleküls werden auf ein höheres Energieniveau gebracht. Beim Zurückfallen auf das ursprüngliche Orbital, also auf das ursprüngliche Energieniveau, entsteht eine Lichtemission im sichtbaren Bereich; die durch Elektrophorese entstandenen DNA-Banden auf dem Gel leuchteten grün auf.

Die Bande mit der erwarteten Basenpaarlänge wurde identifiziert und das entsprechende Gelstück aus dem Gel herausgeschnitten.

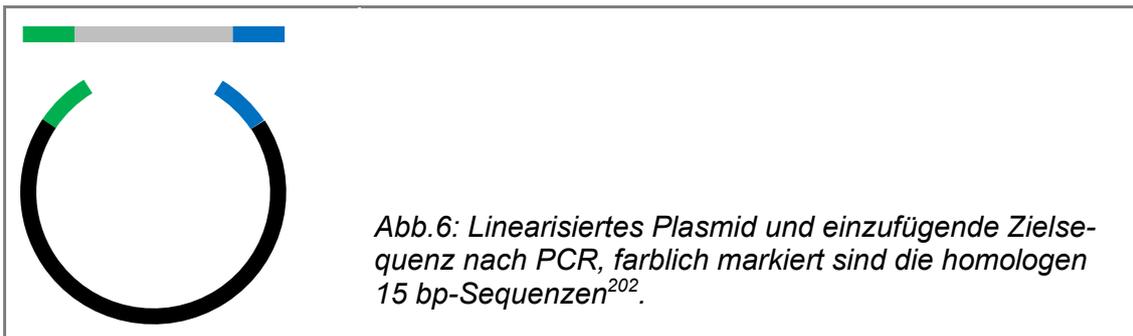
Die Isolierung der DNA aus dem Agarose-Gel erfolgte mit dem Wizard-Kit nach Herstellerangaben. Das Gelstück wurde gewogen und je Milligramm Gel wurde 1 µl *Membrane Binding Solution* zugegeben, welche chaotrope Salze enthielt. Im auf 60°C erwärmten Thermomixer wurde das Reaktionsgefäß so lange bei 300rpm (*revolutions per minute*) geschüttelt (bei Gelstücken über 5 Kilobasenpaare (kb) einfach nur erwärmt und gelegentlich vorsichtig invertiert), bis das Gel gelöst war. Anschließend wurde die Flüssigkeit auf die Säule gegeben und eine Minute bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, um die Bindung der DNA an die Silica-Membran zu ermöglichen. Die chaotropen Salze in *der Membrane Binding Solution* unterstützen sowohl die Auflösung der Agarose als auch die Bindung der negativ geladenen DNA an die Silica-Membran in Anwesenheit von hohen Konzentrationen chaotroper Salze. Nach Zentrifugation bei 13.000 rpm in der Mikrozentrifuge wurde der Durchfluss verworfen. Zur Entfernung von Gelresten und Proteinen wurden zwei Waschschriffe mit *Wash Buffer* angeschlossen und eine weitere Zentrifugation ermöglichte die weitere Verdunstung der Ethanolreste aus der Membran. Die Extraktion der DNA aus der Silica-Säule erfolgte mit Wasser. Mithilfe des NanoDrop-Photometers wurde die Konzentration der DNA anschließend bestimmt.

2.2.1.5 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Zielsequenz wurde durch eine Polymerase-Ketten-Reaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) vervielfältigt und gleichzeitig an den Enden verlängert, so dass an jedem Ende je 15 Basenpaare mit den Enden des linearisierten Plasmids identisch waren.

Um dies zu ermöglichen, wurden die Primersequenzen entsprechend gewählt. Die zum Vektor homologen 15 Basenpaare mussten sich am 5'-Ende der Primer befinden, die zur einzufügenden Zielsequenz spezifischen Basenpaare befinden sich am 3'-Ende (*Abb.6*).

2 Material und Methoden
2.2 Methoden



Dieses 3'-Ende sollte 18-25 bp Länge und einen GC-Anteil von 40-60% haben; die Schmelztemperatur des 3'-Endes sollte zwischen 58-65°C liegen mit maximal 4°C Unterschied zwischen den beiden Primern eines Primerpaares.

Idealerweise sollten nur zwei der fünf Nukleotide am 3'-Ende Guanin oder Cytosin sein.

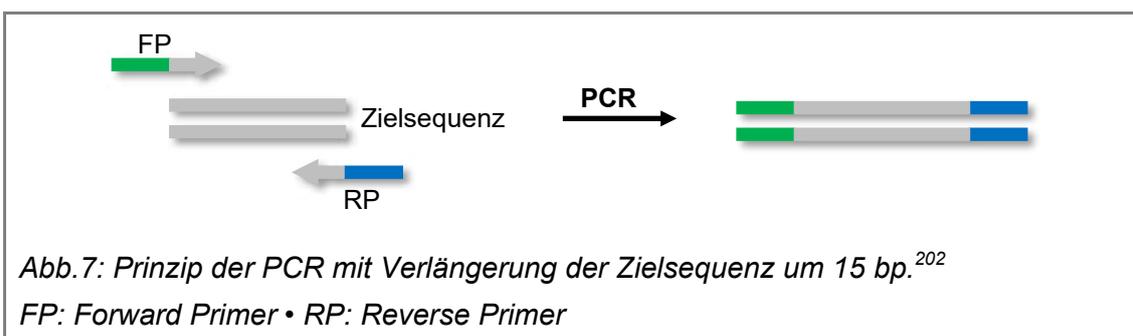


Abb.7: Prinzip der PCR mit Verlängerung der Zielsequenz um 15 bp.²⁰²

FP: Forward Primer • RP: Reverse Primer

Mit diesen Primern erfolgte eine PCR der einzufügenden Zielsequenz (Abb.7). Um zu testen, ob die PCR optimiert werden kann, wurde ein Ansatz mit 1 mM Magnesium (Mg^{2+}) zur Unterstützung der Polymerase²⁰³ und ein weiterer mit 4% Dimethylsulfoxid (DMSO) zur Verbesserung der Denaturierung²⁰⁴ und damit der Senkung der Annealing-Temperatur²⁰⁵ verwendet.

Nach Herstellerangaben wurde hierbei folgendes Pipettierschema verwendet:

Reagenz	Negativkontrolle	Ansatz 1	Ansatz 2 und 3
Clone Amp Premix	12,5 µl	12,5 µl	12,5 µl
Forward Primer	8,0 pmol	8,0 pmol	8,0 pmol
Reverse Primer	8,0 pmol	8,0 pmol	8,0 pmol
DNA-Template	–	56-80 ng	56-80 ng
DMSO oder $MgCl_2$	–	–	1,0 µl
Wasser	auf 25,0 µl	auf 25,0 µl	auf 25,0 µl

Die Denaturierungsphase betrug 98°C für 10 Sekunden. Die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen der DNA, die für die Doppelstrangstruktur verantwortlich sind, wurden durch die hohe Temperatur gelöst und es lagen somit zwei Einzelstränge vor.

In der anschließenden Annealing- oder Hybridisierungsphase lagerten sich die Primer an die DNA-Einzelstränge an. Die Temperatur wurde entsprechend der Primer gewählt und lag bei etwa 5°C unter deren Schmelztemperatur, also abhängig vom Primerpaar zwischen 55°C und 61°C für jeweils 15 Sekunden.

Bei diesen Temperaturen begann die DNA-Polymerase bereits mit der Verlängerung an den 3'-Enden der Primer, so dass die Schmelztemperatur der verlängerten DNA-Stücke bei über 72°C lag.

In der abschließenden Elongationsphase wurde die Temperatur für 60 Sekunden auf 72°C erhöht, was der Optimaltemperatur der DNA-Polymerase entspricht. Der übrige Strang wurde synthetisiert.

Um das Ergebnis zu überprüfen, wurde die synthetisierte DNA mittels Elektrophorese aufgetrennt. War eine Bande der entsprechenden Molekülgröße sichtbar, konnte davon ausgegangen werden, dass die PCR die gewünschte Sequenz vervielfältigt hatte.

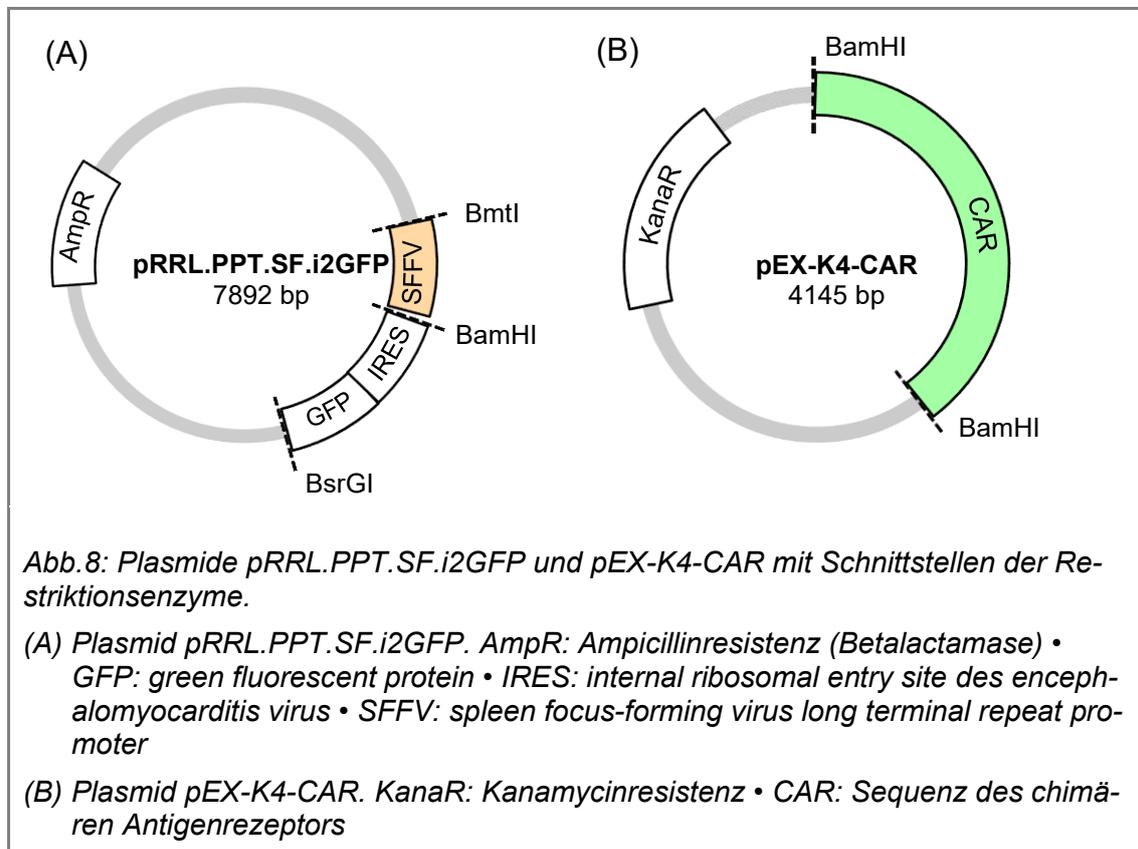
2.2.1.6 InFusion

Die Ligierung von zwei DNA-Molekülen erfolgte mithilfe der InFusion-Methode. Die genaue Zusammensetzung des Enzymmixes ist vom Hersteller nicht angegeben.

100 ng DNA des linearisierten Vektors und 100 ng des aufgereinigten PCR-Fragments mit der Rezeptor-Sequenz wurden mit dem *In-Fusion Enzyme Mix* für 15 Minuten bei 50°C inkubiert und anschließend auf Eis zwischengelagert, bevor die Transformation des entstandenen Plasmides in kompetente Bakterien stattfand.

2.2.1.7 Klassische Klonierung mit DNA-Ligase

Alternativ zur InFusion-Methode wurde zuerst eine klassische Klonierung versucht.



Dabei wurde je ein Restriktionsverdau mit *BamHI* für das *pRRL.PPT.SF.i2GFP*-Plasmid und das *pEX-K4-CAR*-Plasmid angesetzt. Die Ansätze wurden wie oben beschrieben auf einem Agarosegel aufgetrennt und daraus rückisoliert. Um die Religation des *pRRL.PPT.SF.i2GFP*-Plasmides zu verhindern, wurde der linearisierte Vektor noch mit einer alkalischen Phosphatase nach Herstellerangaben in entsprechendem Puffer behandelt. Die Ligation erfolgte mit *T4 DNA Ligase* ebenfalls nach Herstellerangaben in mitgeliefertem Puffer bei Raumtemperatur für 30 Minuten; eingesetzt wurden dabei 100 ng des Vektorrückgrates, das molare Verhältnis des Inserts zum Backbone betrug 3:1. Nach Hitzeinaktivierung der Ligase bei 65°C erfolgte die Transformation des Plasmides.

2.2.2 Bakterien und Plasmide

2.2.2.1 Transformation

Das Einbringen der Plasmide in die Bakterien erfolgte nach Herstellerangaben.

Die *Escherichia coli*-Bakterien waren vom Hersteller so behandelt worden, dass sie freie DNA aufnehmen konnten. Diese kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und dann vorsichtig gemischt. Zu 50 µl der Bakterien wurde je 1 µl DNA zugegeben (also mindestens 5 ng DNA) und die Mischung für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach dem Hitzeschock bei 42°C für 60 Sekunden und der anschließenden Inkubation auf Eis für weitere 1-2 Minuten wurden 500 µl auf 37°C erwärmtes Medium zugegeben. Diese Bakteriensuspension wurde bei 37°C für 60 Minuten inkubiert und dann auf einer LB-Platte ausgestrichen; das in den Platten enthaltene Antibiotikum entsprach der Antibiotikaresistenz des zu erwartenden Plasmides.

2.2.2.2 Vermehrung der Bakterien

Die Kulturplatten wurden im Brutschrank bei 37°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurden stichprobenartig einzelne Kolonien auf je eine neue Platte überimpft und nochmals über Nacht inkubiert. Hiervon wurden wiederum Einzelkolonien überimpft und die Öse diesmal anschließend in Flüssigmedium mit entsprechendem antibiotischem Zusatz ausgewaschen.

Die Kulturplatten wurden erneut im Brutschrank, die Flüssigkulturen in einen Wärmeschüttler über Nacht bei 37°C inkubiert. Die bewachsenen Kulturplatten konnten im Kühlschrank bis zu drei Wochen gelagert werden.

2.2.2.3 Plasmidisolierung

Die Isolierung der Plasmide aus dem Flüssigmedium erfolgte nach Herstellerangaben. Kleinere Mengen Flüssigkultur von 35 ml wurden mit dem Qiagen Miniprep System ohne Vakuumsystem verarbeitet, größere Mengen von 250 ml mit dem Promega Midiprep mit Vakuumsystem.

Zuerst wurden die Bakterien nach Zentrifugation durch eine alkalische Lösung lysiert („alkalische Lyse“); durch den basischen pH-Wert werden außerdem die

Wasserstoffbrückenbindungen der DNA-Doppelhelix gelöst. Nach Neutralisation mit einer essigsäurehaltigen Lösung konnte die Plasmid-DNA aufgrund ihrer Struktur, bei der die Doppelhelix in sich gedreht ist und die Einzelstränge somit nicht auseinander diffundieren können, renaturieren. Bei DNA-Einzelsträngen ist dies nicht möglich, sie befanden sich nach einem Zentrifugationsschritt (bei Pro-mega Midiprep abweichend vom Hersteller-Protokoll: 4500 x g, 30 min, RT) mit den anderen Zellbestandteilen im Pellet; die Plasmid-DNA verblieb im Überstand.

Dieser Überstand durchlief aufgrund eines erzeugten Vakuums oder einer Zentrifugalkraft die Siliciumdioxid-haltige Membran der Säule; diese band DNA in Anwesenheit von hohen Konzentrationen chaotroper Salze.

In mehreren Waschschritten mit salz- und ethanolhaltiger Waschlösung wurden die übrigen Moleküle, wie Proteine oder RNA, entfernt. Die Elution der DNA aus der Säule erfolgte dann mit Wasser.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch photometrische Messung mittels NanoDrop.

2.2.2.4 Analytische Spaltung durch Restriktionsenzyme

Um herauszufinden, ob das durch einen Klonierungsversuch erhaltene Plasmid tatsächlich die gewünschte Sequenz enthielt, wurde ein Restriktionsverdau angesetzt, bei dem mindestens ein Enzym eine spezifische Schnittstelle innerhalb dieser Sequenz besaß und sich diese Sequenz im restlichen Plasmid im besten Fall nicht wiederholte.

Entsprachen die anschließend durch Gelelektrophorese aufgetrennten DNA-Fragmente der erwarteten Länge (*Tabelle 1*), war mit hoher Wahrscheinlichkeit die gewünschte Sequenz enthalten und die Klonierung somit erfolgreich.

Um das Risiko zu vermindern, dass eine Einzelkolonie doch mehrere Klone enthielt, wurde die Kontrolle wiederholt, also nochmals eine Einzelkolonie sowohl auf Platte als auch auf Flüssigmedium überimpft, die Plasmide isoliert und mithilfe von Restriktionsenzymen und Gel-Elektrophorese analysiert.

2 Material und Methoden

2.2 Methoden

Plasmid	Restriktionsenzyme	Anzahl der Banden	Länge der DNA-Fragmente
<i>pRRL.PPT.SF.CAR.i2GFP</i>	BsrGI	2	1584 bp + 7940 bp
<i>pLVX-EF1α-AcGFP1-N1</i>	BsrGI	2	258 bp + 9261 bp
	PfI	2	559 bp + 8960 bp
	BsrGI RsrII	3	258 bp + 673 bp + 8588 bp
<i>pLVX-EF1α-CAR</i>	BsrGI	1	9235 bp
	PfI	2	1547 bp + 7688 bp
	BsrGI XmaI	1	9235 bp
<i>pLVX-SFFV-CAR</i>	BsrGI XmaI	2	1660 bp + 6644 bp
<i>pLVX-EF1α-CAR-PuroR</i>	BsrGI RsrII	2	943 bp + 9439 bp
	BsrGI XmaI	1	10382 bp
<i>pLVX-SFFV-CAR-PuroR</i>	BsrGI XmaI	2	1660 bp + 7791 bp

Tabelle 1: Plasmide und Restriktionsenzyme für analytische Spaltung.

2.2.3 Virusproduktion

2.2.3.1 Zellkultur der Tumorzelllinien

Bei allen drei verwendeten Tumorzelllinien handelte es sich um adhärenente Zellen. HEK293T und MCF7 wurden im Zellkulturmedium DMEM-Medium (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) gezogen, BT474 dagegen in RPMI-Medium (*Roswell Park Memorial Institute Medium*). Falls nicht anders angegeben, waren die Medien vor Verwendung auf 37°C im Wasserbad erwärmt worden.

Sobald unter dem Mikroskop ein dichter Zellrasen erkennbar war, wurde das Medium entfernt; dies war nach 2-4 Tagen der Fall. Die adhärenenten Zellen blieben bei diesem Vorgang an der Wand der Kulturflasche kleben. Um die Reste des Zellkulturmediums zu entfernen, wurden 10 ml PBS (*phosphate buffered saline*) an der den Zellen gegenüberliegenden Seite herunterlaufen lassen, die Kulturflasche dann gedreht, so dass der Puffer die Zellen bedeckte, und die Flasche vorsichtig geschwenkt. Anschließend wurde der Puffer abgesaugt/verworfen. Zum Lösen der adhärenenten Zellen wurden 5 ml Trypsin/EDTA auf die Zellen gegeben und die Flasche geschwenkt, bis sich der makroskopisch farblos-trübe Zellrasen von der Wand der Gewebekulturflasche löste und das Plastik wieder

klar wurde. Als Endopeptidase spaltete Trypsin substratspezifisch Proteine, die für die Adhärenz der Zellen – auch untereinander – verantwortlich sind; EDTA (Ethylendiamintetraacetat) band die Membran-stabilisierenden Kalzium-Kationen in einen Komplex, was ebenfalls die Bildung von Zellausläufern verminderte.²⁰⁶ Die sofort zugegebenen 10 ml DMEM-Kulturmedium neutralisierten die toxische Wirkung von Trypsin.

Nach Zentrifugation (300 x g, 5 min) wurde der Überstand verworfen und die Zellen in frischem Zellkulturmedium aufgenommen. Diese Suspension wurde auf 3-4 Zellkulturflaschen aufgeteilt und mit Medium auf 17-20 ml pro Flasche aufgefüllt. Die Inkubation im Brutschrank erfolgte für 2-4 Tage, bei BT474 für 5-7 Tage, abhängig vom Ergebnis der mikroskopischen Kontrolle.

Das Einfrieren erfolgte in auf 4°C gekühltem fetalen Kälberserum (FCS) mit Zusatz von 10% DMSO zur Verhinderung der Eiskristallbildung²⁰⁷; die Zellen wurden anschließend mithilfe eines mit Isopropanol gefüllten Gefriercontainers um 1°C pro Minute auf -80°C abgekühlt.

Die gefrorenen Zellen wurden aufgetaut und in 37°C erwärmtes Medium gegeben, anschließend abzentrifugiert und das Medium mit dem darin enthaltenen DMSO wurde verworfen. Das Zellpellet konnte dann in Kulturmedium aufgenommen werden. Die Zelllinien sollten mindestens eine Woche vor den Versuchen in Kultur genommen werden.

2.2.3.2 Zellzählung

Um neben der Konzentration der Zellen in einer Suspension auch die Zellviabilität festzustellen, wurden 10 µl der Zellsuspension mit dem identischen Volumen Trypanblau gefärbt, welches aufgrund der defekten Zellmembran in abgestorbene Zellen diffundieren kann²⁰⁸. Die Hälfte dieser Mischung wurde in eine Zählkammer gefüllt; die Zellzählung erfolgte automatisiert mit dem Zählgerät Countess™.

2.2.3.3 Herstellung der Viruspartikel

Für die Produktion der Lentiviren wurde ein *2nd generation lentiviral system* verwendet; die Gene für das Virus befanden sich also auf drei verschiedenen Plasmiden. Das *envelope plasmid* kodierte für das Glykoprotein des *vesicular stomatitis virus* in der Virushülle, welches die Rezeptorbindung an den LDL-Rezeptor (*low density lipoprotein receptor*), die Clathrin-vermittelte Endozytose²⁰⁹ und die Membranfusion mit der Wirtszelle ermöglicht.^{210,211} Das *packaging plasmid* kodierte für die notwendigsten viralen Proteine und enthält vier Gene, unter anderem für Reverse Transkriptase und Integrase (*pol*) oder Kapsidproteine (*gag*) sowie Sequenzen für regulatorische Proteine *tat* und *rev*.²¹²

Das *expression plasmid* oder *transfer plasmid* trug das Gen für den CAR und regulatorische Sequenzen. Eine wichtige regulatorische Sequenz war das *packaging signal* Ψ , welches eine wichtige Rolle bei der Verpackung des Genoms in das Viruspartikel spielte. Da sich die Enzyme, die das Virus für eine Replikation bräuchte, auf anderen Plasmiden und damit außerhalb des Einflussbereiches von Ψ befanden, waren diese Enzyme nicht Teil des Virusgenoms; das Virus konnte sich also nach Infektion einer Zelle nicht vermehren.

Die Plasmide wurden mittels des TransIT-Reagenzes, das mit der DNA einen Lipopolyplex bildete, in HEK293T-Zellen eingebracht²¹³, welche dann das Virus produzierten.

Die Hek294T-Zellen wurden mindestens eine Woche vor Beginn der Virusproduktion aufgetaut und in Kultur genommen. Anschließend wurden sie wie üblich mit Trypsin/EDTA von der Flaschenwand abgelöst, das Medium abzentrifugiert und verworfen. Anschließend wurde die Konzentration auf mindestens $3,75 \times 10^5$ Zellen/ml bis maximal $6,0 \times 10^5$ Zellen/ml eingestellt und in fünf Gewebekulturschalen je 8 ml dieser Suspension gegeben. Die Inkubation erfolgte für 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂.

Der Zellrasen sollte bei der mikroskopischen Kontrolle mindestens 80% der Kulturschale bedecken. War dies nicht der Fall, wurde die Inkubation verlängert. Bei ausreichendem Wachstum der Zellen wurde das Kulturmedium verworfen, wobei

2 Material und Methoden

2.2 Methoden

die adhärennten Zellen am Plastikboden der Gewebekulturschale kleben blieben. Am Rand der Schale wurden vorsichtig 5 ml DMEM ohne FCS und ohne Antibiotika einlaufen lassen, um die Zellen nicht zu lösen, und die Zellen dann für 60 Minuten in den Brutschrank gestellt.

Das restliche Protokoll musste unter S2-Bedingungen erfolgen.

Die eingefrorenen Plasmide wurden aufgetaut und TransIT und Opti-MEM auf Raumtemperatur gestellt.

Pro Platte wurde folgender Ansatz pipettiert:

Opti-MEM	1,5 ml
Δ R8.91 (packaging plasmid)	6,0 μ g
VSVg (envelope plasmid)	2,0 μ g
transfer plasmid (10 kb)	10,0 μ g
TransIT (vorher gut mischen)	30,0 μ l

Der Ansatz wurde mit der Pipette gemischt und für 22 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde er tröpfchenweise auf die Zellen bzw. das Medium gegeben und die Platte vorsichtig geschwenkt.

Während der sechs Stunden im Brutschrank wurden die Plasmide wie oben beschrieben in die HEK293T-Zellen aufgenommen. Das Medium wurde anschließend durch je 7 ml DMEM-Medium (DMEM + 10% FCS + 1% P/S) pro Platte ersetzt und diese dann wieder in den Brutschrank gestellt. In den folgenden 48 Stunden produzierten die Zellen dann die Viruspartikel.

Der Überstand wurde mit einer 10 ml-Pipette aufgenommen und in ein 50 ml-Reaktionsgefäß überführt. Um die Zellreste zu entfernen, erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 10 Minuten bei 400 x g und der Überstand wurde dann mit einem 4,5 μ m-Filter unter Anlage eines Vakuums filtriert. Um die Viruskonzentration zu erhöhen, wurde der Durchlauf auf eine Vivaspin-Säule gegeben und bei 3000 x g für 45 Minuten zentrifugiert; das dadurch abgetrennte Medium wurde verworfen.

Die Lagerung der Viren erfolgte bei -80°C.

2.2.3.4 Virusquantifizierung mit qRT-PCR

Die Konzentrationsbestimmung der Viruspartikel erfolgte mit einer quantitativen Reverse-Transkriptase-PCR (qRT-PCR) nach Herstellerangaben. Hierzu wurden die Viren zuerst lysiert, die freigesetzte Nukleinsäure mithilfe einer Silica-Säule isoliert und eventuell im Eluat vorhandene DNA-Reste der HEK293T-Zellen mithilfe von DNase entfernt.

Mithilfe des LightCyclers wurden die Proben anschließend analysiert. Das Programm begann zunächst mit der Umschreibung von RNA in DNA mithilfe der Reversen Transkriptase bei einer Temperatur von 42°C für 5 Minuten. Anschließend erfolgte eine quantitative PCR. Diese beruhte auf dem Prinzip²¹⁴, dass ein planarer Farbstoff sich zwischen die von den Basenpaaren gebildeten Ebenen schiebt. Der so gebundene Farbstoff fluoreszierte. Je mehr doppelsträngige DNA synthetisiert wurde, desto mehr Farbstoff interkalierte und desto höher war das Fluoreszenz-Signal, das nach jedem PCR-Zyklus gemessen wurde. Da die DNA zumindest anfangs bei ausreichend vorhandenen Substraten in jedem Zyklus etwa verdoppelt wurde, konnten so Rückschlüsse auf die Anfangskonzentration der DNA gezogen werden.

Als Negativkontrollen wurden Wasser oder Leervirus, also ohne *lentiviral transfer plasmid* hergestellte Viruspartikel, verwendet; die Positivkontrolle war im Kit enthalten.

2.2.4 Zellkultur der T-Lymphozyten

2.2.4.1 Gewinnung von mononukleären Zellen

Die Gewinnung der humanen mononukleären Zellen (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*, PBMC) von Blutspendern erfolgte aus den bei der Aufbereitung von Erythrozytenkonzentrat anfallenden Buffy Coats.

Das Blut wurde hierzu in eine Zellkulturflasche gefüllt und mit PBS-Puffer auf 125 ml gebracht. In vier 50ml Falconröhrchen wurden je 15 ml LSM1077 gegeben und anschließend je 30 ml des verdünnten Blutes vorsichtig über dieses Medium geschichtet. Der erste Zentrifugationsschritt erfolgte für 20 Minuten bei

400 x g und ausgeschalteter Bremse. Eine Pipette wurde in die trübe Phase mit den PBMC getaucht und diese vorsichtig aufgesogen sowie in einem frischen Reaktionsgefäß gesammelt. In drei Waschschrritten mit PBS-Puffer in abnehmender Zentrifugationsumdrehung bei 350 x g, 300 x g und 250 x g für je 5 Minuten wurden die LSM1077-Reste entfernt.

Das Zellsediment wurde anschließend direkt weiterverarbeitet und aktiviert oder in Einfriermedium resuspendiert und anschließend eingefroren (24 Stunden bei -80°C, anschließende Lagerung bei -150°C).

Das Auftauen erfolgte so schnell wie möglich, indem die gefrorene Zellsuspension mit 10 ml 37°C warmen X-Vivo-Medium aufgetaut und anschließend für 5 Minuten bei 300 x g zentrifugiert wurde. Der Überstand mit dem zelltoxischen DMSO wurde verworfen, das Pellet in 20 ml X-Vivo resuspendiert und in einer Kulturflasche 90-120 Minuten in den Brutschrank (37°C, 5% CO₂) gestellt. Aufgrund ihrer Plastikadhärenz blieb ein Teil der dendritischen Zellen beim vorsichtigen Abnehmen der Zellsuspension an der Kulturflasche kleben.

Das Medium mit den darin gelösten Zellen wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und anschließend erfolgte die Zellzählung. Hierzu wurde eine Stichprobe der Zellen 1:2 mit Trypanblau verdünnt, 10 µl in die Zählkammer eines Countess Slides gefüllt und mit dem Countess-Gerät analysiert.

Nach Zentrifugation (300 x g, 5 min, RT) wurde der Überstand verworfen und das Pellet in X-Vivo-Medium aufgenommen; die Zellzahl wurde dabei auf 1x10⁶ Zellen/ml eingestellt.

2.2.4.2 Aktivierung der T-Zellen

Die Aktivierung der T-Zellen erfolgte mit Anti-CD3- und Anti-CD28-Antikörpern, mit denen magnetische Kügelchen beschichtet waren.

Pro 1x10⁶ Zellen wurden 25 µl dieser Dynabeads verwendet. Sie wurden zuerst mit 1000 µl PBS-Puffer gewaschen, in einem Reaktionsgefäß für mindestens eine Minute in die Magnetbank gestellt und der Puffer dann mit einer Pipette

abgesaugt und verworfen, während die Kügelchen durch den Magneten an der Innenseite des Reaktionsgefäßes gehalten wurden.

Dann wurden 1000 µl der Zellsuspension dazugegeben, gemischt mit IL-2, falls nicht anders angegeben in der Endkonzentration 30 U/ml, und in einer Kulturplatte im Brutschrank (37°C; 5% CO₂) inkubiert.

2.2.4.3 Infektion der T-Zellen

Um die T-Zellen infizieren zu können, wurden die Magnetkügelchen mithilfe der Magnetbank entfernt, da sonst die Zellen während der Zentrifugation von ihnen zerstört werden könnten.

Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt und nach einem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in frischem X-Vivo ohne Zusätze aufgenommen und auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt.

Um die Infektionseffizienz zu erhöhen²¹⁵, wurde pro 1 ml dieser Zellsuspension je 8 µg Polybren zugegeben sowie ein Reaktionsgefäß mit 50 µl Virussuspension. Die Platten wurden mit Parafilm abgedichtet und bei 32°C für 90 Minuten bei 650 x g zentrifugiert.²¹⁶ Anschließend wurde der Ansatz für 24 Stunden in den Brutschrank gestellt.

Dann wurde das Virus in drei Waschschritten mit PBS entfernt (300 x g, 5 min, RT) und das Zellpellet anschließend in X-Vivo-Medium aufgenommen sowie 100 U/ml IL-2 zugegeben.

2.2.4.4 Zellkultur der T-Lymphozyten

Die Zellen wurden – wenn nicht anders angegeben – in X-Vivo-Medium kultiviert. Alle 2-3 Tage erfolgte eine Zellzählung und die Zellen wurden auf 1×10^6 /ml eingestellt, indem neues Medium zugegeben wurde. Außerdem bekamen sie 30 U/ml IL-2.

2.2.4.5 Reaktivierung

In manchen Versuchen wurden die Zellen reaktiviert. Das Vorgehen ist identisch mit der Aktivierung.

2.2.4.6 Selektion mit Puromycin

Bei späteren Versuchen erfolgte eine Selektion mit 2 µg/ml Puromycin ab dem fünften Tag. Nach 48 Stunden wurde der Ansatz zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in neuem X-Vivo-Medium mit IL-2 aufgenommen und für 48 Stunden inkubiert. Die Selektion wurde dann nochmals wiederholt.

2.2.5 Durchflusszytometrie

2.2.5.1 Färbung extrazellulärer Antigene

Die Färbung der T-Zellen erfolgte mithilfe von mit Fluoreszenzfarbstoffen gelabelten Antikörpern. Dazu wurden $1,5 \times 10^6$ Zellen in ein Reaktionsgefäß gegeben, das Medium abzentrifugiert (5 min, 300 x g) und verworfen. Das Pellet wurde anschließend in 150 µl MACS-Puffer – gekühlt auf 4°C – resuspendiert und in drei Ansätze fraktioniert, je ein Ansatz für die ungefärbte Kontrolle, die Isotypkontrolle, um unspezifisch bindende Antikörper zu detektieren, und die eigentliche Probe; in letzterer sollten 5×10^5 Zellen enthalten sein, die Kontrollen durften weniger enthalten. Es wurden 0,5 µl pro Antikörper verwendet. Die Ansätze wurden bei 4°C für 30-60 Minuten lichtgeschützt in den Kühlschrank gestellt und der Überstand anschließend abzentrifugiert (300 x g, 5 min, 4°C) und verworfen. Das Pellet wurde in 100 µl MACS-Puffer resuspendiert, wieder abzentrifugiert, verworfen und der Waschschrift wiederholt. Schließlich wurden die Zellen in 50-100 µl MACS-Puffer aufgenommen und mit dem FACS-Gerät analysiert.

Die verschiedenen Ansätze der verwendeten extrazellulären Färbungen waren folgende:

1. T-Zell-Populationen und Aktivierungsmarker

CD4 – eFluor 450	1,0 µl
CD8 – PECy7	1,0 µl
CD25 – PE	1,0 µl
CD69 – APC	2,0 µl

2. T-Zell-Populationen und CD45 (Naive und Memory-T-Zellen)

CD4 – eFluor 450	1,0 µl
CD8 – PECy7	1,0 µl
CD45RA – PE	1,0 µl
CD45R0 – APC	1,0 µl

3. HER2/neu auf Tumorzellen

HER2 – FITC	1,0 µl
-------------	--------

4. CAR-Rezeptor

Die Färbung des CAR-Rezeptors erfolgte in einem ersten Schritt mit dem chimären ErbB2-Fc-Protein; das Vorgehen war dabei identisch mit einer extrazellulären Färbung mit Antikörpern. Anschließend wurde das Protokoll mit einem Sekundär-Antikörper wiederholt.

Primärer „Antikörper“:	
Recombinant Human ErbB2/HER2 Fc Chimera	1,0 µl
Sekundär-Antikörper:	
Anti-Fc – PE	1,0 µl

2.2.5.2 Färbung des intrazellulären Antigens FoxP3

Zunächst erfolgte die Färbung mit extrazellulären Antikörpern wie oben beschrieben. Anschließend wurden die Zellen in 250 µl *Fixation/Permeabilization Working Solution* resuspendiert und für 30-60 Minuten bei 4°C lichtgeschützt inkubiert. Dann wurden 500 µl *Permeabilization Buffer* zugegeben und die Suspension anschließend zentrifugiert (300 x g, 5 min, 4°C). Nach einem Waschschrift mit 100 µl *Permeabilization Buffer* wurden die Zellen erneut in 50 µl *Permeabilization Buffer* resuspendiert und 0,75 µl des FoxP3-Antikörpers oder der Isotypkontrolle zugegeben. Nach erneuten 30-60 Minuten bei 4°C (lichtgeschützt) erfolgten zwei Waschschriffe mit je 100 µl *Permeabilization Buffer*. Abschließend wurden die Zellen in 50-100 µl MACS aufgenommen und analysiert.

Extrazelluläre Färbung	
CD4 – eFluor 450	1,0 µl
CD8 – PECy7	1,0 µl
CD25 – PE	1,0 µl
CD69 – PerCP	1,0 µl
Intrazelluläre Färbung	
FoxP3 – APC	0,75 µl

2.2.6 Quantifizierung der Tumorlyse

Die Effizienz der Tumorlyse erfolgte mithilfe eines *Europium Release Assays*. Das Vorgehen erfolgte nach Herstellerangaben²¹⁷.

Zuerst erfolgte das Einbringen eines Markers in die Tumorzellen. Dafür wurden die Zellen wie oben beschrieben mit Trypsin-EDTA von der Kulturflasche gelöst und das Medium nach einem Zentrifugationsschritt verworfen; die Zellen wurden anschließend in RPMI-Medium (RPMI + 10% FCS + 1% P/S) auf die Konzentration 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Zu 2 ml dieser Suspension wurden 4 μ l *BATDA Labeling Reagent (Bis(acetoxymethyl)-2,2':6',2''-terpyridine-6,6''-dicarboxylat)* gegeben und diese Mischung dann für 60 min im Brutschrank inkubiert. Das hydrophobe BATDA konnte die Zellmembran passieren und wurde von intrazellulären Esterasen hydrolysiert, wobei TDA (*2,2':6',2''-terpyridine-6,6''-dicarbonsäure*) entstand; da dieses nicht durch die Zellmembran diffundieren konnte, akkumulierte TDA im Zytoplasma.²¹⁸

Anschließend wurden die Zellen fünfmal in 37°C warmen RPMI-Medium gewaschen (Zentrifugation 300 x g, 7 min, RT). Die Zellen wurden dann in RPMI-Medium in der Konzentration 5×10^4 /ml aufgenommen.

Währenddessen wurde die T-Zell-Suspension vorbereitet. Falls vorhanden, wurden dafür zuerst die Dynabeads entfernt. Anschließend wurde nach Zentrifugation (300 x g, 5 min, RT) der Überstand verworfen und das Pellet in RPMI-Medium aufgenommen.

Bei einer *Effector/Target cell ratio* von 1:20 wurden pro well 5×10^3 Tumorzellen und dementsprechend 1×10^5 T-Zellen benötigt; da jede Probe dreifach pipettiert wurde, wurden 3×10^5 T-Zellen in 300 μ l Medium aufgenommen, bei einem Verhältnis von 1:40 wurden 6×10^5 Zellen verwendet.

Dann wurden in eine 96-well Rundbodenplatte je Vertiefung 100 μ l Suspension der TDA-markierten Tumorzellen (*Target*) und 100 μ l T-Zell-Suspension (*Effector*) im entsprechenden Verhältnis zusammengeführt.

2 Material und Methoden

2.2 Methoden

Zudem gab es drei verschiedene Kontrollen:

- Hintergrund-Kontrolle (100 µl RPMI-Medium + 100 µl Überstand der TDA-markierten Tumorzellsuspension), entnommen nach dem letzten Waschschritt, um die Eigenfluoreszenz des Mediums zu ermitteln
- Spontanrelease (100 µl RPMI-Medium + 100 µl der TDA-markierten Tumorzellsuspension) zur Bestimmung der spontanen Lyse der Tumorzellen
- Maximalrelease (100 µl Lysereagenz + 100 µl der TDA-markierten Tumorzellsuspension), um das maximal mögliche Signal bei vollständiger Lyse aller Tumorzellen zu eruieren

Die Platte wurde zunächst bei 100 x g für 2 Minuten zentrifugiert und dann 2-4 Stunden in den Brutschrank gestellt. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 200 x g für 5 Minuten.

Aus dem Überstand wurden 20 µl entnommen und in eine 96well-Platte gegeben. In jede Vertiefung wurden dann 200 µl Europium-Lösung dazugegeben, wobei sich das Europium mit dem freigesetzten TDA zu einem fluoreszierenden Chelatkomplex verband.²¹⁹ Dieser Ansatz wurde zeitnah mit dem VICTOR-Fluorimeter analysiert.

Die Ergebnisse wurden nach folgenden Formeln berechnet:

$$\text{Spezifische Tumorlyse (\%)} = \frac{\text{TDA-Freisetzung in Proben} - \text{Spontanrelease}}{\text{Maximalrelease} - \text{Spontanrelease}} \times 100$$

$$\text{Spontane Tumorlyse (\%)} = \frac{\text{Spontanrelease} - \text{Hintergrund}}{\text{Maximalrelease} - \text{Hintergrund}} \times 100$$

3 Ergebnisse

3.1 Zellproliferation in verschiedenen Kulturmedien und Interleukinen

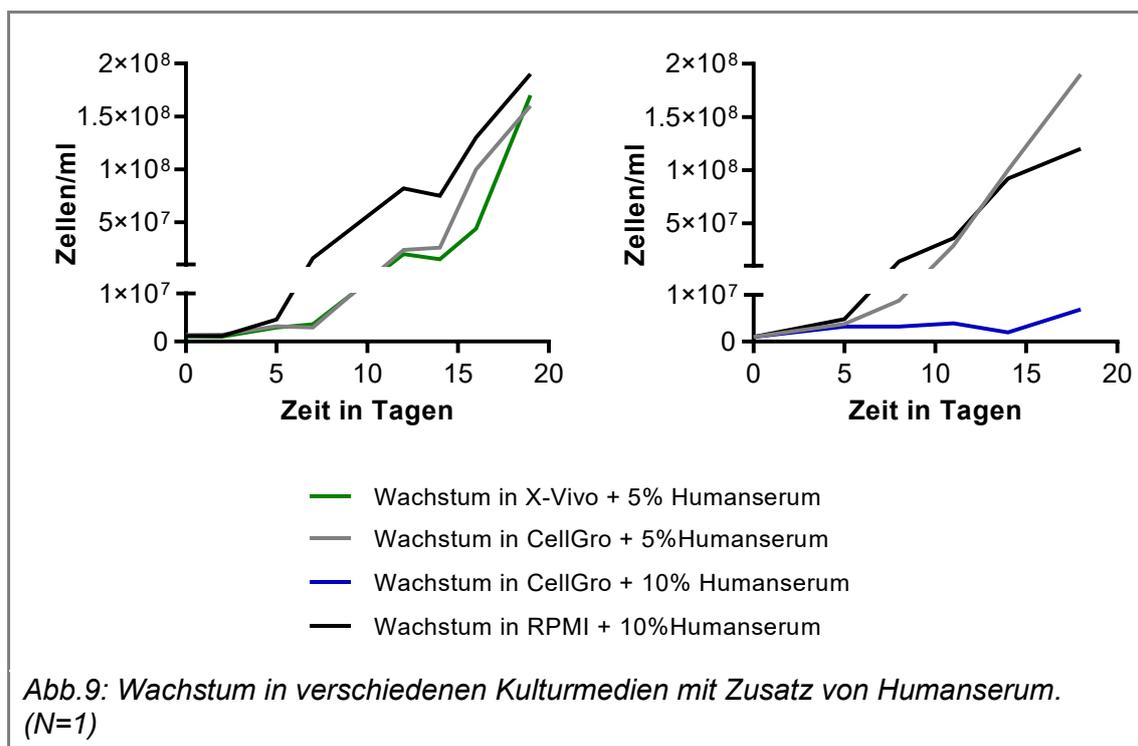
3 Ergebnisse

3.1 Zellproliferation in verschiedenen Kulturmedien und Interleukinen

3.1.1 Wachstum in verschiedenen Kulturmedien

Um das optimale Medium für T-Zellen zu finden, wurden drei verschiedene Kulturmedien getestet. Dazu wurden aktivierte, nicht infizierte Zellen in drei verschiedenen Medien kultiviert.

Der Unterschied zwischen den Wachstumskurven ist sehr gering. Auffällig ist jedoch, dass eine Erhöhung des Humanserumanteils von 5% auf 10% in CellGro-Medium einen negativen Effekt zu haben scheint (Abb.9).

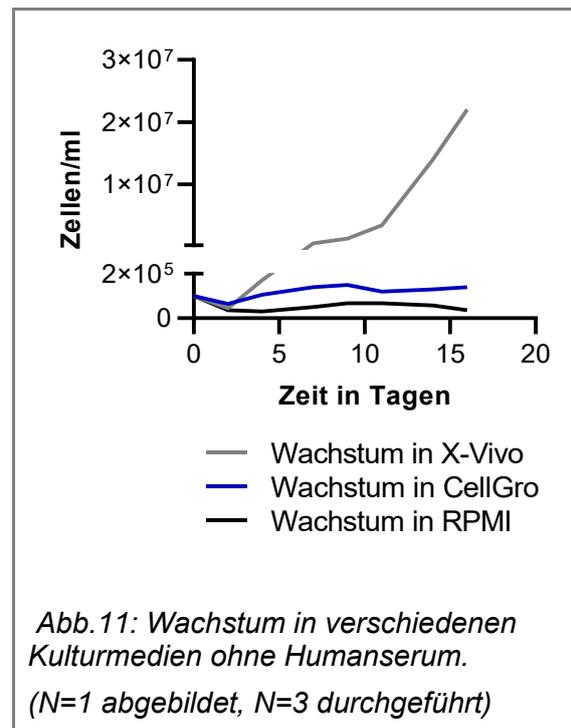
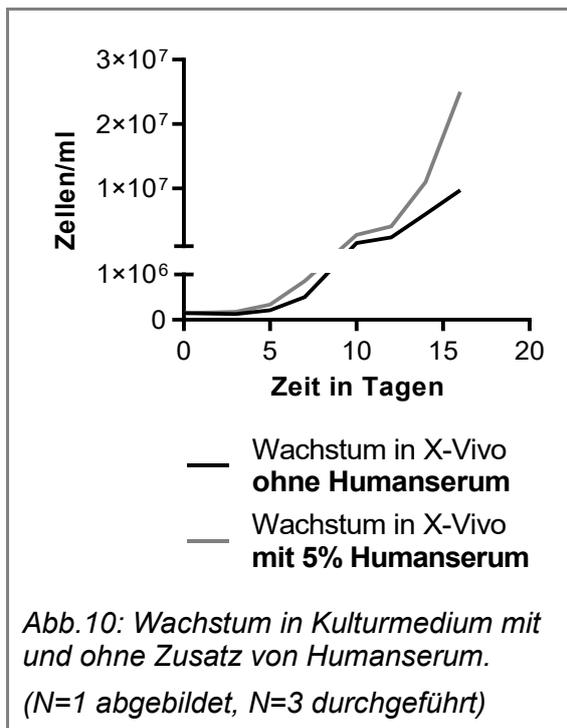


Aufgrund der Diskussion um eine mögliche Prägung der T-Zellen gegen Humanserumbestandteile, wenn Zellen in serumhaltigem Medium aktiviert und kultiviert werden, erfolgte ein Wechsel auf serumfreies Medium (Abb.10), auch wenn in serumhaltigem Medium eine deutlich bessere Zellproliferation zu sehen war (Abb.11).

3 Ergebnisse

3.1 Zellproliferation in verschiedenen Kulturmedien und Interleukinen

Ein Versuch wurde mit Zellen von je drei verschiedenen Spendern durchgeführt. Die Ergebnisse dieser drei Ansätze wurden jedoch nicht gemittelt, da die Werte individuell zu verschieden waren. Die Grundaussage des Ergebnisses wurde jedoch in allen drei Ansätzen gezeigt, weshalb für die beiden Versuche nur ein Graph exemplarisch abgebildet ist.



Fortan wurde das Medium X-Vivo bei den Versuchen verwendet.

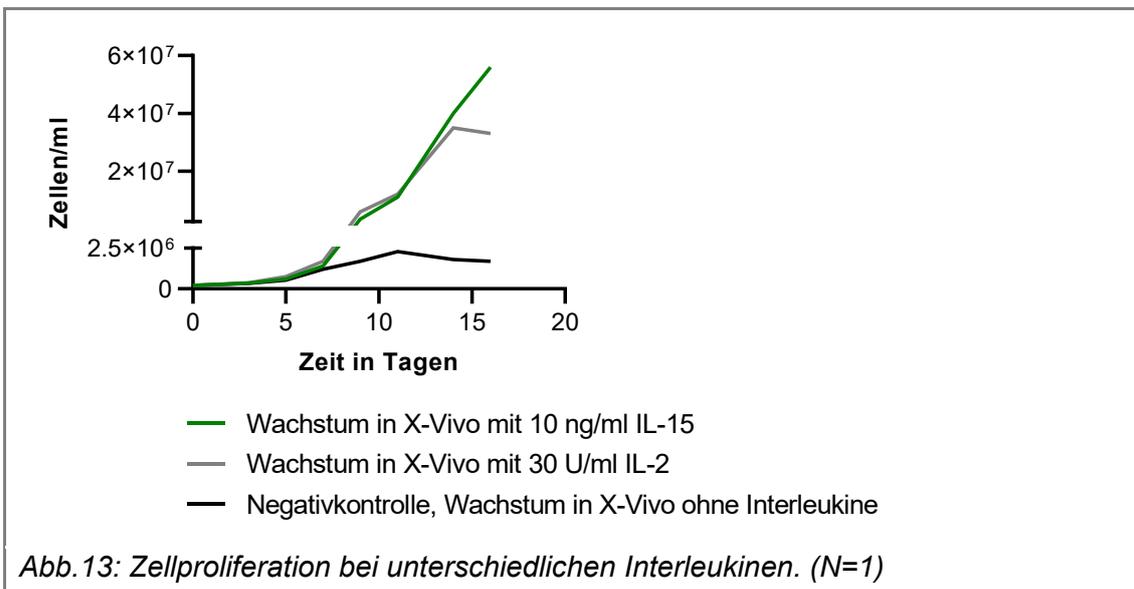
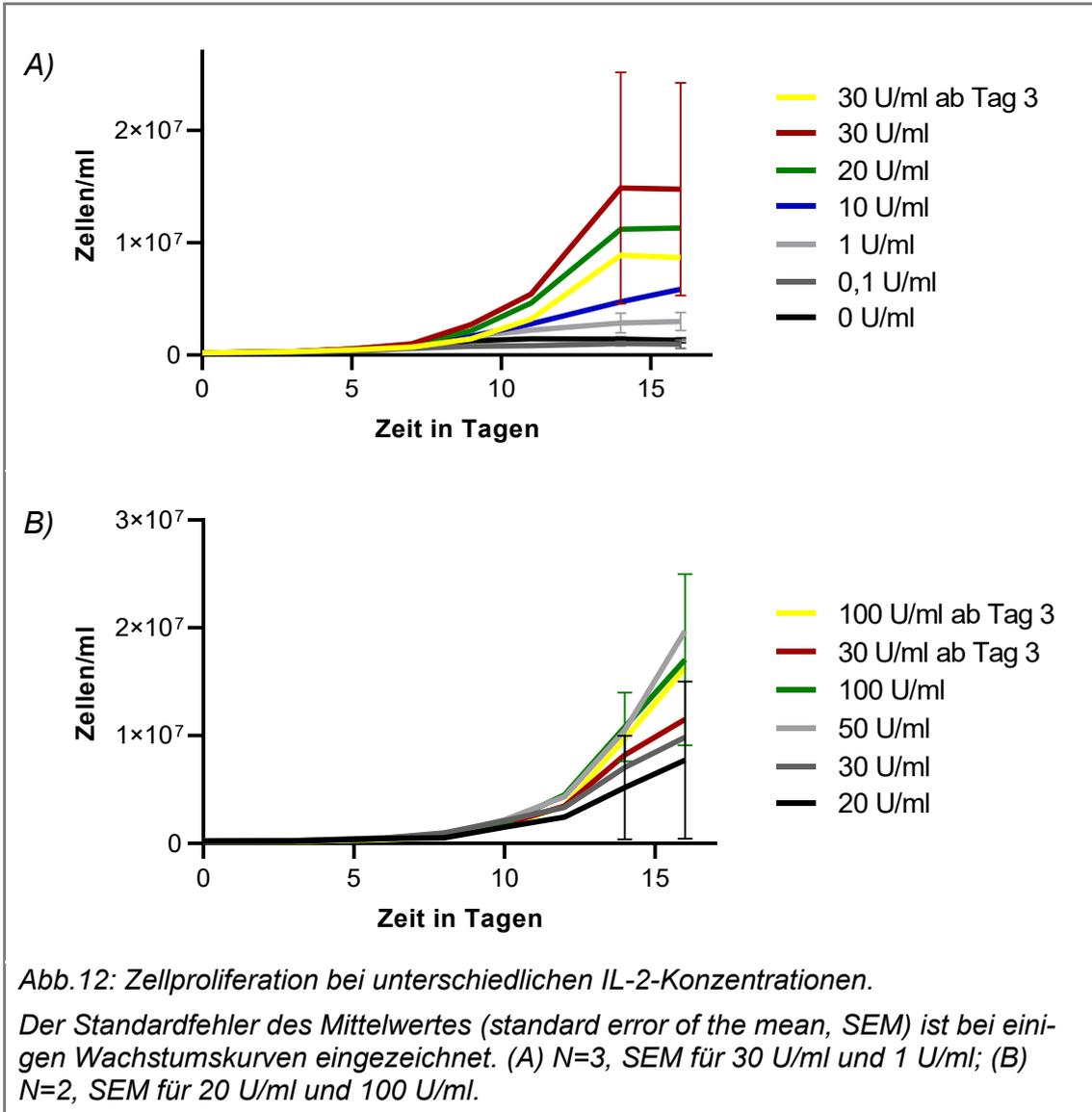
3.1.2 Zellproliferation bei verschiedenen Interleukinkonzentrationen

Um das Zellwachstum bei unterschiedlichen IL-2-Konzentrationen zu vergleichen, wurden Zellen von drei bzw. zwei Spendern verwendet und die Ergebnisse gemittelt. Der Unterschied zwischen Wachstumskurven nebeneinander liegender IL-2-Konzentrationen war bei geringer Spenderanzahl sowie hoher Streubreite zwischen den Werten der einzelnen Spender nicht signifikant (Abb.12).

Die Schlussfolgerung aus diesen Versuchen war, dass 30 U/ml IL-2 ausreichen, um eine ausreichende Zellproliferation zu bewirken. Sollte schnelleres Wachstum erwünscht sein, können bis zu 100 U/ml verwendet werden.

3 Ergebnisse

3.1 Zellproliferation in verschiedenen Kulturmedien und Interleukinen



3 Ergebnisse

3.2 Transduktionseffizienz

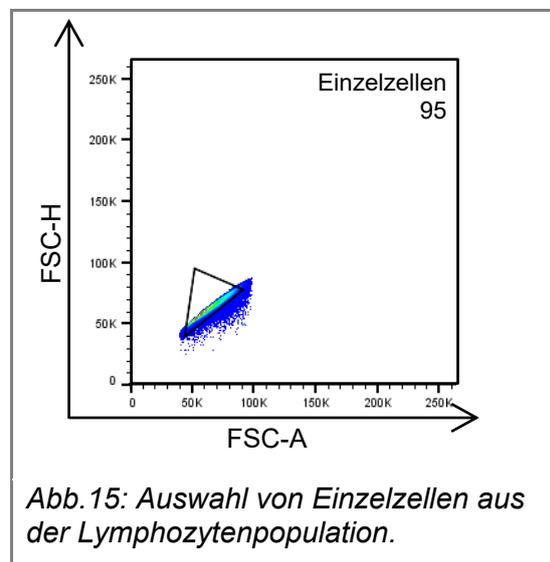
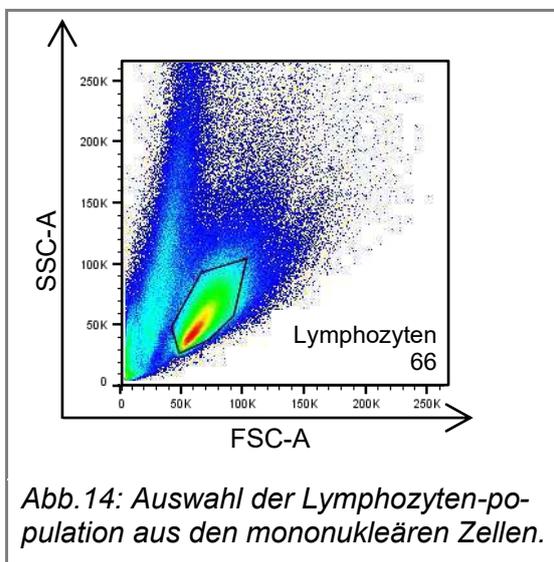
Zusätzlich wurde ein Versuch mit Zellen von nur einem Spender angesetzt, bei dem das Zellwachstum bei IL-2 und Interleukin-15 (IL-15) verglichen wurde; als Kulturmedium wurde X-Vivo verwendet. Das Zellwachstum bei Zugabe von 10 ng/ml IL-15 war geringfügig besser als das bei Zugabe von 30 U/ml IL-2 (Abb.13).

3.2 Transduktionseffizienz

Als Transduktion wird die Übertragung eines Gens durch Infektion der Zielzellen mit einem viralen Vektor bezeichnet. Bei retroviralen Vektoren wie Lentiviren wird das übertragene Gen in das Genom der T-Zellen eingefügt, wodurch diese dauerhaft genetisch verändert werden.

3.2.1 Verwendete Subpopulationen bei der Durchflusszytometrie

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie wurden als Streudiagramm dargestellt. Um die Lymphozyten analysieren zu können, mussten die Signale der Monozyten oder Zelltrümmer herausgefiltert werden. Aus der Lymphozytenpopulation wurden die Signale von Zellaggregaten entfernt, da diese – ebenso wie Zelltrümmer – falsch positive Messsignale verursachen können.



Falls nicht anders angegeben, ist im Folgenden auf den X-Achsen das Vorwärtstreulicht (*forward scatter – area*, FSC-A) – und damit die Größe der Zellen – aufgetragen. Das Seitwärtstreulicht (*side scatter – area*, SSC-A), die Höhe und damit Durchmesser der Zellen (*forward scatter – height*, FSC-H) sowie die

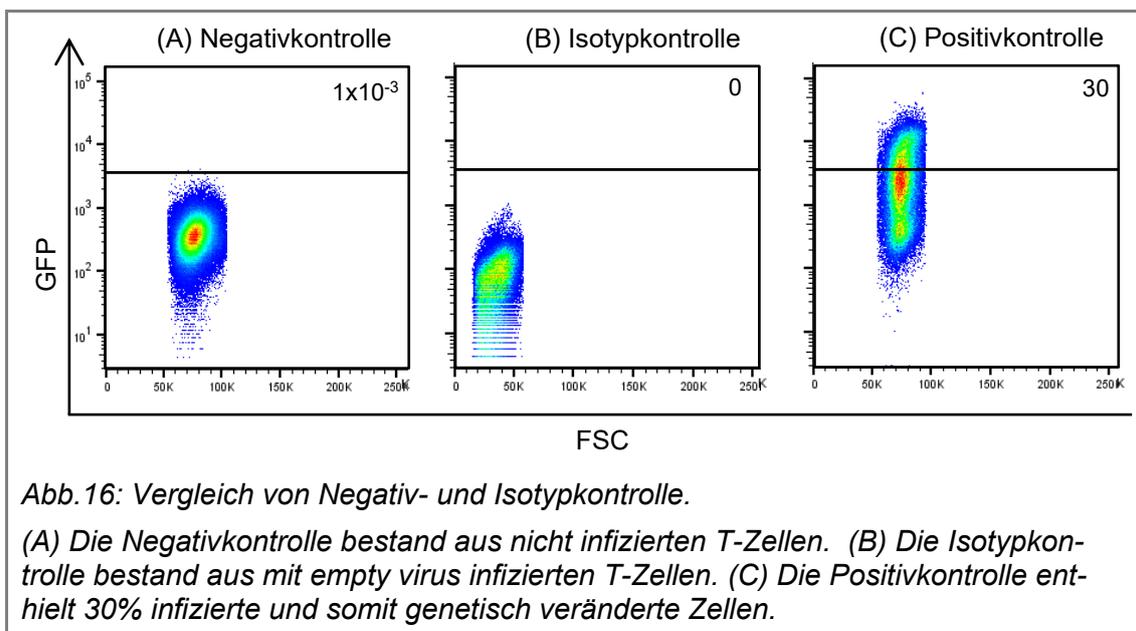
3 Ergebnisse

3.2 Transduktionseffizienz

Fluoreszenzintensität dagegen ist auf der Y-Achse aufgetragen. FSC und SSC wurden mit einer linearen Skala, die Intensität von Fluoreszenz dagegen logarithmisch dargestellt (Abb. 16).

3.2.2 Vergleich von Negativkontrolle und Isotypkontrolle

Um herauszufinden, ob das Virus die Ergebnisse der Durchflusszytometrie verfälschen konnte, wurde eine Viruscharge ohne *transfer plasmid*, also ohne Virusgenom, hergestellt. Dieses wurde mit nicht infizierten Zellen verglichen. Die für die Positivkontrolle verwendete Viruscharge war mit dem Transferplasmid *pRRL.PPT.SF.i2GFP* hergestellt worden, welches ein Gen für ein grün fluoreszierendes Protein (*green fluorescent protein*, GFP) enthielt. Die Expression des GFP konnte im Fluoresceinisothiocyanat-Kanal (FITC-Kanal) gemessen werden.



3.2.3 Transduktionseffizienz in Abhängigkeit von der Dauer des Viruskontaktes

Die Inkubationszeit nach *spin infection* betrug 24 Stunden; dann wurden die Virusreste im Überstand entfernt. Eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 48 Stunden hatte keine signifikanten Auswirkungen auf die Transduktionseffizienz.

3 Ergebnisse

3.2 Transduktionseffizienz

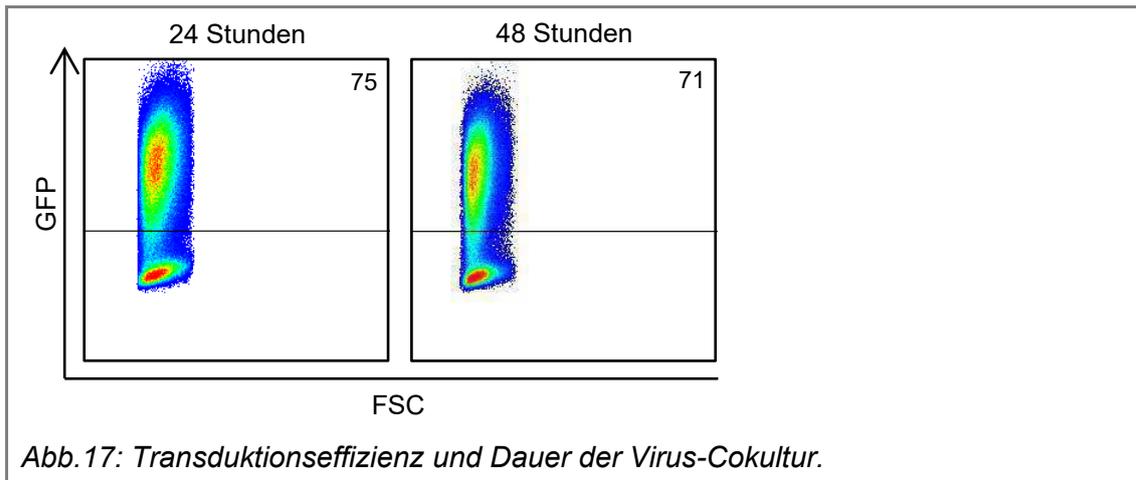


Abb.17: Transduktionseffizienz und Dauer der Virus-Cokultur.

Das in Abb.17 dargestellte Ergebnis wurde in einer Wiederholung des Versuches bestätigt. Die Transduktionseffizienz betrug bei 24 Stunden Inkubationsdauer 41% und nach 48 Stunden Inkubationszeit 36%.

3.2.4 Übersicht über die Transduktion mit verschiedenen Transferplasmiden

Alle zur Virusproduktion verwendeten Transferplasmide resultierten in funktionsfähigen viralen Vektoren (Abb.18).

3.2.5 Erreichte Transduktionseffizienzen

Die Transduktionseffizienzen variierten abhängig von der Viruscharge und der Individualität der T-Zellen verschiedener Spender stark; selbst bei Verwendung derselben Viruscharge führte die Infektion von T-Zellen zweier verschiedener Blutspender beispielsweise zu 63% und 32% infizierten Zellen.

Der Mittelwert der erreichten Transduktionseffizienzen betrug 42,8% (N=26) bei einer Streubreite zwischen 10 und 71%.

3 Ergebnisse
3.2 Transduktionseffizienz

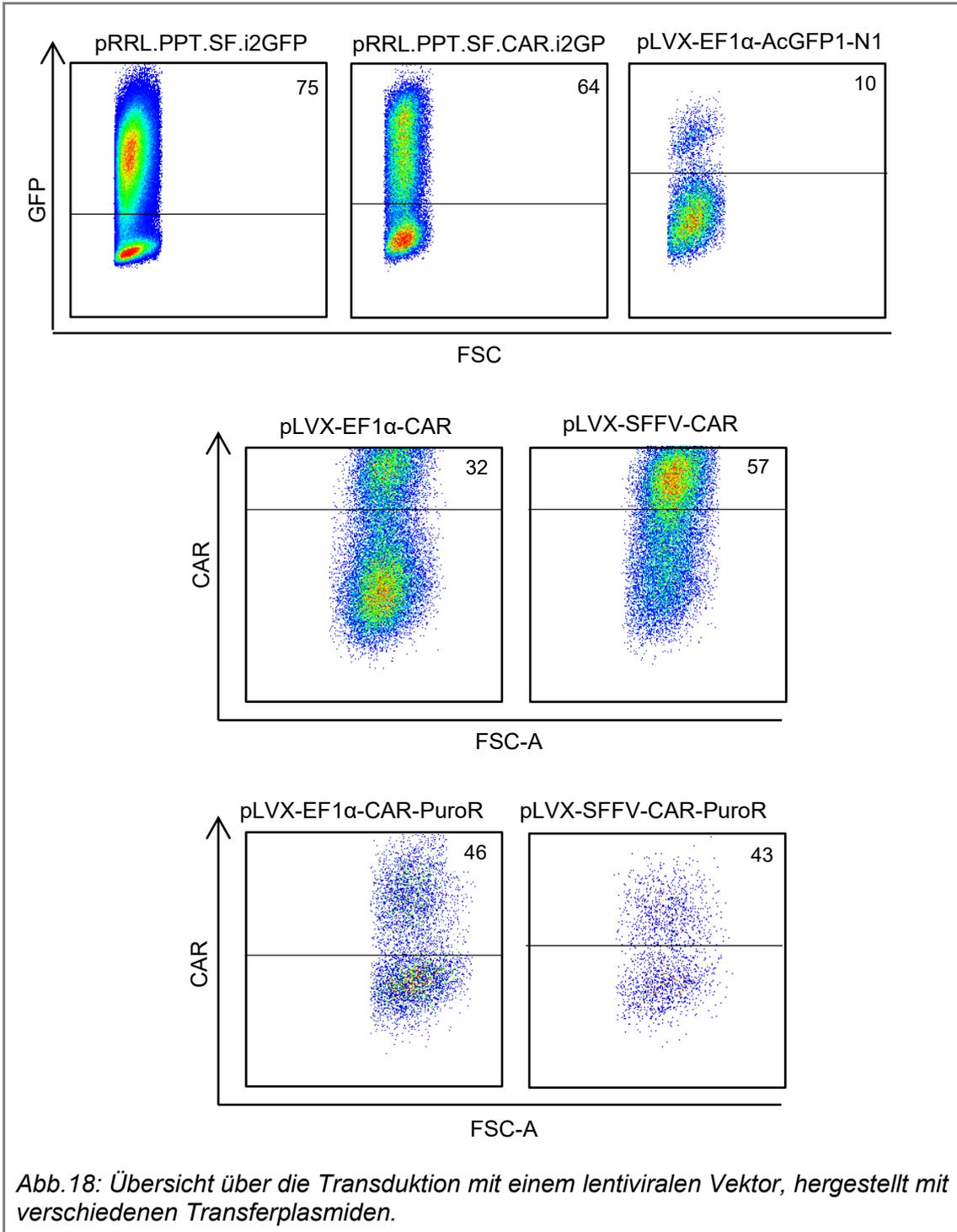


Abb.18: Übersicht über die Transduktion mit einem lentiviralen Vektor, hergestellt mit verschiedenen Transferplasmiden.

3 Ergebnisse

3.3 Virusquantifizierung und Transduktionseffizienz

3.3 Virusquantifizierung und Transduktionseffizienz

Die in 3.3.1 und 3.3.2 beschriebenen Versuche fanden parallel statt. Die einzelnen Aliquote der Viruscharge, hergestellt mit dem Transferplasmid *pRRL.PPT.SF.i2GFP*, wurden dafür gepoolt. Gewöhnlich wurden 50 µl Virussuspension für die Infektion von 1 ml Zellkultur mit 1×10^6 T-Zellen verwendet. Ausgehend davon wurden die Verdünnungen im Verhältnis 1:2, 1:5 und 1:10 ange-
setzt.

3.3.1 Virusquantifizierung mit qRT-PCR

Die Ergebnisse der Virusquantifizierung waren aufgrund der stark positiven Negativkontrolle („empty virus“) nicht verwertbar (N=2).

Probe	Kopien/µl
Negativkontrolle (Wasser)	0,0
Negativkontrolle („empty virus“)	$5,7 \times 10^5$
Virus-Verdünnung 1:10	$1,2 \times 10^6$
Virus-Verdünnung 1:5	$1,3 \times 10^6$
Virus-Verdünnung 1:2	$2,3 \times 10^6$
Standardmenge Virus	$6,4 \times 10^6$

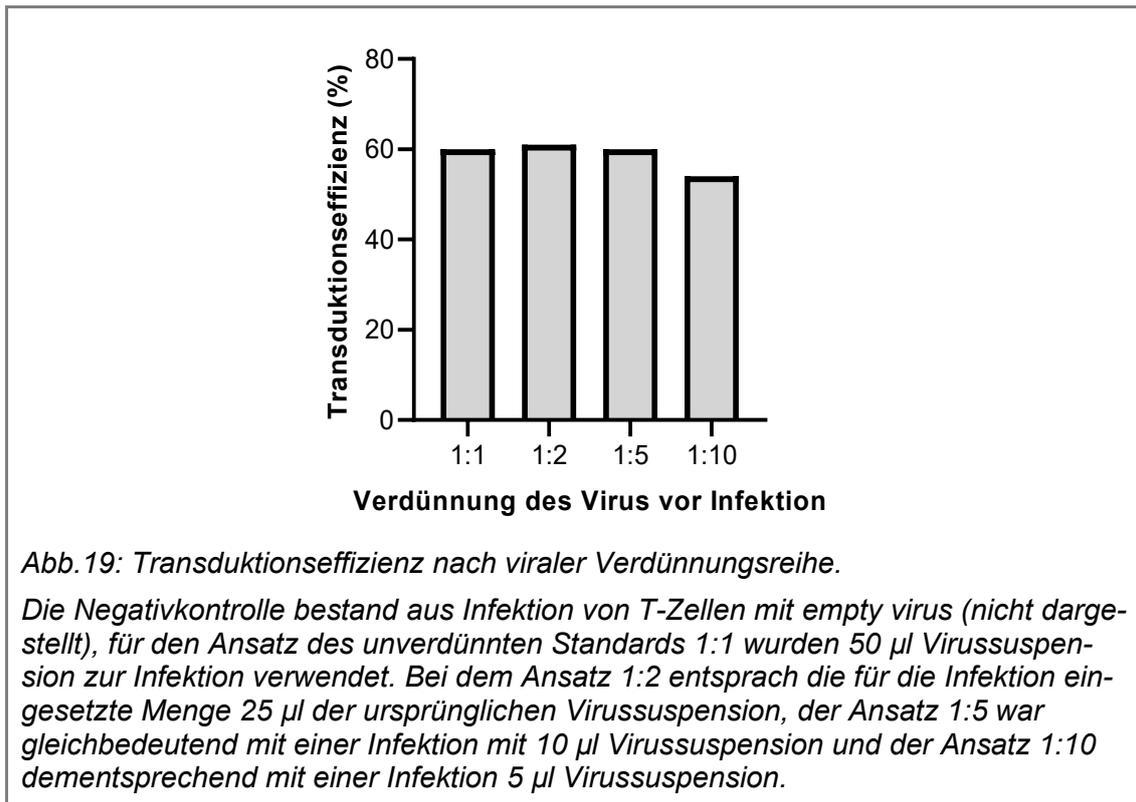
3.3.2 Transduktionseffizienz in Abhängigkeit von der Virusmenge

Unabhängig von der Virusquantifizierung stellte sich die Frage, ob die Anzahl der Viruspartikel und die Transduktionseffizienz noch in einem linearen Zusammenhang stehen und ob letztere erhöht werden kann.

Gewöhnlich wurden 50 µl Virussuspension für die Infektion von 1 ml Zellkultur mit 1×10^6 T-Zellen verwendet. Es zeigten sich sieben Tage nach Aktivierung ähnliche Transduktionseffizienzen bis zur Verwendung von einem Fünftel der Standardmenge. Erst eine weitere Reduktion auf 10% der Virussuspension wirkte sich auf die Anzahl der infizierten T-Lymphozyten aus.

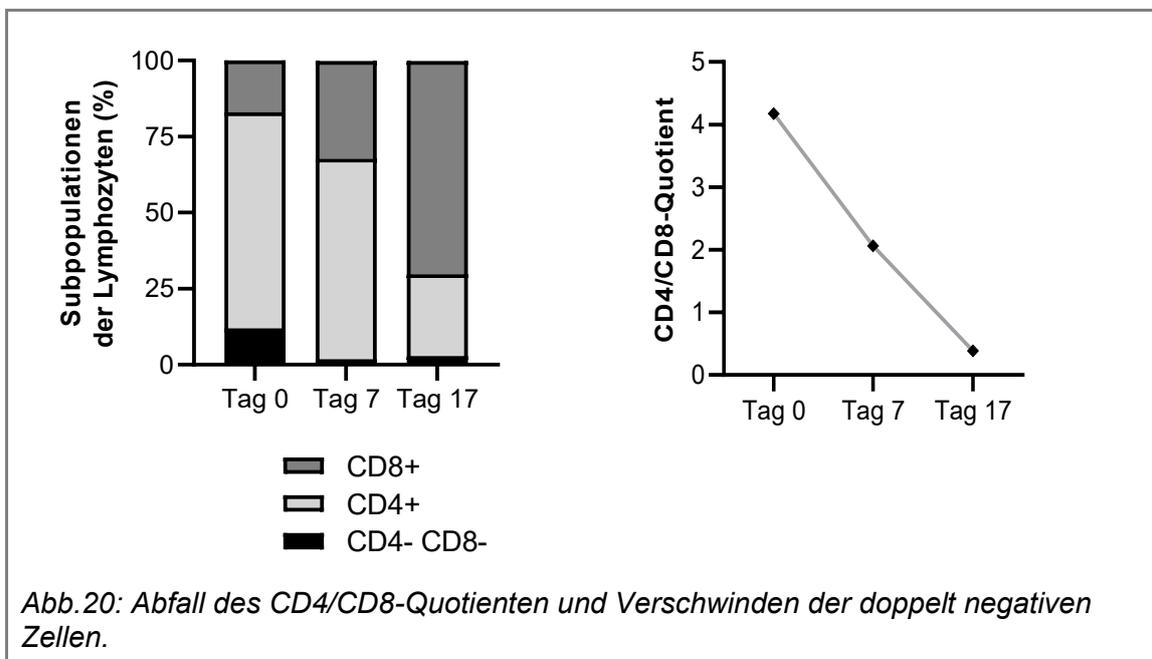
3 Ergebnisse

3.4 Fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie



3.4 Fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie

3.4.1 Population von CD4- und CD8-positiven Zellen



3 Ergebnisse

3.4 Fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie

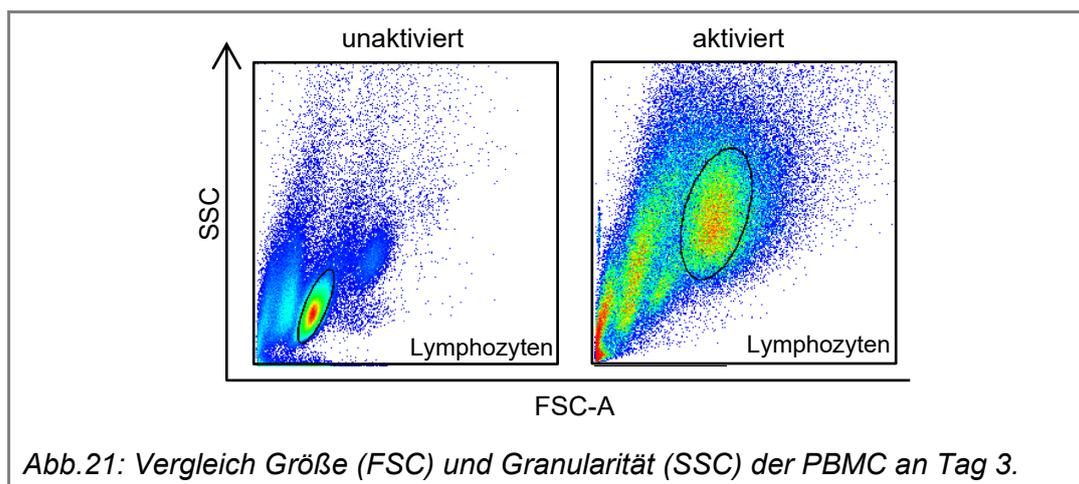
Wie für die Kombination von Aktivierung mit Anti-CD3/CD28 und IL-2-Zugabe vorgeschrieben, war der CD4/CD8-Quotient nach 17-20 Tagen in der Zellkultur ohne Ausnahme deutlich gesunken.^{220 221} Bei geringer Anzahl der Versuche mit reaktivierten T-Zellen (N=5) und großer Streubreite konnte nicht mit Sicherheit festgestellt werden, ob die Reaktivierung diesen Abfall weiter verstärkt.

Der Anteil der doppelt negativen Lymphozyten nahm ebenfalls ab. In dieser Population befanden sich am Tag 0 vermutlich außer T-Zellen auch B-Lymphozyten. Durch die T-Zell-spezifische Aktivierung und die Zugabe spezifischer Zytokine wurden die meisten Nicht-T-Zellen durch „Vernachlässigung“ entfernt.

3.4.2 Aktivierung

3.4.2.1 Aktivierungsmarker CD45 RA und CD45 R0

Um eine Idee davon zu bekommen, was die Aktivierung mit Anti-CD3/Anti-CD28 bewirkt, wurden zunächst CD3-positive Zellen, also T-Lymphozyten, unterschieden in naive T-Zellen, welche das Oberflächenprotein CD45RA exprimieren, und aktivierte T-Lymphozyten und T-Gedächtniszellen, die CD45R0 tragen. Die aktivierten Zellen waren 72 Stunden nach Aktivierung deutlich größer als nicht aktivierte Lymphozyten (*Abb.21*). Außerdem stieg der Anteil an aktivierten T-Zellen von 63% auf 88% (*Abb.23*).



3 Ergebnisse

3.4 Fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie

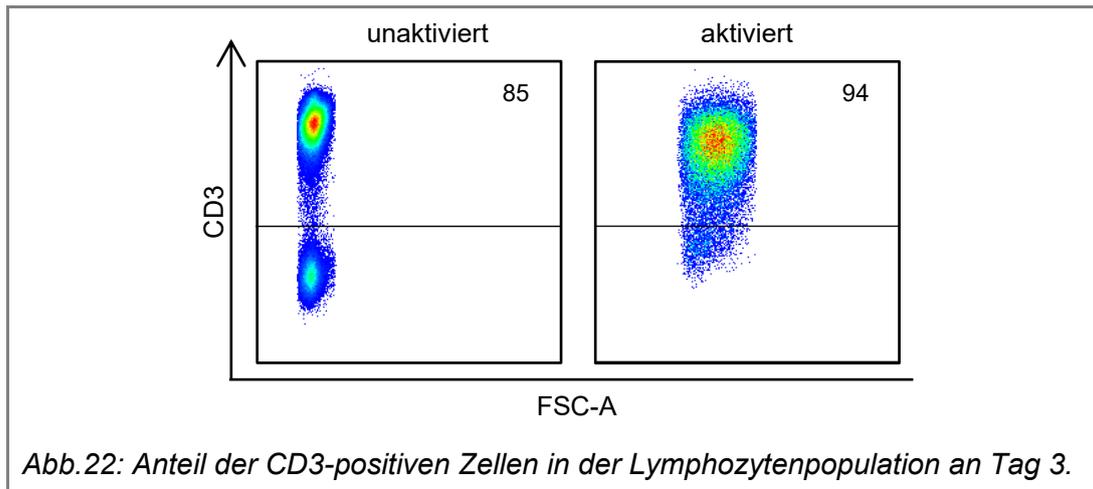


Abb.22: Anteil der CD3-positiven Zellen in der Lymphozytenpopulation an Tag 3.

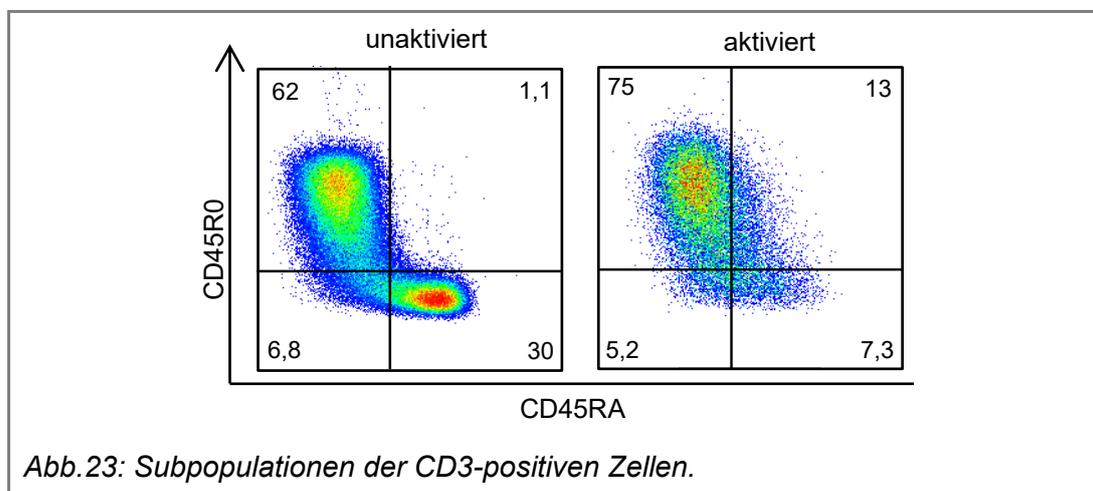


Abb.23: Subpopulationen der CD3-positiven Zellen.

3.4.2.2 Dynamik der Aktivierungsmarker CD25 und CD69

Das Transmembranprotein CD69 ist ein sehr früher Marker für Aktivierung. Es ist etwa 2 bis 4 Stunden nach Aktivierung der T-Zelle detektierbar und erreicht das Maximum mit Plateau zwischen 18 und 48 Stunden; dann sinkt die Expression und erreicht nach 72 Stunden ungefähr den Ausgangswert vor Aktivierung.²²²

CD25 ist die α -Kette des IL-2-Rezeptors (IL2R α). Mit einem Anstieg dieses Markers ist nach 8 bis 12 Stunden nach Aktivierung zu rechnen und das Maximum wird nach 48 bis 96 Stunden erreicht; der Abfall erfolgt deutlich langsamer als bei CD69, und nach 7 bis 21 Tagen ist der Wert unter 20% der maximalen Expression gesunken.^{223 224}

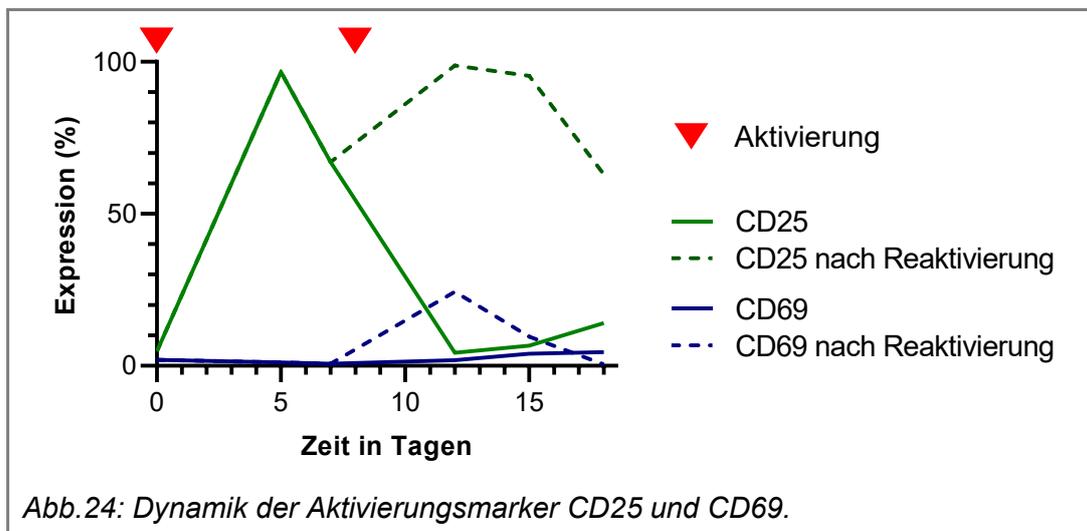
Aufgrund des raschen Abfalls von CD69 auf Normalniveau nach Aktivierung war an Tag 5 keine erhöhte Expression mehr zu verzeichnen (Abb.24). Die Expres-

3 Ergebnisse

3.4 Fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie

sion von CD25 dagegen war an Tag 5 deutlich höher als das Ausgangsniveau und fiel anschließend langsam ab. Nach Reaktivierung an Tag 8 stieg der Marker bis Tag 15 (Tag 7 nach Reaktivierung) an und fiel dann langsam wieder ab; es war eine leichte Verzögerung im Abfall zu erahnen.

Bei CD69 dagegen bewirkte die Reaktivierung eine veränderte Dynamik im Vergleich zur ersten Aktivierung. Die Expression war hier deutlich länger erhöht, nämlich bis Tag 7 nach Reaktivierung.



3.4.3 Eigenfluoreszenz und Stabilität des Gentransfers

Nach einigen Tagen zeigten die Zellen eine erhöhte Eigenfluoreszenz in der Durchflusszytometrie (Abb.25), welche die Auswertung der Ergebnisse beeinträchtigte. So musste bei Verwendung von Vektoren, welche das GFP-Gen im Genom enthielten, die Grenze zwischen transduzierten und nicht transduzierten Zellen verschoben werden. Daraus resultierte jedoch auch ein Absinken des Wertes für die Transduktionseffizienz. Wären die Gates belassen worden, wäre auch die Transduktionseffizienz gleich geblieben, allerdings wäre auch die Negativkontrolle falsch positiv geworden.

Wurde während des Versuches eine Reaktivierung durchgeführt, reduzierte das die Verfälschung der Transduktionseffizienz durch Eigenfluoreszenz (Abb.26). Außerdem ließ die unterschiedliche Höhe des Fluoreszenzsignals vermuten, dass ohne Reaktivierung die Expression des Genproduktes sinkt, während ein

3 Ergebnisse

3.4 Fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie

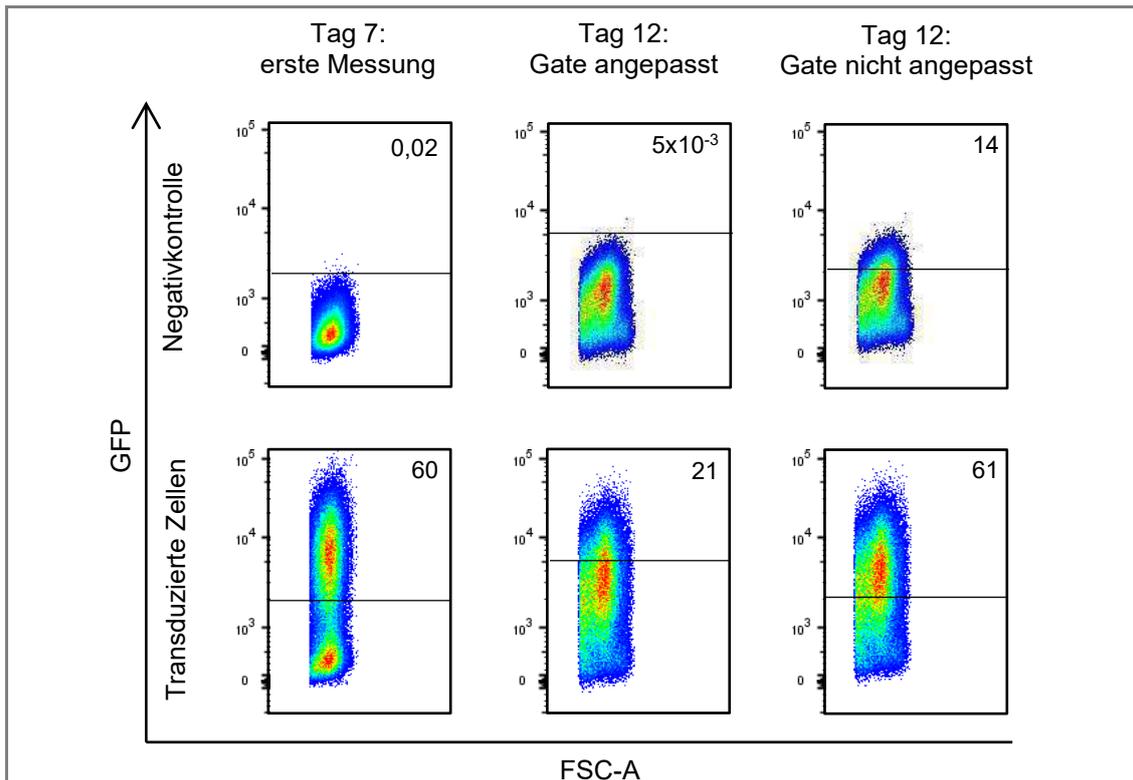


Abb.25: Eigenfluoreszenz und ihre Auswirkung auf die Messung der Transduktionseffizienz.

Für die Transduktion wurden auf dem Transferplasmid pRRL.PPT.SF.i2GFP basierende Viren verwendet; die transduzierten T-Zellen waren somit keine CAR-T-Zellen.

erneuter Kontakt der T-Zellen mit Anti-CD3 und Anti-CD28 wieder zu höheren Signalen und damit verbunden zu einer abgrenzbaren Population von genetisch veränderten Zellen führte (Abb.26).

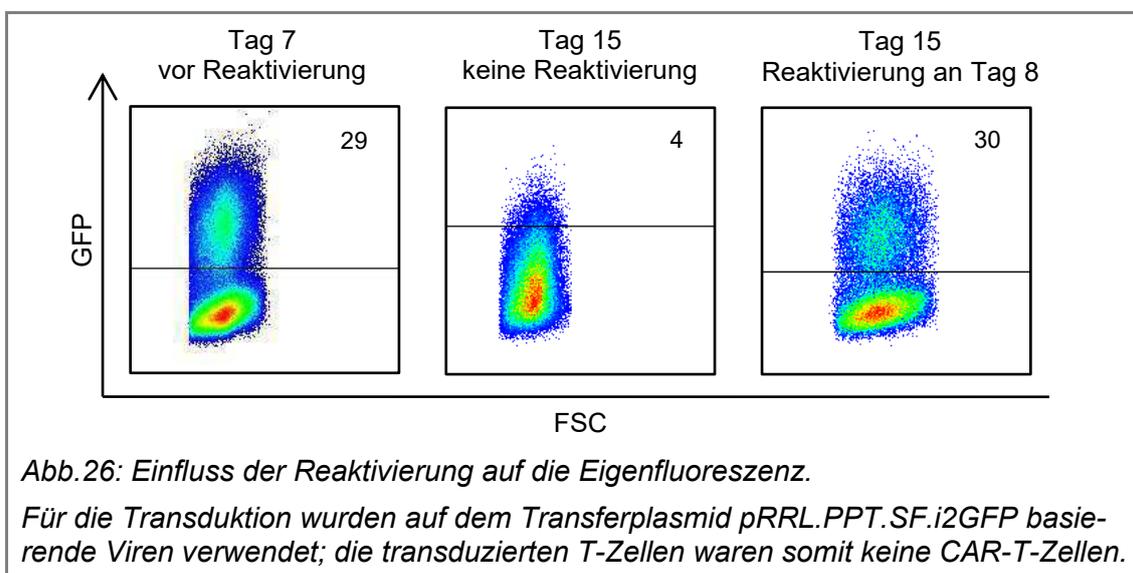


Abb.26: Einfluss der Reaktivierung auf die Eigenfluoreszenz.

Für die Transduktion wurden auf dem Transferplasmid pRRL.PPT.SF.i2GFP basierende Viren verwendet; die transduzierten T-Zellen waren somit keine CAR-T-Zellen.

3 Ergebnisse

3.4 Fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie

Die genetische Veränderung der CAR-T-Zellen schien stabil zu bleiben. Eine Reaktivierung resultierte zwar in einer etwas höheren Anzahl detektierter CARs, aber auch bei Verzicht auf eine solche blieb die Transduktionseffizienz nahezu konstant und die Artefakte durch Eigenfluoreszenz fielen geringer aus (Abb.27).

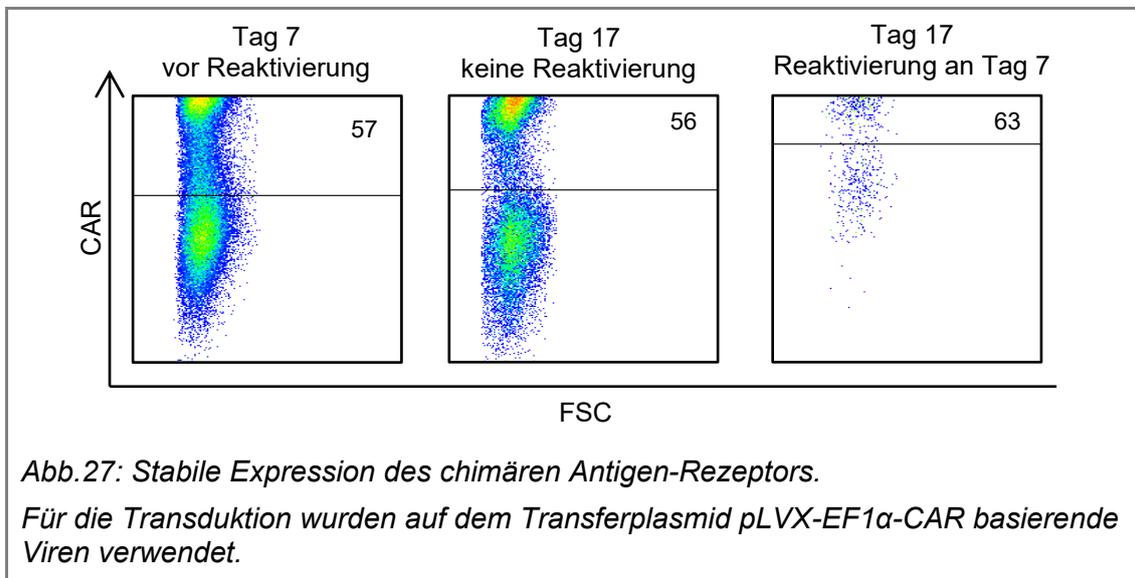


Abb.27: Stabile Expression des chimären Antigen-Rezeptors.

Für die Transduktion wurden auf dem Transferplasmid pLVX-EF1 α -CAR basierende Viren verwendet.

3.4.4 Regulatorische T-Zellen

3.4.4.1 Regulatorische T-Zellen in Abhängigkeit der Zytokine

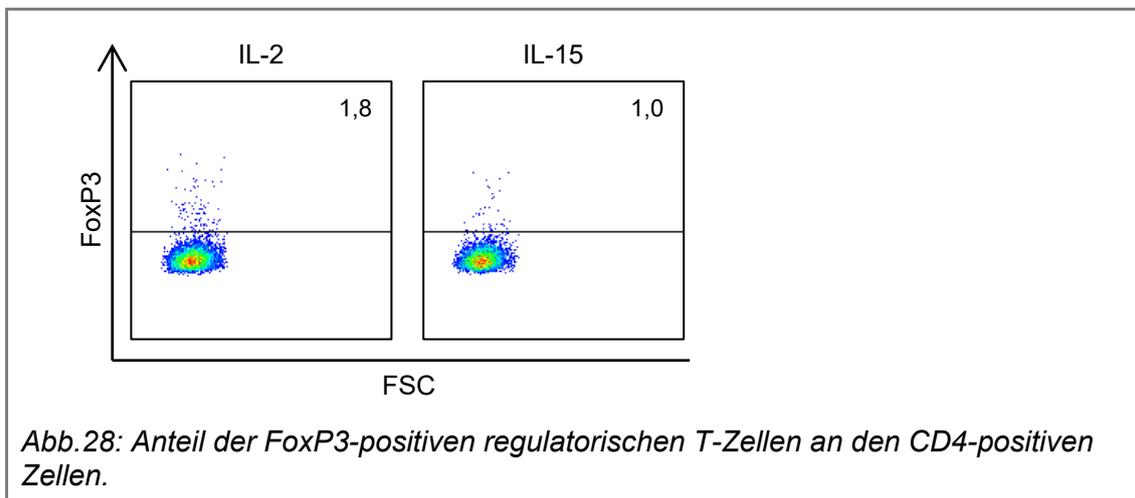


Abb.28: Anteil der FoxP3-positiven regulatorischen T-Zellen an den CD4-positiven Zellen.

Um den Anteil an regulatorischen T-Zellen zu bestimmen, wurde deren Marker FoxP3 verwendet. Da regulatorische CD8-positive Zellen nur in verschwindend geringer Anzahl im Blut zirkulieren²²⁵, wurden lediglich CD4-positive regulatorische T-Zellen analysiert.

3 Ergebnisse

3.4 Fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie

Nach 16 Tagen war der Anteil der CD4+ FoxP3+ Zellen bei Verwendung von 200 U/ml IL-2 für die Zellkultur fast doppelt so hoch wie bei Verwendung von 10 ng/ml IL-15.

3.4.4.2 FoxP3 in CD4-positiven Zellen nach Reaktivierung

In der Population der CD4-positiven Zellen stieg die Zahl der FoxP3-positiven CD4-Zellen zwischen Aktivierung und Reaktivierung kurz an und fiel dann wieder ab (N=4). Nach Reaktivierung war die relative Anzahl der FoxP3-exprimierenden CD4-Zellen gewöhnlich geringer als bei nicht reaktivierten Zellen (N=3).

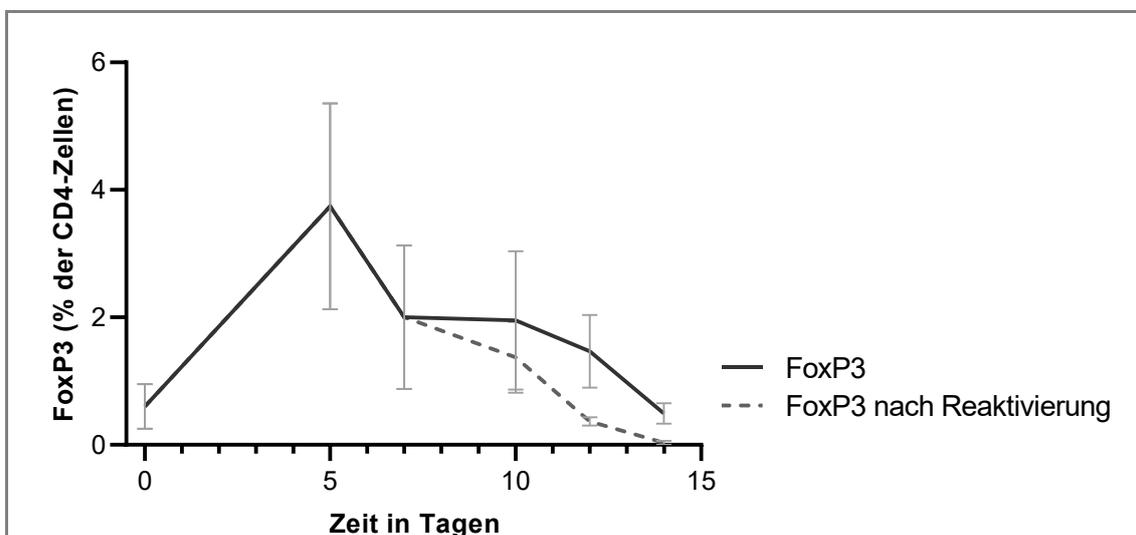


Abb.29: FoxP3-positive Zellen in der CD4-T-Zell-Population. (N=3; Balken: SEM)

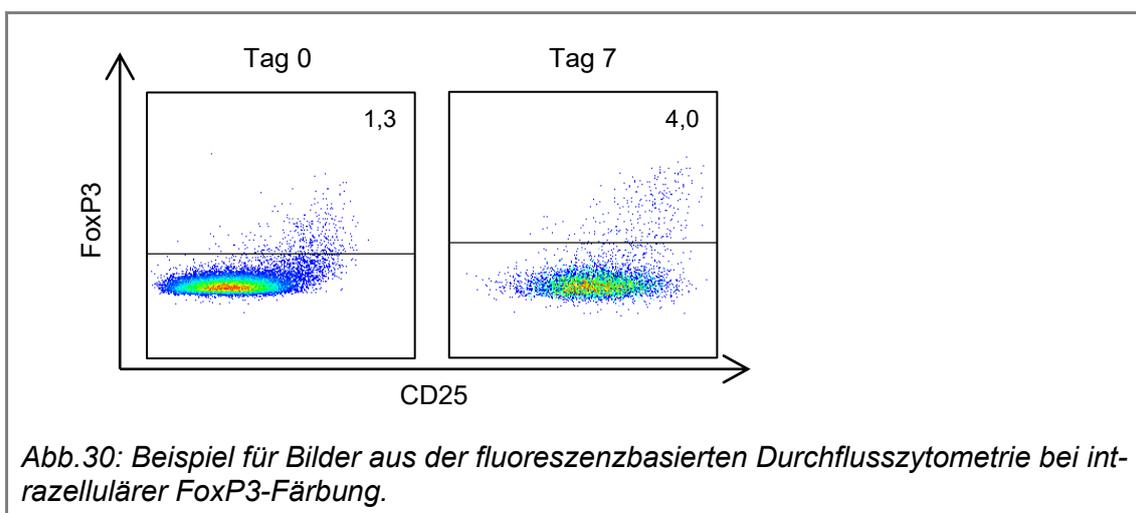


Abb.30: Beispiel für Bilder aus der fluoreszenzbasierten Durchflusszytometrie bei intrazellulärer FoxP3-Färbung.

3 Ergebnisse

3.4 Fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie

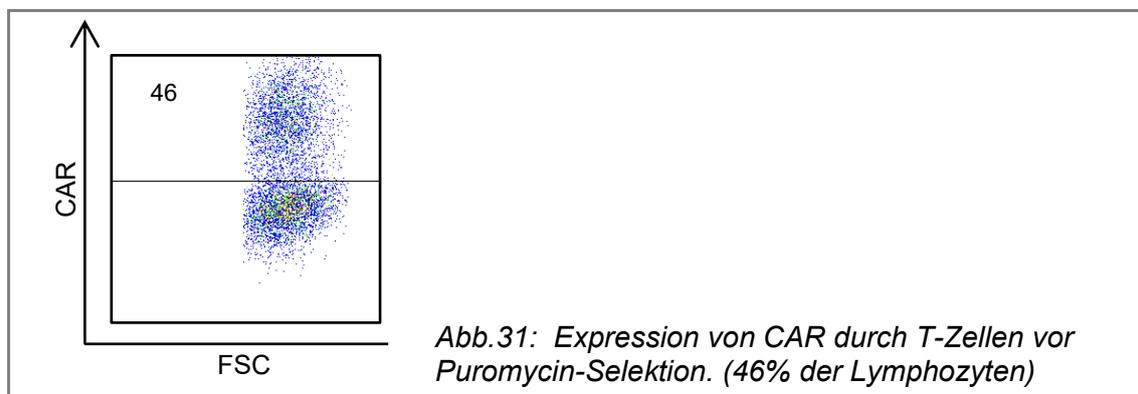
3.4.5 Selektion mit Puromycin

Die Übertragung eines Gens für die Puromycin-N-acetyltransferase durch einen lentiviralen Vektor, dessen Genom auch die Sequenz für den CAR beinhaltet, ermöglichte eine Selektion der CAR-exprimierenden Zellen. Bei Puromycin-Zugabe starb ein Großteil der übrigen Zellen aufgrund der gestörten Proteinbiosynthese²²⁶ ab, während die CAR-T-Zellen das Toxin unschädlich machen konnten.

3.4.5.1 Vergleich verschiedener Puromycin-Konzentrationen

Die T-Zellen wurden aktiviert und 24 Stunden später mit einem lentiviralen Vektor *EF1 α -CAR-PuroR* transduziert; zur Zellkultur wurde sieben Tage nach Aktivierung zum ersten Mal Puromycin in unterschiedlichen Konzentrationen hinzugefügt (0,5 μ g/ml; 1 μ g/ml; 2 μ g/ml; 3 μ g/ml; 4 μ g/ml).

Vor Selektion mit Puromycin exprimierten 46% der Zellen den chimären Antigenrezeptor auf ihrer Oberfläche. Da an Tag 14 die Anzahl der CAR-T-Zellen nicht ausreichend erhöht war, wurde die Selektion an Tag 17 wiederholt.



Puromycin-konzentration	CAR-Expression der T-Lymphozyten		Anzahl der Zellen an Tag 21
	an Tag 14	an Tag 21	
0 μ g/ml	40	56	1,5x10 ⁶
0,5 μ g/ml	74	95	6,2x10 ⁵
1 μ g/ml	86	95	5,0 x10 ⁵
2 μ g/ml	86	91	2,0 x10 ⁵
3 μ g/ml	90	89	4,1 x10 ⁵
4 μ g/ml	90	92	1,9 x10 ⁵

Tabelle 2: CAR-Expression und Anzahl der Zellen nach Puromycin-Selektion.

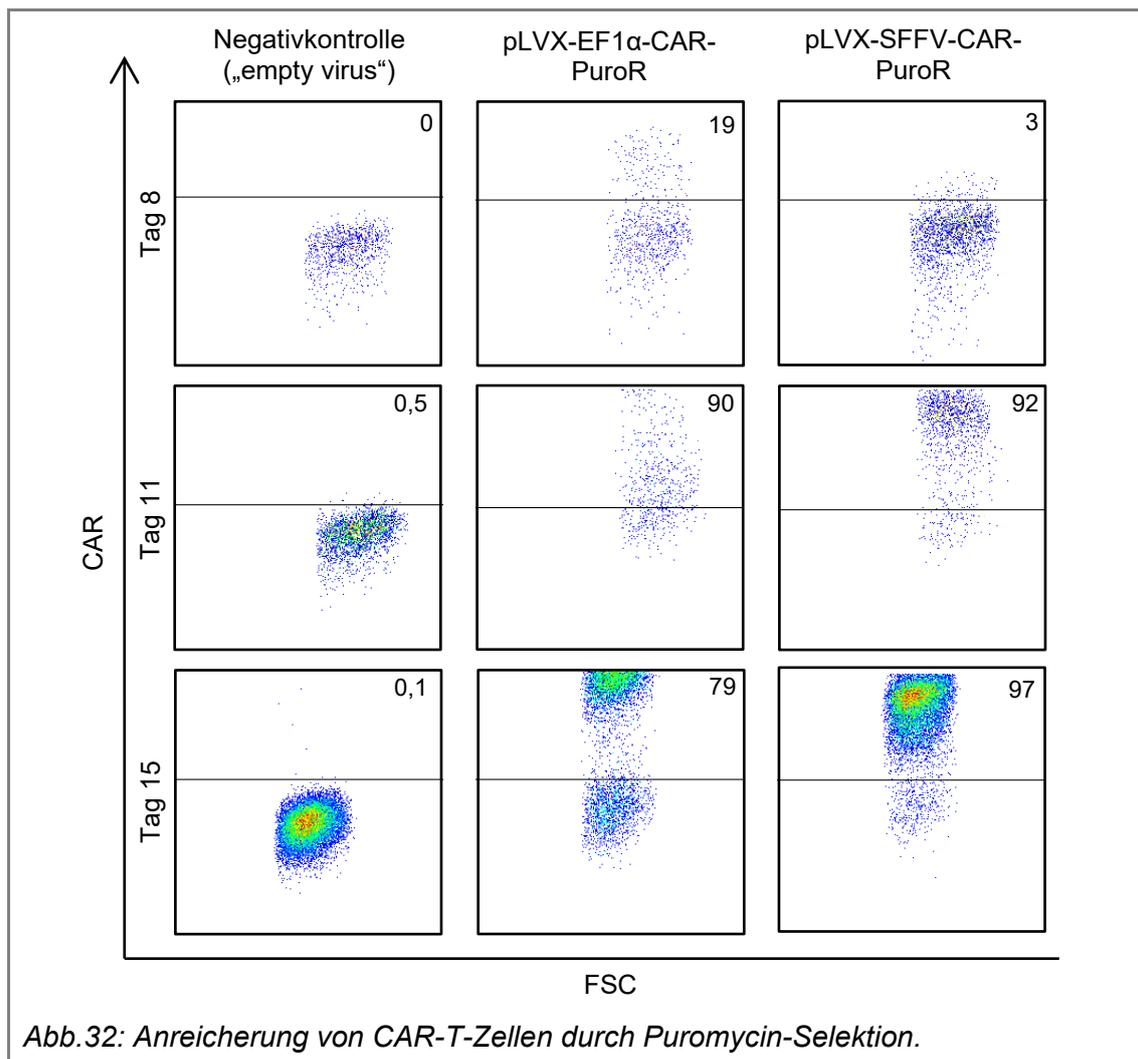
3 Ergebnisse

3.4 Fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie

Bei T-Zellen, die mit 0,5 µg/ml und 1 µg/ml selektiert worden waren, war nicht nur die CAR-Expression höher, sondern auch Viabilität und Anzahl der Zellen an Tag 21. Auch wenn keine kontinuierliche Wachstumskurve erstellt wurde, sondern einmalig ein Teil der Zellen für die Durchflusszytometrie verwendet wurde, waren die Kulturen mit Puromycin alle identisch behandelt worden; lediglich aus der Negativkontrolle wurde ein etwas größeres Volumen der Zellkultur für den FACS-Versuch entnommen.

Die besten Ergebnisse wurden mit 0,5 µg/ml und 1 µg/ml Puromycin erreicht. Fortan wurden diese beiden Konzentrationen für die Selektion verwendet. Bei mehr als 50% transduzierter Zellen wurde 1 µg/ml Puromycin, bei weniger als 50% genetisch veränderter T-Zellen 0,5 µg/ml Puromycin zugegeben.

3.4.5.2 Puromycin-Selektion für Europium-Release-Assay



3 Ergebnisse

3.4 Fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie

Die Selektion mit Puromycin führte zum Absterben eines Großteils der Zellen; CAR-T-Zellen mit Puromycin-N-acetyltransferase dagegen konnten diese Zellkulturbedingungen überleben. Dies führte zu einer Erhöhung des relativen Anteils von CAR-T-Zellen in der Lymphozytenpopulation (*Abb.32*).

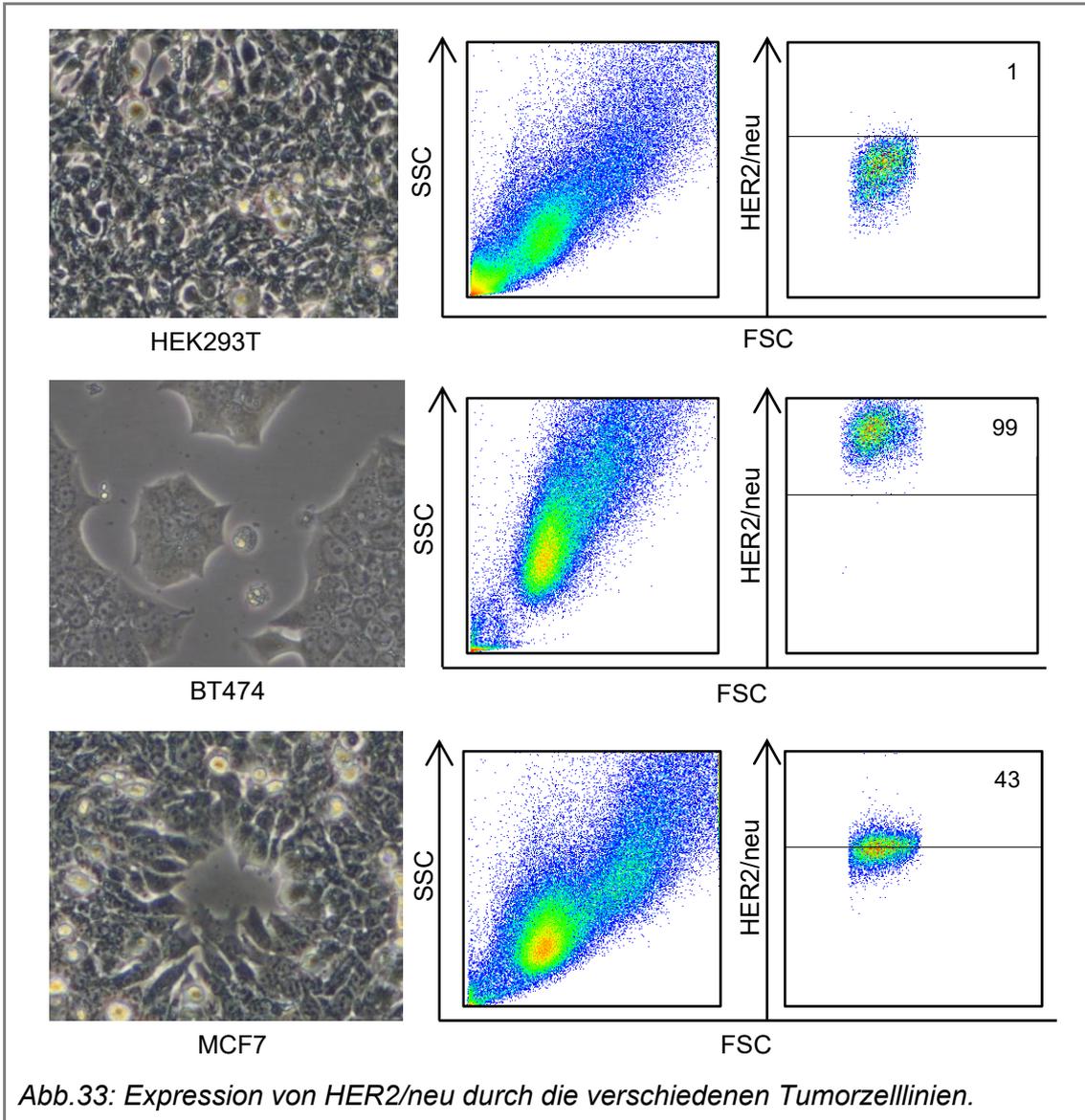
3.4.5.3 Überleben der Puromycin-Selektion

Puromycin war für die nicht transduzierten Zellen letal, während es den CAR-T-Zellen aufgrund der Puromycin-N-acetyltransferase möglich war, das Toxin zu inaktivieren. Dies bedeutete jedoch keine komplette Resistenz gegenüber Puromycin; auch die Proteinbiosynthese der CAR-T-Zellen schien beeinträchtigt zu sein. Nur 41% der T-Zell-Kulturen überlebten die Puromycin-Selektion (N=11), bei den übrigen fiel die Anzahl der Zellen auch Tage nach der Puromycin-Entfernung weiter ab.

3.4.6 HER2/neu-Expression der Tumorzelllinien

Die verwendeten Tumorzelllinien MCF7 und BT474 hatten eine unterschiedliche Expression des Ziel-Antigens HER2/neu. Das embryonale Nierenzellkarzinom HEK293T exprimiert kein HER2/neu; die Zellen banden entweder die fluoreszierenden Antikörper lediglich unspezifisch oder hatten eine erhöhte Eigenfluoreszenz. Mammakarzinomzellen der Linien MCF7 und BT474 besitzen HER2/neu auf ihrer Oberfläche, wobei BT474 eine deutlich stärkere Expression zeigte.

3 Ergebnisse
3.4 Fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie

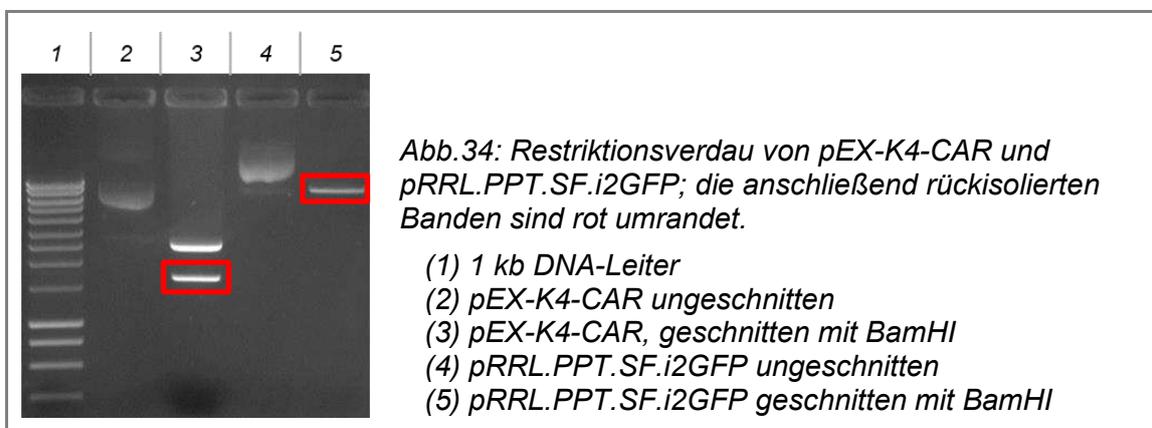


3.5 Klonierung

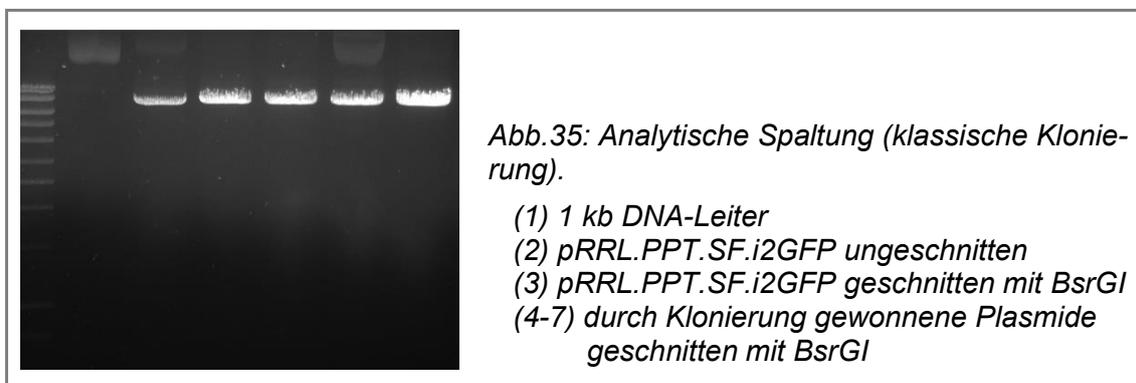
3.5.1 Klassische Klonierung mit DNA-Ligase

Nach einem Restriktionsverdau der Plasmide *pRRL.PPT.SF.i2GFP* und *pEX-K4-CAR* mit *Bam*HI wurden die Ansätze mithilfe einer Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Banden des *pEX-K4-CAR*-Ansatzes hatten die erwartete Länge von 2513 bp und 1632 bp, letztere entsprach der CAR-Sequenz.

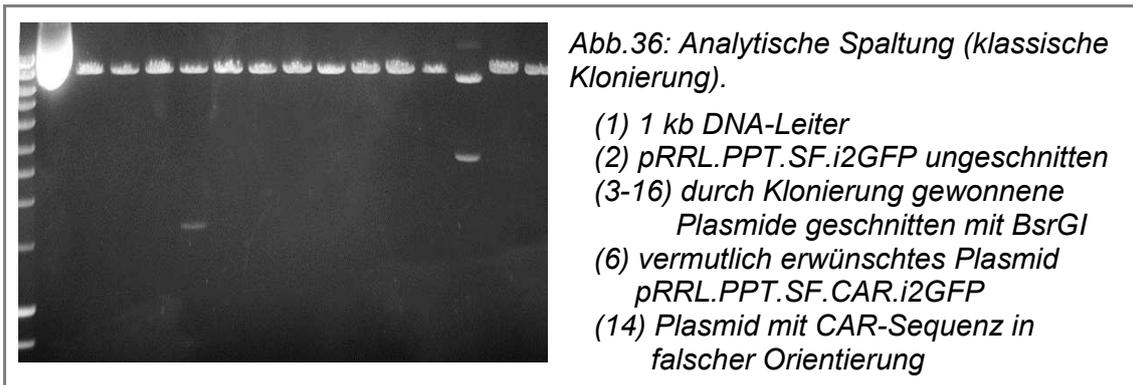
pRRL.PPT.SF.i2GFP dagegen wurde linearisiert bei einer Länge von 7892 bp. Der linearisierte Vektor und die CAR-Sequenz wurden aus dem Gel rückisoliert.



In den ersten Klonierungsversuchen wurde zunächst keine Phosphatase verwendet. Auf den LB-Platten wuchsen 5 und 11 Bakterienkolonien. In der anschließenden analytischen Spaltung mit *Bsr*GI war jedoch nur eine Bande pro Ansatz erkennbar. Dies entsprach religierten oder „doppelten“, also aus zwei miteinander ligierten Backbones bestehenden, Plasmiden. Die CAR-Sequenz war also nicht eingefügt worden (Abb.35).



Die Resultate nach Behandlung des linearisierten *pRRL.PPT.SF.i2GFP*-Plasmids mit *Antarctic Phosphatase* waren etwas besser. Unter den 24 Kolonien befanden sich vier Kolonien, bei denen die CAR-Sequenz in falscher Orientierung eingesetzt worden war, und eine Kolonie, die auch nach erneuter Überprüfung das gewünschte Plasmid *pRRL.PPT.SF.CAR.i2GFP* zu enthalten schien. Die übrigen Ansätze waren religierte oder „doppelte“ Plasmide (Abb.36):



3.5.2 Klonierung mit dem InFusion-Verfahren

Auch für das InFusion-Verfahren wurden die Plasmide zunächst mit Restriktionsenzymen geschnitten und die für die Klonierung benötigten DNA-Stücke aus dem Gel extrahiert. Die Anzahl der Banden und die Moleküllänge der DNA-Fragmente deckten sich mit den Berechnungen.

Aus dem Plasmid *pLVX-EF1 α -AcGFP1-N1* wurde zuerst das Gen für die Puromycin-N-acetyltransferase entfernt. Die DNA der Bande bei 7607 bp wurde aus dem Gel isoliert, die Fragmente der Länge 1353 bp und 559 bp verblieben dagegen im Gel (Abb.37).

Später wurde das Plasmid mit anderen Restriktionsenzymen so geschnitten, dass die Puromycin-Resistenz erhalten blieb. Das gewünschte DNA-Molekül war 8752 bp lang, während die Bande bei 767 bp mit dem übrigen Gel verworfen wurde (Abb.37).

In beiden Versuchen wurde später der Promotor ausgetauscht. Das Plasmid *pRRL.PPT.SF.i2GFP* wurde dafür mit *BmtI* und *BamHI* geschnitten; das 445 bp-Fragment entsprach dem SFFV-Promotor, welches rückisoliert wurde (Abb.38).



Abb.37: Restriktionsverdau von pLVX-EF1 α -AcGFP1-N zum Erhalt des Vektorrückgrats ohne (A) und mit (B) Puromycinresistenz; die anschließend rückisolierten Banden sind rot markiert.

- (1) 1 kb DNA-Leiter
- (2) Plasmid pLVX-EF1 α -AcGFP1-N1 ungeschnitten
- (3+4) Plasmid pLVX-EF1 α -AcGFP1-N1 geschnitten mit BstBI und Tth111I (A) bzw. mit BstBI und NotI

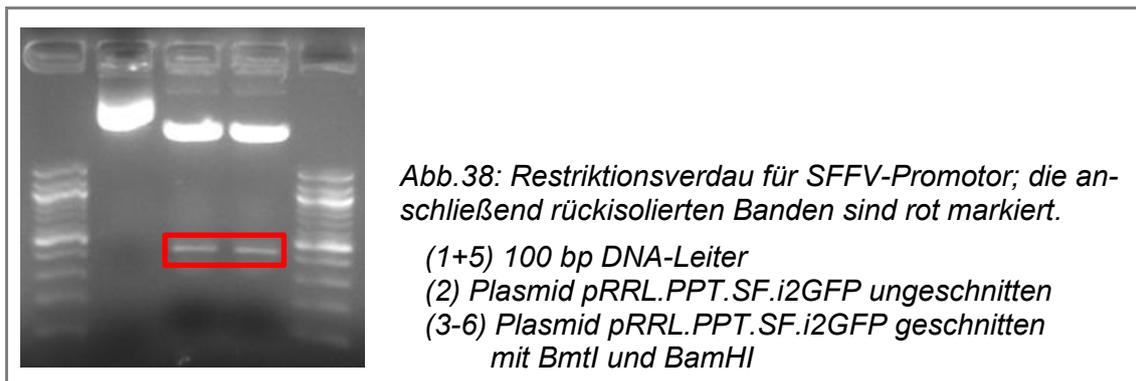


Abb.38: Restriktionsverdau für SFFV-Promotor; die anschließend rückisolierten Banden sind rot markiert.

- (1+5) 100 bp DNA-Leiter
- (2) Plasmid pRRL.PPT.SF.i2GFP ungeschnitten
- (3-6) Plasmid pRRL.PPT.SF.i2GFP geschnitten mit BmtI und BamHI

Die Enden der CAR-Sequenz wurden in einer PCR um je 15 bp verlängert und diese DNA-Sequenz vervielfältigt. Das Produkt wurde auf ein Gel aufgetragen. Als Standard wurde dieselbe DNA-Menge der ausgeschnittenen CAR-Sequenz verwendet wie für den PCR-Ansatz. Diese Bande ist nur schwach erkennbar, die Banden der PCR-Produkte dagegen sehr deutlich, da sie aufgrund der erfolgreichen PCR deutlich mehr DNA enthalten. Zwischen den PCR-Ansätzen mit Mg²⁺ oder DMSO und dem PCR-Ansatz ohne Zusätze scheint im ersten Versuch kein Unterschied bezüglich der erhaltenen DNA-Menge zu bestehen (Abb.39A).

Da bei Verbleiben des Gens für die Puromycinresistenz im Vektor die Sequenz des Vektorendes verändert war, musste ein anderer Reverse-Primer verwendet

3 Ergebnisse

3.5 Klonierung

werden. Die PCR war auch hier erfolgreich, allerdings schienen die Zusätze DMSO und insbesondere $MgCl_2$ die Ausbeute diesmal zu verringern (Abb.39B).

Als Ergebnis der Klonierung mithilfe des InFusion-Verfahrens wurde das Plasmid pLVX-EF1 α -CAR bzw. das Plasmid pLVX-EF1 α -CAR-PuroR angestrebt.

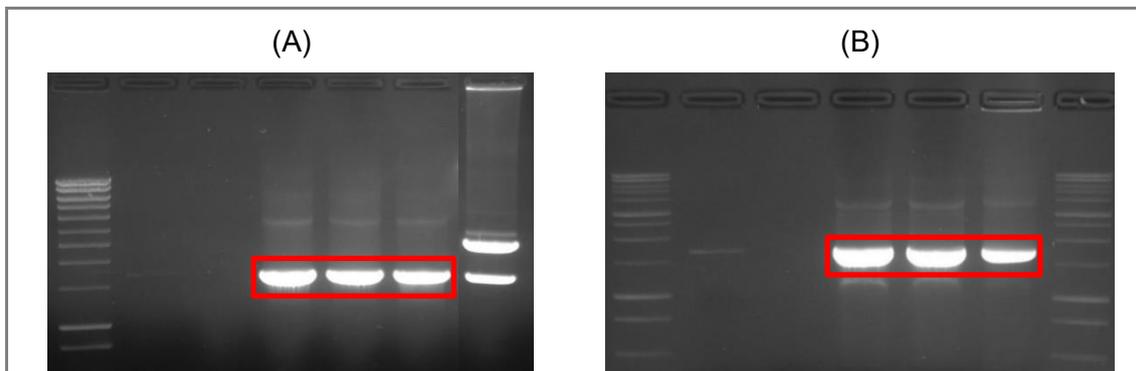


Abb.39: PCR-Produkte der CAR-Sequenz nach Elektrophorese für Versuch ohne (A) und mit Erhalt (B) der Puromycinresistenz; die anschließend rückisolierten Banden sind rot markiert.

- (1) 1 kb DNA-Leiter
- (2) 30 μg ausgeschnittene CAR-Sequenz
- (3) Negativkontrolle der PCR
- (4) PCR-Produkt
- (5) PCR-Produkt (Mg^{2+})
- (6) PCR-Produkt (DMSO)

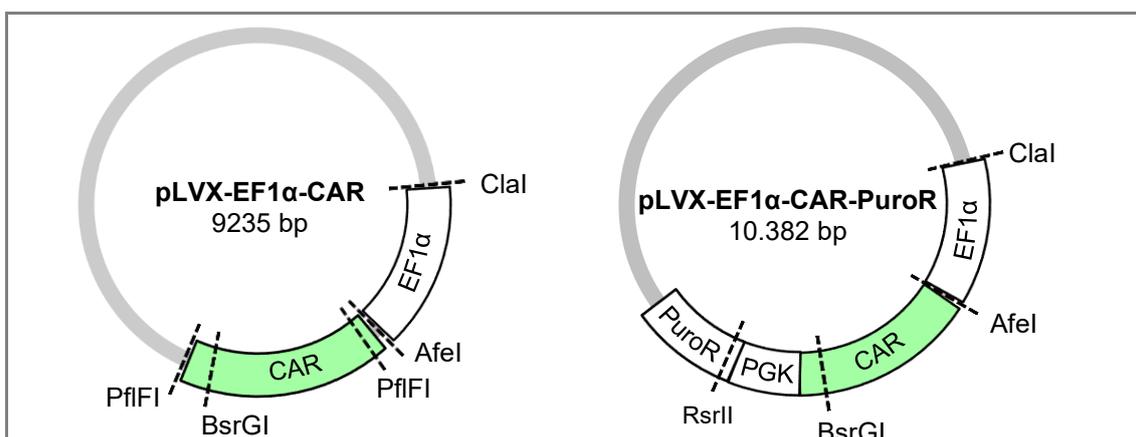


Abb.40: Erwartete Klonierungsprodukte: Plasmid pLVX-EF1 α -CAR (links) und Plasmid pLVX-EF1 α -CAR-PuroR (rechts) mit Schnittstellen der Restriktionsenzyme.

CAR: Sequenz des chimären Antigenrezeptors • EF1 α : human elongation factor 1 alpha promoter • PuroR: Puromycin-Resistenz • PGK: phosphoglycerate kinase promoter

3 Ergebnisse

3.5 Klonierung

Nach der Transformation des InFusion-Ansatzes in Bakterien fanden sich – wie bei allen InFusion-Versuchen – zahlreiche Bakterienkolonien auf den LB-Platten. Aufgrund der großen Anzahl der Kolonien wurde auf eine Zählung verzichtet.

Vereinzelte Kolonien wuchsen auch auf den Platten der Negativkontrollen, deren InFusion-Ansatz aus linearisiertem Plasmid bestanden hatte; das Plasmid war vielleicht nicht vollständig linearisiert worden oder wurde durch den InFusion Enzym-Mix religiert.

Zur Überprüfung wurden die Plasmide aus den Bakterien isoliert und mit Spaltung durch Restriktionsenzyme analysiert. Für jede Probe wurden zwei Restriktionsansätze mit je einem Restriktionsenzym benötigt. Anzahl und Moleküllänge der Banden legten nahe, dass die CAR-Sequenz in den Vektor in korrekter Orientierung eingebaut worden war; die Klonierung war somit erfolgreich (*Abb.41*).

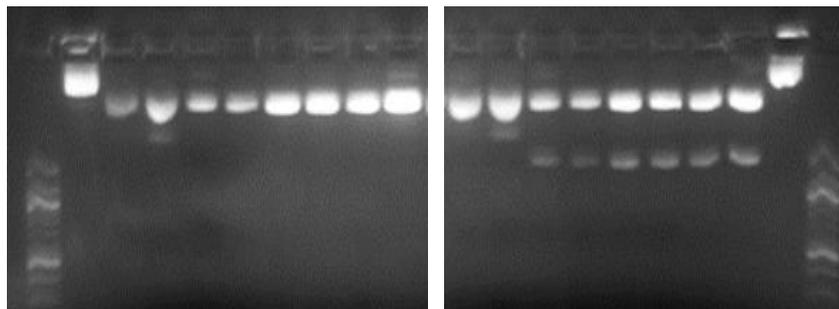


Abb.41: Analytische Spaltung von zwei Negativkontrollen und sechs Proben zur Bestätigung des Plasmids pLVX-EF1 α -CAR.

(1+20) 100 bp DNA-Leiter

(2+19) ungeschnittenes Plasmid pLVX-EF1 α -AcGFP1-N1

(3+4) Negativkontrollen geschnitten mit BsrGI

(5-10) Proben geschnitten mit BsrGI

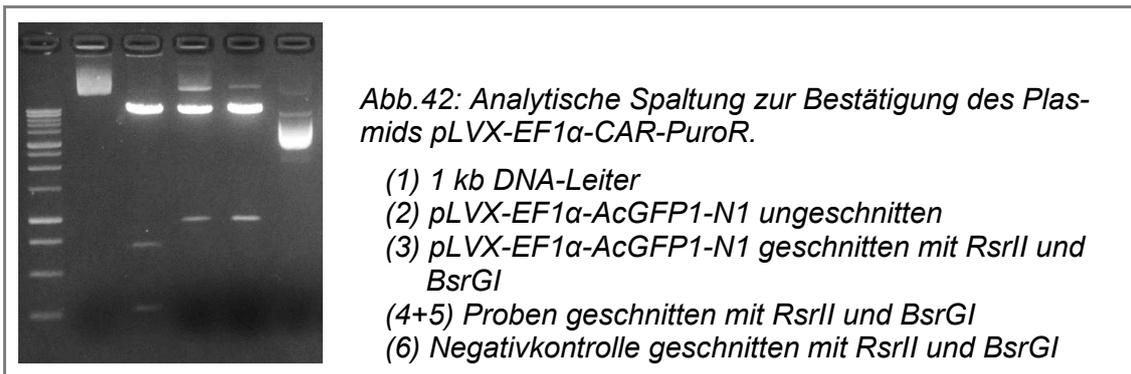
(11+12) Negativkontrollen geschnitten mit PflFI

(13-18) Proben geschnitten mit PflFI

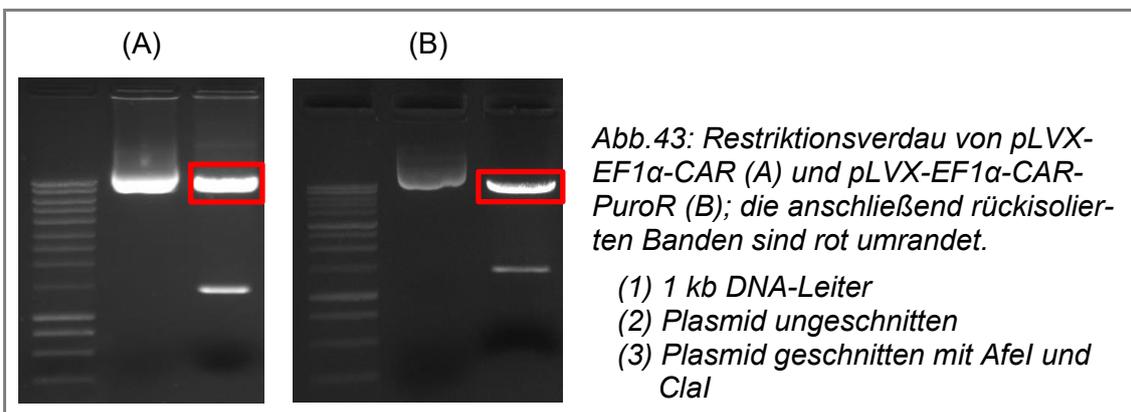
Für die Analyse der Plasmide, welche das Gen für die Puromycinresistenz enthalten sollten, wurden die Restriktionsenzyme RsrII und BsrGI diesmal gleichzeitig in einem Ansatz verwendet. Anzahl der Banden und Fragmentlänge der DNA-Moleküle entsprachen auch hier den Berechnungen (*Abb.42*).

3 Ergebnisse

3.5 Klonierung



Um den Promotor EF1α gegen den SFFV-Promotor auszutauschen, wurden die einzufügende Promotorsequenz und das linearisierte Vektorrückgrat der Plasmide pLVX-EF1a-CAR bzw. pLVX-EF1a-CAR-PuroR durch Restriktionsverdau hergestellt und bei letzteren gleichzeitig die Promotorsequenz entfernt (Abb.43).



Die PCR und die Verlängerung um 15 bp an den Enden der SFFV-Promotorsequenz erfolgte analog zum Einfügen der CAR-Sequenz. Auch hier lief als Standard die DNA-Menge der ausgeschnittenen Sequenz, die für die PCR verwendet wurde; durch die geringe DNA-Menge ist die Bande auch hier nicht zu erkennen.

Der PCR-Ansatz ohne Zusätze scheint quantitativ mehr DNA zu enthalten und das Verfahren somit besser zu funktionieren als bei den PCR-Ansätzen mit DMSO, und DMSO wiederum scheint die PCR weniger zu beeinträchtigen als Mg^{2+} (Abb.44).

Um die Promotorsequenz und das Vektorrückgrat zusammenzufügen, wurde auch hier mit dem InFusion-Verfahren gearbeitet. Nach der Transformation

3 Ergebnisse

3.5 Klonierung

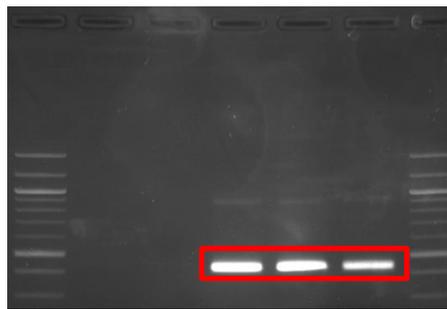


Abb.44: PCR-Produkte der SFFV-Promotor-Sequenz nach Elektrophorese.

- (1+7) 100 bp DNA-Leiter
- (2) SFFV-Sequenz 25 µg
- (3) Negativkontrolle der PCR
- (4) PCR-Produkt
- (5) PCR-Produkt (DMSO)
- (6) PCR-Produkt (Mg²⁺)

wuchsen zahlreiche Bakterienkolonien, während auf den Platten der Negativkontrolle nur vereinzelte Kolonien zu erkennen waren.

Zur Überprüfung des Klonierungserfolges erfolgte eine analytische Spaltung der gewonnenen Plasmide mit den Restriktionsenzymen BsrGI und XmaI.

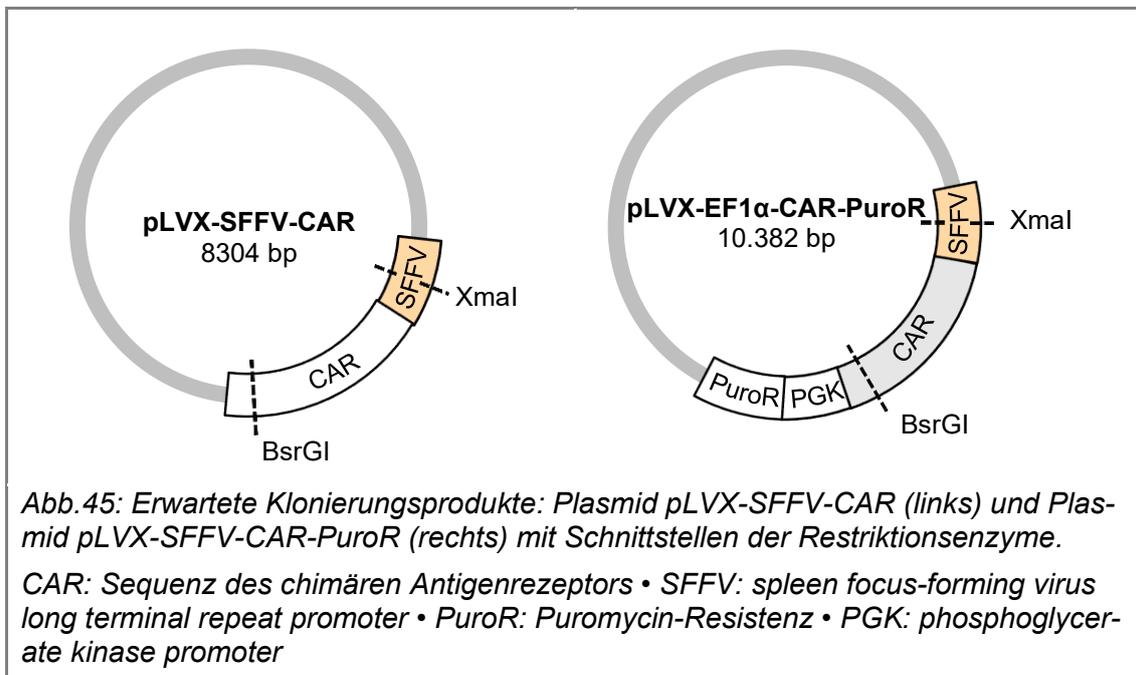


Abb.45: Erwartete Klonierungsprodukte: Plasmid pLVX-SFFV-CAR (links) und Plasmid pLVX-SFFV-CAR-PuroR (rechts) mit Schnittstellen der Restriktionsenzyme.

CAR: Sequenz des chimären Antigenrezeptors • SFFV: spleen focus-forming virus long terminal repeat promoter • PuroR: Puromycin-Resistenz • PGK: phosphoglycerate kinase promoter

Zur Überprüfung, ob das Plasmid pLVX-SFFV-CAR vorlag, waren nach elektrophoretischer Auftrennung der Ansätze bei sechs von elf Proben zwei Banden erkennbar, deren Molekülgröße den Erwartungen von 1660 bp und 6644 bp entsprach. Dieses Ergebnis wurde nach Überimpfung einer Bakterienkolonie und erneuter analytischer Spaltung der isolierten Plasmide bestätigt. Die Molekülgröße der Negativkontrolle scheint der des Plasmides pLVX-EF1α-CAR zu entsprechen. Hierfür ist die wahrscheinlichste Erklärung, dass das Plasmid

3 Ergebnisse

3.5 Klonierung

pLVX-EF1 α -CAR entweder religiert oder im Restriktionsverdau nicht vollständig geschnitten wurde.

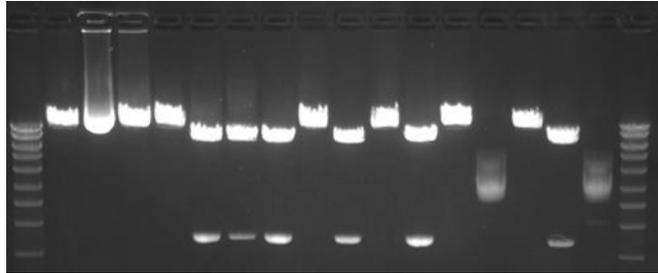


Abb.46: Analytische Spaltung zur Bestätigung des Plasmids *pLVX-SFFV-CAR*.

- (1+18) 1 kb DNA-Leiter
- (2) Negativkontrolle geschnitten mit *BsrGI* und *XmaI*
- (3) *pLVX-EF1 α -CAR* ungeschnitten
- (4) *pLVX-EF1 α -CAR* geschnitten mit *BsrGI* und *XmaI*
- (5-17) Proben geschnitten mit *BsrGI* und *XmaI*

Die analytische Spaltung zur Bestätigung des Plasmids *pLVX-SFFV-CAR-PuroR* erfolgte ebenfalls mit *BsrGI* und *XmaI*. Eine Probe glich dem Plasmid *pLVX-EF1 α -CAR-PuroR*. Das Bandenmuster der übrigen fünf Proben entsprach jedoch den Erwartungen für das Plasmid *pLVX-SFFV-CAR-PuroR*. Somit konnte von einem Erfolg der Klonierung ausgegangen werden.

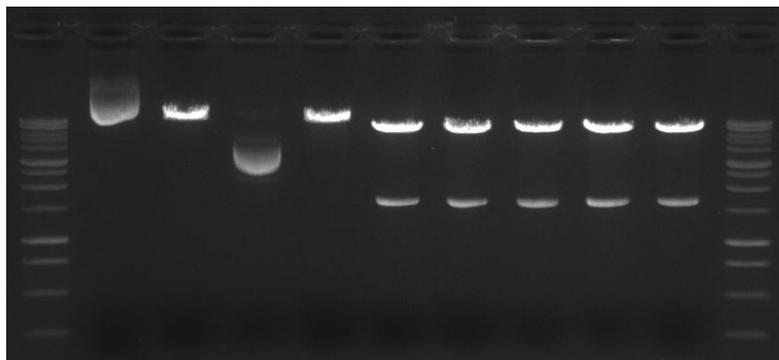


Abb.47: Analytische Spaltung zur Bestätigung des Plasmids *pLVX-SFFV-CAR-PuroR*.

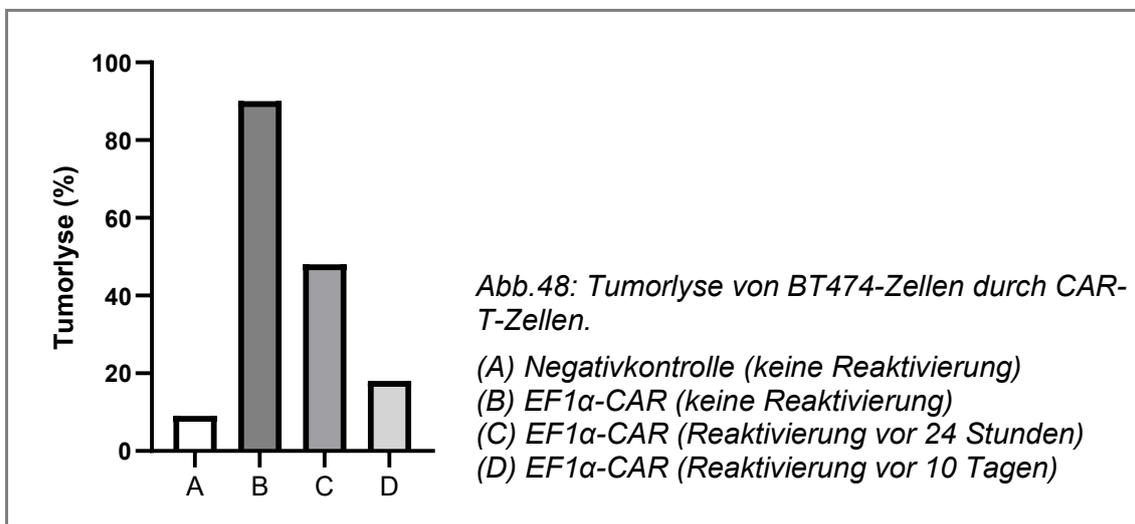
- (1+11) 1 kb DNA-Leiter
- (2) *L1-EF1 α -CAR-PuroR*
- (3) *L1-EF1 α -CAR-PuroR* geschnitten mit *BsrGI* und *XmaI*
- (4) Negativkontrolle geschnitten mit *BsrGI* und *XmaI*
- (5) Probe geschnitten mit *BsrGI* und *XmaI*, Bandenmuster wie *L1-EF1 α -CAR-PuroR*
- (6-10) Proben geschnitten mit *BsrGI* und *XmaI*

3.6 Europium-Release-Assay

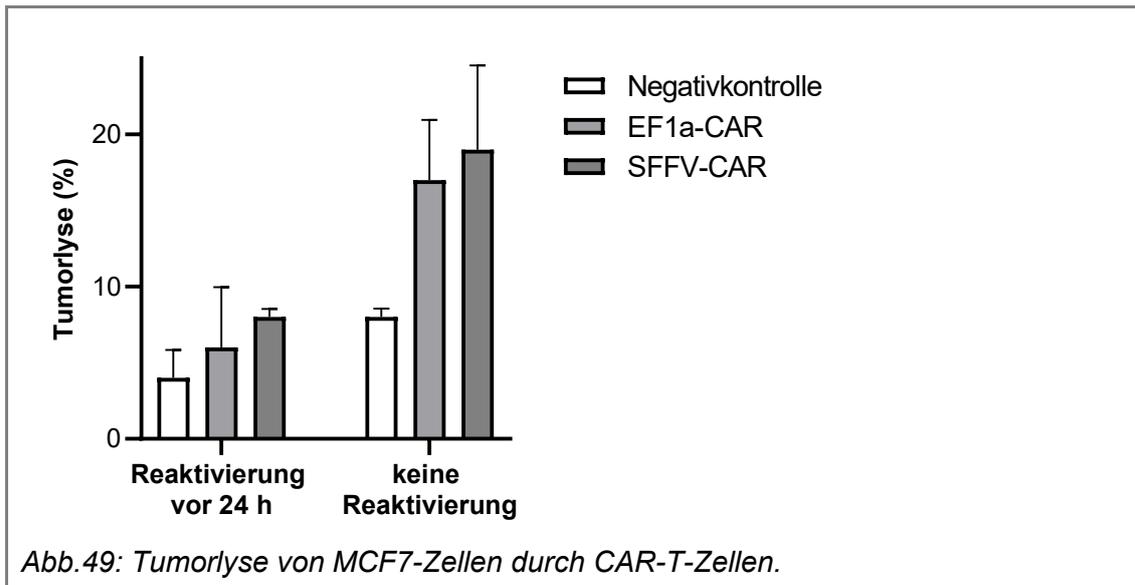
3.6.1 Tumorlyse abhängig vom Zeitpunkt der Reaktivierung

Eine Reaktivierung scheint einen negativen Einfluss auf die zytotoxische Leistung der T-Zellen zu haben. T-Zellen, die am Vortag reaktiviert wurden, zeigen eine deutlich schlechtere Tumorlyse als nicht reaktivierte T-Zellen. Noch schlechter schneiden T-Zellen ab, bei denen die Reaktivierung einige Tage zurücklag.

Als Negativkontrolle dienten nicht transduzierte T-Zellen. Effektorzellen waren T-Zellen, die zu 55% den CAR-Rezeptor exprimierten (N=1). Die Viabilität der Negativkontrolle lag in diesem Versuch deutlich unter der der CAR-T-Zellen.



Auch bei Verwendung der Tumorzelllinie MCF7 zeigten die 24 Stunden vor dem Europium-Release-Assay reaktivierten T-Zellen und insbesondere die CAR-T-Zellen eine weniger effektive Zerstörung der Tumorzellen. Der Anteil der CAR-T-Zellen an der T-Zell-Population betrug im Durchschnitt 28% (N=3).



3.6.2 Tumorlyse abhängig von der Zelllinie

Die T-Zellen im folgenden Versuch waren an Tag 5 reaktiviert und die CAR-positiven T-Zellen ab Tag 8 mit Puromycin selektiert worden. Die Reaktivierung fand vor Selektion statt, um eine erhöhte Expression der Puromycin-N-acetyltransferase zu erreichen. Als Negativkontrolle dienten mit einem „Leervirus“ infizierte T-Zellen.

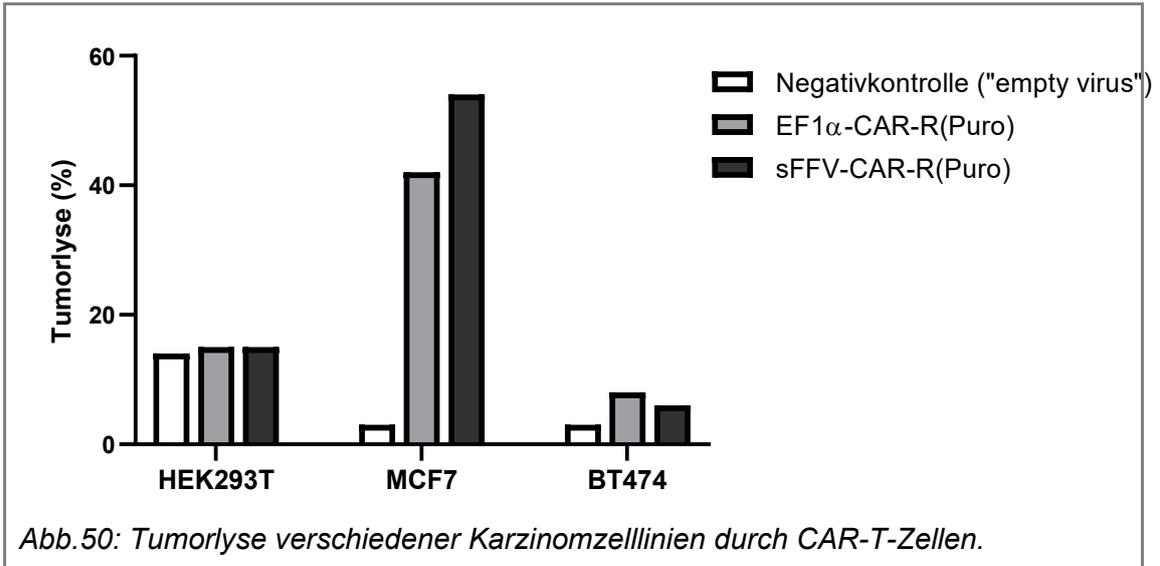
Das Ausmaß der Zerstörung der Malignomzellen hing auch von der Tumorzelllinie ab. HEK293T-Zellen exprimieren kein HER2/neu, und CAR-T-Zellen und T-Zellen hatten hier einen nahezu identischen tumorlytischen Effekt. Allerdings provozierten diese Tumorzellen eine deutlich höhere unspezifische Immunantwort der CAR-negativen T-Zellen als die anderen beiden Tumorzelllinien (N=2).

Der deutlichste Unterschied zwischen CAR-T-Zellen und T-Zellen war bei MCF7-Zellen zu sehen. Gegenüber BT474-Zellen zeigten die CAR-T-Zellen eine deutlich weniger effektive zytotoxische Aktivität (N=2, abgebildet N=1).

Ein Unterschied zwischen den CAR-T-Zellen mit SFFV- oder EF1 α -Promotor war nicht sicher festzustellen (N=1).

3 Ergebnisse

3.6 Europium-Release-Assay



4 Diskussion

4.1 Wahl der Bausteine für die DNA-Sequenz

4.1.1 Aufbau des chimären Antigenrezeptors

Der Aufbau des in diesen Versuchen verwendeten chimären Antigenrezeptors orientierte sich an bereits verwendeten Rezeptoren.

Wie bei Morgan et al.²⁰⁰ basierte die Antigenerkennung durch ein *single chain variable fragment* (durch einen Linker verbundene variable Domänen der schweren und leichten Kette eines Antikörpers; scFv) auf Trastuzumab. Auch der Spacer, die Transmembrandomäne und der Beginn der zytoplasmatischen Domäne, welche aus der CD8 α -Sequenz übernommen wurden, beruhen auf dem dort verwendeten CAR. Der Aufbau der intrazellulären Domäne dagegen stammt von Pule et al.²⁰¹ und bestand aus CD28, CD134 (OX40) und CD3 ζ . Der in dieser Arbeit verwendete CAR ist also in die dritte Generation einzuordnen.

CD28 hat keinen Einfluss auf die Antigenbindung, und auch der Effekt auf die zytotoxische Aktivität der T-Zellen ist vernachlässigbar gering.²²⁷ Es spielt aber eine wichtige Rolle für die Proliferation und IL-2-Sekretion.²²⁸ Eine CD28-Costimulation verhindert außerdem die Entstehung aneurer T-Zellen.³³ Durch Zugabe von IL-2 in die Zellkultur haben CAR-T-Zellen mit und ohne CD28 ähnliche zytotoxische Wirkung auf Tumorzellen, ohne externe Zugabe von IL-2 dagegen sind die CAR-T-Zellen mit CD28 in vitro effektiver.²²⁹ Auch in vivo zeigen CARs mit CD28 eine bessere Tumorkontrolle.²³⁰

In einem CAR sollte CD28 als erste Signaldomäne nach der Membran angeordnet sein, da bei einem weiter distal in der Signalkette angeordneten CD28 die IL-2-Sekretion und damit die Funktion von CD28 deutlich schlechter ist²³¹.

Das zur Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie gehörende CD134 (Synonym: OX40) wird einige Stunden bis Tage nach Aktivierung auf T-Zellen exprimiert^{170 232}; der zugehörige Ligand befindet sich auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen²³³.

4 Diskussion

4.1 Wahl der Bausteine für die DNA-Sequenz

Die OX40-Aktivierung bewirkt ein Überleben der T-Zellen durch die Hochregulation von antiapoptotischen Proteinen und ist außerdem wichtig für die Proliferation.^{234 235} Zusätzlich verstärkt das Signal die Aktivierung und Funktion der T-Zellen, da es zu einer vermehrten Produktion von Zytokinen und Expression von Zytokinrezeptoren führt.^{234 235}

OX40 verhindert die Umwandlung von T-Effektor-Zellen in regulatorische T-Zellen, indem es FoxP3 hemmt; es unterdrückt also die inhibitorischen T_{REG} und fördert die T-Gedächtniszell-Entwicklung.^{236 237} Es führt aber auch zu einer Proliferation der regulatorischen T-Zellen^{238 239} und ist für deren Überleben wichtig²⁴⁰. Paradoxe Weise scheint eine OX40-Stimulation in Kombination mit IL-2 eine Rolle bei der Suppression der Transplantatrejektion zu spielen.^{240 241}

Die zytotoxische Aktivität *in vitro* war bei Verzicht auf externe Zugabe von IL-2 besser, wenn die Signalkette des CARs den Rezeptor OX40 statt 4-1BB enthielt; auch war *in vivo* die Tumorsuppression des Drittgenerations-CARs besser als bei der zweiten Generation.²²⁹ CAR-T-Zellen mit einer aus CD28-OX40-CD3 ζ bestehenden intrazellulären Domäne waren auch nach sechs Wochen noch in der Lage, Tumorzellen abzutöten.²⁰¹ Zellkulturen mit T-Lymphozyten, welche eine CD28-CD3 ζ -Signalkette exprimierten, waren bereits vor diesem Zeitpunkt zugrunde gegangen.²⁰¹

Eine Alternative zu CD134 wäre CD137 (4-1BB). Natürlich vorkommende CD137-positive T-Zellen unterdrücken das Tumorstadium *in vivo*, CD137-negative T-Zellen dagegen nicht²⁴².

Auf die Frage, ob CD134 oder CD137 überlegen ist, gibt es widersprüchliche Angaben. In einer Studie war die tumorlytische Aktivität von OX40-beinhaltenen CAR-T-Zellen besser als bei CD137 in der Signaldomäne²⁴³. In anderen Arbeiten bewirkten die CAR-T-Zellen nach dem Austausch von CD134 gegen CD137 zwar eine ähnliche Lyse der Malignomzellen *in vitro*, CAR-T-Zellen mit CD137 in der Signalkette unterdrückten jedoch *in vivo* das Tumorstadium effektiver²⁴⁴ und zeigten nach 60 Tagen ein besseres Überleben und eine geringere PD1-Expression²⁴⁵.

4 Diskussion

4.1 Wahl der Bausteine für die DNA-Sequenz

Der unersetzbare Baustein der intrazellulären Signalkette ist eine Domäne, die einen oder mehrere ITAMs besitzt. CD3 ζ besitzt drei ITAMs und spielt als Teil des T-Zell-Rezeptor-Komplexes eine wichtige Rolle bei der Initiierung des TCR-Signals¹⁵³. Allerdings ist dieses Signal alleine für die Aktivierung der T-Zellen unzureichend^{246 192}.

Anders als anfänglich angenommen, hat die Transmembrandomäne (TM) durchaus Einfluss auf die Funktion der CAR-T-Zellen. CD3 ζ -Transmembrandomänen der CARs bilden Homodimere mit den entsprechenden Gegenstücken der TCR-Komplexe; eine Mutation dieses Bausteins beeinträchtigt auch die Funktion der CAR-T-Zellen.²⁴⁷

So zeigen CAR-T-Zellen, deren TM und Spacer eine CD8 α -Sequenz besitzen, im Vergleich zu solchen mit CD28-Elementen eine geringere Zytokinsekretion, einen geringeren Anteil an phosphorylierten ITAMs, aber auch einen geringeren Anteil an Zellen, die durch *activation-induced cell death* (AICD) starben.²⁴⁸ Proliferation und tumorlytisches Potential waren dagegen nicht signifikant unterschiedlich.²⁴⁸

Der extrazelluläre Spacer fungiert als Verbindungsstück zwischen TM und scFv. Er verändert die Expression des CARs^{228 249}, beeinflusst das Aktivierungssignal²⁵⁰ und spielt eine entscheidende Rolle für die Funktion des Rezeptors^{249 251}. Während der extrazelluläre Spacer die Funktion des Anti-CD30-CARs von Hombach et al.²⁵⁰ beeinträchtigte, wurde eine effektive Antigenbindung und Tumorlyse von HER2/neu-positiven Tumorzellen durch eine Spacer-Sequenz im Rezeptoraufbau von Moritz et al. erst ermöglicht^{249 252}. Auch bei ROR1-spezifischen CAR-T-Zellen ist die Länge des Spacers für die Funktion essentiell.²⁵³ Eine Erklärung wäre, dass die Notwendigkeit eines Verbindungsstücks abhängig von der Zugänglichkeit des Antigens ist; bei einem distalen CD19 kann vielleicht auf einen Spacer verzichtet werden, bei membranahen Zielstrukturen dagegen scheint ein flexibles Verbindungsstück von Vorteil zu sein.^{253 254} Die Struktur könnte aber auch die Ursache für unerwünschte Nebenwirkungen sein. Ein Spacer, der eine Antikörper-Sequenz besaß, war in einer Studie Auslöser einer immunologischen Reaktion gegen ebendiese Sequenz²⁵⁵. Dies wurde in Versuchen mit einem

4 Diskussion

4.1 Wahl der Bausteine für die DNA-Sequenz

gegen CD19 gerichteten Rezeptor mit einem langen Spacer bestätigt, da sich die CAR-T-Zellen in der Lunge der Mäuse anreicherten und dort unspezifisch aktiviert wurden, was zur T-Zell-Erschöpfung führte.²⁵³ Eine Veränderung in der Sequenz des Spacers stellte die tumorlytische Funktion wieder her.²⁵³

In klinischen Studien wurde die CAR-T-Zell-Therapie bisher bei hämatologischen Malignomen erfolgreich angewendet²⁵⁶, der Einsatz bei soliden Tumoren bleibt Gegenstand der Forschung. Der in dieser Arbeit verwendete Rezeptor ist gegen das Antigen HER2/neu gerichtet, welches zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren (*human epidermal growth factor receptor*, HER) gehört und von verschiedenen Epithelzellen exprimiert wird²⁵⁷. Besondere Bedeutung hat HER2/neu in der Diagnostik und Therapie von Mammakarzinomen. Etwa 25-30% dieser Malignome weisen eine Überexpression von HER2/neu auf²⁵⁸ und sind damit für die Anwendung von Trastuzumab qualifiziert^{259 260}. Wie bei Zhao et al.²⁶¹ stammte die Antigenbindungsstelle des CARs in dieser Arbeit von der des humanisierten Antikörper Trastuzumab.

Auch für andere Karzinome ist eine HER2/neu-Überexpression beschrieben, zum Beispiel für Ovarialkarzinome²⁶², Kolonkarzinome^{263 264}, Magenkarzinome^{260 265 266} und Medulloblastome^{267 268}. Der Marker ist mit einer schlechteren Prognose assoziiert^{267 269}.

HER2/neu ist allerdings auch auf der Oberfläche von gesunden Myokardzellen²⁷⁰ und Epithelzellen zu finden, unter anderem in Brustgewebe, im Gastrointestinaltrakt, in der Lunge, den ableitenden Harnwegen und der Haut²⁵⁷. Folglich ist der hier verwendete chimäre Antigenrezeptor nur zu Forschungszwecken verwendbar. Er wurde bereits in einer klinischen Studie eingeführt, welche aufgrund eines Todesfalles abgebrochen wurde²⁰⁰.

4.1.2 Promotoren

In dieser Arbeit wurden zwei Promotoren vor der CAR-Gensequenz verwendet, der humane EF1 α (*human elongation factor-1 α*)-Promotor und der virale SFFV (*spleen focus-forming virus*)-Promotor.

4 Diskussion

4.2 Vergleich der Klonierungsmethoden

Signifikante Unterschiede bei Verwendung verschiedener Promotoren konnten weder in der Expression des CARs noch bei der Lyse der Malignomzellen in vitro festgestellt werden. Auch in der Literatur sind die Angaben widersprüchlich und von der transduzierten Zelllinie abhängig. Bei induzierten pluripotenten Stammzellen bewirkte der EF1 α -Promotor eine vermehrte Transkription des Transgens²⁷¹, bei Fibrosarkomzellen²⁷¹ und B-Lymphozyten²⁷² dagegen war der SFFV-Promotor in dieser Hinsicht überlegen. Im Mausmodell zeigten CAR-T-Zellen mit EF1 α -Promotor eine höhere Expression des Rezeptors, eine höhere T-Zell-Erschöpfung und somit eine geringere Tumorkontrolle als bei Verwendung eines CMV- oder PGK-Promotors.²⁷³

Allerdings sind diese Ergebnisse kritisch zu betrachten, da auch verschiedene Varianten des EF1 α -Promotors in verschiedenen Expressionsintensitäten resultieren können²⁷⁴.

Die Verwendung des physiologischeren EF1 α -Promotors ist dennoch zu bevorzugen, da für die Therapie eines Menschen weniger Nebenwirkungen zu erwarten sind; so erhöht ein SFFV-Promotor das Malignomrisiko, indem es Mutationen verursacht und Protoonkogene aktiviert.²⁷⁵ Außerdem könnte der SFFV-Promotor als viraler Genombestandteil identifiziert und durch Methylierung „abgeschaltet“ werden, wodurch die CAR-T-Zell-Therapie ineffektiv würde.²⁷⁶

4.2 Vergleich der Klonierungsmethoden

Im Vergleich zur klassischen Klonierung mit Restriktionsenzymen und DNA-Ligase erwies sich die InFusion®-Methode als deutlich effizienter. Die Anzahl der mit dem Klonierungsprodukt transformierten Kolonien war deutlich größer, und ein höherer Anteil dieser Kolonien besaß tatsächlich das gewünschte Plasmid. Zusätzlich war die InFusion®-Methode unabhängiger von den Zielsequenzen der Restriktionsenzyme. Zwar wurden Schnittstellen benötigt, aber die Enden von Vektor und einzufügender Gensequenz mussten diesbezüglich nicht zueinander passen; außerdem konnte eine begrenzte Anzahl an Basenpaaren durch die Verlängerung der Enden während der PCR wieder eingefügt werden, falls eine

4 Diskussion

4.3 Vergleich der Kulturmedien

Durchtrennung des DNA-Moleküls an einer genauen Lokalisation nicht möglich war.

Bezüglich des finanziellen Aspekts war die klassische Klonierung im Einzelversuch günstiger, was aber durch den hohen Materialverbrauch und die Arbeitszeit für die Fehlversuche relativiert wurde.

4.3 Vergleich der Kulturmedien

4.3.1 Humanserum

Ausgangsbasis unseres Protokolls war das einer klinischen Studie aus Philadelphia mit gegen CD19 gerichteten CAR-T-Zellen²⁵⁶, in welchem X-Vivo 15 mit 5% Humanserum verwendet wurde.

Bei Zugabe von Humanserum zu X-Vivo 15 war eine deutlich bessere Proliferation der Lymphozyten zu beobachten als ohne diesen Zusatz. In diesem Medium konnten die Zellen jedoch auch ohne das Serum über einen Zeitraum von über 16 Tagen expandieren.

Der Zusatz von FCS oder Humanserum in Medien zeigte auch in anderen Arbeitsgruppen eine deutlich bessere Zellproliferation.^{277 278} Des Weiteren ist die Zugabe von Serum auch eine Annäherung an die physiologischen Bedingungen in vivo. Im Vergleich zeigten in Zellkulturmedien mit Humanserum aktivierte T-Lymphozyten eine deutlich höhere Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD69 als in Medien mit FCS sowie eine höhere Zytokin-Freisetzung der CD8+ Lymphozyten.²⁷⁷ Außerdem zeigten CAR-T-Zellen bei Verwendung von Medien mit 5% Humanserum eine höhere Expression des Aktivierungsmarkers CD25 als in serumfreiem X-Vivo²⁷⁷, während die Verwendung von serumfreiem Medium zu Veränderungen der Genexpression führte²⁷⁸.

Dennoch erfolgte weitgehend ein Wechsel auf serumfreies Medium. Die komplexe und individuell unterschiedliche Zusammensetzung von Serum, abhängig von Spender und Hersteller, stellen einen nicht ausreichend zu kalkulierenden Faktor dar, wie Lutz et al. für dendritische Mauszellen in FCS nachwiesen; die Zellen wiesen große Unterschiede in Funktion, Oberflächenexpression und

4 Diskussion

4.3 Vergleich der Kulturmedien

Proliferation auf, abhängig vom Überwiegen inhibitorischer oder aktivierender Faktoren im Serum.²⁷⁹ Und selbst dasselbe Serum eines Spenders zeigte in einer Studie im Massenspektrometer eine Veränderung des proteomischen Profils in Abhängigkeit von der Lagerungszeit und -temperatur.²⁸⁰ Dies galt auch für Serum, das bei -80°C gelagert wurde.²⁸⁰

Ausschlaggebend war allerdings, dass Serumbestandteile Einfluss auf immunologische Reaktionen haben können. So zeigten in FCS-haltigem Medium gezogene Tumorzellen beispielsweise ein Antigen, das später mit Humanserum reagieren kann.²⁸¹ In Humanserum gezogene Tumorzellen zeigten dieses Antigen nicht.²⁸¹ Dass Kulturmedium und Aktivierung eine nicht-spezifische Zytotoxizität verursachen können, die gegen Gewebe und Zellen autologen Ursprungs gerichtet ist, wurde an mit Lektin aktivierten Lymphozyten gezeigt^{282 283}.

Die Befürchtung war also, dass T-Zellen, die in serumhaltigem Medium im nicht physiologischen Milieu einer in-vitro-Zellkultur aktiviert und kultiviert werden, gegen Humanserumbestandteile gerichtet sein könnten. Die Selektionsmechanismen, welche in einem Organismus autoreaktive Zellen unschädlich machen, sind in vitro kaum vorhanden. Und wenn man in Erwägung zieht, dass die bisher erfolgreichste Studie mit gegen CD19 gerichteten CAR-T-Zellen durchgeführt wurde, und CD19 auch ein Marker für gesunde B-Zellen ist, scheinen CAR-T-Zellen nach Infusion in Patienten nicht effektiv supprimiert zu werden.

Eine Überlegung wäre dennoch, das Humanserum zukünftig in manchen Experimenten in vitro zu verwenden, vor allem für weitere Versuche mit einer Puromycin-Selektion, um möglicherweise die Letalität der Zellen zu verringern. Eine solche Selektion muss für klinische Studien überhaupt nicht vorgenommen werden, da keine Notwendigkeit für eine Elimination der patienteneigenen T-Lymphozyten, die nicht genetisch verändert sind, besteht; sie können dem Patienten wieder infundiert werden. Bei einer Studie in Philadelphia beispielsweise war der Anteil an infundierten T-Zellen, die den chimären Antigenrezeptor besaßen, etwa 5%²⁵⁶. In vitro jedoch erschweren solch kleine Subpopulationen das Erreichen von signifikanten Ergebnissen.

4.3.2 Vergleich unterschiedlicher Konzentrationen von IL-2

Bezüglich des Vergleichs der verwendeten Konzentrationen für IL-2 entschieden wir uns für 30 U/ml, da dies eine ausreichende Zellproliferation gewährleistete. Unnötig hohe Dosierungen von IL-2 führen zu verstärkter Differenzierung hin zu T-Effektorzellen, während niedrigere Konzentrationen in weniger differenzierten T-Gedächtniszellen resultieren²⁸⁴, welche eine bessere Tumorkontrolle im Mausmodell bewirken²⁸⁵. Allerdings verstärken geringere IL-2-Konzentrationen die inhibitorische Funktion von regulatorischen T-Zellen²⁸⁶, was sich wiederum kontraproduktiv auf die tumorlytische Funktion der CAR-T-Zellen auswirken könnte.

4.3.3 Vergleich der verschiedenen Zytokine

In unserem Versuch war die Proliferation mit 10 ng/ml IL-15 etwas besser als mit 30 U/ml IL-2, wobei IL-15 besonders gegen Ende der 16-tägigen Zellkultur eine kontinuierliche Proliferation bewirkte. Der Anteil an FoxP3-positiven CD4-Zellen war in einer Zellkultur mit Zugabe von IL-15 geringer. Leider ist dieses Zytokin auch deutlich teurer als IL-2.

Auch von anderen Arbeitsgruppen wurde IL-15 als vorteilhaft beschrieben.

Die Wahl des Zytokins hatte zum einen Einfluss auf die Differenzierung der T-Zellen in der Zellkultur. So bewirkt IL-15 verglichen mit IL-2 eine bessere Erhaltung des T_{SCM}-Phänotyps (T-Gedächtnis-Stammzelle, *T memory stem cell*) sowohl in der CD4- als auch in der CD8-positiven T-Lymphozytensubpopulation²⁸⁷. Diese T-Gedächtnis-Stammzellen verfügen über stammzellartige Fähigkeiten; sie können zu zentralen Gedächtnis-T-Zellen (*central memory T cell*, T_{CM}), Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (*effector memory T cell*, T_{EM}) und Effektorzellen differenzieren.²⁸⁸ Diese antigenspezifischen Zellen besitzen Marker von naiven T-Lymphozyten und Gedächtniszellen und sind somit vermutlich eine frühe Differenzierungsstufe nach den naiven T-Zellen und vor T_{CM} und T_{EM}.²⁸⁸ Sie können nach Antigenkontakt rasch zu Effektorzellen differenzieren und proliferieren bei einer Kombination von IL-15 und IL-7 schneller als die beiden anderen Subpopulationen.²⁸⁸ Außerdem zeichnen sie sich durch ein längeres Überleben und eine bessere Tumorbekämpfung aus.²⁸⁸ IL-2 dagegen führt zu mehr kurzlebigen Effektor-

4 Diskussion

4.3 Vergleich der Kulturmedien

T-Zellen.²⁸⁷ Diese können zwar eine gute zytotoxische Aktivität in vitro erreichen, zeigen aber eine schlechtere Tumorkontrolle im Mausmodell.²⁸⁹

Bezüglich der CD4/CD8-Ratio ließ sich allerdings kein entscheidender Unterschied feststellen. Sowohl bei IL-2 als auch IL-15 sank der CD4-Anteil^{287 290}.

IL-2 verursachte mehr T-Zell-Erschöpfung, was an einer höheren Synthese von entsprechenden Markern wie LAG3, CD244, CTLA4 oder PD1 gemessen wurde, und eine erhöhte Apoptoserate²⁹¹ mit gesteigerter Expression von Caspase 3 und mit verringerter Expression des antiapoptotischen BCL2²⁹².²⁸⁷ Auch war eine vermehrte Differenzierung hin zu FoxP3-exprimierenden regulatorischen T-Zellen zu erkennen.²⁸⁷

Bei Kontakt mit den für sie spezifischen Tumorzellen zeigten mit IL-15 kultivierte T-Zellen eine höhere Proliferationsrate und eine bessere Tumorlyse in vitro sowie eine bessere Tumorkontrolle im Mausmodell.²⁸⁷

Einige Arbeitsgruppen kombinierten verschiedene Interleukine, beispielsweise IL-21 und IL-2 für die Zellkultur von Anti-CD19-CAR-T-Zellen, was zu einer besseren Tumorlyse im Tiermodell führte als bei mit IL-2 kultivierten Zellen²⁹³. Eine häufig verwendete Mischung war die von IL-7 und IL-15; verglichen mit IL-2 resultierte sie in einem höheren Anteil eines T_{SCM}-ähnlichen Phänotyps, einer geringeren Anzahl von regulatorischen T-Zellen und einem stabileren CD4/CD8-Quotienten durch eine geringere Erschöpfung und AICD der CD8-Zellen.^{294 295} Es war kein Unterschied in der Antigenpezifität oder der Tumorlyse in vitro zu erkennen, in vivo dagegen korrelierte die Zytokinkombination mit einem verlängerten Überleben der Mäuse.^{294 295} Bei der Auswertung im Rahmen einer klinischen Studie hatten Patienten mit einem höheren Anteil eines T_{SCM}-ähnlichen Phänotyps innerhalb ihrer CAR-T-Zell-Population, also CD8⁺CD45RA⁺CCR7⁺, auch eine höhere Konzentration von CAR-T-Zellen im Blut.²⁹⁵

Allerdings gab es auch kritische Ergebnisse bezüglich der Zytokinkombinationen. So führte die Kombination IL-15 mit IL-21 oder IL-7 im Vergleich mit IL-15 zu

4 Diskussion

4.4 Aktivierung und Reaktivierung

einem geringeren T_{SCM}-Anteil und einer vermehrten Expression von inhibitorischen Rezeptoren sowie einer schlechteren Tumorkontrolle im Mausmodell.²⁸⁷

All die oben genannten Studien verwendeten CAR-T-Zellen, welche gegen CD19 gerichtet waren. Auch bei Verwendung eines gegen Neuroblastom- oder Melanomzellen gerichteten CAR (Anti-GD2-CD28-OX40-CD3ζ) war die tumorlytische Aktivität in vitro bei IL-2 schlechter als bei IL-7 kombiniert mit IL-15²⁹⁶. Bei NY-ESO-1-spezifischen T-Zellen dagegen war kein Unterschied bezüglich deren zytotoxischer Aktivität bei IL-2 oder IL-7 mit IL-15 festzustellen, auch wenn die Zytokinkombination den T_{SCM}-ähnlichen Phänotyp begünstigte.²⁹⁷

Nach Abwägung von Vor- und Nachteilen ist die Verwendung von IL-15 in der Zellkultur der von IL-2 vorzuziehen.

4.4 Aktivierung und Reaktivierung

4.4.1 Anergie, T-Zell-Erschöpfung und Activation-Induced Cell Death

Anergie entsteht durch die unvollständige Aktivierung einer T-Zelle, wenn diese nur durch ein T-Zell-Rezeptor-Signal, ausgelöst zum Beispiel durch Bindung eines spezifischen Antigens, stimuliert wird ohne zusätzliche Signale durch costimulatorische Rezeptoren.²⁹⁸ Eine anerge T-Zellen ist hyporeaktiv, das heißt sie zeigt bei Antigenkontakt keine Reaktion mehr, so ist beispielsweise die Zytokinproduktion nicht mehr signifikant.²⁹⁸ Ein wichtiges costimulatorisches Signal zur Verhinderung von Anergie wird über den Rezeptor CD28 vermittelt.³³

T-Zell-Erschöpfung dagegen entsteht bei wiederholter Restimulation oder wiederholtem Antigenkontakt. Erkrankungen, in deren Verlauf eine solche Funktionsstörung auftreten kann, sind beispielsweise chronische Virusinfektionen oder Malignome; betroffen können sowohl CD4- als auch CD8-positive T-Zellen sein.²⁹⁹ Im Gegensatz zur Anergie beschreibt die Erschöpfung einen graduellen Prozess mit verschiedenen Phasen des Funktionsverlustes, beginnend mit Einstellung der IL-2-Produktion, einer geringeren Proliferationsrate sowie einer verminderten tumorlytischen Aktivität.³⁰⁰ Im weiteren Verlauf verlieren die T-Zellen immer mehr Funktionen. Zunächst ist die Synthese von TNF verringert, und

4 Diskussion

4.4 Aktivierung und Reaktivierung

schließlich setzt die IFN- γ -Freisetzung, die Expression von aktivierenden Rezeptoren und die Fähigkeit zur Degranulation immer weiter aus.³⁰⁰ Stattdessen steigt die Expression von inhibitorischen Rezeptoren wie PD1, CTLA4 oder LAG3.³⁰¹ Anfangs ist eine Wiederherstellung der T-Zell-Funktion ganz oder teilweise möglich. Blackburn et al. beschrieben verschiedene Subpopulationen von erschöpften CD8-Zellen, die sich hinsichtlich ihres Ansprechens auf eine Blockade von PD-L1 (*programmed cell death ligand 1*) und PD1 unterschieden: bei einer Subpopulation bewirkte die Blockade eine Rückbildung der Erschöpfung, eine andere zeigte weiterhin keine Reaktion bei Antigenkontakt; die Erschöpfung schien zu weit fortgeschritten und nicht mehr umkehrbar.^{302 303} Das finale Stadium der T-Zell-Erschöpfung ist der programmierte Zelltod (*activation-induced cell death*, AICD).³⁰⁰

Viele CAR-T-Zellen scheinen dauerhaft ein erhöhtes Aktivierungsniveau zu besitzen und sind damit anfälliger für Erschöpfung und AICD.³⁰⁴ Nach Transfusion im Rahmen einer klinischen Studie nahm die Konzentration von CAR-T-Zellen rasch ab und sie exprimierten PD1 und PD-L1.³⁰⁴ Das Ausmaß des Zellverlustes hängt sowohl von der Konzentration des Antigens als auch von der Anzahl der Restimulationen ab.³⁰⁴

Der Einfluss des permanent erhöhten Aktivierungsniveaus auf die T-Zell-Funktion zeigte sich bei der Verwendung verschieden zusammengesetzter Bauteile der CARs. Je stärker die Aktivierungssignale durch die intrazellulären Domänen waren, desto schlechter war die Tumorbekämpfung der T-Zellen *in vivo*. So war beispielsweise ein CAR der zweiten Generation, dessen Signaldomäne aus CD28 und CD3 ζ bestand, erfolgreicher bezüglich der Tumorkontrolle im Mausmodell als ein Rezeptor der dritten Generation mit einer angefügten OX40-Sequenz.³⁰⁵ Die Überlegenheit von Rezeptoren der zweiten Generation bezüglich der Tumolyse *in vivo* galt auch für CAR-T-Zellen mit einer CD137-CD3 ζ -Signalkette gegenüber solchen mit einer CD28-CD137-CD3 ζ -Domäne.³⁰⁶ Im Vergleich zweier CARs der zweiten Generation waren die Zellen mit einer CD28-CD3 ζ -Sequenz schneller erschöpft als bei Austausch von 4-1BB gegen CD28.³⁰⁷ Eine interessante Beobachtung war auch, dass sich aus den Ergebnissen für die

4 Diskussion

4.4 Aktivierung und Reaktivierung

tumorlytische Aktivität in vitro nicht unbedingt Rückschlüsse auf das Verhalten der CAR-T-Zellen in vivo ziehen lassen.^{289 306 307}

Auch wenn der FAS-Signalweg bei der Initiierung des AICD eine Rolle zu spielen scheint³⁰⁶, bewirkt eine Blockade von FAS ein längeres Überleben der T-Zellen auf Kosten der zytotoxischen Funktion³⁰⁴. Die Blockade von PD1 dagegen verlängert die Lebensdauer der CAR-T-Zellen und erhält deren tumorlytisches Potential.³⁰⁴ Bei PD-L1-exprimierenden Malignomen ist die Tumorlyse sogar verstärkt.³⁰⁴ Auch in einer klinischen Studie schien die zusätzliche Blockade von PD1 einen Überlebensvorteil zu bieten.³⁰⁸

Eine Studie von Long et al. versuchte die Ursache der kontinuierlichen Aktivierung zu finden. Sie verglichen CARs der zweiten Generation mit identischer intrazellulärer CD28-CD3 ζ -Signaldomäne, die sich aber in der Antigenpezifität unterschieden. Sie beobachteten unterschiedlich starke Expressionen von Markern der T-Zell-Erschöpfung; lediglich die CD19-spezifischen CAR-T-Zellen zeigten kaum derartige Marker. Die Antigenbindungsstelle selbst hatte also Einfluss auf die T-Zell-Erschöpfung. In der Folge versagte der Anti-GD2-CAR bei der Tumorkontrolle im Mausmodell, während die gegen CD19 gerichteten CAR-T-Zellen die malignen Zellen erfolgreich eliminierten, obwohl beide Rezeptoren eine ähnliche zytotoxische Aktivität in vitro verursachten. Die T-Zell-Erschöpfung war unabhängig von der Antigenbindung und mit einer Clusterbildung assoziiert, während sich die Anti-CD19-CARs gleichmäßig über die Zelloberfläche verteilten. Nach Ausschluss von Linker, Spacer und Antigenerkennungssequenzen als mögliche Verursacher der Rezeptor-Interaktionen, bewirkte der Austausch von Gerüstregionen im scFv im Anti-CD19-CAR eine vorher nicht vorhandene T-Zell-Erschöpfung; allerdings führte umgekehrt ein Ersetzen der Rahmenstruktur im Anti-GD2-CAR durch die jeweiligen Sequenzen des Anti-CD19-scFvs zu einer fehlenden CAR-Expression.³⁰⁷

Die Balance zwischen unvollständiger Aktivierung, welche zu Anergie führt, und der kontinuierlichen oder übermäßigen Aktivierung der T-Zellen, welche zu Erschöpfung führt, ist also ausschlaggebend für die Tumorbekämpfung. Die Identifizierung entsprechender scFv-Sequenzen und der Aufbau des chimären

4 Diskussion

4.4 Aktivierung und Reaktivierung

Antigenrezeptors, welche diese Kriterien erfüllen, sind weiterhin Gegenstand der Forschung und beeinflussen entscheidend den Erfolg einer CAR-T-Zell-Therapie.

4.4.2 Aktivierung

Wie bei vielen Forschungsgruppen^{256 309} wurden auch in dieser Arbeit zur Aktivierung der T-Zellen CD3/CD28-Dynabeads verwendet. Dies sind magnetische Kügelchen, die mit gegen CD3 und CD28 gerichteten Antikörpern beschichtet sind.

Die PBMC wurden am Tag 0 aktiviert, und nach Herstellerangaben wurden die Zellkulturen an Tag 7-10 reaktiviert.³¹⁰

Die Kombination von Anti-CD3 und Anti-CD28 zur Aktivierung wurde gewählt, um die Entstehung von anergen T-Zellen zu verhindern, welche bei einem TCR-Signal ohne Costimulation vorkommen können.³³ Außerdem ist die CD3/CD28-Costimulation in der Lage, anerge Zellen zur Proliferation anzuregen.³¹¹ Auch die Kombination mit gering dosiertem IL-2 war vorbeschrieben. So führte die Aktivierung von aus Tumorgewebe stammenden T-Zellen mit CD3 und CD28 und Zugabe von 50 U/ml IL-2 zu schneller Proliferation sowie zu einer hohen zytotoxischen T-Zell-Aktivität.³¹²

4.4.3 Reaktivierung

Unsere FACS-Analysen schienen die Vorteile der Reaktivierung zunächst zu untermauern: die T-Lymphozyten zeigten eine länger anhaltende Expression von Aktivierungsmarkern, und auch die Synthese des Genproduktes war verstärkt. Aufgrund der Überlegung, dass eine erneute Aktivierung auch die Expression der Puromycin-N-Acetyltransferase erhöhen könnte, wurden die CAR-T-Zellen vor der Puromycin-Selektion reaktiviert.

Insbesondere CD4-Zellen haben durch die Costimulation von CD3 und CD28 ein verlängertes Überleben sowie eine bessere Proliferation.³¹³ Eine Restimulation verlängert die Lebensdauer erneut, sofern sie rechtzeitig vor Rückfall des Zellvolumens auf die Größe von ruhenden Zellen geschieht, da eine verspätete

4 Diskussion

4.4 Aktivierung und Reaktivierung

Reaktivierung keinen Effekt mehr hat und zu erhöhtem Zellverlust durch Apoptose führt; in einer Arbeit von Levine et al. fand die erste Reaktivierung deshalb an Tag 12 statt, die zweite an Tag 22.³¹³

In Studien sowohl mit transduzierten tumorspezifischen T-Zellen³¹⁴ als auch mit CAR-T-Zellen³¹⁵ führte die Reaktivierung der Zellen zu einer erhöhten Expression des übertragenen Genproduktes, was sowohl durch Messung der mRNA als auch durch FACS-Analyse erkennbar war³¹⁵; auch andere Genprodukte wie β -Aktin und CD3 ϵ wurden hochreguliert, allerdings nicht so stark wie das Transgen³¹⁴.

Eine überraschende Erkenntnis von Heylmann et al. bezüglich der CD3/CD28-Stimulation war, dass durch eine solche Aktivierung proliferierende T-Zellen resistenter gegenüber ionisierenden Strahlen sind als nicht aktivierte und ruhende Zellen; mögliche Gründe sind die Herunterregulierung von proapoptotischen Proteinen und die vermehrte Expression von DNA-Reparatur-Enzymen.³¹⁶ Auch wenn die T-Zellen in der Arbeit nicht erneut aktiviert wurden, ist anzunehmen, dass die darin beschriebenen Mechanismen bei einer Restimulation ebenfalls auftreten. Insgesamt sind in der Literatur also viele Argumente für eine Aktivierung mit CD3 und CD28 sowie für eine Reaktivierung zu finden.

Allerdings sollten die Antikörper spätestens an Tag 4 entfernt werden, um eine bessere Viabilität und Proliferation sicherzustellen.³¹⁷ Die T-Zellen zeigten bei Restimulation außerdem eine erhöhte Zytokin-Freisetzung gegenüber Zellen, die dauerhaft in Kontakt mit den Antikörpern waren.³¹⁷ Eine erhöhte Tumorlyse wurde durch eine frühe Entfernung von Anti-CD3 und Anti-CD28 allerdings nicht ausgelöst.³¹⁷

Die Messung der Zytotoxizität mit dem Europium-Release-Assay unterstützte allerdings eher die Theorie einer T-Zell-Erschöpfung durch Restimulation. Die nicht reaktivierten CAR-T-Zellen zeigten eine deutlich effektivere Tumorlyse als die vor 24 Stunden restimulierten Zellen. Letztere waren wiederum CAR-T-Zellen überlegen, die 10 Tage vorher mit Anti-CD3 und Anti-CD28 reaktiviert und die Antikörper in der Zellkultur belassen worden waren.

4 Diskussion

4.4 Aktivierung und Reaktivierung

Wiederholte Restimulation, beispielsweise mit Anti-CD3 und Anti-CD28, führt zu AICD der T-Zellen³¹⁸ und damit zu einer verlangsamten Expansion³¹⁹.³¹⁹ Auch eine einzige Restimulation an Tag 14 führt zu einem Anstieg von AICD im Vergleich mit einmalig aktivierten Zellen.³¹⁹

4.4.4 Expression der Aktivierungsmarker

Hinsichtlich der Oberflächenexpression führen viele Stimulationen zur Herunterregulierung von Proteinen wie CD62L und CCR7 und einer erhöhten Expression von CD25 und CD69²⁸⁹, wobei CD69 bei wiederholten Reaktivierungen im Abstand von 3-4 Tagen nicht mehr auf das Ausgangsniveau zurückfällt³¹⁹. Dies ist kompatibel mit unseren Ergebnissen, dass bei einmaliger Restimulation die Expressionen von CD25 und insbesondere von CD69 verzögert abfielen.

4.4.5 Expression von FoxP3

Das Verhalten der CAR-T-Zellen bezüglich der Expression von FoxP3 nach Aktivierung und Reaktivierung entsprach dem von physiologischen T-Zellen. Werden T-Zellen aktiviert, können sie vorübergehend FoxP3 exprimieren, verlieren diesen Phänotyp und die inhibitorische Funktion aber nach einigen Tagen wieder.³²⁰ Die verwendete Konzentration von IL-2 könnte die Entstehung von regulatorischen T-Zellen zusätzlich begünstigt haben.²⁸⁶ Nach Reaktivierung ist die Abnahme der FoxP3-exprimierenden CD4-Zellen nochmals verstärkt. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die übrigen T-Zellen nach der Reaktivierung schneller expandierten als die regulatorischen T-Zellen und so den T_{REG}-Anteil verringerten³²¹. Insbesondere die Verwendung von CD3-Antikörpern ist für die meisten T-Zell-Subpopulationen vorteilhafter als für die regulatorischen T-Zellen³²² ³²³. Obwohl der CD28-Signalweg die Expansion³²³ und das Überleben von induzierten T_{REG} fördert³²⁴, unterdrückt eine starke Stimulation dieses Rezeptors die Subpopulation, vermutlich aufgrund der erhöhten Synthese von IL-2, welche durch ein starkes CD28-Signal ausgelöst werden kann.³²⁵ Vielfache Reaktivierungen *in vitro* scheinen außerdem einen Einfluss auf die Genexpression der T_{REG} zu haben, was eine verringerte FoxP3-Synthese und damit eine Einschränkung der inhibitorischen Funktion verursacht.³²⁶ ³²⁷

4.5 Selektion mit Puromycin

Durch die Puromycin-Selektion konnte der Anteil der CAR-exprimierenden Zellen auf über 80-99% erhöht werden. Eine Erhöhung der Virusmenge während der Transduktion hätte diese Zahlen nicht ermöglicht, sondern sie führte in unseren Versuchen eher zur Infektion einer T-Zelle mit mehr Viruspartikeln; die Transduktionseffizienz dagegen blieb trotz verschiedener Virusmengen gleich und sank erst bei Reduzierung auf lediglich 10% der Standardmenge ab.

Aufgrund von nicht verwertbaren Ergebnissen bei einigen Europium-Release-Assays war eine Anreicherung der CAR-T-Zellen jedoch notwendig. Puromycin wurde in bisherigen Untersuchungen eher selten zur T-Zell-Selektion verwendet; Astier et al. verwendeten einmalig 2,5 µg/ml Puromycin an Tag 3, um transduzierte humane T-Zellen zu selektieren³²⁸. Andere Studien verwendeten T-Zelllinien wie die CD4-positiven Lymphomzellen HuT78, für welche 1-2 µg/ml Puromycin eingesetzt wurden.³²⁹ In unseren Versuchen wurde zweimalig 1 µg/ml verwendet, da bei höheren Dosierungen die Viabilität deutlich reduziert war.

Alternativen zur Puromycin-Selektion wie beispielsweise Cell Sorting wären allerdings deutlich aufwendiger und für die Zellen ebenfalls strapaziös.

Für klinische Studien war eine Transduktionseffizienz von 5% dagegen ausreichend, es erfolgte lediglich eine Anreicherung der Lymphozyten durch Monozytendepletion.²⁵⁶ Eine negative Selektion der B-Zellen und Monozyten im klinischen Setting könnte sinnvoll sein, um eine akzidentielle unkontrollierte Aktivierung dieser Zellen während der Zellkultur zu vermeiden³³⁰.

4.6 Transduktion mit retroviralen Vektoren

Um die Gensequenz für den CAR in das Genom der T-Zellen einzufügen, wurde in dieser Arbeit ein lentiviraler Vektor der zweiten Generation verwendet. Da keine klinischen Studien in näherer Zukunft geplant waren, wurde die Verwendung dieser Virusgeneration nicht auf ein sichereres System umgestellt. Alternativen sind die in anderen Arbeiten und auch in klinischen Studien verwendeten γ -Retroviren^{188 297 331} oder Lentiviren der dritten Generation^{256 284}. Letztere sind in klinischen Versuchen aufgrund der höheren Sicherheit gegenüber der zweiten

4 Diskussion

4.6 Transduktion mit retroviralen Vektoren

Generation zu bevorzugen. Durch den Verzicht auf das für *tat* (*transactivator of transcription*) kodierende Gen und die Aufteilung der restlichen *packaging*-Sequenzen auf zwei Plasmide ist die Gefahr, dass in virusproduzierenden Zellen eine Rekombination der Gene zu vermehrungsfähigen Viren mit pathologischem Potential führt, nochmals vermindert.³³² Der Vorteil der lentiviralen Vektoren der zweiten Generation ist, dass die Produktion der Viruspartikel effektiver ist, während die Herstellung von Viren der dritten Generation mehr Material verbraucht.³³³

Die erreichte Transduktionseffizienz von 10-70% wäre in der Klinik ausreichend. In bisherigen klinischen Studien mit gegen CD19 gerichteten CAR-T-Zellen machte deren Anteil an den retransfundierte T-Zellen 5%²⁵⁶ und 10-15%^{256 334} aus, für einen Therapieversuch von GD2-positiven Neuroblastomen betrug die Transduktionseffizienz über 35%³³⁵

Eine weitere Steigerung der Sicherheit könnte durch die Verwendung von Foamy-Viren erreicht werden. Diese sind nach heutigem Stand der Forschung für Menschen apathogen und die Gefahr von Mutationen ist deutlich geringer als bei Lentiviren oder γ -Retroviren.^{336 337 338} In ersten Versuchen mit Verwendung dieses viralen Vektors für die Herstellung von CAR-T-Zellen wurde eine Transduktionseffizienz von 40-65% erreicht.³³⁹

Bei allen verwendeten Retroviren können jedoch unerwünschte Nebenwirkungen auftreten. So ist die Lokalisation der eingefügten Gensequenz in das Genom nicht steuerbar. Neben der Gefahr von Neoplasien³⁴⁰ kann dies auch zu Therapieversagen führen. In einer klinischen Studie wurde bei einem Patienten erst nach der zweiten Transfusion von Anti-CD19-CAR-T-Zellen eine Remission erreicht.³⁴¹ In den Kontrollen nach der ersten Transfusion waren fast ausschließlich CAR-T-Zellen mit einem Gedächtniszell-ähnlichen Phänotyp zu finden, da das Transgen in eine für die T-Zell-Differenzierung wichtige epigenetische Sequenz eingebaut worden war; das zweite Allel schien hypofunktionell zu sein.³⁴¹

Eine weitere Arbeit beschrieb die Wechselwirkung von Sequenzen des Provirus mit Bestandteilen des CARs. Der γ -retrovirale LTR-Promotor verstärkte die

Expression eines CARs der zweiten Generation mit 4-1BB in der Signalkette durch Entstehung einer positiven Rückkopplungsschleife, indem durch ein dauerhaftes 4-1BB-Signal über TRAF2 (*TNF receptor-associated factor 2*) die Aktivierung von NFκB ausgelöst wurde, welches wiederum über den LTR-Promotor eine weitere Transkriptionssteigerung der CAR-Sequenz verursachte; das anhaltende Aktivierungssignal verursachte eine FAS-vermittelte Apoptose der CAR-T-Zellen.³⁴²

Die fehlgeschlagenen Bestimmungen der Viruskonzentration mittels qRT-PCR könnte auf RNA zurückzuführen sein, die aus den virusproduzierenden Tumorzellen stammte. Die Behandlung der Proben mit DNase vor der reversen Transkription machte eine Verunreinigung durch DNA eher unwahrscheinlich. Eine Möglichkeit wäre die Optimierung der qRT-PCR durch Umstellung auf ein zweistufiges System, in welchem die reverse Transkription von der eigentlichen quantitativen Real-Time-PCR unabhängig wäre und eine Änderung der Primer. Weniger aufwendig wäre der Ersatz des fehleranfälligen PCR-Verfahrens durch eine andere Methode wie ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Der Vorteil dieses Verfahrens wäre eine geringere Fehleranfälligkeit, allerdings ist auch die Gefahr einer Kontamination der Plastikplatte mit Lentiviren wahrscheinlicher und ein Verlassen des S2-Bereichs zur maschinellen Analyse der Platte nicht möglich.

4.7 Zytotoxische Aktivität

Die CAR-T-Zellen zeigten in mehreren Versuchen eine spezifische Tumorlyse bei Kontakt mit HER2/neu-positiven Malignomzellen.

Im direkten Vergleich schienen die CAR-T-Zellen allerdings weniger effektiv gegenüber BT474-Zellen zu sein, welche eine höhere HER2/neu-Expression als MCF7-Zellen aufwiesen. Es ist unwahrscheinlich, dass dies von inhibitorischen Molekülen auf der Oberfläche der Tumorzellen verursacht wurde. Laut mehreren Arbeitsgruppen war die Expression von Rezeptoren wie FAS³⁴³ und PD-L1^{344 345} auf den BT474-Zellen nicht detektierbar.

4 Diskussion

4.7 Zytotoxische Aktivität

Der wahrscheinlichste Grund für die geringe tumorlytische Aktivität war eine Erschöpfung der T-Zellen, hervorgerufen durch die vor 15 Tagen erfolgte Reaktivierung und die hohe Antigenkonzentration bei starker Expression auf den Malignomzellen. Die schwache zytotoxische Aktivität ist kompatibel mit dem Ergebnis des Vergleiches der vor 10 Tagen aktivierten CAR-T-Zellen und der nicht reaktivierten Lymphozyten. Jedoch kann die Restimulation nicht der einzige Grund für die mangelhafte Effizienz gegenüber Tumorzellen sein, da CAR-T-Zellen derselben Zellkultur gegen MCF7 ein deutlich besseres Resultat erzielten. Die unterschiedliche Intensität der Reaktion muss also auf die Zielzellen zurückzuführen sein, und aufgrund des Fehlens von Zellen der Tumormikroumgebung am wahrscheinlichsten auf Oberflächenproteine auf den Malignomzellen. BT474 besitzt eine höhere Expression von HER2/neu, welches die Zielstruktur für die CAR-T-Zellen darstellt. Da die T-Zell-Erschöpfung abhängig von der Antigenkonzentration ist³⁰⁴, wurde die schwache zytotoxische Aktivität weiter gesenkt. Eine Rückbildung der Erschöpfung wäre vermutlich möglich gewesen, weil die Zellen gegen MCF7 reagierten und sich somit vor dem Europium-Release-Assay nicht in einem unumkehrbaren Stadium befanden. Ob eine Blockade des PD1/PD-L1-Signalweges eine Verminderung der Erschöpfung erreichen und die schlechte Performance der CAR-T-Zellen gegenüber BT474 verbessern könnte, ist allerdings fraglich. BT474-Zellen exprimieren kaum PD-L1 auf der Zelloberfläche³⁴⁵, somit könnten sich die T-Lymphozyten als einzige weitere Zellart in vitro nur gegenseitig hemmen. Zwar können T-Zellen sowohl PD1 als auch PD-L1 exprimieren, der Anteil insbesondere der PD-L1-positiven Zellen ist jedoch zumindest bei tumorinfiltrierenden T-Zellen gering und doppelt positive Zellen kommen nur vereinzelt vor.^{346 347} Außerdem ist die Interaktion von PD1 und PD-L1 nicht der einzige Signalweg, der an der T-Zell-Erschöpfung beteiligt ist. Eine Reihe weiterer inhibitorischer Rezeptoren, unter anderem LAG3, TIM3 und CD160, spielen ebenfalls eine Rolle.³⁴⁸ Bei Verwendung des Anti-PD1-Antikörpers Pembrolizumab war beispielsweise eine erhöhte Expression von TIM3 auf den T-Zellen zu detektieren.³⁴⁹ Deutlich wird dies auch in der Klinik: bisher gibt es inhibitorische Antikörper für CTLA4, PD1, LAG3 und TIM3, letztere im Teststadium³⁵⁰; allerdings erzielt der gegen PD1 gerichtete Immuncheckpoint-Inhibitor bei nur 36%

4 Diskussion

4.8 Unerwünschte Arzneimittelwirkungen und Gefahren

der Patienten mit PD1-positiven Tumoren ein komplettes oder partielles Ansprechen³⁵¹, bei Hemmung von CTLA4 waren es 10,9%³⁵². Eine deutliche Effizienzsteigerung konnte bei Kombination der Blockade von PD1 mit der von LAG3³⁵³ ³⁵⁴ oder TIM3³⁵⁵ erreicht werden. Auch in der CAR-T-Zell-Therapie gibt es einen Fallbericht über den erfolgreichen Einsatz eines Immuncheckpoint-Inhibitors zur Wiederherstellung der T-Zell-Funktion³⁵⁶.

4.8 Unerwünschte Arzneimittelwirkungen und Gefahren

Die CAR-T-Zell-Therapie erwies sich in klinischen Studien als effektive Behandlungsoption hämatologischer Malignome, gegenüber soliden Tumoren sind die Erfolge allerdings überschaubar.³⁵⁷ ³⁵⁸ Ein wichtiges Hindernis für den Erfolg der Therapie ist die Erschöpfung der CAR-T-Zellen.³⁵⁷ ³⁵⁸ Neben der Auswahl des Rezeptoraufbaus und der -bestandteile gibt es Ansätze zur Vermeidung des Funktionsverlustes der CAR-T-Zellen. Lynn et al. fügten eine genetische Sequenz in die T-Zellen ein, welche sowohl für einen chimären Rezeptor als auch für c-Jun, ein Bestandteil des Transkriptionsfaktors AP-1, kodierte; letzterer wurde dann verstärkt exprimiert. Dies verhinderte eine Erschöpfung der T-Lymphozyten und ermöglichte im Mausmodell eine bessere Tumorkontrolle von Osteosarkomen.³⁵⁹ Eine erhöhte tumorlytische Aktivität in vivo erreichten auch Liu et al., indem sie die T-Zellen neben dem CAR auch einen *PD1/CD28 switch receptor* exprimieren ließen. Dieser koppelte die extrazelluläre Domäne von PD1 mit der intrazellulären Signaldomäne von CD28 und wandelte somit das normalerweise durch PD1/PD-L1-Bindung ausgelöste inhibitorische Signal in das aktivierende CD28-Signal um.³⁴⁹ Beide Ansätze bergen jedoch die Gefahr von schwer beherrschbaren Nebenwirkungen, da sie Regulations- und Selektionsmechanismen umgehen, die für die Verhinderung von Autoimmunreaktionen wichtig sind³⁶⁰.

Auch wenn die Zugabe von Immuncheckpoint-Inhibitoren bei geringem Ansprechen der CAR-T-Zell-Therapie sowohl im Tiermodell³⁶¹ als auch in manchen Fallberichten erfolgreich war³⁵⁶, können bei dieser Kombination auch schwere Nebenwirkungen wie Autoimmunthyreoiditis, Lungenversagen und Graft-versus-Host-ähnliche Hauterkrankungen auftreten³⁶².

4 Diskussion

4.8 Unerwünschte Arzneimittelwirkungen und Gefahren

Auch ohne PD1-Inhibitoren konnte die Therapie mit CAR-T-Zellen unerwünschte Auswirkungen haben. In klinischen Studien und Fallberichten beschriebene Nebenwirkungen sind teilweise schwerwiegend. Unter anderem kam es zu einer schweren Anaphylaxie mit Herz-Kreislaufstillstand bei Verwendung eines auf einem murinen Antikörper basierenden CAR³⁶³. Die Gefahr von gegen den CAR gerichteten Immunreaktionen ist aufgrund des geringeren Anteils der xenobiotischen Sequenzen in humanisierten Antikörpern zwar geringer als in chimären Antikörpern, aber nicht ausgeschlossen und bereits in klinischen Studien aufgetreten.³⁶⁴ In einer Phase-I-Studie verstarb ein Patient an einem Sepsis-ähnlichen Syndrom bei Therapie mit einem gegen CD19 gerichteten Rezeptor; in den Blutkulturen waren keine Bakterien nachweisbar.³⁰⁹ Eine Studie wurde mit zwei an ALL erkrankten Kindern durchgeführt, die beide im Verlauf ein Zytokin-Freisetzungssyndrom mit Makrophagen-Aktivierungssyndrom, ein mildes Tumorlyse-Syndrom und erwartungsgemäß eine B-Zell-Aplasie sowie Hypogammaglobulinämie entwickelten; bei einem Patienten kam es zum Rezidiv der ALL mit CD19-negativen Malignomzellen.³³⁴ Eine weitere Studie mit 39 an ALL erkrankten Kindern erfasste bei 46% einen schweren bis lebensbedrohlichen Verlauf des Zytokin-Freisetzungssyndroms, bei 36% ein MODS (*multi organ dysfunction syndrome*), 26% entwickelten einen teils katecholaminresistenten vasoplegischen Schock und 13% ein ARDS (*acute respiratory distress syndrome*).³⁶⁵ Ähnliche Zahlen erhob auch eine Studie mit 111 erwachsenen DLBCL-Patienten: 53% entwickelten ein Zytokin-Freisetzungssyndrom, davon hatten 37% einen schweren oder lebensbedrohlichen Verlauf.³⁶⁶ Ein schwerer Verlauf eines Tumorlyse-Syndroms mit akuter Nierenschädigung ist bei einem erwachsenen Patienten mit Therapie-refraktärer chronischer lymphatischer Leukämie (CLL) beschrieben.²⁵⁶

Neben dem Zytokin-Freisetzungssyndrom sind neurotoxische Effekte häufig. Mögliche Symptome sind unter anderem Delir, Verwirrung, Aphasie, Halluzinationen und Krampfanfälle.³⁶⁷ Schwere neurotoxische Symptomatik trat bei 13-50% der Patienten in Studien mit einem CD19-CAR auf.³⁶⁸ In klinischen Studien zur Evaluation der CAR-T-Zell-Therapie bei soliden Tumoren sind – außer bei der Behandlung cerebraler Malignome – bisher keine neurologischen Auffälligkeiten beschrieben.³⁶⁸ In einer Studie mit 133 Studienpatienten mit B-ALL, NHL (Non-

4 Diskussion

4.8 Unerwünschte Arzneimittelwirkungen und Gefahren

Hodgkin-Lymphom) oder CLL entwickelten 40% eine meist mild verlaufende neurologische Symptomatik, allerdings verstarben vier Patienten an neurologischen Nebenwirkungen.³⁶⁹

Eine vorhersehbare Auswirkung der gegen CD19 gerichteten CAR-T-Zell-Therapie war eine schwere Immunsuppression durch eine B-Zell-Aplasie. Von 189 Patienten entwickelten 13% eine Sepsis, drei Patienten verstarben an einem fatalen Verlauf einer *Escherichia coli*- oder Candida-Infektion.³⁷⁰ Ein Fallbericht beschrieb das Auftreten einer Progressiven Multifokalen Leukenzephalopathie (PML) sieben Monate nach Applikation der CAR-T-Zellen.³⁷¹

Ausgelöst wurde die B-Zell-Aplasie durch die Eliminierung von gesunden B-Lymphozyten, die ebenfalls CD19 exprimieren, durch die gegen CD19 gerichteten CAR-T-Zellen. Diese Lyse von gesunden Körperzellen, die das spezifische Antigen der CAR-T-Zellen exprimieren, wird als *on target/off tumor*-Toxizität bezeichnet. Tumorspezifische Antigene sind durch Mutationen entstandene Neoantigene, die oft nur zu einem geringen Teil auf der Zelloberfläche präsentiert werden und somit nur eingeschränkt als Zielstruktur nutzbar sind.³⁷² Die Mehrheit der tumorinfiltrierenden T-Zellen erkennt tumorassoziierte Antigene, die auch auf der Oberfläche von gesunden Körperzellen zu finden sind und auf Malignomzellen verstärkt exprimiert werden.³⁷²

Da auch die meisten in der CAR-T-Zell-Therapie verwendeten Antigene tumorassoziiert sind, kam es immer wieder zu Zwischenfällen. Morgan et al. berichteten über einen tödlichen Krankheitsverlauf bei einer Colonkarzinom-Patientin, die 15 Minuten nach Gabe von gegen HER2/neu gerichteten CAR-T-Zellen mit Atemnot und Lungenödem reagierte. Aufgrund der hohen Dichte von CAR-T-Zellen in der Lunge der Patientin war die wahrscheinlichste Ursache des letalen ARDS die Reaktion der T-Zellen gegen HER2/neu, welches sich in geringer Anzahl auch auf gesunden Epithelzellen der Bronchien und Bronchiolen befindet²⁵⁷, was zu einem Zytokinsturm und zu Multiorganversagen führte.²⁰⁰ In einer klinischen Studie kam es zu hepatotoxischen Nebenwirkungen bei mehreren Patienten, da die T-Zellen ihr spezifisches Antigen Carboanhydrase-IX nicht nur auf dem Gewebe des Nierenzellkarzinoms, sondern auch auf den biliären

4 Diskussion

4.8 Unerwünschte Arzneimittelwirkungen und Gefahren

Epithelzellen fanden.³⁷³ Nach Gabe von CAR-T-Zellen erkannten diese ihr spezifisches Carcinoembryonales Antigen (CEA) auch auf gesunden Colon-Epithelzellen, was vorübergehend schwere Colitiden verursachte.³⁷⁴

Angesichts dieser Nebenwirkungen ist die Umgehung von Regulationsmechanismen, kritisch zu betrachten, da sie die Wahrscheinlichkeit für schwere Zwischenfälle erhöht. Die bei Lynn et al. durch epigenetische Modifizierung erreichte Verbesserung der zytotoxischen Aktivität gegenüber Zellen, die nur eine geringe Expression des spezifischen Antigens aufweisen³⁵⁹, oder die Umwandlung eines inhibitorischen in ein aktivierendes Signal machen den Einsatz solcher CAR-T-Zellen zumindest bei tumorassoziierten Antigenen gefährlich. Die genetische Veränderung der T-Zellen, um sie einen künstlichen T-Zell-Rezeptor exprimieren zu lassen, stellt bereits einen Eingriff in die Selektion der Lymphozyten dar. Ein CAR, der eine hohe Affinität zu seinem Antigen aufweist, bewirkt eine höhere Elimination von Zielzellen mit geringerer Antigenexpression.³⁷⁵ T-Zellen mit einem Rezeptor mit niedrigerer Affinität dagegen wurden erst von Zielzellen mit hoher Antigenexpression aktiviert, was für tumorassoziierte Antigene vorteilhaft sein könnte.³⁷⁵ Die Gefahren der Umgehung von affinitätsbasierter Selektion zeigten sich in einem weiteren Fallbericht.³⁷⁶ Aus dem Blut eines Melanompatienten wurde die Sequenz eines T-Zell-Rezeptors gewonnen, der für auf HLA-A*01 präsentierte MAGE-A3 spezifisch war. Dieser Rezeptor wurde so verändert, dass er eine verstärkte Affinität für sein Antigen aufwies. Dieser rekombinante Rezeptor wurde dann in T-Zellen der Studienpatienten eingefügt, die beide an kardiotoxischen Nebenwirkungen verstarben. Ursache war die Kreuzreaktion des Rezeptors mit Titin, was auf Herzzellen exprimiert wird. Der „Spender“ des ursprünglichen Rezeptors zeigte dagegen keine kardiotoxischen Symptome.³⁷⁶

Das therapeutische Potential wie auch die Gefahren der CAR-T-Zell-Therapie resultieren aus der Funktion der T-Zellen als Koordinatoren des spezifischen Immunsystems und aus der Fähigkeit, Gedächtniszellen zu bilden und damit einen anhaltenden Therapieerfolg zu ermöglichen. In einer Studie waren CAR-T-Zellen noch nach 192 Wochen im Blut nachweisbar¹⁸⁸, eine andere detektierte nach 6

4 Diskussion

4.8 Unerwünschte Arzneimittelwirkungen und Gefahren

Monaten noch CAR-T-Zellen im Knochenmark und CAR-T-Gedächtniszellen im Blut³⁷⁷.

4.9 Fazit und Ausblick

4.9.1 Fazit

Zusammenfassend ist es in dieser Arbeit gelungen, ein Protokoll für die Herstellung funktionierender CAR-T-Zellen zu erstellen, um weitere Forschung bezüglich einzelner Bestandteile des Rezeptors zu ermöglichen. Es wurde gezeigt, dass die CAR-T-Zellen spezifisch auf ihr Antigen reagieren und maligne Zellen, die diese Oberflächenstruktur besitzen, *in vitro* eliminieren können.

Ein effektives Vorgehen für den Austausch einzelner Bauteile des CAR wurde ebenfalls etabliert, wobei sich die InFusion®-Methode als effizienter erwies als die klassische Klonierung. Der Einfluss von Spacer, Linker und Transmembrandomäne sowie von einzelnen Sequenzen des *single chain variable fragment* sind bisher weniger erforscht als derjenige der Signaldomäne. In den letzten Jahren wurde jedoch immer deutlicher, welchen entscheidenden Einfluss diese Bestandteile auf die Funktion der T-Zellen und damit auf die klinischen Resultate haben können.^{251 307}

Eines der größten Hindernisse für den Therapieerfolg in klinischen Studien ist die T-Zell-Erschöpfung.³⁵⁷ Da die maßgeblich beteiligte antigenunabhängige dauerhafte Aktivierung vom Aufbau und den Sequenzen des Rezeptors abhängt³⁵⁷, ist Forschung in diesem Bereich dringend erforderlich. Aufgrund der Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen^{244 245} könnte ein Austausch von OX40 gegen 4-1BB in der Signaldomäne dieser Funktionsstörung der T-Zellen vorbeugen. Die Beibehaltung des aktivierenden CD28 in der Signalkette soll die Entstehung von Anergie verhindern, da die T-Zellen *in vivo* keine oder eine nicht ausreichende Anzahl von antigenpräsentierenden Zellen, die das spezifische Antigen präsentieren und durch Corezeptoren das für die T-Zell-Aktivierung nötige zweite Signal ermöglichen, vorfinden werden.^{33 230}

Die Herausforderung besteht in der Konstruktion einer Rezeptorstruktur, die bei Antigenkontakt eine ausreichende Aktivierung zur Verhinderung von Anergie gewährleistet, aber trotzdem kein kontinuierlich erhöhtes Aktivierungsniveau und damit T-Zell-Erschöpfung bewirkt.

Neben dem Aufbau des CARs kann dieser Erschöpfungszustand auch ein Resultat der Zellkulturbedingungen sein. So erwies sich eine Restimulation als kontraproduktiv, da sie eine Beeinträchtigung der tumorlytischen Funktion der CAR-T-Zellen verursachte. Das Ausmaß dieser verminderten Effektivität war auch abhängig vom Zeitpunkt einer erneuten Stimulation. Sowohl in dem in dieser Arbeit etablierten Protokoll *in vitro* als auch in zukünftigen Experimenten im Mausmodell oder in klinischen Studien sollte somit auf eine Reaktivierung oder auf ein Belassen der aktivierenden Antikörper in der Zellkultur verzichtet werden, auch wenn klinische Studien^{256 334} mit einem gegen CD19 gerichteten CAR und langer Exposition gegenüber den Aktivierungsbeads erfolgreich waren.

Besonders bei schlechter Tumorlyse war eine Selektion der CAR-T-Zellen nötig, um aussagekräftige Ergebnisse im Vergleich mit normalen T-Lymphozyten zu erhalten. Da die Steigerung der für die Transduktion eingesetzten Virusmenge den Anteil der CAR-T-Zellen nur begrenzt erhöhen konnte, erfolgte die Selektion mit Puromycin, welche jedoch zu einer hohen Letalität der Lymphozyten führte.

Zwar bewirkte die Restimulation auch eine Erhöhung der Expression des Transgens, was für die Puromycin-Selektion wünschenswert ist, da eine vermehrte Synthese von Puromycin-N-Acetyltransferase die Überlebenswahrscheinlichkeit der transduzierten T-Zellen verbessern sollte. Sie verursacht jedoch auch Erschöpfung und AICD, was durch die eingeschränkte zytotoxische Aktivität die Erhebung von validen Ergebnissen zumindest gegenüber der Tumorzelllinie BT474 ebenfalls erschwerte. Der vorübergehende Einsatz von Humanserum könnte eine Verbesserung des Zellüberlebens bei nicht-klinischen Experimenten erreichen. Für die Behandlung von Patienten sollte eine Aktivierung von T-Zellen *in vitro* im Beisein von Humanserum wegen des Risikos, dass die Lymphozyten dann gegen darin enthaltene humane Strukturen gerichtet sein könnten, unterbleiben. Ansonsten ist nicht davon auszugehen, dass die Retransfusion von nicht transduzierten autologen T-Lymphozyten für den Patienten ein signifikant erhöhtes Risiko darstellt. Eine Anreicherung von CAR-T-Zellen durch Puromycin wäre also in der Klinik nicht notwendig, und die T-Zellen könnten problemlos in serumfreiem Medium expandiert werden. Allerdings könnte die Entfernung von

Monozyten, und vorsorglich auch von dendritischen sowie B-Zellen, eine akzidentielle Aktivierung dieser Zellen durch Plastik³³⁰ oder andere Zellkulturbestandteile verhindern. Ebenso könnte eine möglichst kurze Zeit in Zellkultur und eine schnelle Retransfusion nach Auftauen und Transduktion Veränderungen der Lymphozyten *in vitro*²⁷⁸ begrenzen. Eine weitere Verbesserung der Patientensicherheit könnte die Transduktion mit den – nach heutigem Wissensstand – apathogenen Foamy-Viruspartikeln sein.³⁷⁸

Bei auf das Labor beschränkten Versuchen wie in dieser Arbeit dagegen waren solche Sicherheitsaspekte nicht relevant.

Neben einem Verzicht auf Restimulation verbesserte die Verwendung von IL-15 anstelle von IL-2 die Proliferation der T-Lymphozyten. Andere Arbeitsgruppen wiesen im Mausmodell nach, dass mit IL-15 kultivierte T-Zellen eine bessere Tumorkontrolle gewährleisten.²⁸⁷ Sie zeigen eine geringere Expression von Erschöpfungsmarkern, einen geringeren Anteil an regulatorischen T-Zellen, ein längeres Überleben und einen höheren Anteil von geringer differenzierten T-Lymphozyten wie T-Gedächtnis-Stammzellen.²⁸⁷

4.9.2 Bedeutung der CAR-T-Zell-Therapie

Die CAR-T-Zell-Therapie ist bisher nicht als First-Line-Therapie geeignet. Sie ist sehr kostenintensiv^{379 380} und kann schwere Nebenwirkungen^{365 366} verursachen. Tödliche Verläufe sind in mehreren klinischen Studien beschrieben.^{200 309}

Um die Patientensicherheit zu erhöhen, fusionierten Straathof et al. ein humanes *FK506 binding protein* (FKBP) mit Caspase-9.¹⁹⁷ FKBP bildet nach Bindung von FK506 (Tacrolimus) Dimere, was eine gesteuerte Induktion der Dimerisierung durch Zugabe von FK506 ermöglichte.³⁸¹ Durch die Kopplung an Caspase-9 dimerisiert auch diese und wird dadurch aktiviert, und die Apoptose wird eingeleitet.³⁸² Zusammengefasst verursachte also die Gabe von Tacrolimus oder einem Derivat die Apoptose von 99% der CAR-T-Zellen^{197, 383} Die Funktion der induzierbaren Caspase-9 (iCasp9) wurde klinisch erfolgreich getestet.³⁸³

Ein anderer Ansatz ist die Verstärkung der Antikörper-Therapie durch CAR-T-Zellen, deren Zielstruktur nicht im Körper vorkommt. Tamada et al. verwendeten beispielsweise gegen FITC gerichtete CAR-T-Zellen in Kombination mit einem für ein Tumor-assoziiertes Antigen spezifischen Antikörper. Dies bewirkte zunächst eine verbesserte Tumorkontrolle im Mausmodell, führte aber dann zu Antigen-negativen Tumorvarianten. Jedoch könnten in diesem Therapieansatz verschiedene Antikörper gleichzeitig verwendet werden.³⁸⁴

Trotz aller Gefahren ist die CAR-T-Zell-Therapie eine Option bei therapierefraktären Krankheitsverläufen von CD19-positiven B-Zell-Malignomen. Die Resultate beim Einsatz der chimären Rezeptoren gegen solide Tumoren reichen bisher nicht an die Erfolge in der Hämatookologie heran. Dennoch stellen diese künstlichen Rezeptoren einen vielversprechenden Forschungsansatz dar. Sollte es gelingen, das destruktive Potential der T-Lymphozyten gezielt gegen maligne Zellen zu richten, könnte diese Form der Gentherapie für Patienten mit fortgeschrittenen soliden Tumoren lebensrettend sein.

5 Zusammenfassung

Die CAR-T-Zell-Therapie stellt eine neuartige und effektive Option in der Behandlung von therapierefraktären CD19-positiven B-Zell-Malignomen dar.

Bisher ließ sich der Erfolg jedoch nicht auf solide Tumoren übertragen, wobei sich die T-Zell-Erschöpfung in klinischen Studien als eines der größten Hindernisse herausstellte. Die T-Zell-Erschöpfung wird durch ein kontinuierlich erhöhtes Aktivierungsniveau der T-Lymphozyten verursacht und ist abhängig vom Aufbau des chimären Antigenrezeptors. Gleichzeitig wird eine ausreichende Aktivierung bei Antigenkontakt zur Verhinderung von Anergie benötigt. Die Schwierigkeit besteht in der Konstruktion eines Rezeptors, welcher die beiden teils konkurrierenden Anforderungen erfüllt. Die Ausschaltung der Regulierungsmechanismen der T-Zell-Erschöpfung und des AICD (*activation-induced cell death*) birgt jedoch das Risiko von lebensbedrohlichen Zwischenfällen.

In dieser Arbeit wurde ein Protokoll zur Herstellung von CAR-T-Zellen etabliert, welche *in vitro* zu einer spezifische Tumorlyse befähigt sind. Um den Einfluss einzelner Bestandteile des chimären Antigenrezeptors (CAR) auf die Funktion der CAR-T-Zellen in Zukunft untersuchen zu können, wurde die InFusion®-Methode als eine effektive Möglichkeit zum Austausch dieser Elemente etabliert.

Auch die Zellkulturbedingungen können zum Funktionsverlust der CAR-T-Zellen beitragen. Eine Restimulation der T-Lymphozyten verursachte eine deutliche Verminderung der tumorlytischen Aktivität, wobei der Zeitpunkt der Reaktivierung die Stärke dieses Funktionsverlustes beeinflusste. Eine wiederholte Stimulation sollte deshalb in Zukunft unterlassen werden. In unseren Experimenten zeigte sich die T-Zell-Erschöpfung in den Europium-Release-Assays, wo die tumorlytische Aktivität von restimulierten CAR-T-Zellen gegenüber der Tumorzelllinie BT474 geringer ausfiel als gegenüber MCF7, obwohl BT474 eine höhere Dichte des für den CAR spezifischen Antigens auf der Membranoberfläche exprimierte.

Der Selektionsdruck mit Puromycin verursachte einen hohen Zellverlust und damit verbunden häufig die Notwendigkeit, ein Experiment abubrechen. Gleichzeitig ist die Anreicherung von CAR-T-Zellen nötig, um valide Unterschiede zur

Funktion normaler T-Lymphozyten in vitro detektieren zu können. Zur Verminderung dieser Letalität kann zukünftig ein Versuch mit Zellkulturmedium, welchem Humanserum zugesetzt ist, unternommen werden. In klinischen Studien sollte dann auf eine Aktivierung von T-Zellen in Anwesenheit von Humanserum verzichtet werden, um das Risiko einer späteren Kreuzreaktion gegen humane Strukturen zu senken. Allerdings wäre eine Selektion mit Puromycin vor Transfusion von autologen T-Lymphozyten auch nicht nötig.

Die Wahl von IL-15 gegenüber IL-2 bewirkt eine verbesserte Proliferation sowie einen geringeren Anteil von regulatorischen T-Zellen. Wie andere Arbeitsgruppen bereits im Tiermodell nachweisen konnten, zeigen mit IL-15 kultivierte CAR-T-Zellen eine erfolgreichere Tumorkontrolle.

Ein Hauptziel der aktuellen Forschung im Bereich der CAR-T-Zell-Therapie ist die Verminderung von T-Zell-Erschöpfung und AICD, um das hocheffektive zytotoxische Potential von T-Lymphozyten gegen solide Malignome einsetzen zu können.

6 Literaturverzeichnis

6.1 Literaturverzeichnis in Reihenfolge der Verweisnummern

¹ European Medicines Agency. (2018, 29 Juni). First two CAR-T cell medicines recommended for approval in the European Union. [Pressemeldung]. Abgerufen von <https://www.ema.europa.eu/en/news/first-two-car-t-cell-medicines-recommended-approval-european-union>

² Gross, G., Waks, T. and Eshhar, Z. (1989) 'Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(24), pp. 10024-8.

³ Porter, D. L., Levine, B. L., Bunin, N., Stadtmauer, E. A., Luger, S. M., Goldstein, S., Loren, A., Phillips, J., Nasta, S., Perl, A., Schuster, S., Tsai, D., Sohal, A., Veloso, E., Emerson, S. and June, C. H. (2006) 'A phase 1 trial of donor lymphocyte infusions expanded and activated ex vivo via CD3/CD28 costimulation', *Blood*, 107(4), pp. 1325-31.

⁴ Kondo, M., Weissman, I. L. and Akashi, K. (1997) 'Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow', *Cell*, 91(5), pp. 661-72.

⁵ Krueger, A. (2018) 'Thymus Colonization: Who, How, How Many?', *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 66(2), pp. 81-88.

⁶ Ujije, H. and Shevach, E. M. (2016) 'gammadelta T Cells Protect the Liver and Lungs of Mice from Autoimmunity Induced by Scurfy Lymphocytes', *J Immunol*, 196(4), pp. 1517-28.

⁷ Rothenberg, E. V. (2019) 'Programming for T-lymphocyte fates: modularity and mechanisms', *Genes Dev*, 33(17-18), pp. 1117-1135.

⁸ Germain, R. N. (2002) 'T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision', *Nat Rev Immunol*, 2(5), pp. 309-22.

⁹ Takaba, H. and Takayanagi, H. (2017) 'The Mechanisms of T Cell Selection in the Thymus', *Trends Immunol*, 38(11), pp. 805-816.

¹⁰ Engel, I. and Hedrick, S. M. (1988) 'Site-directed mutations in the VDJ junctional region of a T cell receptor beta chain cause changes in antigenic peptide recognition', *Cell*, 54(4), pp. 473-84.

¹¹ Lanier, L. L., Allison, J. P. and Phillips, J. H. (1986) 'Correlation of cell surface antigen expression on human thymocytes by multi-color flow cytometric analysis: implications for differentiation', *J Immunol*, 137(8), pp. 2501-7.

¹² Peschon, J. J., Morrissey, P. J., Grabstein, K. H., Ramsdell, F. J., Maraskovsky, E., Gliniak, B. C., Park, L. S., Ziegler, S. F., Williams, D. E., Ware, C. B., Meyer, J. D. and Davison, B. L. (1994) 'Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice', *J Exp Med*, 180(5), pp. 1955-60.

¹³ Sawicka, M., Stritesky, G. L., Reynolds, J., Abourashchi, N., Lythe, G., Molina-Paris, C. and Hogquist, K. A. (2014) 'From pre-DP, post-DP, SP4, and SP8

6 Literaturverzeichnis

6.1 Literaturverzeichnis in Reihenfolge der Verweisnummern

Thymocyte Cell Counts to a Dynamical Model of Cortical and Medullary Selection', *Front Immunol*, 5, pp. 19.

¹⁴ Daley, S. R., Teh, C., Hu, D. Y., Strasser, A. and Gray, D. H. D. (2017) 'Cell death and thymic tolerance', *Immunol Rev*, 277(1), pp. 9-20.

¹⁵ Starr, T. K., Jameson, S. C. and Hogquist, K. A. (2003) 'Positive and negative selection of T cells', *Annu Rev Immunol*, 21, pp. 139-76.

¹⁶ Bill, J. and Palmer, E. (1989) 'Positive selection of CD4+ T cells mediated by MHC class II-bearing stromal cell in the thymic cortex', *Nature*, 341(6243), pp. 649-51.

¹⁷ Kisielow, P., Teh, H. S., Bluthmann, H. and von Boehmer, H. (1988) 'Positive selection of antigen-specific T cells in thymus by restricting MHC molecules', *ibid.*335(6192), pp. 730-3.

¹⁸ Vasquez, N. J., Kaye, J. and Hedrick, S. M. (1992) 'In vivo and in vitro clonal deletion of double-positive thymocytes', *J Exp Med*, 175(5), pp. 1307-16.

¹⁹ Klein, L., Kyewski, B., Allen, P. M. and Hogquist, K. A. (2014) 'Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see)', *Nat Rev Immunol*, 14(6), pp. 377-91.

²⁰ Hori, S., Nomura, T. and Sakaguchi, S. (2003) 'Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3', *Science*, 299(5609), pp. 1057-61.

²¹ Li, M. O. and Rudensky, A. Y. (2016) 'T cell receptor signalling in the control of regulatory T cell differentiation and function', *Nat Rev Immunol*, 16(4), pp. 220-33.

²² Hochweller, K., Wabnitz, G. H., Samstag, Y., Suffner, J., Hammerling, G. J. and Garbi, N. (2010) 'Dendritic cells control T cell tonic signaling required for responsiveness to foreign antigen', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(13), pp. 5931-6.

²³ Davey, G. M., Schober, S. L., Endrizzi, B. T., Dutcher, A. K., Jameson, S. C. and Hogquist, K. A. (1998) 'Preselection thymocytes are more sensitive to T cell receptor stimulation than mature T cells', *J Exp Med*, 188(10), pp. 1867-74.

²⁴ Liang, J., Lyu, J., Zhao, M., Li, D., Zheng, M., Fang, Y., Zhao, F., Lou, J., Guo, C., Wang, L., Wang, D., Liu, W. and Lu, L. (2017) 'Tesp1 regulates T cell receptor-induced calcium signals by recruiting inositol 1,4,5-trisphosphate receptors', *Nat Commun*, 8, pp. 15732.

²⁵ Lo, W. L., Donermeyer, D. L. and Allen, P. M. (2012) 'A voltage-gated sodium channel is essential for the positive selection of CD4(+) T cells', *Nat Immunol*, 13(9), pp. 880-7.

²⁶ Li, Q. J., Chau, J., Ebert, P. J., Sylvester, G., Min, H., Liu, G., Braich, R., Manoharan, M., Soutschek, J., Skare, P., Klein, L. O., Davis, M. M. and Chen, C. Z. (2007) 'miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection', *Cell*, 129(1), pp. 147-61.

²⁷ Gunzer, M., Schafer, A., Borgmann, S., Grabbe, S., Zanker, K. S., Brocker, E. B., Kampgen, E. and Friedl, P. (2000) 'Antigen presentation in extracellular

6 Literaturverzeichnis

6.1 Literaturverzeichnis in Reihenfolge der Verweisnummern

matrix: interactions of T cells with dendritic cells are dynamic, short lived, and sequential', *Immunity*, 13(3), pp. 323-32.

²⁸ Bousso, P. and Robey, E. (2003) 'Dynamics of CD8+ T cell priming by dendritic cells in intact lymph nodes', *Nat Immunol*, 4(6), pp. 579-85.

²⁹ Dustin, M. L., Bromley, S. K., Kan, Z., Peterson, D. A. and Unanue, E. R. (1997) 'Antigen receptor engagement delivers a stop signal to migrating T lymphocytes', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(8), pp. 3909-13.

³⁰ Wang, Y., Li, D., Nurieva, R., Yang, J., Sen, M., Carreno, R., Lu, S., McIntyre, B. W., Molldrem, J. J., Legge, G. B. and Ma, Q. (2009) 'LFA-1 affinity regulation is necessary for the activation and proliferation of naive T cells', *J Biol Chem*, 284(19), pp. 12645-53.

³¹ Gao, G. F., Rao, Z. and Bell, J. I. (2002) 'Molecular coordination of alphabeta T-cell receptors and coreceptors CD8 and CD4 in their recognition of peptide-MHC ligands', *Trends Immunol*, 23(8), pp. 408-13.

³² Byrne, J. A., Butler, J. L. and Cooper, M. D. (1988) 'Differential activation requirements for virgin and memory T cells', *J Immunol*, 141(10), pp. 3249-57.

³³ Harding, F. A., McArthur, J. G., Gross, J. A., Raulet, D. H. and Allison, J. P. (1992) 'CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones', *Nature*, 356(6370), pp. 607-9.

³⁴ Bohineust, A., Garcia, Z., Beuneu, H., Lemaitre, F. and Bousso, P. (2018) 'Termination of T cell priming relies on a phase of unresponsiveness promoting disengagement from APCs and T cell division', *J Exp Med*, 215(5), pp. 1481-1492.

³⁵ Xiao, Z., Casey, K. A., Jameson, S. C., Curtsinger, J. M. and Mescher, M. F. (2009) 'Programming for CD8 T cell memory development requires IL-12 or type I IFN', *J Immunol*, 182(5), pp. 2786-94.

³⁶ Curtsinger, J. M. and Mescher, M. F. (2010) 'Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation', *Curr Opin Immunol*, 22(3), pp. 333-40.

³⁷ Agarwal, S. and Rao, A. (1998) 'Modulation of chromatin structure regulates cytokine gene expression during T cell differentiation', *Immunity*, 9(6), pp. 765-75.

³⁸ Balazs, M., Martin, F., Zhou, T. and Kearney, J. (2002) 'Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses', *ibid.*17(3), pp. 341-52.

³⁹ Nutt, S. L., Hodgkin, P. D., Tarlinton, D. M. and Corcoran, L. M. (2015) 'The generation of antibody-secreting plasma cells', *Nat Rev Immunol*, 15(3), pp. 160-71.

⁴⁰ Swain, S. L., McKinstry, K. K. and Strutt, T. M. (2012) 'Expanding roles for CD4(+) T cells in immunity to viruses', *ibid.*12(2), pp. 136-48.

⁴¹ Brown, D. M., Lee, S., Garcia-Hernandez Mde, L. and Swain, S. L. (2012) 'Multifunctional CD4 cells expressing gamma interferon and perforin mediate protection against lethal influenza virus infection', *J Virol*, 86(12), pp. 6792-803.

6 Literaturverzeichnis

6.1 Literaturverzeichnis in Reihenfolge der Verweisnummern

- ⁴² Suzuki, Y., Orellana, M. A., Schreiber, R. D. and Remington, J. S. (1988) 'Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*', *Science*, 240(4851), pp. 516-8.
- ⁴³ Gondek, D. C., Roan, N. R. and Starnbach, M. N. (2009) 'T cell responses in the absence of IFN-gamma exacerbate uterine infection with *Chlamydia trachomatis*', *J Immunol*, 183(2), pp. 1313-9.
- ⁴⁴ Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T. and Hume, D. A. (2004) 'Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions', *J Leukoc Biol*, 75(2), pp. 163-89.
- ⁴⁵ Weiss, G. and Schaible, U. E. (2015) 'Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria', *Immunol Rev*, 264(1), pp. 182-203.
- ⁴⁶ Bogen, B., Fauskanger, M., Haabeth, O. A. and Tveita, A. (2019) 'CD4(+) T cells indirectly kill tumor cells via induction of cytotoxic macrophages in mouse models', *Cancer Immunol Immunother*, 68(11), pp. 1865-1873.
- ⁴⁷ Coffman, R. L., Seymour, B. W., Leberman, D. A., Hiraki, D. D., Christiansen, J. A., Shrader, B., Cherwinski, H. M., Savelkoul, H. F., Finkelman, F. D., Bond, M. W. and et al. (1988) 'The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation', *Immunol Rev*, 102, pp. 5-28.
- ⁴⁸ Mosmann, T. R. and Coffman, R. L. (1989) 'TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties', *Annu Rev Immunol*, 7, pp. 145-73.
- ⁴⁹ Leberman, D. A. and Coffman, R. L. (1988) 'Interleukin 4 causes isotype switching to IgE in T cell-stimulated clonal B cell cultures', *J Exp Med*, 168(3), pp. 853-62.
- ⁵⁰ Coffman, R. L., Seymour, B. W., Hudak, S., Jackson, J. and Rennick, D. (1989) 'Antibody to interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice', *Science*, 245(4915), pp. 308-10.
- ⁵¹ McKenzie, G. J., Bancroft, A., Grecis, R. K. and McKenzie, A. N. (1998) 'A distinct role for interleukin-13 in Th2-cell-mediated immune responses', *Curr Biol*, 8(6), pp. 339-42.
- ⁵² Veldhoen, M., Uyttenhove, C., van Snick, J., Helmbj, H., Westendorf, A., Buer, J., Martin, B., Wilhelm, C. and Stockinger, B. (2008) 'Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset', *Nat Immunol*, 9(12), pp. 1341-6.
- ⁵³ Dardalhon, V., Awasthi, A., Kwon, H., Galileos, G., Gao, W., Sobel, R. A., Mitsdoerffer, M., Strom, T. B., Elyaman, W., Ho, I. C., Khoury, S., Oukka, M. and Kuchroo, V. K. Ibid. 'IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells', pp. 1347-55.
- ⁵⁴ Anuradha, R., George, P. J., Hanna, L. E., Chandrasekaran, V., Kumaran, P., Nutman, T. B. and Babu, S. (2013) 'IL-4-, TGF-beta-, and IL-1-dependent expansion of parasite antigen-specific Th9 cells is associated with clinical pathology in human lymphatic filariasis', *J Immunol*, 191(5), pp. 2466-73.

6 Literaturverzeichnis

6.1 Literaturverzeichnis in Reihenfolge der Verweisnummern

- ⁵⁵ Rivera Vargas, T., Humblin, E., Vegran, F., Ghiringhelli, F. and Apetoh, L. (2017) 'TH9 cells in anti-tumor immunity', *Semin Immunopathol*, 39(1), pp. 39-46.
- ⁵⁶ Lu, Y., Wang, Q., Xue, G., Bi, E., Ma, X., Wang, A., Qian, J., Dong, C. and Yi, Q. (2018) 'Th9 Cells Represent a Unique Subset of CD4(+) T Cells Endowed with the Ability to Eradicate Advanced Tumors', *Cancer Cell*, 33(6), pp. 1048-1060 e7.
- ⁵⁷ Chakraborty, S., Kubatzky, K. F. and Mitra, D. K. (2019) 'An Update on Interleukin-9: From Its Cellular Source and Signal Transduction to Its Role in Immunopathogenesis', *Int J Mol Sci*, 20(9).
- ⁵⁸ Lee, J. E., Zhu, Z., Bai, Q., Brady, T. J., Xiao, H., Wakefield, M. R. and Fang, Y. (2019) 'The Role of Interleukin-9 in Cancer', *Pathol Oncol Res*.
- ⁵⁹ Trifari, S., Kaplan, C. D., Tran, E. H., Crellin, N. K. and Spits, H. (2009) 'Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells', *Nat Immunol*, 10(8), pp. 864-71.
- ⁶⁰ Duhon, T., Geiger, R., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A. and Sallusto, F. Ibid.'Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells', pp. 857-63.
- ⁶¹ Eyerich, S., Eyerich, K., Pennino, D., Carbone, T., Nasorri, F., Pallotta, S., Cianfarani, F., Odorisio, T., Traidl-Hoffmann, C., Behrendt, H., Durham, S. R., Schmidt-Weber, C. B. and Cavani, A. (2009) 'Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling', *J Clin Invest*, 119(12), pp. 3573-85.
- ⁶² Wolk, K., Kunz, S., Witte, E., Friedrich, M., Asadullah, K. and Sabat, R. (2004) 'IL-22 increases the innate immunity of tissues', *Immunity*, 21(2), pp. 241-54.
- ⁶³ Boniface, K., Bernard, F. X., Garcia, M., Gurney, A. L., Lecron, J. C. and Morel, F. (2005) 'IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes', *J Immunol*, 174(6), pp. 3695-702.
- ⁶⁴ Aujla, S. J., Chan, Y. R., Zheng, M., Fei, M., Askew, D. J., Pociask, D. A., Reinhart, T. A., McAllister, F., Edeal, J., Gaus, K., Husain, S., Kreindler, J. L., Dubin, P. J., Pilewski, J. M., Myerburg, M. M., Mason, C. A., Iwakura, Y. and Kolls, J. K. (2008) 'IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia', *Nat Med*, 14(3), pp. 275-81.
- ⁶⁵ Malley, R., Srivastava, A., Lipsitch, M., Thompson, C. M., Watkins, C., Tzianabos, A. and Anderson, P. W. (2006) 'Antibody-independent, interleukin-17A-mediated, cross-serotype immunity to pneumococci in mice immunized intranasally with the cell wall polysaccharide', *Infect Immun*, 74(4), pp. 2187-95.
- ⁶⁶ LeibundGut-Landmann, S., Gross, O., Robinson, M. J., Osorio, F., Slack, E. C., Tsoni, S. V., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V., Brown, G. D., Ruland, J. and Reis e Sousa, C. (2007) 'Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17', *Nat Immunol*, 8(6), pp. 630-8.

6 Literaturverzeichnis

6.1 Literaturverzeichnis in Reihenfolge der Verweisnummern

- ⁶⁷ Li, Y., Wei, C., Xu, H., Jia, J., Wei, Z., Guo, R., Jia, Y., Wu, Y., Li, Y., Qi, X., Li, Z. and Gao, X. (2018) 'The Immunoregulation of Th17 in Host against Intracellular Bacterial Infection', *Mediators Inflamm*, 2018, pp. 6587296.
- ⁶⁸ Harrington, L. E., Hatton, R. D., Mangan, P. R., Turner, H., Murphy, T. L., Murphy, K. M. and Weaver, C. T. (2005) 'Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages', *Nat Immunol*, 6(11), pp. 1123-32.
- ⁶⁹ Laan, M., Cui, Z. H., Hoshino, H., Lotvall, J., Sjostrand, M., Gruenert, D. C., Skoogh, B. E. and Linden, A. (1999) 'Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways', *J Immunol*, 162(4), pp. 2347-52.
- ⁷⁰ Mitsdoerffer, M., Lee, Y., Jager, A., Kim, H. J., Korn, T., Kolls, J. K., Cantor, H., Bettelli, E. and Kuchroo, V. K. (2010) 'Proinflammatory T helper type 17 cells are effective B-cell helpers', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(32), pp. 14292-7.
- ⁷¹ McAdam, A. J., Greenwald, R. J., Levin, M. A., Chernova, T., Malenkovich, N., Ling, V., Freeman, G. J. and Sharpe, A. H. (2001) 'ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching', *Nature*, 409(6816), pp. 102-5.
- ⁷² Reinhardt, R. L., Liang, H. E. and Locksley, R. M. (2009) 'Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire', *Nat Immunol*, 10(4), pp. 385-93.
- ⁷³ Ebert, L. M., Horn, M. P., Lang, A. B. and Moser, B. (2004) 'B cells alter the phenotype and function of follicular-homing CXCR5+ T cells', *Eur J Immunol*, 34(12), pp. 3562-71.
- ⁷⁴ Zotos, D., Coquet, J. M., Zhang, Y., Light, A., D'Costa, K., Kallies, A., Corcoran, L. M., Godfrey, D. I., Toellner, K. M., Smyth, M. J., Nutt, S. L. and Tarlinton, D. M. (2010) 'IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism', *J Exp Med*, 207(2), pp. 365-78.
- ⁷⁵ Liu, D., Xu, H., Shih, C., Wan, Z., Ma, X., Ma, W., Luo, D. and Qi, H. (2015) 'T-B-cell entanglement and ICOSL-driven feed-forward regulation of germinal centre reaction', *Nature*, 517(7533), pp. 214-8.
- ⁷⁶ Ozaki, K., Spolski, R., Feng, C. G., Qi, C. F., Cheng, J., Sher, A., Morse, H. C., 3rd, Liu, C., Schwartzberg, P. L. and Leonard, W. J. (2002) 'A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production', *Science*, 298(5598), pp. 1630-4.
- ⁷⁷ Breitfeld, D., Ohl, L., Kremmer, E., Ellwart, J., Sallusto, F., Lipp, M. and Forster, R. (2000) 'Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production', *J Exp Med*, 192(11), pp. 1545-52.
- ⁷⁸ Schaerli, P., Willmann, K., Lang, A. B., Lipp, M., Loetscher, P. and Moser, B. *Ibid.* 'CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function', pp. 1553-62.
- ⁷⁹ Forster, R., Mattis, A. E., Kremmer, E., Wolf, E., Brem, G. and Lipp, M. (1996) 'A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen', *Cell*, 87(6), pp. 1037-47.

6 Literaturverzeichnis

6.1 Literaturverzeichnis in Reihenfolge der Verweisnummern

- ⁸⁰ Burzyn, D., Kuswanto, W., Kolodin, D., Shadrach, J. L., Cerletti, M., Jang, Y., Sefik, E., Tan, T. G., Wagers, A. J., Benoist, C. and Mathis, D. (2013) 'A special population of regulatory T cells potentiates muscle repair', *ibid.* 155, pp. 1282-95.
- ⁸¹ Rowe, J. H., Ertelt, J. M., Xin, L. and Way, S. S. (2012) 'Pregnancy imprints regulatory memory that sustains anergy to fetal antigen', *Nature*, 490(7418), pp. 102-6.
- ⁸² Eller, K., Kirsch, A., Wolf, A. M., Sopper, S., Tagwerker, A., Stanzl, U., Wolf, D., Patsch, W., Rosenkranz, A. R. and Eller, P. (2011) 'Potential role of regulatory T cells in reversing obesity-linked insulin resistance and diabetic nephropathy', *Diabetes*, 60(11), pp. 2954-62.
- ⁸³ Liesz, A., Suri-Payer, E., Veltkamp, C., Doerr, H., Sommer, C., Rivest, S., Giese, T. and Veltkamp, R. (2009) 'Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke', *Nat Med*, 15(2), pp. 192-9.
- ⁸⁴ Kleinschnitz, C., Kraft, P., Dreykluft, A., Hagedorn, I., Gobel, K., Schuhmann, M. K., Langhauser, F., Helluy, X., Schwarz, T., Bittner, S., Mayer, C. T., Brede, M., Varallyay, C., Pham, M., Bendszus, M., Jakob, P., Magnus, T., Meuth, S. G., Iwakura, Y., Zerneck, A., Sparwasser, T., Nieswandt, B., Stoll, G. and Wiendl, H. (2013) 'Regulatory T cells are strong promoters of acute ischemic stroke in mice by inducing dysfunction of the cerebral microvasculature', *Blood*, 121(4), pp. 679-91.
- ⁸⁵ Shimizu, J., Yamazaki, S. and Sakaguchi, S. (1999) 'Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity', *J Immunol*, 163(10), pp. 5211-8.
- ⁸⁶ Shang, B., Liu, Y., Jiang, S. J. and Liu, Y. (2015) 'Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3+ regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis', *Sci Rep*, 5, pp. 15179.
- ⁸⁷ Yu, F., Sharma, S., Edwards, J., Feigenbaum, L. and Zhu, J. (2015) 'Dynamic expression of transcription factors T-bet and GATA-3 by regulatory T cells maintains immunotolerance', *Nat Immunol*, 16(2), pp. 197-206.
- ⁸⁸ Apostolou, I. and von Boehmer, H. (2004) 'In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells', *J Exp Med*, 199(10), pp. 1401-8.
- ⁸⁹ Vieira, P. L., Christensen, J. R., Minaee, S., O'Neill, E. J., Barrat, F. J., Boonstra, A., Barthlott, T., Stockinger, B., Wraith, D. C. and O'Garra, A. (2004) 'IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells', *J Immunol*, 172(10), pp. 5986-93.
- ⁹⁰ Faria, A. M. and Weiner, H. L. (2005) 'Oral tolerance', *Immunol Rev*, 206, pp. 232-59.
- ⁹¹ Palomares, O., Yaman, G., Azkur, A. K., Akkoc, T., Akdis, M. and Akdis, C. A. (2010) 'Role of Treg in immune regulation of allergic diseases', *Eur J Immunol*, 40(5), pp. 1232-40.
- ⁹² de Waal Malefyt, R., Haanen, J., Spits, H., Roncarolo, M. G., te Velde, A., Figdor, C., Johnson, K., Kastelein, R., Yssel, H. and de Vries, J. E. (1991)

6 Literaturverzeichnis

6.1 Literaturverzeichnis in Reihenfolge der Verweisnummern

'Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression', *J Exp Med*, 174(4), pp. 915-24.

⁹³ Joss, A., Akdis, M., Faith, A., Blaser, K. and Akdis, C. A. (2000) 'IL-10 directly acts on T cells by specifically altering the CD28 co-stimulation pathway', *Eur J Immunol*, 30(6), pp. 1683-90.

⁹⁴ Varma, T. K., Toliver-Kinsky, T. E., Lin, C. Y., Koutrouvelis, A. P., Nichols, J. E. and Sherwood, E. R. (2001) 'Cellular mechanisms that cause suppressed gamma interferon secretion in endotoxin-tolerant mice', *Infect Immun*, 69(9), pp. 5249-63.

⁹⁵ Sanjabi, S., Oh, S. A. and Li, M. O. (2017) 'Regulation of the Immune Response by TGF-beta: From Conception to Autoimmunity and Infection', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 9(6).

⁹⁶ Powrie, F., Carlino, J., Leach, M. W., Mauze, S. and Coffman, R. L. (1996) 'A critical role for transforming growth factor-beta but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1-mediated colitis by CD45RB(low) CD4+ T cells', *J Exp Med*, 183(6), pp. 2669-74.

⁹⁷ Collison, L. W., Workman, C. J., Kuo, T. T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K. M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R. S. and Vignali, D. A. (2007) 'The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function', *Nature*, 450(7169), pp. 566-9.

⁹⁸ Gondek, D. C., Lu, L. F., Quezada, S. A., Sakaguchi, S. and Noelle, R. J. (2005) 'Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism', *J Immunol*, 174(4), pp. 1783-6.

⁹⁹ Takenaka, M. C., Robson, S. and Quintana, F. J. (2016) 'Regulation of the T Cell Response by CD39', *Trends Immunol*, 37(7), pp. 427-439.

¹⁰⁰ Pandiyan, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J. and Lenardo, M. J. (2007) 'CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells', *Nat Immunol*, 8(12), pp. 1353-62.

¹⁰¹ Palomares, O., Martin-Fontecha, M., Lauener, R., Traidl-Hoffmann, C., Cavkaytar, O., Akdis, M. and Akdis, C. A. (2014) 'Regulatory T cells and immune regulation of allergic diseases: roles of IL-10 and TGF-beta', *Genes Immun*, 15(8), pp. 511-20.

¹⁰² Qureshi, O. S., Zheng, Y., Nakamura, K., Attridge, K., Manzotti, C., Schmidt, E. M., Baker, J., Jeffery, L. E., Kaur, S., Briggs, Z., Hou, T. Z., Fütter, C. E., Anderson, G., Walker, L. S. and Sansom, D. M. (2011) 'Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4', *Science*, 332(6029), pp. 600-3.

¹⁰³ Francisco, L. M., Sage, P. T. and Sharpe, A. H. (2010) 'The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity', *Immunol Rev*, 236, pp. 219-42.

6 Literaturverzeichnis

6.1 Literaturverzeichnis in Reihenfolge der Verweisnummern

¹⁰⁴ Chung, Y., Tanaka, S., Chu, F., Nurieva, R. I., Martinez, G. J., Rawal, S., Wang, Y. H., Lim, H., Reynolds, J. M., Zhou, X. H., Fan, H. M., Liu, Z. M., Neelapu, S. S. and Dong, C. (2011) 'Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions', *Nat Med*, 17(8), pp. 983-8.

¹⁰⁵ Arruvito, L., Payaslian, F., Baz, P., Podhorzer, A., Billordo, A., Pandolfi, J., Semeniuk, G., Arribalzaga, E. and Fainboim, L. (2014) 'Identification and clinical relevance of naturally occurring human CD8+HLA-DR+ regulatory T cells', *J Immunol*, 193(9), pp. 4469-76.

¹⁰⁶ Zaba, L. C., Fuentes-Duculan, J., Eungdamrong, N. J., Abello, M. V., Novitskaya, I., Pierson, K. C., Gonzalez, J., Krueger, J. G. and Lowes, M. A. (2009) 'Psoriasis is characterized by accumulation of immunostimulatory and Th1/Th17 cell-polarizing myeloid dendritic cells', *J Invest Dermatol*, 129(1), pp. 79-88.

¹⁰⁷ Plank, M. W., Kaiko, G. E., Maltby, S., Weaver, J., Tay, H. L., Shen, W., Wilson, M. S., Durum, S. K. and Foster, P. S. (2017) 'Th22 Cells Form a Distinct Th Lineage from Th17 Cells In Vitro with Unique Transcriptional Properties and Tbet-Dependent Th1 Plasticity', *J Immunol*, 198(5), pp. 2182-2190.

¹⁰⁸ Gagliani, N., Amezcu Vesely, M. C., Iseppon, A., Brockmann, L., Xu, H., Palm, N. W., de Zoete, M. R., Licona-Limon, P., Paiva, R. S., Ching, T., Weaver, C., Zi, X., Pan, X., Fan, R., Garmire, L. X., Cotton, M. J., Drier, Y., Bernstein, B., Geginat, J., Stockinger, B., Esplugues, E., Huber, S. and Flavell, R. A. (2015) 'Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation', *Nature*, 523(7559), pp. 221-5.

¹⁰⁹ Xu, L., Kitani, A., Fuss, I. and Strober, W. (2007) 'Cutting edge: regulatory T cells induce CD4+CD25-Foxp3- T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta', *J Immunol*, 178(11), pp. 6725-9.

¹¹⁰ Tsuji, M., Komatsu, N., Kawamoto, S., Suzuki, K., Kanagawa, O., Honjo, T., Hori, S. and Fagarasan, S. (2009) 'Preferential generation of follicular B helper T cells from Foxp3+ T cells in gut Peyer's patches', *Science*, 323(5920), pp. 1488-92.

¹¹¹ Lin, Y., Ritchea, S., Logar, A., Slight, S., Messmer, M., Rangel-Moreno, J., Guglani, L., Alcorn, J. F., Strawbridge, H., Park, S. M., Onishi, R., Nyugen, N., Walter, M. J., Pociask, D., Randall, T. D., Gaffen, S. L., Iwakura, Y., Kolls, J. K. and Khader, S. A. (2009) 'Interleukin-17 is required for T helper 1 cell immunity and host resistance to the intracellular pathogen *Francisella tularensis*', *Immunity*, 31(5), pp. 799-810.

¹¹² Riddell, S. R., Watanabe, K. S., Goodrich, J. M., Li, C. R., Agha, M. E. and Greenberg, P. D. (1992) 'Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones', *Science*, 257(5067), pp. 238-41.

¹¹³ Smyth, M. J. and Trapani, J. A. (1998) 'The relative role of lymphocyte granule exocytosis versus death receptor-mediated cytotoxicity in viral pathophysiology', *J Virol*, 72(1), pp. 1-9.

6 Literaturverzeichnis

6.1 Literaturverzeichnis in Reihenfolge der Verweisnummern

- ¹¹⁴ Dotiwala, F., Mulik, S., Polidoro, R. B., Ansara, J. A., Burleigh, B. A., Walch, M., Gazzinelli, R. T. and Lieberman, J. (2016) 'Killer lymphocytes use granulysin, perforin and granzymes to kill intracellular parasites', *Nat Med*, 22(2), pp. 210-6.
- ¹¹⁵ Barral, D. C. and Brenner, M. B. (2007) 'CD1 antigen presentation: how it works', *Nat Rev Immunol*, 7(12), pp. 929-41.
- ¹¹⁶ Blum, J. S., Wearsch, P. A. and Cresswell, P. (2013) 'Pathways of antigen processing', *Annu Rev Immunol*, 31, pp. 443-73.
- ¹¹⁷ Chavez-Galan, L., Arenas-Del Angel, M. C., Zenteno, E., Chavez, R. and Lascurain, R. (2009) 'Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes', *Cell Mol Immunol*, 6(1), pp. 15-25.
- ¹¹⁸ Keene, J. A. and Forman, J. (1982) 'Helper activity is required for the in vivo generation of cytotoxic T lymphocytes', *J Exp Med*, 155(3), pp. 768-82.
- ¹¹⁹ Bennett, S. R., Carbone, F. R., Karamalis, F., Miller, J. F. and Heath, W. R. (1997) 'Induction of a CD8+ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4+ T cell help', *ibid.* 186(1), pp. 65-70.
- ¹²⁰ Buller, R. M., Holmes, K. L., Hugin, A., Frederickson, T. N. and Morse, H. C., 3rd (1987) 'Induction of cytotoxic T-cell responses in vivo in the absence of CD4 helper cells', *Nature*, 328(6125), pp. 77-9.
- ¹²¹ Janssen, E. M., Lemmens, E. E., Wolfe, T., Christen, U., von Herrath, M. G. and Schoenberger, S. P. (2003) 'CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes', *ibid.* 421(6925), pp. 852-6.
- ¹²² Sun, J. C., Williams, M. A. and Bevan, M. J. (2004) 'CD4+ T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8+ T cells after acute infection', *Nat Immunol*, 5(9), pp. 927-33.
- ¹²³ Bennett, S. R., Carbone, F. R., Karamalis, F., Flavell, R. A., Miller, J. F. and Heath, W. R. (1998) 'Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling', *Nature*, 393(6684), pp. 478-80.
- ¹²⁴ Cella, M., Scheidegger, D., Palmer-Lehmann, K., Lane, P., Lanzavecchia, A. and Alber, G. (1996) 'Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation', *J Exp Med*, 184(2), pp. 747-52.
- ¹²⁵ Williams, M. A., Tyznik, A. J. and Bevan, M. J. (2006) 'Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells', *Nature*, 441(7095), pp. 890-3.
- ¹²⁶ Pipkin, M. E., Sacks, J. A., Cruz-Guilloty, F., Lichtenheld, M. G., Bevan, M. J. and Rao, A. (2010) 'Interleukin-2 and inflammation induce distinct transcriptional programs that promote the differentiation of effector cytolytic T cells', *Immunity*, 32(1), pp. 79-90.
- ¹²⁷ Allard, E. L., Hardy, M. P., Leignadier, J., Marquis, M., Rooney, J., Lehoux, D. and Labrecque, N. (2007) 'Overexpression of IL-21 promotes massive CD8+ memory T cell accumulation', *Eur J Immunol*, 37(11), pp. 3069-77.

6 Literaturverzeichnis

6.1 Literaturverzeichnis in Reihenfolge der Verweisnummern

- ¹²⁸ Cui, W., Joshi, N. S., Jiang, A. and Kaech, S. M. (2009) 'Effects of Signal 3 during CD8 T cell priming: Bystander production of IL-12 enhances effector T cell expansion but promotes terminal differentiation', *Vaccine*, 27(15), pp. 2177-87.
- ¹²⁹ Veiga-Fernandes, H., Walter, U., Bourgeois, C., McLean, A. and Rocha, B. (2000) 'Response of naive and memory CD8+ T cells to antigen stimulation in vivo', *Nat Immunol*, 1(1), pp. 47-53.
- ¹³⁰ Zimmermann, C., Prevost-Blondel, A., Blaser, C. and Pircher, H. (1999) 'Kinetics of the response of naive and memory CD8 T cells to antigen: similarities and differences', *Eur J Immunol*, 29(1), pp. 284-90.
- ¹³¹ Cho, B. K., Wang, C., Sugawa, S., Eisen, H. N. and Chen, J. (1999) 'Functional differences between memory and naive CD8 T cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(6), pp. 2976-81.
- ¹³² Strutt, T. M., McKinstry, K. K., Dibble, J. P., Winchell, C., Kuang, Y., Curtis, J. D., Huston, G., Dutton, R. W. and Swain, S. L. (2010) 'Memory CD4+ T cells induce innate responses independently of pathogen', *Nat Med*, 16(5), pp. 558-64, 1p following 564.
- ¹³³ Croft, M., Bradley, L. M. and Swain, S. L. (1994) 'Naive versus memory CD4 T cell response to antigen. Memory cells are less dependent on accessory cell costimulation and can respond to many antigen-presenting cell types including resting B cells', *J Immunol*, 152(6), pp. 2675-85.
- ¹³⁴ Curtsinger, J. M., Schmidt, C. S., Mondino, A., Lins, D. C., Kedl, R. M., Jenkins, M. K. and Mescher, M. F. (1999) 'Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ T cells', *ibid.* 162, pp. 3256-62.
- ¹³⁵ Curtsinger, J. M., Valenzuela, J. O., Agarwal, P., Lins, D. and Mescher, M. F. (2005) 'Type I IFNs provide a third signal to CD8 T cells to stimulate clonal expansion and differentiation', *ibid.* 174(8), pp. 4465-9.
- ¹³⁶ Curtsinger, J. M., Lins, D. C. and Mescher, M. F. (1998) 'CD8+ memory T cells (CD44^{high}, Ly-6C⁺) are more sensitive than naive cells to (CD44^{low}, Ly-6C⁻) to TCR/CD8 signaling in response to antigen', *ibid.* 160(7), pp. 3236-43.
- ¹³⁷ Beckman, E. M., Porcelli, S. A., Morita, C. T., Behar, S. M., Furlong, S. T. and Brenner, M. B. (1994) 'Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted alpha beta+ T cells', *Nature*, 372(6507), pp. 691-4.
- ¹³⁸ Kjer-Nielsen, L., Patel, O., Corbett, A. J., Le Nours, J., Meehan, B., Liu, L., Bhati, M., Chen, Z., Kostenko, L., Reantragoon, R., Williamson, N. A., Purcell, A. W., Dudek, N. L., McConville, M. J., O'Hair, R. A., Khairallah, G. N., Godfrey, D. I., Fairlie, D. P., Rossjohn, J. and McCluskey, J. (2012) 'MR1 presents microbial vitamin B metabolites to MAIT cells', *ibid.* 491(7426), pp. 717-23.
- ¹³⁹ Lepore, M., Mori, L. and De Libero, G. (2018) 'The Conventional Nature of Non-MHC-Restricted T Cells', *Front Immunol*, 9, pp. 1365.
- ¹⁴⁰ Brenner, M. B., McLean, J., Dialynas, D. P., Strominger, J. L., Smith, J. A., Owen, F. L., Seidman, J. G., Ip, S., Rosen, F. and Krangel, M. S. (1986) 'Identification of a putative second T-cell receptor', *Nature*, 322(6075), pp. 145-9.

6 Literaturverzeichnis

6.1 Literaturverzeichnis in Reihenfolge der Verweisnummern

- ¹⁴¹ McIntyre, B. W. and Allison, J. P. (1983) 'The mouse T cell receptor: structural heterogeneity of molecules of normal T cells defined by xenoantiserum', *Cell*, 34(3), pp. 739-46.
- ¹⁴² Hedrick, S. M., Cohen, D. I., Nielsen, E. A. and Davis, M. M. (1984) 'Isolation of cDNA clones encoding T cell-specific membrane-associated proteins', *Nature*, 308(5955), pp. 149-53.
- ¹⁴³ Dong, Zheng, L., Lin, J., Zhang, B., Zhu, Y., Li, N., Xie, S., Wang, Y., Gao, N. and Huang, Z. (2019) 'Structural basis of assembly of the human T cell receptor-CD3 complex', *ibid.*573(7775), pp. 546-552.
- ¹⁴⁴ Birnbaum, M. E., Mendoza, J. L., Sethi, D. K., Dong, S., Glanville, J., Dobbins, J., Ozkan, E., Davis, M. M., Wucherpfennig, K. W. and Garcia, K. C. (2014b) 'Deconstructing the peptide-MHC specificity of T cell recognition', *Cell*, 157(5), pp. 1073-87.
- ¹⁴⁵ Yague, J., White, J., Coleclough, C., Kappler, J., Palmer, E. and Marrack, P. (1985) 'The T cell receptor: the alpha and beta chains define idiotype, and antigen and MHC specificity', *ibid.*42(1), pp. 81-7.
- ¹⁴⁶ Love, P. E. and Hayes, S. M. (2010) 'ITAM-mediated signaling by the T-cell antigen receptor', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(6), pp. a002485.
- ¹⁴⁷ Birnbaum, M. E., Berry, R., Hsiao, Y. S., Chen, Z., Shingu-Vazquez, M. A., Yu, X., Waghray, D., Fischer, S., McCluskey, J., Rossjohn, J., Walz, T. and Garcia, K. C. (2014a) 'Molecular architecture of the alphabeta T cell receptor-CD3 complex', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(49), pp. 17576-81.
- ¹⁴⁸ Love, P. E. and Shores, E. W. (2000) 'ITAM multiplicity and thymocyte selection: how low can you go?', *Immunity*, 12(6), pp. 591-7.
- ¹⁴⁹ Nika, K., Soldani, C., Salek, M., Paster, W., Gray, A., Etzensperger, R., Fugger, L., Polzella, P., Cerundolo, V., Dushek, O., Hofer, T., Viola, A. and Acuto, O. (2010) 'Constitutively active Lck kinase in T cells drives antigen receptor signal transduction', *ibid.*32, pp. 766-77.
- ¹⁵⁰ Samelson, L. E., Phillips, A. F., Luong, E. T. and Klausner, R. D. (1990) 'Association of the fyn protein-tyrosine kinase with the T-cell antigen receptor', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(11), pp. 4358-62.
- ¹⁵¹ Horejsi, V., Zhang, W. and Schraven, B. (2004) 'Transmembrane adaptor proteins: organizers of immunoreceptor signalling', *Nat Rev Immunol*, 4(8), pp. 603-16.
- ¹⁵² Zhang, W., Sloan-Lancaster, J., Kitchen, J., Tribble, R. P. and Samelson, L. E. (1998) 'LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation', *Cell*, 92(1), pp. 83-92.
- ¹⁵³ Gaud, G., Lesourne, R. and Love, P. E. (2018) 'Regulatory mechanisms in T cell receptor signalling', *Nat Rev Immunol*, 18(8), pp. 485-497.
- ¹⁵⁴ Schwartz, R. H., Mueller, D. L., Jenkins, M. K. and Quill, H. (1989) 'T-cell clonal anergy', *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 54 Pt 2, pp. 605-10.

6 Literaturverzeichnis

6.1 Literaturverzeichnis in Reihenfolge der Verweisnummern

- ¹⁵⁵ Jenkins, M. K., Chen, C. A., Jung, G., Mueller, D. L. and Schwartz, R. H. (1990) 'Inhibition of antigen-specific proliferation of type 1 murine T cell clones after stimulation with immobilized anti-CD3 monoclonal antibody', *J Immunol*, 144(1), pp. 16-22.
- ¹⁵⁶ June, C. H., Ledbetter, J. A., Linsley, P. S. and Thompson, C. B. (1990) 'Role of the CD28 receptor in T-cell activation', *Immunol Today*, 11(6), pp. 211-6.
- ¹⁵⁷ Linsley, P. S., Clark, E. A. and Ledbetter, J. A. (1990) 'T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB-1', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(13), pp. 5031-5.
- ¹⁵⁸ Viola, A. and Lanzavecchia, A. (1996) 'T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds', *Science*, 273(5271), pp. 104-6.
- ¹⁵⁹ Boise, L. H., Minn, A. J., Noel, P. J., June, C. H., Accavitti, M. A., Lindsten, T. and Thompson, C. B. (1995) 'CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL', *Immunity*, 3(1), pp. 87-98.
- ¹⁶⁰ Thompson, C. B., Lindsten, T., Ledbetter, J. A., Kunkel, S. L., Young, H. A., Emerson, S. G., Leiden, J. M. and June, C. H. (1989) 'CD28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell-derived lymphokines/cytokines', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(4), pp. 1333-7.
- ¹⁶¹ Lindstein, T., June, C. H., Ledbetter, J. A., Stella, G. and Thompson, C. B. (1989) 'Regulation of lymphokine messenger RNA stability by a surface-mediated T cell activation pathway', *Science*, 244(4902), pp. 339-43.
- ¹⁶² Zhou, X. Y., Yashiro-Ohtani, Y., Nakahira, M., Park, W. R., Abe, R., Hamaoka, T., Naramura, M., Gu, H. and Fujiwara, H. (2002) 'Molecular mechanisms underlying differential contribution of CD28 versus non-CD28 costimulatory molecules to IL-2 promoter activation', *J Immunol*, 168(8), pp. 3847-54.
- ¹⁶³ McAdam, A. J., Schweitzer, A. N. and Sharpe, A. H. (1998) 'The role of B7 co-stimulation in activation and differentiation of CD4+ and CD8+ T cells', *Immunol Rev*, 165, pp. 231-47.
- ¹⁶⁴ Tang, Q., Henriksen, K. J., Boden, E. K., Tooley, A. J., Ye, J., Subudhi, S. K., Zheng, X. X., Strom, T. B. and Bluestone, J. A. (2003) 'Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells', *J Immunol*, 171(7), pp. 3348-52.
- ¹⁶⁵ Linsley, P. S., Brady, W., Urnes, M., Grosmaire, L. S., Damle, N. K. and Ledbetter, J. A. (1991) 'CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7', *J Exp Med*, 174(3), pp. 561-9.
- ¹⁶⁶ Linsley, P. S., Bradshaw, J., Greene, J., Peach, R., Bennett, K. L. and Mittler, R. S. (1996) 'Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement', *Immunity*, 4(6), pp. 535-43.
- ¹⁶⁷ Essery, G., Feldmann, M. and Lamb, J. R. (1988) 'Interleukin-2 can prevent and reverse antigen-induced unresponsiveness in cloned human T lymphocytes', *Immunology*, 64(3), pp. 413-7.

6 Literaturverzeichnis

6.1 Literaturverzeichnis in Reihenfolge der Verweisnummern

- ¹⁶⁸ Wells, A. D., Walsh, M. C., Bluestone, J. A. and Turka, L. A. (2001) 'Signaling through CD28 and CTLA-4 controls two distinct forms of T cell anergy', *J Clin Invest*, 108(6), pp. 895-903.
- ¹⁶⁹ Sharpe, A. H. (2009) 'Mechanisms of costimulation', *Immunol Rev*, 229(1), pp. 5-11.
- ¹⁷⁰ Croft, M. (2010) 'Control of immunity by the TNFR-related molecule OX40 (CD134)', *Annu Rev Immunol*, 28, pp. 57-78.
- ¹⁷¹ Croft, M., So, T., Duan, W. and Soroosh, P. (2009) 'The significance of OX40 and OX40L to T-cell biology and immune disease', *Immunol Rev*, 229(1), pp. 173-91.
- ¹⁷² Rogers, P. R., Song, J., Gramaglia, I., Killeen, N. and Croft, M. (2001) 'OX40 promotes Bcl-xL and Bcl-2 expression and is essential for long-term survival of CD4 T cells', *Immunity*, 15(3), pp. 445-55.
- ¹⁷³ Maxwell, J. R., Weinberg, A., Prell, R. A. and Vella, A. T. (2000) 'Danger and OX40 receptor signaling synergize to enhance memory T cell survival by inhibiting peripheral deletion', *J Immunol*, 164(1), pp. 107-12.
- ¹⁷⁴ Bansal-Pakala, P., Jember, A. G. and Croft, M. (2001) 'Signaling through OX40 (CD134) breaks peripheral T-cell tolerance', *Nat Med*, 7(8), pp. 907-12.
- ¹⁷⁵ Valzasina, B., Guiducci, C., Dislich, H., Killeen, N., Weinberg, A. D. and Colombo, M. P. (2005) 'Triggering of OX40 (CD134) on CD4(+)CD25+ T cells blocks their inhibitory activity: a novel regulatory role for OX40 and its comparison with GITR', *Blood*, 105(7), pp. 2845-51.
- ¹⁷⁶ Piconese, S., Valzasina, B. and Colombo, M. P. (2008) 'OX40 triggering blocks suppression by regulatory T cells and facilitates tumor rejection', *J Exp Med*, 205(4), pp. 825-39.
- ¹⁷⁷ Buchan, S. L., Rogel, A. and Al-Shamkhani, A. (2018) 'The immunobiology of CD27 and OX40 and their potential as targets for cancer immunotherapy', *Blood*, 131(1), pp. 39-48.
- ¹⁷⁸ Curti, B. D., Kovacsovics-Bankowski, M., Morris, N., Walker, E., Chisholm, L., Floyd, K., Walker, J., Gonzalez, I., Meeuwssen, T., Fox, B. A., Moudgil, T., Miller, W., Haley, D., Coffey, T., Fisher, B., Delanty-Miller, L., Rymarchyk, N., Kelly, T., Crocenzi, T., Bernstein, E., Sanborn, R., Urba, W. J. and Weinberg, A. D. (2013) 'OX40 is a potent immune-stimulating target in late-stage cancer patients', *Cancer Res*, 73(24), pp. 7189-7198.
- ¹⁷⁹ Aspeslagh, S., Postel-Vinay, S., Rusakiewicz, S., Soria, J. C., Zitvogel, L. and Marabelle, A. (2016) 'Rationale for anti-OX40 cancer immunotherapy', *Eur J Cancer*, 52, pp. 50-66.
- ¹⁸⁰ Mingueneau, M., Roncagalli, R., Gregoire, C., Kissenpfennig, A., Miazek, A., Archambaud, C., Wang, Y., Perrin, P., Bertosio, E., Sansoni, A., Richelme, S., Locksley, R. M., Aguado, E., Malissen, M. and Malissen, B. (2009) 'Loss of the LAT adaptor converts antigen-responsive T cells into pathogenic effectors that function independently of the T cell receptor', *Immunity*, 31(2), pp. 197-208.

6 Literaturverzeichnis

6.1 Literaturverzeichnis in Reihenfolge der Verweisnummern

¹⁸¹ Seddon, B., Legname, G., Tomlinson, P. and Zamoyska, R. (2000) 'Long-term survival but impaired homeostatic proliferation of Naive T cells in the absence of p56lck', *Science*, 290(5489), pp. 127-31.

¹⁸² Molina, T. J., Kishihara, K., Siderovski, D. P., van Ewijk, W., Narendran, A., Timms, E., Wakeham, A., Paige, C. J., Hartmann, K. U., Veillette, A. and et al. (1992) 'Profound block in thymocyte development in mice lacking p56lck', *Nature*, 357(6374), pp. 161-4.

¹⁸³ Lovatt, M., Filby, A., Parravicini, V., Werlen, G., Palmer, E. and Zamoyska, R. (2006) 'Lck regulates the threshold of activation in primary T cells, while both Lck and Fyn contribute to the magnitude of the extracellular signal-related kinase response', *Mol Cell Biol*, 26(22), pp. 8655-65.

¹⁸⁴ Tsun, A., Qureshi, I., Stinchcombe, J. C., Jenkins, M. R., de la Roche, M., Kleczkowska, J., Zamoyska, R. and Griffiths, G. M. (2011) 'Centrosome docking at the immunological synapse is controlled by Lck signaling', *J Cell Biol*, 192(4), pp. 663-74.

¹⁸⁵ Cartellieri, M., Bachmann, M., Feldmann, A., Bippes, C., Stamova, S., Wehner, R., Temme, A. and Schmitz, M. (2010) 'Chimeric antigen receptor-engineered T cells for immunotherapy of cancer', *J Biomed Biotechnol*, 2010, pp. 956304.

¹⁸⁶ Sadelain, M., Brentjens, R. and Riviere, I. (2009) 'The promise and potential pitfalls of chimeric antigen receptors', *Curr Opin Immunol*, 21(2), pp. 215-23.

¹⁸⁷ Willemsen, R. A., Ronteltap, C., Chames, P., Debets, R. and Bolhuis, R. L. (2005) 'T cell retargeting with MHC class I-restricted antibodies: the CD28 costimulatory domain enhances antigen-specific cytotoxicity and cytokine production', *J Immunol*, 174(12), pp. 7853-8.

¹⁸⁸ Louis, C. U., Savoldo, B., Dotti, G., Pule, M., Yvon, E., Myers, G. D., Rossig, C., Russell, H. V., Diouf, O., Liu, E., Liu, H., Wu, M. F., Gee, A. P., Mei, Z., Rooney, C. M., Heslop, H. E. and Brenner, M. K. (2011) 'Antitumor activity and long-term fate of chimeric antigen receptor-positive T cells in patients with neuroblastoma', *Blood*, 118(23), pp. 6050-6.

¹⁸⁹ Deeks, S. G., Wagner, B., Anton, P. A., Mitsuyasu, R. T., Scadden, D. T., Huang, C., Macken, C., Richman, D. D., Christopherson, C., June, C. H., Lazar, R., Broad, D. F., Jalali, S. and Hege, K. M. (2002) 'A phase II randomized study of HIV-specific T-cell gene therapy in subjects with undetectable plasma viremia on combination antiretroviral therapy', *Mol Ther*, 5(6), pp. 788-97.

¹⁹⁰ Seif, M., Einsele, H. and Loffler, J. (2019) 'CAR T Cells Beyond Cancer: Hope for Immunomodulatory Therapy of Infectious Diseases', *Front Immunol*, 10, pp. 2711.

¹⁹¹ Maus, M. V., Grupp, S. A., Porter, D. L. and June, C. H. (2014) 'Antibody-modified T cells: CARs take the front seat for hematologic malignancies', *Blood*, 123(17), pp. 2625-35.

6 Literaturverzeichnis

6.1 Literaturverzeichnis in Reihenfolge der Verweisnummern

- ¹⁹² Brocker, T. (2000) 'Chimeric Fv-zeta or Fv-epsilon receptors are not sufficient to induce activation or cytokine production in peripheral T cells', *ibid.*96(5), pp. 1999-2001.
- ¹⁹³ Barrett, D. M., Singh, N., Porter, D. L., Grupp, S. A. and June, C. H. (2014) 'Chimeric antigen receptor therapy for cancer', *Annu Rev Med*, 65, pp. 333-47.
- ¹⁹⁴ Hu, B., Ren, J., Luo, Y., Keith, B., Young, R. M., Scholler, J., Zhao, Y. and June, C. H. (2017) 'Augmentation of Antitumor Immunity by Human and Mouse CAR T Cells Secreting IL-18', *Cell Rep*, 20(13), pp. 3025-3033.
- ¹⁹⁵ Kueberuwa, G., Kalaitidou, M., Cheadle, E., Hawkins, R. E. and Gilham, D. E. (2018) 'CD19 CAR T Cells Expressing IL-12 Eradicate Lymphoma in Fully Lymphoreplete Mice through Induction of Host Immunity', *Mol Ther Oncolytics*, 8, pp. 41-51.
- ¹⁹⁶ Chmielewski, M. and Abken, H. (2017) 'CAR T Cells Releasing IL-18 Convert to T-Bet(high) FoxO1(low) Effectors that Exhibit Augmented Activity against Advanced Solid Tumors', *Cell Rep*, 21(11), pp. 3205-3219.
- ¹⁹⁷ Straathof, K. C., Pule, M. A., Yotnda, P., Dotti, G., Vanin, E. F., Brenner, M. K., Heslop, H. E., Spencer, D. M. and Rooney, C. M. (2005) 'An inducible caspase 9 safety switch for T-cell therapy', *Blood*, 105(11), pp. 4247-54.
- ¹⁹⁸ Schambach, A., Bohne, J., Chandra, S., Will, E., Margison, G. P., Williams, D. A. and Baum, C. (2006) 'Equal potency of gammaretroviral and lentiviral SIN vectors for expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in hematopoietic cells', *Mol Ther*, 13(2), pp. 391-400.
- ¹⁹⁹ Lois, C., Hong, E. J., Pease, S., Brown, E. J. and Baltimore, D. (2002) 'Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors', *Science*, 295(5556), pp. 868-72.
- ²⁰⁰ Morgan, R. A., Yang, J. C., Kitano, M., Dudley, M. E., Laurencot, C. M. and Rosenberg, S. A. (2010) 'Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2', *Mol Ther*, 18(4), pp. 843-51.
- ²⁰¹ Pule, M. A., Straathof, K. C., Dotti, G., Heslop, H. E., Rooney, C. M. and Brenner, M. K. (2005) 'A chimeric T cell antigen receptor that augments cytokine release and supports clonal expansion of primary human T cells', *ibid.*12(5), pp. 933-41.
- ²⁰² *In-Fusion® HD Cloning Kit User Manual*. (Takara Bio USA Inc. 2016).
- ²⁰³ Robertson, J. M. and Walsh-Weller, J. (1998) 'An introduction to PCR primer design and optimization of amplification reactions', *Methods Mol Biol*, 98, pp. 121-54.
- ²⁰⁴ Varadaraj, K. and Skinner, D. M. (1994) 'Denaturants or cosolvents improve the specificity of PCR amplification of a G + C-rich DNA using genetically engineered DNA polymerases', *Gene*, 140(1), pp. 1-5.
- ²⁰⁵ Jensen, M. A., Fukushima, M. and Davis, R. W. (2010) 'DMSO and betaine greatly improve amplification of GC-rich constructs in de novo synthesis', *PLoS One*, 5(6), pp. e11024.

6 Literaturverzeichnis

6.1 Literaturverzeichnis in Reihenfolge der Verweisnummern

- ²⁰⁶ Schrödel, A. (2009) 'Trypsinierung von Zellkulturzellen', *Biologie in unserer Zeit*, 39(4).
- ²⁰⁷ Shu, Z., Heimfeld, S. and Gao, D. (2014) 'Hematopoietic SCT with cryopreserved grafts: adverse reactions after transplantation and cryoprotectant removal before infusion', *Bone Marrow Transplant*, 49(4), pp. 469-76.
- ²⁰⁸ Mullick Chowdhury, S., Lalwani, G., Zhang, K., Yang, J. Y., Neville, K. and Sitharaman, B. (2013) 'Cell specific cytotoxicity and uptake of graphene nanoribbons', *Biomaterials*, 34(1), pp. 283-93.
- ²⁰⁹ Johannsdottir, H. K., Mancini, R., Kartenbeck, J., Amato, L. and Helenius, A. (2009) 'Host cell factors and functions involved in vesicular stomatitis virus entry', *J Virol*, 83(1), pp. 440-53.
- ²¹⁰ Belot, L., Albertini, A. and Gaudin, Y. (2019) 'Structural and cellular biology of rhabdovirus entry', *Adv Virus Res*, 104, pp. 147-183.
- ²¹¹ Finkelshtein, D., Werman, A., Novick, D., Barak, S. and Rubinstein, M. (2013) 'LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(18), pp. 7306-11.
- ²¹² Zufferey, R., Nagy, D., Mandel, R. J., Naldini, L. and Trono, D. (1997) 'Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo', *Nat Biotechnol*, 15(9), pp. 871-5.
- ²¹³ Chen, W., Li, H., Liu, Z. and Yuan, W. (2016) 'Lipopolyplex for Therapeutic Gene Delivery and Its Application for the Treatment of Parkinson's Disease', *Front Aging Neurosci*, 8, pp. 68.
- ²¹⁴ 'Lenti-X™ qRT-PCR Titration Kit User Manual', (Takara Bio USA Inc. 2013).
- ²¹⁵ Davis, H. E., Morgan, J. R. and Yarmush, M. L. (2002) 'Polybrene increases retrovirus gene transfer efficiency by enhancing receptor-independent virus adsorption on target cell membranes', *Biophys Chem*, 97(2-3), pp. 159-72.
- ²¹⁶ Kotani, H., Newton, P. B., 3rd, Zhang, S., Chiang, Y. L., Otto, E., Weaver, L., Blaese, R. M., Anderson, W. F. and McGarrity, G. J. (1994) 'Improved methods of retroviral vector transduction and production for gene therapy', *Hum Gene Ther*, 5(1), pp. 19-28.
- ²¹⁷ 'DELFI® EuTDA Cytotoxicity Reagents', (PerkinElmer 2006).
- ²¹⁸ Saarinen, K., Kivisto, K., Blomberg, K., Punnonen, K. and Leino, L. (2000) 'Time-resolved fluorometric assay for leukocyte adhesion using a fluorescence enhancing ligand', *J Immunol Methods*, 236(1-2), pp. 19-26.
- ²¹⁹ Blomberg, K., Hautala, R., Lovgren, J., Mikkala, V. M., Lindqvist, C. and Akerman, K. (1996) 'Time-resolved fluorometric assay for natural killer activity using target cells labelled with a fluorescence enhancing ligand', *ibid.* 193(2), pp. 199-206.
- ²²⁰ Markt, S., Magnani, Z., Ciceri, F., Cazzaniga, S., Riddell, S. R., Traversari, C., Bordignon, C. and Bonini, C. (2003) 'Immunologic potential of donor lymphocytes expressing a suicide gene for early immune reconstitution after

6 Literaturverzeichnis

6.1 Literaturverzeichnis in Reihenfolge der Verweisnummern

hematopoietic T-cell-depleted stem cell transplantation', *Blood*, 101(4), pp. 1290-8.

²²¹ Sauce, D., Tonnelier, N., Duperrier, A., Petracca, B., de Carvalho Bittencourt, M., Saadi, M., Saas, P., Ferrand, C., Herve, P., Tiberghien, P. and Robinet, E. (2002) 'Influence of ex vivo expansion and retrovirus-mediated gene transfer on primary T lymphocyte phenotype and functions', *J Hematother Stem Cell Res*, 11(6), pp. 929-40.

²²² Simms, P. E. and Ellis, T. M. (1996) 'Utility of flow cytometric detection of CD69 expression as a rapid method for determining poly- and oligoclonal lymphocyte activation', *Clin Diagn Lab Immunol*, 3(3), pp. 301-4.

²²³ Antas, P. R., Oliveira, E. B., Milagres, A. S., Franken, K. C., Ottenhoff, T. H., Klatser, P., Sarno, E. N. and Sampaio, E. P. (2002) 'Kinetics of T cell-activation molecules in response to Mycobacterium tuberculosis antigens', *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 97(8), pp. 1097-9.

²²⁴ Waldmann, T. A. (2007) 'Anti-Tac (daclizumab, Zenapax) in the treatment of leukemia, autoimmune diseases, and in the prevention of allograft rejection: a 25-year personal odyssey', *J Clin Immunol*, 27(1), pp. 1-18.

²²⁵ Siegmund, K., Ruckert, B., Ouaked, N., Burgler, S., Speiser, A., Akdis, C. A. and Schmidt-Weber, C. B. (2009) 'Unique phenotype of human tonsillar and in vitro-induced FOXP3+CD8+ T cells', *J Immunol*, 182(4), pp. 2124-30.

²²⁶ Soeiro, R., Vaughan, M. H. and Darnell, J. E. (1968) 'The effect of puromycin on intranuclear steps in ribosome biosynthesis', *J Cell Biol*, 36(1), pp. 91-101.

²²⁷ Chmielewski, M., Hombach, A. A. and Abken, H. (2011) 'CD28 cosignalling does not affect the activation threshold in a chimeric antigen receptor-redirectioned T-cell attack', *Gene Ther*, 18(1), pp. 62-72.

²²⁸ Hombach, A., Sent, D., Schneider, C., Heuser, C., Koch, D., Pohl, C., Seliger, B. and Abken, H. (2001) 'T-cell activation by recombinant receptors: CD28 costimulation is required for interleukin 2 secretion and receptor-mediated T-cell proliferation but does not affect receptor-mediated target cell lysis', *Cancer Res*, 61(5), pp. 1976-82.

²²⁹ Hombach, A. A. and Abken, H. (2011) 'Costimulation by chimeric antigen receptors revisited the T cell antitumor response benefits from combined CD28-OX40 signalling', *Int J Cancer*, 129(12), pp. 2935-44.

²³⁰ Haynes, N. M., Trapani, J. A., Teng, M. W., Jackson, J. T., Cerruti, L., Jane, S. M., Kershaw, M. H., Smyth, M. J. and Darcy, P. K. (2002) 'Rejection of syngeneic colon carcinoma by CTLs expressing single-chain antibody receptors codelivering CD28 costimulation', *J Immunol*, 169(10), pp. 5780-6.

²³¹ Finney, H. M., Lawson, A. D., Bebbington, C. R. and Weir, A. N. (1998) 'Chimeric receptors providing both primary and costimulatory signaling in T cells from a single gene product', *ibid.* 161(6), pp. 2791-7.

²³² Durkop, H., Latza, U., Himmelreich, P. and Stein, H. (1995) 'Expression of the human OX40 (hOX40) antigen in normal and neoplastic tissues', *Br J Haematol*, 91(4), pp. 927-31.

6 Literaturverzeichnis

6.1 Literaturverzeichnis in Reihenfolge der Verweisnummern

- ²³³ Ohshima, Y., Tanaka, Y., Tozawa, H., Takahashi, Y., Maliszewski, C. and Delespesse, G. (1997) 'Expression and function of OX40 ligand on human dendritic cells', *J Immunol*, 159(8), pp. 3838-48.
- ²³⁴ Croft, M. (2009) 'The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases', *Nat Rev Immunol*, 9(4), pp. 271-85.
- ²³⁵ Chen, L. and Flies, D. B. (2013) 'Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition', *ibid.*13, pp. 227-42.
- ²³⁶ Vu, M. D., Xiao, X., Gao, W., Degauque, N., Chen, M., Kroemer, A., Killeen, N., Ishii, N. and Li, X. C. (2007) 'OX40 costimulation turns off Foxp3+ Tregs', *Blood*, 110(7), pp. 2501-10.
- ²³⁷ So, T. and Croft, M. (2007) 'Cutting edge: OX40 inhibits TGF-beta- and antigen-driven conversion of naive CD4 T cells into CD25+Foxp3+ T cells', *J Immunol*, 179(3), pp. 1427-30.
- ²³⁸ Kumar, P., Alharshawi, K., Bhattacharya, P., Marinelarena, A., Haddad, C., Sun, Z., Chiba, S., Epstein, A. L. and Prabhakar, B. S. (2017) 'Soluble OX40L and JAG1 Induce Selective Proliferation of Functional Regulatory T-Cells Independent of canonical TCR signaling', *Sci Rep*, 7, pp. 39751.
- ²³⁹ Alharshawi, K., Marinelarena, A., Kumar, P., El-Sayed, O., Bhattacharya, P., Sun, Z., Epstein, A. L., Maker, A. V. and Prabhakar, B. S. *Ibid.*'PKC- is dispensable for OX40L-induced TCR-independent Treg proliferation but contributes by enabling IL-2 production from effector T-cells', (1), pp. 6594.
- ²⁴⁰ Kroemer, A., Xiao, X., Vu, M. D., Gao, W., Minamimura, K., Chen, M., Maki, T. and Li, X. C. (2007) 'OX40 controls functionally different T cell subsets and their resistance to depletion therapy', *J Immunol*, 179(8), pp. 5584-91.
- ²⁴¹ Xiao, X., Gong, W., Demirci, G., Liu, W., Spoerl, S., Chu, X., Bishop, D. K., Turka, L. A. and Li, X. C. (2012) 'New insights on OX40 in the control of T cell immunity and immune tolerance in vivo', *ibid.*188(2), pp. 892-901.
- ²⁴² Ye, Q., Song, D. G., Poussin, M., Yamamoto, T., Best, A., Li, C., Coukos, G. and Powell, D. J., Jr. (2014) 'CD137 accurately identifies and enriches for naturally occurring tumor-reactive T cells in tumor', *Clin Cancer Res*, 20(1), pp. 44-55.
- ²⁴³ Wu, M. R., Zhang, T., Alcon, A. and Sentman, C. L. (2015) 'DNAM-1-based chimeric antigen receptors enhance T cell effector function and exhibit in vivo efficacy against melanoma', *Cancer Immunol Immunother*, 64(4), pp. 409-18.
- ²⁴⁴ Tang, X., Tang, Q., Mao, Y., Huang, X., Jia, L., Zhu, J. and Feng, Z. (2019) 'CD137 Co-Stimulation Improves The Antitumor Effect Of LMP1-Specific Chimeric Antigen Receptor T Cells In Vitro And In Vivo', *Onco Targets Ther*, 12, pp. 9341-9350.
- ²⁴⁵ Quintarelli, C., Orlando, D., Boffa, I., Guercio, M., Polito, V. A., Petretto, A., Lavarello, C., Sinibaldi, M., Weber, G., Del Bufalo, F., Giorda, E., Scarsella, M., Petrini, S., Pagliara, D., Locatelli, F., De Angelis, B. and Caruana, I. (2018) 'Choice of costimulatory domains and of cytokines determines CAR T-cell activity in neuroblastoma', *Oncoimmunology*, 7(6), pp. e1433518.

6 Literaturverzeichnis

6.1 Literaturverzeichnis in Reihenfolge der Verweisnummern

- ²⁴⁶ Brocker, T. and Karjalainen, K. (1995) 'Signals through T cell receptor-zeta chain alone are insufficient to prime resting T lymphocytes', *J Exp Med*, 181(5), pp. 1653-9.
- ²⁴⁷ Bridgeman, J. S., Hawkins, R. E., Bagley, S., Blaylock, M., Holland, M. and Gilham, D. E. (2010) 'The optimal antigen response of chimeric antigen receptors harboring the CD3zeta transmembrane domain is dependent upon incorporation of the receptor into the endogenous TCR/CD3 complex', *J Immunol*, 184(12), pp. 6938-49.
- ²⁴⁸ Alabanza, L., Pegues, M., Geldres, C., Shi, V., Wiltzius, J. J. W., Sievers, S. A., Yang, S. and Kochenderfer, J. N. (2017) 'Function of Novel Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptors with Human Variable Regions Is Affected by Hinge and Transmembrane Domains', *Mol Ther*, 25(11), pp. 2452-2465.
- ²⁴⁹ Moritz, D. and Groner, B. (1995) 'A spacer region between the single chain antibody- and the CD3 zeta-chain domain of chimeric T cell receptor components is required for efficient ligand binding and signaling activity', *Gene Ther*, 2(8), pp. 539-46.
- ²⁵⁰ Hombach, A., Heuser, C., Gerken, M., Fischer, B., Lewalter, K., Diehl, V., Pohl, C. and Abken, H. (2000) 'T cell activation by recombinant FcepsilonRI gamma-chain immune receptors: an extracellular spacer domain impairs antigen-dependent T cell activation but not antigen recognition', *ibid.*7(12), pp. 1067-75.
- ²⁵¹ Patel, S. D., Moskalenko, M., Smith, D., Maske, B., Finer, M. H. and McArthur, J. G. (1999) 'Impact of chimeric immune receptor extracellular protein domains on T cell function', *ibid.*6(3), pp. 412-9.
- ²⁵² Moritz, D., Wels, W., Mattern, J. and Groner, B. (1994) 'Cytotoxic T lymphocytes with a grafted recognition specificity for ERBB2-expressing tumor cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(10), pp. 4318-22.
- ²⁵³ Hudecek, M., Sommermeyer, D., Kosasih, P. L., Silva-Benedict, A., Liu, L., Rader, C., Jensen, M. C. and Riddell, S. R. (2015) 'The nonsignaling extracellular spacer domain of chimeric antigen receptors is decisive for in vivo antitumor activity', *Cancer Immunol Res*, 3(2), pp. 125-35.
- ²⁵⁴ Guest, R. D., Hawkins, R. E., Kirillova, N., Cheadle, E. J., Arnold, J., O'Neill, A., Irlam, J., Chester, K. A., Kemshead, J. T., Shaw, D. M., Embleton, M. J., Stern, P. L. and Gilham, D. E. (2005) 'The role of extracellular spacer regions in the optimal design of chimeric immune receptors: evaluation of four different scFvs and antigens', *J Immunother*, 28(3), pp. 203-11.
- ²⁵⁵ Hombach, A., Hombach, A. A. and Abken, H. (2010) 'Adoptive immunotherapy with genetically engineered T cells: modification of the IgG1 Fc 'spacer' domain in the extracellular moiety of chimeric antigen receptors avoids 'off-target' activation and unintended initiation of an innate immune response', *Gene Ther*, 17(10), pp. 1206-13.
- ²⁵⁶ Porter, D. L., Levine, B. L., Kalos, M., Bagg, A. and June, C. H. (2011) 'Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia', *N Engl J Med*, 365(8), pp. 725-33.

6 Literaturverzeichnis

6.1 Literaturverzeichnis in Reihenfolge der Verweisnummern

- ²⁵⁷ Press, M. F., Cordon-Cardo, C. and Slamon, D. J. (1990) 'Expression of the HER-2/neu proto-oncogene in normal human adult and fetal tissues', *Oncogene*, 5(7), pp. 953-62.
- ²⁵⁸ Slamon, D. J., Godolphin, W., Jones, L. A., Holt, J. A., Wong, S. G., Keith, D. E., Levin, W. J., Stuart, S. G., Udove, J., Ullrich, A. and et al. (1989) 'Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer', *Science*, 244(4905), pp. 707-12.
- ²⁵⁹ Carter, P., Presta, L., Gorman, C. M., Ridgway, J. B., Henner, D., Wong, W. L., Rowland, A. M., Kotts, C., Carver, M. E. and Shepard, H. M. (1992) 'Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(10), pp. 4285-9.
- ²⁶⁰ Bang, Y. J., Van Cutsem, E., Feyereislova, A., Chung, H. C., Shen, L., Sawaki, A., Lordick, F., Ohtsu, A., Omuro, Y., Satoh, T., Aprile, G., Kulikov, E., Hill, J., Lehle, M., Ruschoff, J., Kang, Y. K. and To, G. A. T. I. (2010) 'Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial', *Lancet*, 376(9742), pp. 687-97.
- ²⁶¹ Zhao, Y., Wang, Q. J., Yang, S., Kochenderfer, J. N., Zheng, Z., Zhong, X., Sadelain, M., Eshhar, Z., Rosenberg, S. A. and Morgan, R. A. (2009) 'A herceptin-based chimeric antigen receptor with modified signaling domains leads to enhanced survival of transduced T lymphocytes and antitumor activity', *J Immunol*, 183(9), pp. 5563-74.
- ²⁶² Lanitis, E., Dangaj, D., Hagemann, I. S., Song, D. G., Best, A., Sandaltzopoulos, R., Coukos, G. and Powell, D. J., Jr. (2012) 'Primary human ovarian epithelial cancer cells broadly express HER2 at immunologically-detectable levels', *PLoS One*, 7(11), pp. e49829.
- ²⁶³ D'Emilia, J., Bulovas, K., D'Ercole, K., Wolf, B., Steele, G., Jr. and Summerhayes, I. C. (1989) 'Expression of the c-erbB-2 gene product (p185) at different stages of neoplastic progression in the colon', *Oncogene*, 4(10), pp. 1233-9.
- ²⁶⁴ Disel, U., Germain, A., Yilmazel, B., Abali, H., Bolat, F. A., Yelensky, R., Elvin, J. A., Lipson, D., Chmielecki, J., Wang, K., Stephens, P. J., Ross, J. S., Miller, V. A., Ali, S. M. and George, T. J., Jr. (2015) 'Durable clinical benefit to trastuzumab and chemotherapy in a patient with metastatic colon adenocarcinoma harboring ERBB2 amplification', *Oncoscience*, 2(6), pp. 581-4.
- ²⁶⁵ Kameda, T., Yasui, W., Yoshida, K., Tsujino, T., Nakayama, H., Ito, M., Ito, H. and Tahara, E. (1990) 'Expression of ERBB2 in human gastric carcinomas: relationship between p185ERBB2 expression and the gene amplification', *Cancer Res*, 50(24), pp. 8002-9.
- ²⁶⁶ Fukushige, S., Matsubara, K., Yoshida, M., Sasaki, M., Suzuki, T., Semba, K., Toyoshima, K. and Yamamoto, T. (1986) 'Localization of a novel v-erbB-related gene, c-erbB-2, on human chromosome 17 and its amplification in a gastric cancer cell line', *Mol Cell Biol*, 6(3), pp. 955-8.

6 Literaturverzeichnis

6.1 Literaturverzeichnis in Reihenfolge der Verweisnummern

- ²⁶⁷ Gajjar, A., Hernan, R., Kocak, M., Fuller, C., Lee, Y., McKinnon, P. J., Wallace, D., Lau, C., Chintagumpala, M., Ashley, D. M., Kellie, S. J., Kun, L. and Gilbertson, R. J. (2004) 'Clinical, histopathologic, and molecular markers of prognosis: toward a new disease risk stratification system for medulloblastoma', *J Clin Oncol*, 22(6), pp. 984-93.
- ²⁶⁸ Ahmed, N., Ratnayake, M., Savoldo, B., Perlaky, L., Dotti, G., Wels, W. S., Bhattacharjee, M. B., Gilbertson, R. J., Shine, H. D., Weiss, H. L., Rooney, C. M., Heslop, H. E. and Gottschalk, S. (2007) 'Regression of experimental medulloblastoma following transfer of HER2-specific T cells', *Cancer Res*, 67(12), pp. 5957-64.
- ²⁶⁹ Borresen, A. L., Ottestad, L., Gaustad, A., Andersen, T. I., Heikkila, R., Jahnsen, T., Tveit, K. M. and Nesland, J. M. (1990) 'Amplification and protein over-expression of the neu/HER-2/c-erbB-2 protooncogene in human breast carcinomas: relationship to loss of gene sequences on chromosome 17, family history and prognosis', *Br J Cancer*, 62(4), pp. 585-90.
- ²⁷⁰ Rohrbach, S., Niemann, B., Silber, R. E. and Holtz, J. (2005) 'Neuregulin receptors erbB2 and erbB4 in failing human myocardium -- depressed expression and attenuated activation', *Basic Res Cardiol*, 100(3), pp. 240-9.
- ²⁷¹ Hoffmann, D., Schott, J. W., Geis, F. K., Lange, L., Muller, F. J., Lenz, D., Zychlinski, D., Steinemann, D., Morgan, M., Moritz, T. and Schambach, A. (2017) 'Detailed comparison of retroviral vectors and promoter configurations for stable and high transgene expression in human induced pluripotent stem cells', *Gene Ther*, 24(5), pp. 298-307.
- ²⁷² Winiarska, M., Nowis, D., Firczuk, M., Zagozdzon, A., Gabrysiak, M., Sadowski, R., Barankiewicz, J., Dwojak, M. and Golab, J. (2017) 'Selection of an optimal promoter for gene transfer in normal B cells', *Mol Med Rep*, 16(3), pp. 3041-3048.
- ²⁷³ Frigault, M. J., Lee, J., Basil, M. C., Carpenito, C., Motohashi, S., Scholler, J., Kawalekar, O. U., Guedan, S., McGettigan, S. E., Posey, A. D., Jr., Ang, S., Cooper, L. J., Platt, J. M., Johnson, F. B., Paulos, C. M., Zhao, Y., Kalos, M., Milone, M. C. and June, C. H. (2015) 'Identification of chimeric antigen receptors that mediate constitutive or inducible proliferation of T cells', *Cancer Immunol Res*, 3(4), pp. 356-67.
- ²⁷⁴ Zheng, C. and Baum, B. J. (2014) 'All human EF1alpha promoters are not equal: markedly affect gene expression in constructs from different sources', *Int J Med Sci*, 11(5), pp. 404-8.
- ²⁷⁵ Zychlinski, D., Schambach, A., Modlich, U., Maetzig, T., Meyer, J., Grassman, E., Mishra, A. and Baum, C. (2008) 'Physiological promoters reduce the genotoxic risk of integrating gene vectors', *Mol Ther*, 16(4), pp. 718-25.
- ²⁷⁶ Herbst, F., Ball, C. R., Tuorto, F., Nowrouzi, A., Wang, W., Zavidij, O., Dieter, S. M., Fessler, S., van der Hoeven, F., Kloz, U., Lyko, F., Schmidt, M., von Kalle, C. and Glimm, H. (2012) 'Extensive methylation of promoter sequences silences lentiviral transgene expression during stem cell differentiation in vivo', *ibid.* 20(5), pp. 1014-21.

6 Literaturverzeichnis

6.1 Literaturverzeichnis in Reihenfolge der Verweisnummern

- ²⁷⁷ Loney-Greene, M. A., Boddapati, A. K., Su, H. C., Cantor, J. R. and Lenardo, M. J. (2020) 'Human Plasma-like Medium Improves T Lymphocyte Activation', *iScience*, 23(1), pp. 100759.
- ²⁷⁸ Block, A., Rohde, M., Erben, U., Hammer, M., Hummel, M., Blunert, K., Schultheiss, H. P., Volk, H. D. and Noutsias, M. (2008) 'Impact of cell culture media on the expansion efficiency and T-cell receptor Vbeta (TRBV) repertoire of in vitro expanded T cells using feeder cells', *Med Sci Monit*, 14(5), pp. BR88-95.
- ²⁷⁹ Lutz, M. B. and Rossner, S. (2007) 'Factors influencing the generation of murine dendritic cells from bone marrow: the special role of fetal calf serum', *Immunobiology*, 212(9-10), pp. 855-62.
- ²⁸⁰ Ahmad, S., Sundaramoorthy, E., Arora, R., Sen, S., Karthikeyan, G. and Sengupta, S. (2009) 'Progressive degradation of serum samples limits proteomic biomarker discovery', *Anal Biochem*, 394(2), pp. 237-42.
- ²⁸¹ Irie, R. F., Irie, K. and Morton, D. L. (1974) 'Natural antibody in human serum to a neoantigen in human cultured cells grown in fetal bovine serum', *J Natl Cancer Inst*, 52(4), pp. 1051-8.
- ²⁸² Holm, G. and Perlmann, P. (1965) 'Phytohaemagglutinin-induced cytotoxic action of unsensitized immunologically competent cells on allogeneic and xenogeneic tissue culture cells', *Nature*, 207(999), pp. 818-21.
- ²⁸³ MacDermott, R. P., Nash, G. S., Saint, J. G., Clark, E. A., Zaras, A. G. and Boldt, D. (1976) 'Autologous human cellular cytotoxicity induced by mitogenic and nonmitogenic lectins', *J Immunol*, 117(4), pp. 1402-3.
- ²⁸⁴ Kaartinen, T., Luostarinen, A., Maliniemi, P., Keto, J., Arvas, M., Belt, H., Koponen, J., Mäkinen, P. I., Loskog, A., Mustjoki, S., Porkka, K., Ylä-Herttuala, S. and Korhonen, M. (2017) 'Low interleukin-2 concentration favors generation of early memory T cells over effector phenotypes during chimeric antigen receptor T-cell expansion', *Cytotherapy*, 19(6), pp. 689-702.
- ²⁸⁵ Sommermeyer, D., Hudecek, M., Kosasih, P. L., Gogishvili, T., Maloney, D. G., Turtle, C. J. and Riddell, S. R. (2016) 'Chimeric antigen receptor-modified T cells derived from defined CD8+ and CD4+ subsets confer superior antitumor reactivity in vivo', *Leukemia*, 30(2), pp. 492-500.
- ²⁸⁶ Moon, B. I., Kim, T. H. and Seoh, J. Y. (2015) 'Functional Modulation of Regulatory T Cells by IL-2', *PLoS One*, 10(11), pp. e0141864.
- ²⁸⁷ Alizadeh, D., Wong, R. A., Yang, X., Wang, D., Pecoraro, J. R., Kuo, C. F., Aguilar, B., Qi, Y., Ann, D. K., Starr, R., Urak, R., Wang, X., Forman, S. J. and Brown, C. E. (2019) 'IL15 Enhances CAR-T Cell Antitumor Activity by Reducing mTORC1 Activity and Preserving Their Stem Cell Memory Phenotype', *Cancer Immunol Res*, 7(5), pp. 759-772.
- ²⁸⁸ Gattinoni, L., Lugli, E., Ji, Y., Pos, Z., Paulos, C. M., Quigley, M. F., Almeida, J. R., Gostick, E., Yu, Z., Carpenito, C., Wang, E., Douek, D. C., Price, D. A., June, C. H., Marincola, F. M., Roederer, M. and Restifo, N. P. (2011) 'A human

6 Literaturverzeichnis

6.1 Literaturverzeichnis in Reihenfolge der Verweisnummern

memory T cell subset with stem cell-like properties', *Nat Med*, 17(10), pp. 1290-7.

²⁸⁹ Gattinoni, L., Klebanoff, C. A., Palmer, D. C., Wrzesinski, C., Kerstann, K., Yu, Z., Finkelstein, S. E., Theoret, M. R., Rosenberg, S. A. and Restifo, N. P. (2005) 'Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8+ T cells', *J Clin Invest*, 115(6), pp. 1616-26.

²⁹⁰ Mercier-Letondal, P., Montcuquet, N., Sauce, D., Certoux, J. M., Jeanningros, S., Ferrand, C., Bonyhadi, M., Tiberghien, P. and Robinet, E. (2008) 'Alloreactivity of ex vivo-expanded T cells is correlated with expansion and CD4/CD8 ratio', *Cytotherapy*, 10(3), pp. 275-88.

²⁹¹ Lenardo, M. J. (1991) 'Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis', *Nature*, 353(6347), pp. 858-61.

²⁹² Li, X. C., Demirci, G., Ferrari-Lacraz, S., Groves, C., Coyle, A., Malek, T. R. and Strom, T. B. (2001) 'IL-15 and IL-2: a matter of life and death for T cells in vivo', *Nat Med*, 7(1), pp. 114-8.

²⁹³ Singh, H., Figliola, M. J., Dawson, M. J., Huls, H., Olivares, S., Switzer, K., Mi, T., Maiti, S., Kebriaei, P., Lee, D. A., Champlin, R. E. and Cooper, L. J. (2011) 'Reprogramming CD19-specific T cells with IL-21 signaling can improve adoptive immunotherapy of B-lineage malignancies', *Cancer Res*, 71(10), pp. 3516-27.

²⁹⁴ Zhou, J., Jin, L., Wang, F., Zhang, Y., Liu, B. and Zhao, T. (2019) 'Chimeric antigen receptor T (CAR-T) cells expanded with IL-7/IL-15 mediate superior antitumor effects', *Protein Cell*, 10(10), pp. 764-769.

²⁹⁵ Xu, Y., Zhang, M., Ramos, C. A., Durett, A., Liu, E., Dakhova, O., Liu, H., Creighton, C. J., Gee, A. P., Heslop, H. E., Rooney, C. M., Savoldo, B. and Dotti, G. (2014) 'Closely related T-memory stem cells correlate with in vivo expansion of CAR-CD19-T cells and are preserved by IL-7 and IL-15', *Blood*, 123(24), pp. 3750-9.

²⁹⁶ Gargett, T. and Brown, M. P. (2015) 'Different cytokine and stimulation conditions influence the expansion and immune phenotype of third-generation chimeric antigen receptor T cells specific for tumor antigen GD2', *Cytotherapy*, 17(4), pp. 487-95.

²⁹⁷ Gong, W., Hoffmann, J. M., Stock, S., Wang, L., Liu, Y., Schubert, M. L., Neuber, B., Huckelhoven-Krauss, A., Gern, U., Schmitt, A., Muller-Tidow, C., Shiku, H., Schmitt, M. and Sellner, L. (2019) 'Comparison of IL-2 vs IL-7/IL-15 for the generation of NY-ESO-1-specific T cells', *Cancer Immunol Immunother*, 68(7), pp. 1195-1209.

²⁹⁸ Jenkins, M. K., Pardoll, D. M., Mizuguchi, J., Quill, H. and Schwartz, R. H. (1987) 'T-cell unresponsiveness in vivo and in vitro: fine specificity of induction and molecular characterization of the unresponsive state', *Immunol Rev*, 95, pp. 113-35.

6 Literaturverzeichnis

6.1 Literaturverzeichnis in Reihenfolge der Verweisnummern

- ²⁹⁹ Crawford, A., Angelosanto, J. M., Kao, C., Doering, T. A., Odorizzi, P. M., Barnett, B. E. and Wherry, E. J. (2014) 'Molecular and transcriptional basis of CD4(+) T cell dysfunction during chronic infection', *Immunity*, 40(2), pp. 289-302.
- ³⁰⁰ Wherry, E. J. (2011) 'T cell exhaustion', *Nat Immunol*, 12(6), pp. 492-9.
- ³⁰¹ Wherry, E. J., Ha, S. J., Kaech, S. M., Haining, W. N., Sarkar, S., Kalia, V., Subramaniam, S., Blattman, J. N., Barber, D. L. and Ahmed, R. (2007) 'Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection', *Immunity*, 27(4), pp. 670-84.
- ³⁰² Blackburn, S. D., Shin, H., Freeman, G. J. and Wherry, E. J. (2008) 'Selective expansion of a subset of exhausted CD8 T cells by alphaPD-L1 blockade', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(39), pp. 15016-21.
- ³⁰³ Wherry, E. J. and Kurachi, M. (2015) 'Molecular and cellular insights into T cell exhaustion', *Nat Rev Immunol*, 15(8), pp. 486-99.
- ³⁰⁴ Gargett, T., Yu, W., Dotti, G., Yvon, E. S., Christo, S. N., Hayball, J. D., Lewis, I. D., Brenner, M. K. and Brown, M. P. (2016) 'GD2-specific CAR T Cells Undergo Potent Activation and Deletion Following Antigen Encounter but can be Protected From Activation-induced Cell Death by PD-1 Blockade', *Mol Ther*, 24(6), pp. 1135-1149.
- ³⁰⁵ Hombach, A. A., Rappl, G. and Abken, H. (2013) 'Arming cytokine-induced killer cells with chimeric antigen receptors: CD28 outperforms combined CD28-OX40 "super-stimulation"', *ibid.* 21(12), pp. 2268-77.
- ³⁰⁶ Kunkele, A., Johnson, A. J., Rolczynski, L. S., Chang, C. A., Hogle, V., Kelly-Spratt, K. S. and Jensen, M. C. (2015) 'Functional Tuning of CARs Reveals Signaling Threshold above Which CD8+ CTL Antitumor Potency Is Attenuated due to Cell Fas-FasL-Dependent AICD', *Cancer Immunol Res*, 3(4), pp. 368-79.
- ³⁰⁷ Long, A. H., Haso, W. M., Shern, J. F., Wanhainen, K. M., Murgai, M., Ingaramo, M., Smith, J. P., Walker, A. J., Kohler, M. E., Venkateshwara, V. R., Kaplan, R. N., Patterson, G. H., Fry, T. J., Orentas, R. J. and Mackall, C. L. (2015) '4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors', *Nat Med*, 21(6), pp. 581-90.
- ³⁰⁸ Heczey, A., Louis, C. U., Savoldo, B., Dakhova, O., Durett, A., Grilley, B., Liu, H., Wu, M. F., Mei, Z., Gee, A., Mehta, B., Zhang, H., Mahmood, N., Tashiro, H., Heslop, H. E., Dotti, G., Rooney, C. M. and Brenner, M. K. (2017) 'CAR T Cells Administered in Combination with Lymphodepletion and PD-1 Inhibition to Patients with Neuroblastoma', *Mol Ther*, 25(9), pp. 2214-2224.
- ³⁰⁹ Brentjens, R., Yeh, R., Bernal, Y., Riviere, I. and Sadelain, M. (2010) 'Treatment of chronic lymphocytic leukemia with genetically targeted autologous T cells: case report of an unforeseen adverse event in a phase I clinical trial', *ibid.* 18(4), pp. 666-8.
- ³¹⁰ *Instructions: Dynabeads® Human T-Activator CD3/CD28.* (Life Technologies Corporation, 2011).

6 Literaturverzeichnis

6.1 Literaturverzeichnis in Reihenfolge der Verweisnummern

- ³¹¹ Colombetti, S., Benigni, F., Basso, V. and Mondino, A. (2002) 'Clonal anergy is maintained independently of T cell proliferation', *J Immunol*, 169(11), pp. 6178-86.
- ³¹² Nijhuis, E. W., vd Wiel-van Kemenade, E., Figdor, C. G. and van Lier, R. A. (1990) 'Activation and expansion of tumour-infiltrating lymphocytes by anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies', *Cancer Immunol Immunother*, 32(4), pp. 245-50.
- ³¹³ Levine, B. L., Bernstein, W. B., Connors, M., Craighead, N., Lindsten, T., Thompson, C. B. and June, C. H. (1997) 'Effects of CD28 costimulation on long-term proliferation of CD4+ T cells in the absence of exogenous feeder cells', *J Immunol*, 159(12), pp. 5921-30.
- ³¹⁴ Burns, W. R., Zheng, Z., Rosenberg, S. A. and Morgan, R. A. (2009) 'Lack of specific gamma-retroviral vector long terminal repeat promoter silencing in patients receiving genetically engineered lymphocytes and activation upon lymphocyte restimulation', *Blood*, 114(14), pp. 2888-99.
- ³¹⁵ Pollok, K. E., van der Loo, J. C., Cooper, R. J., Kennedy, L. and Williams, D. A. (1999) 'Costimulation of transduced T lymphocytes via T cell receptor-CD3 complex and CD28 leads to increased transcription of integrated retrovirus', *Hum Gene Ther*, 10(13), pp. 2221-36.
- ³¹⁶ Heylmann, D., Badura, J., Becker, H., Fahrner, J. and Kaina, B. (2018) 'Sensitivity of CD3/CD28-stimulated versus non-stimulated lymphocytes to ionizing radiation and genotoxic anticancer drugs: key role of ATM in the differential radiation response', *Cell Death Dis*, 9(11), pp. 1053.
- ³¹⁷ Garlie, N. K., LeFever, A. V., Siebenlist, R. E., Levine, B. L., June, C. H. and Lum, L. G. (1999) 'T cells coactivated with immobilized anti-CD3 and anti-CD28 as potential immunotherapy for cancer', *J Immunother*, 22(4), pp. 336-45.
- ³¹⁸ Li, Y. and Kurlander, R. J. (2010) 'Comparison of anti-CD3 and anti-CD28-coated beads with soluble anti-CD3 for expanding human T cells: differing impact on CD8 T cell phenotype and responsiveness to restimulation', *J Transl Med*, 8, pp. 104.
- ³¹⁹ Hedfors, I. A. and Brinchmann, J. E. (2003) 'Long-term proliferation and survival of in vitro-activated T cells is dependent on Interleukin-2 receptor signalling but not on the high-affinity IL-2R', *Scand J Immunol*, 58(5), pp. 522-32.
- ³²⁰ Pillai, V., Ortega, S. B., Wang, C. K. and Karandikar, N. J. (2007) 'Transient regulatory T-cells: a state attained by all activated human T-cells', *Clin Immunol*, 123(1), pp. 18-29.
- ³²¹ Tresoldi, E., Dell'Albani, I., Stabilini, A., Jofra, T., Valle, A., Gagliani, N., Bondanza, A., Roncarolo, M. G. and Battaglia, M. (2011) 'Stability of human rapamycin-expanded CD4+CD25+ T regulatory cells', *Haematologica*, 96(9), pp. 1357-65.
- ³²² He, X., Smeets, R. L., van Rijssen, E., Boots, A. M., Joosten, I. and Koenen, H. J. (2017) 'Single CD28 stimulation induces stable and polyclonal expansion of human regulatory T cells', *Sci Rep*, 7, pp. 43003.

6 Literaturverzeichnis

6.1 Literaturverzeichnis in Reihenfolge der Verweisnummern

- ³²³ Golovina, T. N., Mikheeva, T., Suhoski, M. M., Aqui, N. A., Tai, V. C., Shan, X., Liu, R., Balcarcel, R. R., Fisher, N., Levine, B. L., Carroll, R. G., Warner, N., Blazar, B. R., June, C. H. and Riley, J. L. (2008) 'CD28 costimulation is essential for human T regulatory expansion and function', *J Immunol*, 181(4), pp. 2855-68.
- ³²⁴ Liu, Y., Amarnath, S. and Chen, W. (2006) 'Requirement of CD28 signaling in homeostasis/survival of TGF-beta converted CD4+CD25+ Tregs from thymic CD4+CD25- single positive T cells', *Transplantation*, 82(7), pp. 953-64.
- ³²⁵ Semple, K., Nguyen, A., Yu, Y., Wang, H., Anasetti, C. and Yu, X. Z. (2011) 'Strong CD28 costimulation suppresses induction of regulatory T cells from naive precursors through Lck signaling', *Blood*, 117(11), pp. 3096-103.
- ³²⁶ Floess, S., Freyer, J., Siewert, C., Baron, U., Olek, S., Polansky, J., Schlawe, K., Chang, H. D., Bopp, T., Schmitt, E., Klein-Hessling, S., Serfling, E., Hamann, A. and Huehn, J. (2007) 'Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells', *PLoS Biol*, 5(2), pp. e38.
- ³²⁷ Hoffmann, P., Boeld, T. J., Eder, R., Huehn, J., Floess, S., Wieczorek, G., Olek, S., Dietmaier, W., Andreesen, R. and Edinger, M. (2009) 'Loss of FOXP3 expression in natural human CD4+CD25+ regulatory T cells upon repetitive in vitro stimulation', *Eur J Immunol*, 39(4), pp. 1088-97.
- ³²⁸ Astier, A. L., Beriou, G., Eisenhaure, T. M., Anderton, S. M., Hafler, D. A. and Hacohen, N. (2010) 'RNA interference screen in primary human T cells reveals FLT3 as a modulator of IL-10 levels', *J Immunol*, 184(2), pp. 685-93.
- ³²⁹ Bilal, M. Y., Vacaflares, A. and Houtman, J. C. (2015) 'Optimization of methods for the genetic modification of human T cells', *Immunol Cell Biol*, 93(10), pp. 896-908.
- ³³⁰ Kelley, J. L., Rozek, M. M., Suenram, C. A. and Schwartz, C. J. (1987) 'Activation of human blood monocytes by adherence to tissue culture plastic surfaces', *Exp Mol Pathol*, 46(3), pp. 266-78.
- ³³¹ Brentjens, R. J., Riviere, I., Park, J. H., Davila, M. L., Wang, X., Stefanski, J., Taylor, C., Yeh, R., Bartido, S., Borquez-Ojeda, O., Olszewska, M., Bernal, Y., Pegram, H., Przybylowski, M., Hollyman, D., Usachenko, Y., Pirraglia, D., Hoseney, J., Santos, E., Halton, E., Maslak, P., Scheinberg, D., Jurcic, J., Heaney, M., Heller, G., Frattini, M. and Sadelain, M. (2011) 'Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias', *Blood*, 118(18), pp. 4817-28.
- ³³² Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R. J., Nguyen, M., Trono, D. and Naldini, L. (1998) 'A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system', *J Virol*, 72(11), pp. 8463-71.
- ³³³ Cribbs, A. P., Kennedy, A., Gregory, B. and Brennan, F. M. (2013) 'Simplified production and concentration of lentiviral vectors to achieve high transduction in primary human T cells', *BMC Biotechnol*, 13, pp. 98.
- ³³⁴ Grupp, S. A., Kalos, M., Barrett, D., Aplenc, R., Porter, D. L., Rheingold, S. R., Teachey, D. T., Chew, A., Hauck, B., Wright, J. F., Milone, M. C., Levine, B. L.

6 Literaturverzeichnis

6.1 Literaturverzeichnis in Reihenfolge der Verweisnummern

and June, C. H. (2013) 'Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia', *N Engl J Med*, 368(16), pp. 1509-1518.

³³⁵ Pule, M. A., Savoldo, B., Myers, G. D., Rossig, C., Russell, H. V., Dotti, G., Huls, M. H., Liu, E., Gee, A. P., Mei, Z., Yvon, E., Weiss, H. L., Liu, H., Rooney, C. M., Heslop, H. E. and Brenner, M. K. (2008) 'Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma', *Nat Med*, 14(11), pp. 1264-70.

³³⁶ Nienhuis, A. W., Dunbar, C. E. and Sorrentino, B. P. (2006) 'Genotoxicity of retroviral integration in hematopoietic cells', *Mol Ther*, 13(6), pp. 1031-49.

³³⁷ Linial, M. (2000) 'Why aren't foamy viruses pathogenic?', *Trends Microbiol*, 8(6), pp. 284-9.

³³⁸ Liu, W., Liu, Z., Cao, X., Cao, Z., Xue, L., Zhu, F., He, X. and Li, W. (2007) 'Recombinant human foamy virus, a novel vector for neurological disorders gene therapy, drives production of GAD in cultured astrocytes', *Mol Ther*, 15(10), pp. 1834-41.

³³⁹ Simantirakis, E., Atsaves, V., Tsironis, I., Gkyzi, M., Konstantopoulos, K. and Vassilopoulos, G. (2019) 'Foamy Virus Based Vectors for CAR-T Cell Development', *Blood*, 134.

³⁴⁰ Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M. P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C. S., Pawliuk, R., Morillon, E., Sorensen, R., Forster, A., Fraser, P., Cohen, J. I., de Saint Basile, G., Alexander, I., Wintergerst, U., Frebourg, T., Aurias, A., Stoppa-Lyonnet, D., Romana, S., Radford-Weiss, I., Gross, F., Valensi, F., Delabesse, E., Macintyre, E., Sigaux, F., Soulier, J., Leiva, L. E., Wissler, M., Prinz, C., Rabbitts, T. H., Le Deist, F., Fischer, A. and Cavazzana-Calvo, M. (2003) 'LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1', *Science*, 302(5644), pp. 415-9.

³⁴¹ Fraietta, J. A., Nobles, C. L., Sammons, M. A., Lundh, S., Carty, S. A., Reich, T. J., Cogdill, A. P., Morrissette, J. J. D., DeNizio, J. E., Reddy, S., Hwang, Y., Gohil, M., Kulikovskaya, I., Nazimuddin, F., Gupta, M., Chen, F., Everett, J. K., Alexander, K. A., Lin-Shiao, E., Gee, M. H., Liu, X., Young, R. M., Ambrose, D., Wang, Y., Xu, J., Jordan, M. S., Marcucci, K. T., Levine, B. L., Garcia, K. C., Zhao, Y., Kalos, M., Porter, D. L., Kohli, R. M., Lacey, S. F., Berger, S. L., Bushman, F. D., June, C. H. and Melenhorst, J. J. (2018) 'Disruption of TET2 promotes the therapeutic efficacy of CD19-targeted T cells', *Nature*, 558(7709), pp. 307-312.

³⁴² Gomes-Silva, D., Mukherjee, M., Srinivasan, M., Krenciute, G., Dakhova, O., Zheng, Y., Cabral, J. M. S., Rooney, C. M., Orange, J. S., Brenner, M. K. and Mamonkin, M. (2017) 'Tonic 4-1BB Costimulation in Chimeric Antigen Receptors Impedes T Cell Survival and Is Vector-Dependent', *Cell Rep*, 21(1), pp. 17-26.

³⁴³ Chen, J. J., Shen, H. C., Rivera Rosado, L. A., Zhang, Y., Di, X. and Zhang, B. (2012) 'Mislocalization of death receptors correlates with cellular resistance to their cognate ligands in human breast cancer cells', *Oncotarget*, 3(8), pp. 833-42.

6 Literaturverzeichnis

6.1 Literaturverzeichnis in Reihenfolge der Verweisnummern

³⁴⁴ Rom-Jurek, E. M., Kirchhammer, N., Ugocsai, P., Ortmann, O., Wege, A. K. and Brockhoff, G. (2018) 'Regulation of Programmed Death Ligand 1 (PD-L1) Expression in Breast Cancer Cell Lines In Vitro and in Immunodeficient and Humanized Tumor Mice', *Int J Mol Sci*, 19(2).

³⁴⁵ Li, H., Yuan, W., Bin, S., Wu, G., Li, P., Liu, M., Yang, J., Li, X., Yang, K. and Gu, H. (2020) 'Overcome trastuzumab resistance of breast cancer using anti-HER2 chimeric antigen receptor T cells and PD1 blockade', *Am J Cancer Res*, 10(2), pp. 688-703.

³⁴⁶ Arrieta, O., Montes-Servin, E., Hernandez-Martinez, J. M., Cardona, A. F., Casas-Ruiz, E., Crispin, J. C., Motola, D., Flores-Estrada, D. and Barrera, L. (2017) 'Expression of PD-1/PD-L1 and PD-L2 in peripheral T-cells from non-small cell lung cancer patients', *Oncotarget*, 8(60), pp. 101994-102005.

³⁴⁷ Zhao, Y., Harrison, D. L., Song, Y., Ji, J., Huang, J. and Hui, E. (2018) 'Antigen-Presenting Cell-Intrinsic PD-1 Neutralizes PD-L1 in cis to Attenuate PD-1 Signaling in T Cells', *Cell Rep*, 24(2), pp. 379-390 e6.

³⁴⁸ Blackburn, S. D., Shin, H., Haining, W. N., Zou, T., Workman, C. J., Polley, A., Betts, M. R., Freeman, G. J., Vignali, D. A. and Wherry, E. J. (2009) 'Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection', *Nat Immunol*, 10(1), pp. 29-37.

³⁴⁹ Liu, X., Ranganathan, R., Jiang, S., Fang, C., Sun, J., Kim, S., Newick, K., Lo, A., June, C. H., Zhao, Y. and Moon, E. K. (2016) 'A Chimeric Switch-Receptor Targeting PD1 Augments the Efficacy of Second-Generation CAR T Cells in Advanced Solid Tumors', *Cancer Res*, 76(6), pp. 1578-90.

³⁵⁰ Pühr, H. C. and Ilhan-Mutlu, A. (2019) 'New emerging targets in cancer immunotherapy: the role of LAG3', *ESMO Open*, 4(2), pp. e000482.

³⁵¹ Topalian, S. L., Hodi, F. S., Brahmer, J. R., Gettinger, S. N., Smith, D. C., McDermott, D. F., Powderly, J. D., Carvajal, R. D., Sosman, J. A., Atkins, M. B., Leming, P. D., Spigel, D. R., Antonia, S. J., Horn, L., Drake, C. G., Pardoll, D. M., Chen, L., Sharfman, W. H., Anders, R. A., Taube, J. M., McMiller, T. L., Xu, H., Korman, A. J., Jure-Kunkel, M., Agrawal, S., McDonald, D., Kollia, G. D., Gupta, A., Wigginton, J. M. and Sznol, M. (2012) 'Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer', *N Engl J Med*, 366(26), pp. 2443-54.

³⁵² Hodi, F. S., O'Day, S. J., McDermott, D. F., Weber, R. W., Sosman, J. A., Haanen, J. B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J. C., Akerley, W., van den Eertwegh, A. J., Lutzky, J., Lorigan, P., Vaubel, J. M., Linette, G. P., Hogg, D., Ottensmeier, C. H., Lebbe, C., Peschel, C., Quirt, I., Clark, J. I., Wolchok, J. D., Weber, J. S., Tian, J., Yellin, M. J., Nichol, G. M., Hoos, A. and Urba, W. J. (2010) 'Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma', *ibid.* 363(8), pp. 711-23.

³⁵³ Woo, S. R., Turnis, M. E., Goldberg, M. V., Bankoti, J., Selby, M., Nirschl, C. J., Bettini, M. L., Gravano, D. M., Vogel, P., Liu, C. L., Tansombatvisit, S., Grosso, J. F., Netto, G., Smeltzer, M. P., Chau, A., Utz, P. J., Workman, C. J., Pardoll, D. M., Korman, A. J., Drake, C. G. and Vignali, D. A. (2012) 'Immune

6 Literaturverzeichnis

6.1 Literaturverzeichnis in Reihenfolge der Verweisnummern

inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape', *Cancer Res*, 72(4), pp. 917-27.

³⁵⁴ Ascierto, P. A., Melero, I., Bhatia, S., Bono, P., Sanborn, R. E., Lipson, E. J., Callahan, M. K., Gajewski, T., Gomez-Roca, C. A., Hodi, F. S., Curigliano, G., Nyakas, M., Preusser, M., Koguchi, Y., Maurer, M., Clynes, R., Mitra, P., Suryawanshi, S. and Muñoz-Couselo, E. (2017) 'Initial efficacy of anti-lymphocyte activation gene-3 (anti-LAG-3; BMS-986016) in combination with nivolumab (nivo) in pts with melanoma (MEL) previously treated with anti-PD-1/PD-L1 therapy', *Journal of Clinical Oncology*, 35(15_suppl), pp. 9520-9520.

³⁵⁵ Friedlaender, A., Addeo, A. and Banna, G. (2019) 'New emerging targets in cancer immunotherapy: the role of TIM3', *ESMO Open*, 4(Suppl 3), pp. e000497.

³⁵⁶ Chong, E. A., Melenhorst, J. J., Lacey, S. F., Ambrose, D. E., Gonzalez, V., Levine, B. L., June, C. H. and Schuster, S. J. (2017) 'PD-1 blockade modulates chimeric antigen receptor (CAR)-modified T cells: refueling the CAR', *Blood*, 129(8), pp. 1039-1041.

³⁵⁷ Ajina, A. and Maher, J. (2018) 'Strategies to Address Chimeric Antigen Receptor Tonic Signaling', *Mol Cancer Ther*, 17(9), pp. 1795-1815.

³⁵⁸ Martinez, M. and Moon, E. K. (2019) 'CAR T Cells for Solid Tumors: New Strategies for Finding, Infiltrating, and Surviving in the Tumor Microenvironment', *Front Immunol*, 10, pp. 128.

³⁵⁹ Lynn, R. C., Weber, E. W., Sotillo, E., Gennert, D., Xu, P., Good, Z., Anbunathan, H., Lattin, J., Jones, R., Tieu, V., Nagaraja, S., Granja, J., de Bourcy, C. F. A., Majzner, R., Satpathy, A. T., Quake, S. R., Monje, M., Chang, H. Y. and Mackall, C. L. (2019) 'c-Jun overexpression in CAR T cells induces exhaustion resistance', *Nature*, 576(7786), pp. 293-300.

³⁶⁰ Sharpe, A. H., Wherry, E. J., Ahmed, R. and Freeman, G. J. (2007) 'The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection', *Nat Immunol*, 8(3), pp. 239-45.

³⁶¹ John, L. B., Kershaw, M. H. and Darcy, P. K. (2013) 'Blockade of PD-1 immunosuppression boosts CAR T-cell therapy', *Oncoimmunology*, 2(10), pp. e26286.

³⁶² Kambhampati, S., Gray, L., Fakhri, B., Lo, M., Vu, K., Arora, S., Kaplan, L., Ai, W. Z. and Andreadis, C. (2020) 'Immune-related Adverse Events Associated With Checkpoint Inhibition in the Setting of CAR T Cell Therapy: A Case Series', *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 20(3), pp. e118-e123.

³⁶³ Maus, M. V., Haas, A. R., Beatty, G. L., Albelda, S. M., Levine, B. L., Liu, X., Zhao, Y., Kalos, M. and June, C. H. (2013) 'T cells expressing chimeric antigen receptors can cause anaphylaxis in humans', *Cancer Immunol Res*, 1, pp. 26-31.

³⁶⁴ Lamers, C. H., Willemsen, R., van Elzakker, P., van Steenbergen-Langeveld, S., Broertjes, M., Oosterwijk-Wakka, J., Oosterwijk, E., Sleijfer, S., Debets, R. and Gratama, J. W. (2011) 'Immune responses to transgene and retroviral vector in patients treated with ex vivo-engineered T cells', *Blood*, 117(1), pp. 72-82.

6 Literaturverzeichnis

6.1 Literaturverzeichnis in Reihenfolge der Verweisnummern

- ³⁶⁵ Fitzgerald, J. C., Weiss, S. L., Maude, S. L., Barrett, D. M., Lacey, S. F., Melenhorst, J. J., Shaw, P., Berg, R. A., June, C. H., Porter, D. L., Frey, N. V., Grupp, S. A. and Teachey, D. T. (2017) 'Cytokine Release Syndrome After Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia', *Crit Care Med*, 45(2), pp. e124-e131.
- ³⁶⁶ Awasthi, R., Pacaud, L., Waldron, E., Tam, C. S., Jager, U., Borchmann, P., Jaglowski, S., Foley, S. R., van Besien, K., Wagner-Johnston, N. D., Kersten, M. J., Schuster, S. J., Salles, G., Maziarz, R. T., Anak, O., Del Corral, C., Chu, J., Gershgorin, I., Pruteanu-Malinici, I., Chakraborty, A., Mueller, K. T. and Waller, E. K. (2020) 'Tisagenlecleucel cellular kinetics, dose, and immunogenicity in relation to clinical factors in relapsed/refractory DLBCL', *Blood Adv*, 4(3), pp. 560-572.
- ³⁶⁷ Maude, S. L., Frey, N., Shaw, P. A., Aplenc, R., Barrett, D. M., Bunin, N. J., Chew, A., Gonzalez, V. E., Zheng, Z., Lacey, S. F., Mahnke, Y. D., Melenhorst, J. J., Rheingold, S. R., Shen, A., Teachey, D. T., Levine, B. L., June, C. H., Porter, D. L. and Grupp, S. A. (2014) 'Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia', *N Engl J Med*, 371(16), pp. 1507-17.
- ³⁶⁸ Gust, J., Taraseviciute, A. and Turtle, C. J. (2018) 'Neurotoxicity Associated with CD19-Targeted CAR-T Cell Therapies', *CNS Drugs*, 32(12), pp. 1091-1101.
- ³⁶⁹ Gust, J., Hay, K. A., Hanafi, L. A., Li, D., Myerson, D., Gonzalez-Cuyar, L. F., Yeung, C., Liles, W. C., Wurfel, M., Lopez, J. A., Chen, J., Chung, D., Harju-Baker, S., Ozpolat, T., Fink, K. R., Riddell, S. R., Maloney, D. G. and Turtle, C. J. (2017) 'Endothelial Activation and Blood-Brain Barrier Disruption in Neurotoxicity after Adoptive Immunotherapy with CD19 CAR-T Cells', *Cancer Discov*, 7(12), pp. 1404-1419.
- ³⁷⁰ Topp, M. S., Gokbuget, N., Stein, A. S., Zugmaier, G., O'Brien, S., Bargou, R. C., Dombret, H., Fielding, A. K., Heffner, L., Larson, R. A., Neumann, S., Foa, R., Litzow, M., Ribera, J. M., Rambaldi, A., Schiller, G., Bruggemann, M., Horst, H. A., Holland, C., Jia, C., Maniar, T., Huber, B., Nagorsen, D., Forman, S. J. and Kantarjian, H. M. (2015) 'Safety and activity of blinatumomab for adult patients with relapsed or refractory B-precursor acute lymphoblastic leukaemia: a multicentre, single-arm, phase 2 study', *Lancet Oncol*, 16(1), pp. 57-66.
- ³⁷¹ Sdrimas, K., Diaz-Paez, M., Camargo, J. F. and Lekakis, L. J. (2020) 'Progressive multifocal leukoencephalopathy after CAR T therapy', *Int J Hematol*.
- ³⁷² Morris, E. C., Bendle, G. M. and Stauss, H. J. (2003) 'Prospects for immunotherapy of malignant disease', *Clin Exp Immunol*, 131(1), pp. 1-7.
- ³⁷³ Lamers, C. H., Sleijfer, S., van Steenbergen, S., van Elzaker, P., van Krimpen, B., Groot, C., Vulto, A., den Bakker, M., Oosterwijk, E., Debets, R. and Gratama, J. W. (2013) 'Treatment of metastatic renal cell carcinoma with CAIX CAR-engineered T cells: clinical evaluation and management of on-target toxicity', *Mol Ther*, 21(4), pp. 904-12.
- ³⁷⁴ Parkhurst, M. R., Yang, J. C., Langan, R. C., Dudley, M. E., Nathan, D. A., Feldman, S. A., Davis, J. L., Morgan, R. A., Merino, M. J., Sherry, R. M., Hughes, M. S., Kammula, U. S., Phan, G. Q., Lim, R. M., Wank, S. A., Restifo, N. P.,

6 Literaturverzeichnis

6.1 Literaturverzeichnis in Reihenfolge der Verweisnummern

Robbins, P. F., Laurencot, C. M. and Rosenberg, S. A. (2011) 'T cells targeting carcinoembryonic antigen can mediate regression of metastatic colorectal cancer but induce severe transient colitis', *ibid.*19(3), pp. 620-6.

³⁷⁵ Chmielewski, M., Hombach, A., Heuser, C., Adams, G. P. and Abken, H. (2004) '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*, 173(12), pp. 7647-53.

³⁷⁶ Linette, G. P., Stadtmauer, E. A., Maus, M. V., Rapoport, A. P., Levine, B. L., Emery, L., Litzky, L., Bagg, A., Carreno, B. M., Cimino, P. J., Binder-Scholl, G. K., Smethurst, D. P., Gerry, A. B., Pumphrey, N. J., Bennett, A. D., Brewer, J. E., Dukes, J., Harper, J., Tayton-Martin, H. K., Jakobsen, B. K., Hassan, N. J., Kalos, M. and June, C. H. (2013) 'Cardiovascular toxicity and titin cross-reactivity of affinity-enhanced T cells in myeloma and melanoma', *Blood*, 122(6), pp. 863-71.

³⁷⁷ Kalos, M., Levine, B. L., Porter, D. L., Katz, S., Grupp, S. A., Bagg, A. and June, C. H. (2011) 'T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia', *Sci Transl Med*, 3(95), pp. 95ra73.

³⁷⁸ Simantirakis, E., Tsironis, I. and Vassilopoulos, G. (2020) 'FV Vectors as Alternative Gene Vehicles for Gene Transfer in HSCs', *Viruses*, 12(3).

³⁷⁹ Silbert, S., Yanik, G. A. and Shuman, A. G. (2019) 'How Should We Determine the Value of CAR T-Cell Therapy?', *AMA J Ethics*, 21(10), pp. E844-851.

³⁸⁰ Regenauer, A. (2019) 'Gene Therapy for Cancer - A New Dimension and Challenge for Insurers', *J Insur Med*, 48(1), pp. 58-64.

³⁸¹ Spencer, D. M., Wandless, T. J., Schreiber, S. L. and Crabtree, G. R. (1993) 'Controlling signal transduction with synthetic ligands', *Science*, 262(5136), pp. 1019-24.

³⁸² Renatus, M., Stennicke, H. R., Scott, F. L., Liddington, R. C. and Salvesen, G. S. (2001) 'Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(25), pp. 14250-5.

³⁸³ Di Stasi, A., Tey, S. K., Dotti, G., Fujita, Y., Kennedy-Nasser, A., Martinez, C., Straathof, K., Liu, E., Durett, A. G., Grilley, B., Liu, H., Cruz, C. R., Savoldo, B., Gee, A. P., Schindler, J., Krance, R. A., Heslop, H. E., Spencer, D. M., Rooney, C. M. and Brenner, M. K. (2011) 'Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy', *N Engl J Med*, 365(18), pp. 1673-83.

³⁸⁴ Tamada, K., Geng, D., Sakoda, Y., Bansal, N., Srivastava, R., Li, Z. and Davila, E. (2012) 'Redirecting gene-modified T cells toward various cancer types using tagged antibodies', *Clin Cancer Res*, 18(23), pp. 6436-45.

6.2 Literaturverzeichnis in alphabetischer Reihenfolge

Agarwal, S. and Rao, A. (1998) 'Modulation of chromatin structure regulates cytokine gene expression during T cell differentiation', *Immunity*, 9(6), pp. 765-75.

Ahmad, S., Sundaramoorthy, E., Arora, R., Sen, S., Karthikeyan, G. and Sengupta, S. (2009) 'Progressive degradation of serum samples limits proteomic biomarker discovery', *Anal Biochem*, 394(2), pp. 237-42.

Ahmed, N., Ratnayake, M., Savoldo, B., Perlaky, L., Dotti, G., Wels, W. S., Bhattacharjee, M. B., Gilbertson, R. J., Shine, H. D., Weiss, H. L., Rooney, C. M., Heslop, H. E. and Gottschalk, S. (2007) 'Regression of experimental medulloblastoma following transfer of HER2-specific T cells', *Cancer Res*, 67(12), pp. 5957-64.

Ajina, A. and Maher, J. (2018) 'Strategies to Address Chimeric Antigen Receptor Tonic Signaling', *Mol Cancer Ther*, 17(9), pp. 1795-1815.

Alabanza, L., Pegues, M., Geldres, C., Shi, V., Wiltzius, J. J. W., Sievers, S. A., Yang, S. and Kochenderfer, J. N. (2017) 'Function of Novel Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptors with Human Variable Regions Is Affected by Hinge and Transmembrane Domains', *Mol Ther*, 25(11), pp. 2452-2465.

Alharshawi, K., Marinelarena, A., Kumar, P., El-Sayed, O., Bhattacharya, P., Sun, Z., Epstein, A. L., Maker, A. V. and Prabhakar, B. S. (2017) 'PKC- is dispensable for OX40L-induced TCR-independent Treg proliferation but contributes by enabling IL-2 production from effector T-cells', *Sci Rep*, 7(1), pp. 6594.

Alizadeh, D., Wong, R. A., Yang, X., Wang, D., Pecoraro, J. R., Kuo, C. F., Aguilar, B., Qi, Y., Ann, D. K., Starr, R., Urak, R., Wang, X., Forman, S. J. and Brown, C. E. (2019) 'IL15 Enhances CAR-T Cell Antitumor Activity by Reducing mTORC1 Activity and Preserving Their Stem Cell Memory Phenotype', *Cancer Immunol Res*, 7(5), pp. 759-772.

Allard, E. L., Hardy, M. P., Leignadier, J., Marquis, M., Rooney, J., Lehoux, D. and Labrecque, N. (2007) 'Overexpression of IL-21 promotes massive CD8+ memory T cell accumulation', *Eur J Immunol*, 37(11), pp. 3069-77.

Antas, P. R., Oliveira, E. B., Milagres, A. S., Franken, K. C., Ottenhoff, T. H., Klatser, P., Sarno, E. N. and Sampaio, E. P. (2002) 'Kinetics of T cell-activation molecules in response to Mycobacterium tuberculosis antigens', *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 97(8), pp. 1097-9.

Anuradha, R., George, P. J., Hanna, L. E., Chandrasekaran, V., Kumaran, P., Nutman, T. B. and Babu, S. (2013) 'IL-4-, TGF-beta-, and IL-1-dependent expansion of parasite antigen-specific Th9 cells is associated with clinical pathology in human lymphatic filariasis', *J Immunol*, 191(5), pp. 2466-73.

Apostolou, I. and von Boehmer, H. (2004) 'In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells', *J Exp Med*, 199(10), pp. 1401-8.

Arrieta, O., Montes-Servin, E., Hernandez-Martinez, J. M., Cardona, A. F., Casas-Ruiz, E., Crispin, J. C., Motola, D., Flores-Estrada, D. and Barrera, L.

6 Literaturverzeichnis

6.2 Literaturverzeichnis in alphabetischer Reihenfolge

(2017) 'Expression of PD-1/PD-L1 and PD-L2 in peripheral T-cells from non-small cell lung cancer patients', *Oncotarget*, 8(60), pp. 101994-102005.

Arruvito, L., Payaslian, F., Baz, P., Podhorzer, A., Billordo, A., Pandolfi, J., Semeniuk, G., Arribalzaga, E. and Fainboim, L. (2014) 'Identification and clinical relevance of naturally occurring human CD8+HLA-DR+ regulatory T cells', *J Immunol*, 193(9), pp. 4469-76.

Ascierto, P. A., Melero, I., Bhatia, S., Bono, P., Sanborn, R. E., Lipson, E. J., Callahan, M. K., Gajewski, T., Gomez-Roca, C. A., Hodi, F. S., Curigliano, G., Nyakas, M., Preusser, M., Koguchi, Y., Maurer, M., Clynes, R., Mitra, P., Suryawanshi, S. and Muñoz-Couselo, E. (2017) 'Initial efficacy of anti-lymphocyte activation gene-3 (anti-LAG-3; BMS-986016) in combination with nivolumab (nivo) in pts with melanoma (MEL) previously treated with anti-PD-1/PD-L1 therapy', *Journal of Clinical Oncology*, 35(15_suppl), pp. 9520-9520.

Aspeshlagh, S., Postel-Vinay, S., Rusakiewicz, S., Soria, J. C., Zitvogel, L. and Marabelle, A. (2016) 'Rationale for anti-OX40 cancer immunotherapy', *Eur J Cancer*, 52, pp. 50-66.

Astier, A. L., Beriou, G., Eisenhaure, T. M., Anderton, S. M., Hafler, D. A. and Hacohen, N. (2010) 'RNA interference screen in primary human T cells reveals FLT3 as a modulator of IL-10 levels', *J Immunol*, 184(2), pp. 685-93.

Aujla, S. J., Chan, Y. R., Zheng, M., Fei, M., Askew, D. J., Pociask, D. A., Reinhart, T. A., McAllister, F., Edeal, J., Gaus, K., Husain, S., Kreindler, J. L., Dubin, P. J., Pilewski, J. M., Myerburg, M. M., Mason, C. A., Iwakura, Y. and Kolls, J. K. (2008) 'IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia', *Nat Med*, 14(3), pp. 275-81.

Awasthi, R., Pacaud, L., Waldron, E., Tam, C. S., Jager, U., Borchmann, P., Jaglowski, S., Foley, S. R., van Besien, K., Wagner-Johnston, N. D., Kersten, M. J., Schuster, S. J., Salles, G., Maziarz, R. T., Anak, O., Del Corral, C., Chu, J., Gershgorin, I., Pruteanu-Malinici, I., Chakraborty, A., Mueller, K. T. and Waller, E. K. (2020) 'Tisagenlecleucel cellular kinetics, dose, and immunogenicity in relation to clinical factors in relapsed/refractory DLBCL', *Blood Adv*, 4(3), pp. 560-572.

Balazs, M., Martin, F., Zhou, T. and Kearney, J. (2002) 'Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses', *Immunity*, 17(3), pp. 341-52.

Bang, Y. J., Van Cutsem, E., Feyereislova, A., Chung, H. C., Shen, L., Sawaki, A., Lordick, F., Ohtsu, A., Omuro, Y., Satoh, T., Aprile, G., Kulikov, E., Hill, J., Lehle, M., Ruschoff, J., Kang, Y. K. and To, G. A. T. I. (2010) 'Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial', *Lancet*, 376(9742), pp. 687-97.

Bansal-Pakala, P., Jember, A. G. and Croft, M. (2001) 'Signaling through OX40 (CD134) breaks peripheral T-cell tolerance', *Nat Med*, 7(8), pp. 907-12.

- Barral, D. C. and Brenner, M. B. (2007) 'CD1 antigen presentation: how it works', *Nat Rev Immunol*, 7(12), pp. 929-41.
- Barrett, D. M., Singh, N., Porter, D. L., Grupp, S. A. and June, C. H. (2014) 'Chimeric antigen receptor therapy for cancer', *Annu Rev Med*, 65, pp. 333-47.
- Beckman, E. M., Porcelli, S. A., Morita, C. T., Behar, S. M., Furlong, S. T. and Brenner, M. B. (1994) 'Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted alpha beta+ T cells', *Nature*, 372(6507), pp. 691-4.
- Belot, L., Albertini, A. and Gaudin, Y. (2019) 'Structural and cellular biology of rhabdovirus entry', *Adv Virus Res*, 104, pp. 147-183.
- Bennett, S. R., Carbone, F. R., Karamalis, F., Flavell, R. A., Miller, J. F. and Heath, W. R. (1998) 'Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling', *Nature*, 393(6684), pp. 478-80.
- Bennett, S. R., Carbone, F. R., Karamalis, F., Miller, J. F. and Heath, W. R. (1997) 'Induction of a CD8+ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4+ T cell help', *J Exp Med*, 186(1), pp. 65-70.
- Bilal, M. Y., Vacaflares, A. and Houtman, J. C. (2015) 'Optimization of methods for the genetic modification of human T cells', *Immunol Cell Biol*, 93(10), pp. 896-908.
- Bill, J. and Palmer, E. (1989) 'Positive selection of CD4+ T cells mediated by MHC class II-bearing stromal cell in the thymic cortex', *Nature*, 341(6243), pp. 649-51.
- Birnbaum, M. E., Berry, R., Hsiao, Y. S., Chen, Z., Shingu-Vazquez, M. A., Yu, X., Waghray, D., Fischer, S., McCluskey, J., Rossjohn, J., Walz, T. and Garcia, K. C. (2014a) 'Molecular architecture of the alphabeta T cell receptor-CD3 complex', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(49), pp. 17576-81.
- Birnbaum, M. E., Mendoza, J. L., Sethi, D. K., Dong, S., Glanville, J., Dobbins, J., Ozkan, E., Davis, M. M., Wucherpfennig, K. W. and Garcia, K. C. (2014b) 'Deconstructing the peptide-MHC specificity of T cell recognition', *Cell*, 157(5), pp. 1073-87.
- Blackburn, S. D., Shin, H., Freeman, G. J. and Wherry, E. J. (2008) 'Selective expansion of a subset of exhausted CD8 T cells by alphaPD-L1 blockade', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(39), pp. 15016-21.
- Blackburn, S. D., Shin, H., Haining, W. N., Zou, T., Workman, C. J., Polley, A., Betts, M. R., Freeman, G. J., Vignali, D. A. and Wherry, E. J. (2009) 'Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection', *Nat Immunol*, 10(1), pp. 29-37.
- Block, A., Rohde, M., Erben, U., Hammer, M., Hummel, M., Blunert, K., Schultheiss, H. P., Volk, H. D. and Noutsias, M. (2008) 'Impact of cell culture media on the expansion efficiency and T-cell receptor Vbeta (TRBV) repertoire of in vitro expanded T cells using feeder cells', *Med Sci Monit*, 14(5), pp. BR88-95.
- Blomberg, K., Hautala, R., Lovgren, J., Mukkala, V. M., Lindqvist, C. and Akerman, K. (1996) 'Time-resolved fluorometric assay for natural killer activity

using target cells labelled with a fluorescence enhancing ligand', *J Immunol Methods*, 193(2), pp. 199-206.

Blum, J. S., Wearsch, P. A. and Cresswell, P. (2013) 'Pathways of antigen processing', *Annu Rev Immunol*, 31, pp. 443-73.

Bogen, B., Fauskanger, M., Haabeth, O. A. and Tveita, A. (2019) 'CD4(+) T cells indirectly kill tumor cells via induction of cytotoxic macrophages in mouse models', *Cancer Immunol Immunother*, 68(11), pp. 1865-1873.

Bohineust, A., Garcia, Z., Beuneu, H., Lemaitre, F. and Bousso, P. (2018) 'Termination of T cell priming relies on a phase of unresponsiveness promoting disengagement from APCs and T cell division', *J Exp Med*, 215(5), pp. 1481-1492.

Boise, L. H., Minn, A. J., Noel, P. J., June, C. H., Accavitti, M. A., Lindsten, T. and Thompson, C. B. (1995) 'CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL', *Immunity*, 3(1), pp. 87-98.

Boniface, K., Bernard, F. X., Garcia, M., Gurney, A. L., Lecron, J. C. and Morel, F. (2005) 'IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes', *J Immunol*, 174(6), pp. 3695-702.

Borresen, A. L., Ottestad, L., Gaustad, A., Andersen, T. I., Heikkila, R., Jahnsen, T., Tveit, K. M. and Nesland, J. M. (1990) 'Amplification and protein over-expression of the neu/HER-2/c-erbB-2 protooncogene in human breast carcinomas: relationship to loss of gene sequences on chromosome 17, family history and prognosis', *Br J Cancer*, 62(4), pp. 585-90.

Bousso, P. and Robey, E. (2003) 'Dynamics of CD8+ T cell priming by dendritic cells in intact lymph nodes', *Nat Immunol*, 4(6), pp. 579-85.

Breitfeld, D., Ohl, L., Kremmer, E., Ellwart, J., Sallusto, F., Lipp, M. and Forster, R. (2000) 'Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production', *J Exp Med*, 192(11), pp. 1545-52.

Brenner, M. B., McLean, J., Dialynas, D. P., Strominger, J. L., Smith, J. A., Owen, F. L., Seidman, J. G., Ip, S., Rosen, F. and Krangel, M. S. (1986) 'Identification of a putative second T-cell receptor', *Nature*, 322(6075), pp. 145-9.

Brentjens, R., Yeh, R., Bernal, Y., Riviere, I. and Sadelain, M. (2010) 'Treatment of chronic lymphocytic leukemia with genetically targeted autologous T cells: case report of an unforeseen adverse event in a phase I clinical trial', *Mol Ther*, 18(4), pp. 666-8.

Brentjens, R. J., Riviere, I., Park, J. H., Davila, M. L., Wang, X., Stefanski, J., Taylor, C., Yeh, R., Bartido, S., Borquez-Ojeda, O., Olszewska, M., Bernal, Y., Pegram, H., Przybylowski, M., Hollyman, D., Usachenko, Y., Pirraglia, D., Hosey, J., Santos, E., Halton, E., Maslak, P., Scheinberg, D., Jurcic, J., Heaney, M., Heller, G., Frattini, M. and Sadelain, M. (2011) 'Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias', *Blood*, 118(18), pp. 4817-28.

6 Literaturverzeichnis

6.2 Literaturverzeichnis in alphabetischer Reihenfolge

Bridgeman, J. S., Hawkins, R. E., Bagley, S., Blaylock, M., Holland, M. and Gilham, D. E. (2010) 'The optimal antigen response of chimeric antigen receptors harboring the CD3zeta transmembrane domain is dependent upon incorporation of the receptor into the endogenous TCR/CD3 complex', *J Immunol*, 184(12), pp. 6938-49.

Brocker, T. (2000) 'Chimeric Fv-zeta or Fv-epsilon receptors are not sufficient to induce activation or cytokine production in peripheral T cells', *Blood*, 96(5), pp. 1999-2001.

Brocker, T. and Karjalainen, K. (1995) 'Signals through T cell receptor-zeta chain alone are insufficient to prime resting T lymphocytes', *J Exp Med*, 181(5), pp. 1653-9.

Brown, D. M., Lee, S., Garcia-Hernandez Mde, L. and Swain, S. L. (2012) 'Multifunctional CD4 cells expressing gamma interferon and perforin mediate protection against lethal influenza virus infection', *J Virol*, 86(12), pp. 6792-803.

Buchan, S. L., Rogel, A. and Al-Shamkhani, A. (2018) 'The immunobiology of CD27 and OX40 and their potential as targets for cancer immunotherapy', *Blood*, 131(1), pp. 39-48.

Buller, R. M., Holmes, K. L., Hugin, A., Frederickson, T. N. and Morse, H. C., 3rd (1987) 'Induction of cytotoxic T-cell responses in vivo in the absence of CD4 helper cells', *Nature*, 328(6125), pp. 77-9.

Burns, W. R., Zheng, Z., Rosenberg, S. A. and Morgan, R. A. (2009) 'Lack of specific gamma-retroviral vector long terminal repeat promoter silencing in patients receiving genetically engineered lymphocytes and activation upon lymphocyte restimulation', *Blood*, 114(14), pp. 2888-99.

Burzyn, D., Kuswanto, W., Kolodin, D., Shadrach, J. L., Cerletti, M., Jang, Y., Sefik, E., Tan, T. G., Wagers, A. J., Benoist, C. and Mathis, D. (2013) 'A special population of regulatory T cells potentiates muscle repair', *Cell*, 155(6), pp. 1282-95.

Byrne, J. A., Butler, J. L. and Cooper, M. D. (1988) 'Differential activation requirements for virgin and memory T cells', *J Immunol*, 141(10), pp. 3249-57.

Cartellieri, M., Bachmann, M., Feldmann, A., Bippes, C., Stamova, S., Wehner, R., Temme, A. and Schmitz, M. (2010) 'Chimeric antigen receptor-engineered T cells for immunotherapy of cancer', *J Biomed Biotechnol*, 2010, pp. 956304.

Carter, P., Presta, L., Gorman, C. M., Ridgway, J. B., Henner, D., Wong, W. L., Rowland, A. M., Kotts, C., Carver, M. E. and Shepard, H. M. (1992) 'Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(10), pp. 4285-9.

Cella, M., Scheidegger, D., Palmer-Lehmann, K., Lane, P., Lanzavecchia, A. and Alber, G. (1996) 'Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation', *J Exp Med*, 184(2), pp. 747-52.

6 Literaturverzeichnis

6.2 Literaturverzeichnis in alphabetischer Reihenfolge

Chakraborty, S., Kubatzky, K. F. and Mitra, D. K. (2019) 'An Update on Interleukin-9: From Its Cellular Source and Signal Transduction to Its Role in Immunopathogenesis', *Int J Mol Sci*, 20(9).

Chavez-Galan, L., Arenas-Del Angel, M. C., Zenteno, E., Chavez, R. and Lascurain, R. (2009) 'Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes', *Cell Mol Immunol*, 6(1), pp. 15-25.

Chen, J. J., Shen, H. C., Rivera Rosado, L. A., Zhang, Y., Di, X. and Zhang, B. (2012) 'Mislocalization of death receptors correlates with cellular resistance to their cognate ligands in human breast cancer cells', *Oncotarget*, 3(8), pp. 833-42.

Chen, L. and Flies, D. B. (2013) 'Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition', *Nat Rev Immunol*, 13(4), pp. 227-42.

Chen, W., Li, H., Liu, Z. and Yuan, W. (2016) 'Lipopolyplex for Therapeutic Gene Delivery and Its Application for the Treatment of Parkinson's Disease', *Front Aging Neurosci*, 8, pp. 68.

Chmielewski, M. and Abken, H. (2017) 'CAR T Cells Releasing IL-18 Convert to T-Bet(high) FoxO1(low) Effectors that Exhibit Augmented Activity against Advanced Solid Tumors', *Cell Rep*, 21(11), pp. 3205-3219.

Chmielewski, M., Hombach, A., Heuser, C., Adams, G. P. and Abken, H. (2004) '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*, 173(12), pp. 7647-53.

Chmielewski, M., Hombach, A. A. and Abken, H. (2011) 'CD28 cosignalling does not affect the activation threshold in a chimeric antigen receptor-redirectioned T-cell attack', *Gene Ther*, 18(1), pp. 62-72.

Cho, B. K., Wang, C., Sugawa, S., Eisen, H. N. and Chen, J. (1999) 'Functional differences between memory and naive CD8 T cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(6), pp. 2976-81.

Chong, E. A., Melenhorst, J. J., Lacey, S. F., Ambrose, D. E., Gonzalez, V., Levine, B. L., June, C. H. and Schuster, S. J. (2017) 'PD-1 blockade modulates chimeric antigen receptor (CAR)-modified T cells: refueling the CAR', *Blood*, 129(8), pp. 1039-1041.

Chung, Y., Tanaka, S., Chu, F., Nurieva, R. I., Martinez, G. J., Rawal, S., Wang, Y. H., Lim, H., Reynolds, J. M., Zhou, X. H., Fan, H. M., Liu, Z. M., Neelapu, S. S. and Dong, C. (2011) 'Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions', *Nat Med*, 17(8), pp. 983-8.

Coffman, R. L., Seymour, B. W., Hudak, S., Jackson, J. and Rennick, D. (1989) 'Antibody to interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice', *Science*, 245(4915), pp. 308-10.

Coffman, R. L., Seymour, B. W., Lebman, D. A., Hiraki, D. D., Christiansen, J. A., Shrader, B., Cherwinski, H. M., Savelkoul, H. F., Finkelman, F. D., Bond, M. W. and et al. (1988) 'The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation', *Immunol Rev*, 102, pp. 5-28.

6 Literaturverzeichnis

6.2 Literaturverzeichnis in alphabetischer Reihenfolge

Collison, L. W., Workman, C. J., Kuo, T. T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K. M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R. S. and Vignali, D. A. (2007) 'The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function', *Nature*, 450(7169), pp. 566-9.

Colombetti, S., Benigni, F., Basso, V. and Mondino, A. (2002) 'Clonal anergy is maintained independently of T cell proliferation', *J Immunol*, 169(11), pp. 6178-86.

Crawford, A., Angelosanto, J. M., Kao, C., Doering, T. A., Odorizzi, P. M., Barnett, B. E. and Wherry, E. J. (2014) 'Molecular and transcriptional basis of CD4(+) T cell dysfunction during chronic infection', *Immunity*, 40(2), pp. 289-302.

Cribbs, A. P., Kennedy, A., Gregory, B. and Brennan, F. M. (2013) 'Simplified production and concentration of lentiviral vectors to achieve high transduction in primary human T cells', *BMC Biotechnol*, 13, pp. 98.

Croft, M. (2009) 'The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases', *Nat Rev Immunol*, 9(4), pp. 271-85.

Croft, M. (2010) 'Control of immunity by the TNFR-related molecule OX40 (CD134)', *Annu Rev Immunol*, 28, pp. 57-78.

Croft, M., Bradley, L. M. and Swain, S. L. (1994) 'Naive versus memory CD4 T cell response to antigen. Memory cells are less dependent on accessory cell costimulation and can respond to many antigen-presenting cell types including resting B cells', *J Immunol*, 152(6), pp. 2675-85.

Croft, M., So, T., Duan, W. and Soroosh, P. (2009) 'The significance of OX40 and OX40L to T-cell biology and immune disease', *Immunol Rev*, 229(1), pp. 173-91.

Cui, W., Joshi, N. S., Jiang, A. and Kaech, S. M. (2009) 'Effects of Signal 3 during CD8 T cell priming: Bystander production of IL-12 enhances effector T cell expansion but promotes terminal differentiation', *Vaccine*, 27(15), pp. 2177-87.

Curti, B. D., Kovacsovics-Bankowski, M., Morris, N., Walker, E., Chisholm, L., Floyd, K., Walker, J., Gonzalez, I., Meeuwssen, T., Fox, B. A., Moudgil, T., Miller, W., Haley, D., Coffey, T., Fisher, B., Delanty-Miller, L., Rymarchyk, N., Kelly, T., Crocenzi, T., Bernstein, E., Sanborn, R., Urba, W. J. and Weinberg, A. D. (2013) 'OX40 is a potent immune-stimulating target in late-stage cancer patients', *Cancer Res*, 73(24), pp. 7189-7198.

Curtsinger, J. M., Lins, D. C. and Mescher, M. F. (1998) 'CD8+ memory T cells (CD44^{high}, Ly-6C⁺) are more sensitive than naive cells to (CD44^{low}, Ly-6C⁻) to TCR/CD8 signaling in response to antigen', *J Immunol*, 160(7), pp. 3236-43.

Curtsinger, J. M. and Mescher, M. F. (2010) 'Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation', *Curr Opin Immunol*, 22(3), pp. 333-40.

Curtsinger, J. M., Schmidt, C. S., Mondino, A., Lins, D. C., Kedl, R. M., Jenkins, M. K. and Mescher, M. F. (1999) 'Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4⁺ and CD8⁺ T cells', *J Immunol*, 162(6), pp. 3256-62.

Curtsinger, J. M., Valenzuela, J. O., Agarwal, P., Lins, D. and Mescher, M. F. (2005) 'Type I IFNs provide a third signal to CD8 T cells to stimulate clonal expansion and differentiation', *J Immunol*, 174(8), pp. 4465-9.

6 Literaturverzeichnis

6.2 Literaturverzeichnis in alphabetischer Reihenfolge

D'Emilia, J., Bulovas, K., D'Ercole, K., Wolf, B., Steele, G., Jr. and Summerhayes, I. C. (1989) 'Expression of the c-erbB-2 gene product (p185) at different stages of neoplastic progression in the colon', *Oncogene*, 4(10), pp. 1233-9.

Daley, S. R., Teh, C., Hu, D. Y., Strasser, A. and Gray, D. H. D. (2017) 'Cell death and thymic tolerance', *Immunol Rev*, 277(1), pp. 9-20.

Dardalhon, V., Awasthi, A., Kwon, H., Galileos, G., Gao, W., Sobel, R. A., Mitsdoerffer, M., Strom, T. B., Elyaman, W., Ho, I. C., Khoury, S., Oukka, M. and Kuchroo, V. K. (2008) 'IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells', *Nat Immunol*, 9(12), pp. 1347-55.

Davey, G. M., Schober, S. L., Endrizzi, B. T., Dutcher, A. K., Jameson, S. C. and Hogquist, K. A. (1998) 'Preselection thymocytes are more sensitive to T cell receptor stimulation than mature T cells', *J Exp Med*, 188(10), pp. 1867-74.

Davis, H. E., Morgan, J. R. and Yarmush, M. L. (2002) 'Polybrene increases retrovirus gene transfer efficiency by enhancing receptor-independent virus adsorption on target cell membranes', *Biophys Chem*, 97(2-3), pp. 159-72.

de Waal Malefyt, R., Haanen, J., Spits, H., Roncarolo, M. G., te Velde, A., Figdor, C., Johnson, K., Kastelein, R., Yssel, H. and de Vries, J. E. (1991) 'Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression', *J Exp Med*, 174(4), pp. 915-24.

Deeks, S. G., Wagner, B., Anton, P. A., Mitsuyasu, R. T., Scadden, D. T., Huang, C., Macken, C., Richman, D. D., Christopherson, C., June, C. H., Lazar, R., Broad, D. F., Jalali, S. and Hege, K. M. (2002) 'A phase II randomized study of HIV-specific T-cell gene therapy in subjects with undetectable plasma viremia on combination antiretroviral therapy', *Mol Ther*, 5(6), pp. 788-97.

'DELFI[®] EuTDA Cytotoxicity Reagents', (PerkinElmer 2006).

Di Stasi, A., Tey, S. K., Dotti, G., Fujita, Y., Kennedy-Nasser, A., Martinez, C., Straathof, K., Liu, E., Durett, A. G., Grilley, B., Liu, H., Cruz, C. R., Savoldo, B., Gee, A. P., Schindler, J., Krance, R. A., Heslop, H. E., Spencer, D. M., Rooney, C. M. and Brenner, M. K. (2011) 'Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy', *N Engl J Med*, 365(18), pp. 1673-83.

Disel, U., Germain, A., Yilmazel, B., Abali, H., Bolat, F. A., Yelensky, R., Elvin, J. A., Lipson, D., Chmielecki, J., Wang, K., Stephens, P. J., Ross, J. S., Miller, V. A., Ali, S. M. and George, T. J., Jr. (2015) 'Durable clinical benefit to trastuzumab and chemotherapy in a patient with metastatic colon adenocarcinoma harboring ERBB2 amplification', *Oncoscience*, 2(6), pp. 581-4.

Dong, Zheng, L., Lin, J., Zhang, B., Zhu, Y., Li, N., Xie, S., Wang, Y., Gao, N. and Huang, Z. (2019) 'Structural basis of assembly of the human T cell receptor-CD3 complex', *Nature*, 573(7775), pp. 546-552.

6 Literaturverzeichnis

6.2 Literaturverzeichnis in alphabetischer Reihenfolge

Dotiwala, F., Mulik, S., Polidoro, R. B., Ansara, J. A., Burleigh, B. A., Walch, M., Gazzinelli, R. T. and Lieberman, J. (2016) 'Killer lymphocytes use granulysin, perforin and granzymes to kill intracellular parasites', *Nat Med*, 22(2), pp. 210-6.

Duhen, T., Geiger, R., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A. and Sallusto, F. (2009) 'Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells', *Nat Immunol*, 10(8), pp. 857-63.

Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R. J., Nguyen, M., Trono, D. and Naldini, L. (1998) 'A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system', *J Virol*, 72(11), pp. 8463-71.

Durkop, H., Latza, U., Himmelreich, P. and Stein, H. (1995) 'Expression of the human OX40 (hOX40) antigen in normal and neoplastic tissues', *Br J Haematol*, 91(4), pp. 927-31.

Dustin, M. L., Bromley, S. K., Kan, Z., Peterson, D. A. and Unanue, E. R. (1997) 'Antigen receptor engagement delivers a stop signal to migrating T lymphocytes', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(8), pp. 3909-13.

Ebert, L. M., Horn, M. P., Lang, A. B. and Moser, B. (2004) 'B cells alter the phenotype and function of follicular-homing CXCR5+ T cells', *Eur J Immunol*, 34(12), pp. 3562-71.

Eller, K., Kirsch, A., Wolf, A. M., Sopper, S., Tagwerker, A., Stanzl, U., Wolf, D., Patsch, W., Rosenkranz, A. R. and Eller, P. (2011) 'Potential role of regulatory T cells in reversing obesity-linked insulin resistance and diabetic nephropathy', *Diabetes*, 60(11), pp. 2954-62.

Engel, I. and Hedrick, S. M. (1988) 'Site-directed mutations in the VDJ junctional region of a T cell receptor beta chain cause changes in antigenic peptide recognition', *Cell*, 54(4), pp. 473-84.

Essery, G., Feldmann, M. and Lamb, J. R. (1988) 'Interleukin-2 can prevent and reverse antigen-induced unresponsiveness in cloned human T lymphocytes', *Immunology*, 64(3), pp. 413-7.

Eyerich, S., Eyerich, K., Pennino, D., Carbone, T., Nasorri, F., Pallotta, S., Cianfarani, F., Odorasio, T., Traidl-Hoffmann, C., Behrendt, H., Durham, S. R., Schmidt-Weber, C. B. and Cavani, A. (2009) 'Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling', *J Clin Invest*, 119(12), pp. 3573-85.

Faria, A. M. and Weiner, H. L. (2005) 'Oral tolerance', *Immunol Rev*, 206, pp. 232-59.

Finkelshtein, D., Werman, A., Novick, D., Barak, S. and Rubinstein, M. (2013) 'LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(18), pp. 7306-11.

Finney, H. M., Lawson, A. D., Bebbington, C. R. and Weir, A. N. (1998) 'Chimeric receptors providing both primary and costimulatory signaling in T cells from a single gene product', *J Immunol*, 161(6), pp. 2791-7.

Fitzgerald, J. C., Weiss, S. L., Maude, S. L., Barrett, D. M., Lacey, S. F., Melenhorst, J. J., Shaw, P., Berg, R. A., June, C. H., Porter, D. L., Frey, N. V.,

Grupp, S. A. and Teachey, D. T. (2017) 'Cytokine Release Syndrome After Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia', *Crit Care Med*, 45(2), pp. e124-e131.

Floess, S., Freyer, J., Siewert, C., Baron, U., Olek, S., Polansky, J., Schlawe, K., Chang, H. D., Bopp, T., Schmitt, E., Klein-Hessling, S., Serfling, E., Hamann, A. and Huehn, J. (2007) 'Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells', *PLoS Biol*, 5(2), pp. e38.

Forster, R., Mattis, A. E., Kremmer, E., Wolf, E., Brem, G. and Lipp, M. (1996) 'A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen', *Cell*, 87(6), pp. 1037-47.

Fraietta, J. A., Nobles, C. L., Sammons, M. A., Lundh, S., Carty, S. A., Reich, T. J., Cogdill, A. P., Morrisette, J. J. D., DeNizio, J. E., Reddy, S., Hwang, Y., Gohil, M., Kulikovskaya, I., Nazimuddin, F., Gupta, M., Chen, F., Everett, J. K., Alexander, K. A., Lin-Shiao, E., Gee, M. H., Liu, X., Young, R. M., Ambrose, D., Wang, Y., Xu, J., Jordan, M. S., Marcucci, K. T., Levine, B. L., Garcia, K. C., Zhao, Y., Kalos, M., Porter, D. L., Kohli, R. M., Lacey, S. F., Berger, S. L., Bushman, F. D., June, C. H. and Melenhorst, J. J. (2018) 'Disruption of TET2 promotes the therapeutic efficacy of CD19-targeted T cells', *Nature*, 558(7709), pp. 307-312.

Francisco, L. M., Sage, P. T. and Sharpe, A. H. (2010) 'The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity', *Immunol Rev*, 236, pp. 219-42.

Friedlaender, A., Addeo, A. and Banna, G. (2019) 'New emerging targets in cancer immunotherapy: the role of TIM3', *ESMO Open*, 4(Suppl 3), pp. e000497.

Frigault, M. J., Lee, J., Basil, M. C., Carpenito, C., Motohashi, S., Scholler, J., Kawalekar, O. U., Guedan, S., McGettigan, S. E., Posey, A. D., Jr., Ang, S., Cooper, L. J., Platt, J. M., Johnson, F. B., Paulos, C. M., Zhao, Y., Kalos, M., Milone, M. C. and June, C. H. (2015) 'Identification of chimeric antigen receptors that mediate constitutive or inducible proliferation of T cells', *Cancer Immunol Res*, 3(4), pp. 356-67.

Fukushige, S., Matsubara, K., Yoshida, M., Sasaki, M., Suzuki, T., Semba, K., Toyoshima, K. and Yamamoto, T. (1986) 'Localization of a novel v-erbB-related gene, c-erbB-2, on human chromosome 17 and its amplification in a gastric cancer cell line', *Mol Cell Biol*, 6(3), pp. 955-8.

Gagliani, N., Amezcu Vesely, M. C., Iseppon, A., Brockmann, L., Xu, H., Palm, N. W., de Zoete, M. R., Licona-Limon, P., Paiva, R. S., Ching, T., Weaver, C., Zi, X., Pan, X., Fan, R., Garmire, L. X., Cotton, M. J., Drier, Y., Bernstein, B., Geginat, J., Stockinger, B., Esplugues, E., Huber, S. and Flavell, R. A. (2015) 'Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation', *Nature*, 523(7559), pp. 221-5.

Gajjar, A., Hernan, R., Kocak, M., Fuller, C., Lee, Y., McKinnon, P. J., Wallace, D., Lau, C., Chintagumpala, M., Ashley, D. M., Kellie, S. J., Kun, L. and Gilbertson, R. J. (2004) 'Clinical, histopathologic, and molecular markers of

6 Literaturverzeichnis

6.2 Literaturverzeichnis in alphabetischer Reihenfolge

prognosis: toward a new disease risk stratification system for medulloblastoma', *J Clin Oncol*, 22(6), pp. 984-93.

Gao, G. F., Rao, Z. and Bell, J. I. (2002) 'Molecular coordination of alphabeta T-cell receptors and coreceptors CD8 and CD4 in their recognition of peptide-MHC ligands', *Trends Immunol*, 23(8), pp. 408-13.

Gargett, T. and Brown, M. P. (2015) 'Different cytokine and stimulation conditions influence the expansion and immune phenotype of third-generation chimeric antigen receptor T cells specific for tumor antigen GD2', *Cytotherapy*, 17(4), pp. 487-95.

Gargett, T., Yu, W., Dotti, G., Yvon, E. S., Christo, S. N., Hayball, J. D., Lewis, I. D., Brenner, M. K. and Brown, M. P. (2016) 'GD2-specific CAR T Cells Undergo Potent Activation and Deletion Following Antigen Encounter but can be Protected From Activation-induced Cell Death by PD-1 Blockade', *Mol Ther*, 24(6), pp. 1135-1149.

Garlie, N. K., LeFever, A. V., Siebenlist, R. E., Levine, B. L., June, C. H. and Lum, L. G. (1999) 'T cells coactivated with immobilized anti-CD3 and anti-CD28 as potential immunotherapy for cancer', *J Immunother*, 22(4), pp. 336-45.

Gattinoni, L., Klebanoff, C. A., Palmer, D. C., Wrzesinski, C., Kerstann, K., Yu, Z., Finkelstein, S. E., Theoret, M. R., Rosenberg, S. A. and Restifo, N. P. (2005) 'Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8+ T cells', *J Clin Invest*, 115(6), pp. 1616-26.

Gattinoni, L., Lugli, E., Ji, Y., Pos, Z., Paulos, C. M., Quigley, M. F., Almeida, J. R., Gostick, E., Yu, Z., Carpenito, C., Wang, E., Douek, D. C., Price, D. A., June, C. H., Marincola, F. M., Roederer, M. and Restifo, N. P. (2011) 'A human memory T cell subset with stem cell-like properties', *Nat Med*, 17(10), pp. 1290-7.

Gaud, G., Lesourne, R. and Love, P. E. (2018) 'Regulatory mechanisms in T cell receptor signalling', *Nat Rev Immunol*, 18(8), pp. 485-497.

Germain, R. N. (2002) 'T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision', *Nat Rev Immunol*, 2(5), pp. 309-22.

Golovina, T. N., Mikheeva, T., Suhoski, M. M., Aqui, N. A., Tai, V. C., Shan, X., Liu, R., Balcarcel, R. R., Fisher, N., Levine, B. L., Carroll, R. G., Warner, N., Blazar, B. R., June, C. H. and Riley, J. L. (2008) 'CD28 costimulation is essential for human T regulatory expansion and function', *J Immunol*, 181(4), pp. 2855-68.

Gomes-Silva, D., Mukherjee, M., Srinivasan, M., Krenciute, G., Dakhova, O., Zheng, Y., Cabral, J. M. S., Rooney, C. M., Orange, J. S., Brenner, M. K. and Mamonkin, M. (2017) 'Tonic 4-1BB Costimulation in Chimeric Antigen Receptors Impedes T Cell Survival and Is Vector-Dependent', *Cell Rep*, 21(1), pp. 17-26.

Gondek, D. C., Lu, L. F., Quezada, S. A., Sakaguchi, S. and Noelle, R. J. (2005) 'Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism', *J Immunol*, 174(4), pp. 1783-6.

Gondek, D. C., Roan, N. R. and Starnbach, M. N. (2009) 'T cell responses in the absence of IFN-gamma exacerbate uterine infection with *Chlamydia trachomatis*', *J Immunol*, 183(2), pp. 1313-9.

Gong, W., Hoffmann, J. M., Stock, S., Wang, L., Liu, Y., Schubert, M. L., Neuber, B., Huckelhoven-Krauss, A., Gern, U., Schmitt, A., Muller-Tidow, C., Shiku, H., Schmitt, M. and Sellner, L. (2019) 'Comparison of IL-2 vs IL-7/IL-15 for the generation of NY-ESO-1-specific T cells', *Cancer Immunol Immunother*, 68(7), pp. 1195-1209.

Gross, G., Waks, T. and Eshhar, Z. (1989) 'Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(24), pp. 10024-8.

Grupp, S. A., Kalos, M., Barrett, D., Aplenc, R., Porter, D. L., Rheingold, S. R., Teachey, D. T., Chew, A., Hauck, B., Wright, J. F., Milone, M. C., Levine, B. L. and June, C. H. (2013) 'Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia', *N Engl J Med*, 368(16), pp. 1509-1518.

Guest, R. D., Hawkins, R. E., Kirillova, N., Cheadle, E. J., Arnold, J., O'Neill, A., Irlam, J., Chester, K. A., Kemshead, J. T., Shaw, D. M., Embleton, M. J., Stern, P. L. and Gilham, D. E. (2005) 'The role of extracellular spacer regions in the optimal design of chimeric immune receptors: evaluation of four different scFvs and antigens', *J Immunother*, 28(3), pp. 203-11.

Gunzer, M., Schafer, A., Borgmann, S., Grabbe, S., Zanker, K. S., Brocker, E. B., Kampgen, E. and Friedl, P. (2000) 'Antigen presentation in extracellular matrix: interactions of T cells with dendritic cells are dynamic, short lived, and sequential', *Immunity*, 13(3), pp. 323-32.

Gust, J., Hay, K. A., Hanafi, L. A., Li, D., Myerson, D., Gonzalez-Cuyar, L. F., Yeung, C., Liles, W. C., Wurfel, M., Lopez, J. A., Chen, J., Chung, D., Harju-Baker, S., Ozpolat, T., Fink, K. R., Riddell, S. R., Maloney, D. G. and Turtle, C. J. (2017) 'Endothelial Activation and Blood-Brain Barrier Disruption in Neurotoxicity after Adoptive Immunotherapy with CD19 CAR-T Cells', *Cancer Discov*, 7(12), pp. 1404-1419.

Gust, J., Taraseviciute, A. and Turtle, C. J. (2018) 'Neurotoxicity Associated with CD19-Targeted CAR-T Cell Therapies', *CNS Drugs*, 32(12), pp. 1091-1101.

Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M. P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C. S., Pawliuk, R., Morillon, E., Sorensen, R., Forster, A., Fraser, P., Cohen, J. I., de Saint Basile, G., Alexander, I., Wintergerst, U., Frebourg, T., Aurias, A., Stoppa-Lyonnet, D., Romana, S., Radford-Weiss, I., Gross, F., Valensi, F., Delabesse, E., Macintyre, E., Sigaux, F., Soulier, J., Leiva, L. E., Wissler, M., Prinz, C., Rabbitts, T. H., Le Deist, F., Fischer, A. and Cavazzana-Calvo, M. (2003) 'LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1', *Science*, 302(5644), pp. 415-9.

Harding, F. A., McArthur, J. G., Gross, J. A., Raulet, D. H. and Allison, J. P. (1992) 'CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones', *Nature*, 356(6370), pp. 607-9.

6 Literaturverzeichnis

6.2 Literaturverzeichnis in alphabetischer Reihenfolge

Harrington, L. E., Hatton, R. D., Mangan, P. R., Turner, H., Murphy, T. L., Murphy, K. M. and Weaver, C. T. (2005) 'Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages', *Nat Immunol*, 6(11), pp. 1123-32.

Haynes, N. M., Trapani, J. A., Teng, M. W., Jackson, J. T., Cerruti, L., Jane, S. M., Kershaw, M. H., Smyth, M. J. and Darcy, P. K. (2002) 'Rejection of syngeneic colon carcinoma by CTLs expressing single-chain antibody receptors codelivering CD28 costimulation', *J Immunol*, 169(10), pp. 5780-6.

He, X., Smeets, R. L., van Rijssen, E., Boots, A. M., Joosten, I. and Koenen, H. J. (2017) 'Single CD28 stimulation induces stable and polyclonal expansion of human regulatory T cells', *Sci Rep*, 7, pp. 43003.

Heczey, A., Louis, C. U., Savoldo, B., Dakhova, O., Durett, A., Grilley, B., Liu, H., Wu, M. F., Mei, Z., Gee, A., Mehta, B., Zhang, H., Mahmood, N., Tashiro, H., Heslop, H. E., Dotti, G., Rooney, C. M. and Brenner, M. K. (2017) 'CAR T Cells Administered in Combination with Lymphodepletion and PD-1 Inhibition to Patients with Neuroblastoma', *Mol Ther*, 25(9), pp. 2214-2224.

Hedfors, I. A. and Brinchmann, J. E. (2003) 'Long-term proliferation and survival of in vitro-activated T cells is dependent on Interleukin-2 receptor signalling but not on the high-affinity IL-2R', *Scand J Immunol*, 58(5), pp. 522-32.

Hedrick, S. M., Cohen, D. I., Nielsen, E. A. and Davis, M. M. (1984) 'Isolation of cDNA clones encoding T cell-specific membrane-associated proteins', *Nature*, 308(5955), pp. 149-53.

Herbst, F., Ball, C. R., Tuorto, F., Nowrouzi, A., Wang, W., Zavidij, O., Dieter, S. M., Fessler, S., van der Hoeven, F., Kloz, U., Lyko, F., Schmidt, M., von Kalle, C. and Glimm, H. (2012) 'Extensive methylation of promoter sequences silences lentiviral transgene expression during stem cell differentiation in vivo', *Mol Ther*, 20(5), pp. 1014-21.

Heylmann, D., Badura, J., Becker, H., Fahrner, J. and Kaina, B. (2018) 'Sensitivity of CD3/CD28-stimulated versus non-stimulated lymphocytes to ionizing radiation and genotoxic anticancer drugs: key role of ATM in the differential radiation response', *Cell Death Dis*, 9(11), pp. 1053.

Hochweller, K., Wabnitz, G. H., Samstag, Y., Suffner, J., Hammerling, G. J. and Garbi, N. (2010) 'Dendritic cells control T cell tonic signaling required for responsiveness to foreign antigen', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(13), pp. 5931-6.

Hodi, F. S., O'Day, S. J., McDermott, D. F., Weber, R. W., Sosman, J. A., Haanen, J. B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J. C., Akerley, W., van den Eertwegh, A. J., Lutzky, J., Lorigan, P., Vaubel, J. M., Linette, G. P., Hogg, D., Ottensmeier, C. H., Lebbe, C., Peschel, C., Quirt, I., Clark, J. I., Wolchok, J. D., Weber, J. S., Tian, J., Yellin, M. J., Nichol, G. M., Hoos, A. and Urban, W. J. (2010) 'Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma', *N Engl J Med*, 363(8), pp. 711-23.

Hoffmann, D., Schott, J. W., Geis, F. K., Lange, L., Muller, F. J., Lenz, D., Zychlinski, D., Steinemann, D., Morgan, M., Moritz, T. and Schambach, A. (2017)

'Detailed comparison of retroviral vectors and promoter configurations for stable and high transgene expression in human induced pluripotent stem cells', *Gene Ther*, 24(5), pp. 298-307.

Hoffmann, P., Boeld, T. J., Eder, R., Huehn, J., Floess, S., Wieczorek, G., Olek, S., Dietmaier, W., Andreesen, R. and Edinger, M. (2009) 'Loss of FOXP3 expression in natural human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells upon repetitive in vitro stimulation', *Eur J Immunol*, 39(4), pp. 1088-97.

Holm, G. and Perlmann, P. (1965) 'Phytohaemagglutinin-induced cytotoxic action of unsensitized immunologically competent cells on allogeneic and xenogeneic tissue culture cells', *Nature*, 207(999), pp. 818-21.

Hombach, A., Heuser, C., Gerken, M., Fischer, B., Lewalter, K., Diehl, V., Pohl, C. and Abken, H. (2000) 'T cell activation by recombinant FcepsilonRI gamma-chain immune receptors: an extracellular spacer domain impairs antigen-dependent T cell activation but not antigen recognition', *Gene Ther*, 7(12), pp. 1067-75.

Hombach, A., Hombach, A. A. and Abken, H. (2010) 'Adoptive immunotherapy with genetically engineered T cells: modification of the IgG1 Fc 'spacer' domain in the extracellular moiety of chimeric antigen receptors avoids 'off-target' activation and unintended initiation of an innate immune response', *Gene Ther*, 17(10), pp. 1206-13.

Hombach, A., Sent, D., Schneider, C., Heuser, C., Koch, D., Pohl, C., Seliger, B. and Abken, H. (2001) 'T-cell activation by recombinant receptors: CD28 costimulation is required for interleukin 2 secretion and receptor-mediated T-cell proliferation but does not affect receptor-mediated target cell lysis', *Cancer Res*, 61(5), pp. 1976-82.

Hombach, A. A. and Abken, H. (2011) 'Costimulation by chimeric antigen receptors revisited the T cell antitumor response benefits from combined CD28-OX40 signalling', *Int J Cancer*, 129(12), pp. 2935-44.

Hombach, A. A., Rappl, G. and Abken, H. (2013) 'Arming cytokine-induced killer cells with chimeric antigen receptors: CD28 outperforms combined CD28-OX40 "super-stimulation"', *Mol Ther*, 21(12), pp. 2268-77.

Horejsi, V., Zhang, W. and Schraven, B. (2004) 'Transmembrane adaptor proteins: organizers of immunoreceptor signalling', *Nat Rev Immunol*, 4(8), pp. 603-16.

Hori, S., Nomura, T. and Sakaguchi, S. (2003) 'Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3', *Science*, 299(5609), pp. 1057-61.

Hu, B., Ren, J., Luo, Y., Keith, B., Young, R. M., Scholler, J., Zhao, Y. and June, C. H. (2017) 'Augmentation of Antitumor Immunity by Human and Mouse CAR T Cells Secreting IL-18', *Cell Rep*, 20(13), pp. 3025-3033.

Hudecek, M., Sommermeyer, D., Kosasih, P. L., Silva-Benedict, A., Liu, L., Rader, C., Jensen, M. C. and Riddell, S. R. (2015) 'The nonsignaling extracellular spacer domain of chimeric antigen receptors is decisive for in vivo antitumor activity', *Cancer Immunol Res*, 3(2), pp. 125-35.

In-Fusion® HD Cloning Kit User Manual. (Takara Bio USA Inc. 2016).

Instructions: Dynabeads® Human T-Activator CD3/CD28. (Life Technologies Corporation, 2011).

Irie, R. F., Irie, K. and Morton, D. L. (1974) 'Natural antibody in human serum to a neoantigen in human cultured cells grown in fetal bovine serum', *J Natl Cancer Inst*, 52(4), pp. 1051-8.

Janssen, E. M., Lemmens, E. E., Wolfe, T., Christen, U., von Herrath, M. G. and Schoenberger, S. P. (2003) 'CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes', *Nature*, 421(6925), pp. 852-6.

Jenkins, M. K., Chen, C. A., Jung, G., Mueller, D. L. and Schwartz, R. H. (1990) 'Inhibition of antigen-specific proliferation of type 1 murine T cell clones after stimulation with immobilized anti-CD3 monoclonal antibody', *J Immunol*, 144(1), pp. 16-22.

Jenkins, M. K., Pardoll, D. M., Mizuguchi, J., Quill, H. and Schwartz, R. H. (1987) 'T-cell unresponsiveness in vivo and in vitro: fine specificity of induction and molecular characterization of the unresponsive state', *Immunol Rev*, 95, pp. 113-35.

Jensen, M. A., Fukushima, M. and Davis, R. W. (2010) 'DMSO and betaine greatly improve amplification of GC-rich constructs in de novo synthesis', *PLoS One*, 5(6), pp. e11024.

Johannsdottir, H. K., Mancini, R., Kartenbeck, J., Amato, L. and Helenius, A. (2009) 'Host cell factors and functions involved in vesicular stomatitis virus entry', *J Virol*, 83(1), pp. 440-53.

John, L. B., Kershaw, M. H. and Darcy, P. K. (2013) 'Blockade of PD-1 immunosuppression boosts CAR T-cell therapy', *Oncoimmunology*, 2(10), pp. e26286.

Joss, A., Akdis, M., Faith, A., Blaser, K. and Akdis, C. A. (2000) 'IL-10 directly acts on T cells by specifically altering the CD28 co-stimulation pathway', *Eur J Immunol*, 30(6), pp. 1683-90.

June, C. H., Ledbetter, J. A., Linsley, P. S. and Thompson, C. B. (1990) 'Role of the CD28 receptor in T-cell activation', *Immunol Today*, 11(6), pp. 211-6.

Kaartinen, T., Luostarinen, A., Maliniemi, P., Keto, J., Arvas, M., Belt, H., Koponen, J., Makinen, P. I., Loskog, A., Mustjoki, S., Porkka, K., Yla-Herttuala, S. and Korhonen, M. (2017) 'Low interleukin-2 concentration favors generation of early memory T cells over effector phenotypes during chimeric antigen receptor T-cell expansion', *Cytotherapy*, 19(6), pp. 689-702.

Kalos, M., Levine, B. L., Porter, D. L., Katz, S., Grupp, S. A., Bagg, A. and June, C. H. (2011) 'T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia', *Sci Transl Med*, 3(95), pp. 95ra73.

Kambhampati, S., Gray, L., Fakhri, B., Lo, M., Vu, K., Arora, S., Kaplan, L., Ai, W. Z. and Andreadis, C. (2020) 'Immune-related Adverse Events Associated With

Checkpoint Inhibition in the Setting of CAR T Cell Therapy: A Case Series', *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 20(3), pp. e118-e123.

Kameda, T., Yasui, W., Yoshida, K., Tsujino, T., Nakayama, H., Ito, M., Ito, H. and Tahara, E. (1990) 'Expression of ERBB2 in human gastric carcinomas: relationship between p185ERBB2 expression and the gene amplification', *Cancer Res*, 50(24), pp. 8002-9.

Keene, J. A. and Forman, J. (1982) 'Helper activity is required for the in vivo generation of cytotoxic T lymphocytes', *J Exp Med*, 155(3), pp. 768-82.

Kelley, J. L., Rozek, M. M., Suenram, C. A. and Schwartz, C. J. (1987) 'Activation of human blood monocytes by adherence to tissue culture plastic surfaces', *Exp Mol Pathol*, 46(3), pp. 266-78.

Kisielow, P., Teh, H. S., Bluthmann, H. and von Boehmer, H. (1988) 'Positive selection of antigen-specific T cells in thymus by restricting MHC molecules', *Nature*, 335(6192), pp. 730-3.

Kjer-Nielsen, L., Patel, O., Corbett, A. J., Le Nours, J., Meehan, B., Liu, L., Bhati, M., Chen, Z., Kostenko, L., Reantragoon, R., Williamson, N. A., Purcell, A. W., Dudek, N. L., McConville, M. J., O'Hair, R. A., Khairallah, G. N., Godfrey, D. I., Fairlie, D. P., Rossjohn, J. and McCluskey, J. (2012) 'MR1 presents microbial vitamin B metabolites to MAIT cells', *Nature*, 491(7426), pp. 717-23.

Klein, L., Kyewski, B., Allen, P. M. and Hogquist, K. A. (2014) 'Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see)', *Nat Rev Immunol*, 14(6), pp. 377-91.

Kleinschnitz, C., Kraft, P., Dreykluft, A., Hagedorn, I., Gobel, K., Schuhmann, M. K., Langhauser, F., Helluy, X., Schwarz, T., Bittner, S., Mayer, C. T., Brede, M., Varallyay, C., Pham, M., Bendszus, M., Jakob, P., Magnus, T., Meuth, S. G., Iwakura, Y., Zerneck, A., Sparwasser, T., Nieswandt, B., Stoll, G. and Wiendl, H. (2013) 'Regulatory T cells are strong promoters of acute ischemic stroke in mice by inducing dysfunction of the cerebral microvasculature', *Blood*, 121(4), pp. 679-91.

Kondo, M., Weissman, I. L. and Akashi, K. (1997) 'Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow', *Cell*, 91(5), pp. 661-72.

Kotani, H., Newton, P. B., 3rd, Zhang, S., Chiang, Y. L., Otto, E., Weaver, L., Blaese, R. M., Anderson, W. F. and McGarrity, G. J. (1994) 'Improved methods of retroviral vector transduction and production for gene therapy', *Hum Gene Ther*, 5(1), pp. 19-28.

Kroemer, A., Xiao, X., Vu, M. D., Gao, W., Minamimura, K., Chen, M., Maki, T. and Li, X. C. (2007) 'OX40 controls functionally different T cell subsets and their resistance to depletion therapy', *J Immunol*, 179(8), pp. 5584-91.

Krueger, A. (2018) 'Thymus Colonization: Who, How, How Many?', *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 66(2), pp. 81-88.

Kueberuwa, G., Kalaitidou, M., Cheadle, E., Hawkins, R. E. and Gilham, D. E. (2018) 'CD19 CAR T Cells Expressing IL-12 Eradicate Lymphoma in Fully

Lymphoreplete Mice through Induction of Host Immunity', *Mol Ther Oncolytics*, 8, pp. 41-51.

Kumar, P., Alharshawi, K., Bhattacharya, P., Marinelarena, A., Haddad, C., Sun, Z., Chiba, S., Epstein, A. L. and Prabhakar, B. S. (2017) 'Soluble OX40L and JAG1 Induce Selective Proliferation of Functional Regulatory T-Cells Independent of canonical TCR signaling', *Sci Rep*, 7, pp. 39751.

Kunkele, A., Johnson, A. J., Rolczynski, L. S., Chang, C. A., Hoglund, V., Kelly-Spratt, K. S. and Jensen, M. C. (2015) 'Functional Tuning of CARs Reveals Signaling Threshold above Which CD8+ CTL Antitumor Potency Is Attenuated due to Cell Fas-FasL-Dependent AICD', *Cancer Immunol Res*, 3(4), pp. 368-79.

Laan, M., Cui, Z. H., Hoshino, H., Lotvall, J., Sjostrand, M., Gruenert, D. C., Skoogh, B. E. and Linden, A. (1999) 'Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways', *J Immunol*, 162(4), pp. 2347-52.

Lamers, C. H., Sleijfer, S., van Steenbergen, S., van Elzaker, P., van Krimpen, B., Groot, C., Vulto, A., den Bakker, M., Oosterwijk, E., Debets, R. and Gratama, J. W. (2013) 'Treatment of metastatic renal cell carcinoma with CAIX CAR-engineered T cells: clinical evaluation and management of on-target toxicity', *Mol Ther*, 21(4), pp. 904-12.

Lamers, C. H., Willemsen, R., van Elzaker, P., van Steenbergen-Langeveld, S., Broertjes, M., Oosterwijk-Wakka, J., Oosterwijk, E., Sleijfer, S., Debets, R. and Gratama, J. W. (2011) 'Immune responses to transgene and retroviral vector in patients treated with ex vivo-engineered T cells', *Blood*, 117(1), pp. 72-82.

Lanier, L. L., Allison, J. P. and Phillips, J. H. (1986) 'Correlation of cell surface antigen expression on human thymocytes by multi-color flow cytometric analysis: implications for differentiation', *J Immunol*, 137(8), pp. 2501-7.

Lanitis, E., Dangaj, D., Hagemann, I. S., Song, D. G., Best, A., Sandaltzopoulos, R., Coukos, G. and Powell, D. J., Jr. (2012) 'Primary human ovarian epithelial cancer cells broadly express HER2 at immunologically-detectable levels', *PLoS One*, 7(11), pp. e49829.

Lebman, D. A. and Coffman, R. L. (1988) 'Interleukin 4 causes isotype switching to IgE in T cell-stimulated clonal B cell cultures', *J Exp Med*, 168(3), pp. 853-62.

Lee, J. E., Zhu, Z., Bai, Q., Brady, T. J., Xiao, H., Wakefield, M. R. and Fang, Y. (2019) 'The Role of Interleukin-9 in Cancer', *Pathol Oncol Res*.

LeibundGut-Landmann, S., Gross, O., Robinson, M. J., Osorio, F., Slack, E. C., Tsoni, S. V., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V., Brown, G. D., Ruland, J. and Reis e Sousa, C. (2007) 'Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17', *Nat Immunol*, 8(6), pp. 630-8.

Lenardo, M. J. (1991) 'Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis', *Nature*, 353(6347), pp. 858-61.

Leney-Greene, M. A., Boddapati, A. K., Su, H. C., Cantor, J. R. and Lenardo, M. J. (2020) 'Human Plasma-like Medium Improves T Lymphocyte Activation', *iScience*, 23(1), pp. 100759.

- 'Lenti-X™ qRT-PCR Titration Kit User Manual', (Takara Bio USA Inc. 2013).
- Lepore, M., Mori, L. and De Libero, G. (2018) 'The Conventional Nature of Non-MHC-Restricted T Cells', *Front Immunol*, 9, pp. 1365.
- Levine, B. L., Bernstein, W. B., Connors, M., Craighead, N., Lindsten, T., Thompson, C. B. and June, C. H. (1997) 'Effects of CD28 costimulation on long-term proliferation of CD4+ T cells in the absence of exogenous feeder cells', *J Immunol*, 159(12), pp. 5921-30.
- Li, H., Yuan, W., Bin, S., Wu, G., Li, P., Liu, M., Yang, J., Li, X., Yang, K. and Gu, H. (2020) 'Overcome trastuzumab resistance of breast cancer using anti-HER2 chimeric antigen receptor T cells and PD1 blockade', *Am J Cancer Res*, 10(2), pp. 688-703.
- Li, M. O. and Rudensky, A. Y. (2016) 'T cell receptor signalling in the control of regulatory T cell differentiation and function', *Nat Rev Immunol*, 16(4), pp. 220-33.
- Li, Q. J., Chau, J., Ebert, P. J., Sylvester, G., Min, H., Liu, G., Braich, R., Manoharan, M., Soutschek, J., Skare, P., Klein, L. O., Davis, M. M. and Chen, C. Z. (2007) 'miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection', *Cell*, 129(1), pp. 147-61.
- Li, X. C., Demirci, G., Ferrari-Lacraz, S., Groves, C., Coyle, A., Malek, T. R. and Strom, T. B. (2001) 'IL-15 and IL-2: a matter of life and death for T cells in vivo', *Nat Med*, 7(1), pp. 114-8.
- Li, Y. and Kurlander, R. J. (2010) 'Comparison of anti-CD3 and anti-CD28-coated beads with soluble anti-CD3 for expanding human T cells: differing impact on CD8 T cell phenotype and responsiveness to restimulation', *J Transl Med*, 8, pp. 104.
- Li, Y., Wei, C., Xu, H., Jia, J., Wei, Z., Guo, R., Jia, Y., Wu, Y., Li, Y., Qi, X., Li, Z. and Gao, X. (2018) 'The Immunoregulation of Th17 in Host against Intracellular Bacterial Infection', *Mediators Inflamm*, 2018, pp. 6587296.
- Liang, J., Lyu, J., Zhao, M., Li, D., Zheng, M., Fang, Y., Zhao, F., Lou, J., Guo, C., Wang, L., Wang, D., Liu, W. and Lu, L. (2017) 'Tesp1 regulates T cell receptor-induced calcium signals by recruiting inositol 1,4,5-trisphosphate receptors', *Nat Commun*, 8, pp. 15732.
- Liesz, A., Suri-Payer, E., Veltkamp, C., Doerr, H., Sommer, C., Rivest, S., Giese, T. and Veltkamp, R. (2009) 'Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke', *Nat Med*, 15(2), pp. 192-9.
- Lin, Y., Ritchea, S., Logar, A., Slight, S., Messmer, M., Rangel-Moreno, J., Guglani, L., Alcorn, J. F., Strawbridge, H., Park, S. M., Onishi, R., Nyugen, N., Walter, M. J., Pociask, D., Randall, T. D., Gaffen, S. L., Iwakura, Y., Kolls, J. K. and Khader, S. A. (2009) 'Interleukin-17 is required for T helper 1 cell immunity and host resistance to the intracellular pathogen *Francisella tularensis*', *Immunity*, 31(5), pp. 799-810.

6 Literaturverzeichnis

6.2 Literaturverzeichnis in alphabetischer Reihenfolge

Lindstein, T., June, C. H., Ledbetter, J. A., Stella, G. and Thompson, C. B. (1989) 'Regulation of lymphokine messenger RNA stability by a surface-mediated T cell activation pathway', *Science*, 244(4902), pp. 339-43.

Linette, G. P., Stadtmauer, E. A., Maus, M. V., Rapoport, A. P., Levine, B. L., Emery, L., Litzky, L., Bagg, A., Carreno, B. M., Cimino, P. J., Binder-Scholl, G. K., Smethurst, D. P., Gerry, A. B., Pumphrey, N. J., Bennett, A. D., Brewer, J. E., Dukes, J., Harper, J., Tayton-Martin, H. K., Jakobsen, B. K., Hassan, N. J., Kalos, M. and June, C. H. (2013) 'Cardiovascular toxicity and titin cross-reactivity of affinity-enhanced T cells in myeloma and melanoma', *Blood*, 122(6), pp. 863-71.

Linial, M. (2000) 'Why aren't foamy viruses pathogenic?', *Trends Microbiol*, 8(6), pp. 284-9.

Linsley, P. S., Bradshaw, J., Greene, J., Peach, R., Bennett, K. L. and Mittler, R. S. (1996) 'Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement', *Immunity*, 4(6), pp. 535-43.

Linsley, P. S., Brady, W., Urnes, M., Grosmaire, L. S., Damle, N. K. and Ledbetter, J. A. (1991) 'CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7', *J Exp Med*, 174(3), pp. 561-9.

Linsley, P. S., Clark, E. A. and Ledbetter, J. A. (1990) 'T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB-1', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(13), pp. 5031-5.

Liu, D., Xu, H., Shih, C., Wan, Z., Ma, X., Ma, W., Luo, D. and Qi, H. (2015) 'T-B-cell entanglement and ICOSL-driven feed-forward regulation of germinal centre reaction', *Nature*, 517(7533), pp. 214-8.

Liu, W., Liu, Z., Cao, X., Cao, Z., Xue, L., Zhu, F., He, X. and Li, W. (2007) 'Recombinant human foamy virus, a novel vector for neurological disorders gene therapy, drives production of GAD in cultured astrocytes', *Mol Ther*, 15(10), pp. 1834-41.

Liu, X., Ranganathan, R., Jiang, S., Fang, C., Sun, J., Kim, S., Newick, K., Lo, A., June, C. H., Zhao, Y. and Moon, E. K. (2016) 'A Chimeric Switch-Receptor Targeting PD1 Augments the Efficacy of Second-Generation CAR T Cells in Advanced Solid Tumors', *Cancer Res*, 76(6), pp. 1578-90.

Liu, Y., Amarnath, S. and Chen, W. (2006) 'Requirement of CD28 signaling in homeostasis/survival of TGF-beta converted CD4+CD25+ Tregs from thymic CD4+CD25- single positive T cells', *Transplantation*, 82(7), pp. 953-64.

Lo, W. L., Donermeyer, D. L. and Allen, P. M. (2012) 'A voltage-gated sodium channel is essential for the positive selection of CD4(+) T cells', *Nat Immunol*, 13(9), pp. 880-7.

Lois, C., Hong, E. J., Pease, S., Brown, E. J. and Baltimore, D. (2002) 'Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors', *Science*, 295(5556), pp. 868-72.

Long, A. H., Haso, W. M., Shern, J. F., Wanhainen, K. M., Murgai, M., Ingaramo, M., Smith, J. P., Walker, A. J., Kohler, M. E., Venkateshwara, V. R., Kaplan, R. N., Patterson, G. H., Fry, T. J., Orentas, R. J. and Mackall, C. L. (2015) '4-1BB

6 Literaturverzeichnis

6.2 Literaturverzeichnis in alphabetischer Reihenfolge

costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors', *Nat Med*, 21(6), pp. 581-90.

Louis, C. U., Savoldo, B., Dotti, G., Pule, M., Yvon, E., Myers, G. D., Rossig, C., Russell, H. V., Diouf, O., Liu, E., Liu, H., Wu, M. F., Gee, A. P., Mei, Z., Rooney, C. M., Heslop, H. E. and Brenner, M. K. (2011) 'Antitumor activity and long-term fate of chimeric antigen receptor-positive T cells in patients with neuroblastoma', *Blood*, 118(23), pp. 6050-6.

Lovatt, M., Filby, A., Parravicini, V., Werlen, G., Palmer, E. and Zamoyska, R. (2006) 'Lck regulates the threshold of activation in primary T cells, while both Lck and Fyn contribute to the magnitude of the extracellular signal-related kinase response', *Mol Cell Biol*, 26(22), pp. 8655-65.

Love, P. E. and Hayes, S. M. (2010) 'ITAM-mediated signaling by the T-cell antigen receptor', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(6), pp. a002485.

Love, P. E. and Shores, E. W. (2000) 'ITAM multiplicity and thymocyte selection: how low can you go?', *Immunity*, 12(6), pp. 591-7.

Lu, Y., Wang, Q., Xue, G., Bi, E., Ma, X., Wang, A., Qian, J., Dong, C. and Yi, Q. (2018) 'Th9 Cells Represent a Unique Subset of CD4(+) T Cells Endowed with the Ability to Eradicate Advanced Tumors', *Cancer Cell*, 33(6), pp. 1048-1060 e7.

Lutz, M. B. and Rossner, S. (2007) 'Factors influencing the generation of murine dendritic cells from bone marrow: the special role of fetal calf serum', *Immunobiology*, 212(9-10), pp. 855-62.

Lynn, R. C., Weber, E. W., Sotillo, E., Gennert, D., Xu, P., Good, Z., Anbunathan, H., Lattin, J., Jones, R., Tieu, V., Nagaraja, S., Granja, J., de Bourcy, C. F. A., Majzner, R., Satpathy, A. T., Quake, S. R., Monje, M., Chang, H. Y. and Mackall, C. L. (2019) 'c-Jun overexpression in CAR T cells induces exhaustion resistance', *Nature*, 576(7786), pp. 293-300.

MacDermott, R. P., Nash, G. S., Saint, J. G., Clark, E. A., Zaras, A. G. and Boldt, D. (1976) 'Autologous human cellular cytotoxicity induced by mitogenic and nonmitogenic lectins', *J Immunol*, 117(4), pp. 1402-3.

Malley, R., Srivastava, A., Lipsitch, M., Thompson, C. M., Watkins, C., Tzianabos, A. and Anderson, P. W. (2006) 'Antibody-independent, interleukin-17A-mediated, cross-serotype immunity to pneumococci in mice immunized intranasally with the cell wall polysaccharide', *Infect Immun*, 74(4), pp. 2187-95.

Markt, S., Magnani, Z., Ciceri, F., Cazzaniga, S., Riddell, S. R., Traversari, C., Bordignon, C. and Bonini, C. (2003) 'Immunologic potential of donor lymphocytes expressing a suicide gene for early immune reconstitution after hematopoietic T-cell-depleted stem cell transplantation', *Blood*, 101(4), pp. 1290-8.

Martinez, M. and Moon, E. K. (2019) 'CAR T Cells for Solid Tumors: New Strategies for Finding, Infiltrating, and Surviving in the Tumor Microenvironment', *Front Immunol*, 10, pp. 128.

Maude, S. L., Frey, N., Shaw, P. A., Aplenc, R., Barrett, D. M., Bunin, N. J., Chew, A., Gonzalez, V. E., Zheng, Z., Lacey, S. F., Mahnke, Y. D., Melenhorst, J. J., Rheingold, S. R., Shen, A., Teachey, D. T., Levine, B. L., June, C. H., Porter, D.

6 Literaturverzeichnis

6.2 Literaturverzeichnis in alphabetischer Reihenfolge

- L. and Grupp, S. A. (2014) 'Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia', *N Engl J Med*, 371(16), pp. 1507-17.
- Maus, M. V., Grupp, S. A., Porter, D. L. and June, C. H. (2014) 'Antibody-modified T cells: CARs take the front seat for hematologic malignancies', *Blood*, 123(17), pp. 2625-35.
- Maus, M. V., Haas, A. R., Beatty, G. L., Albelda, S. M., Levine, B. L., Liu, X., Zhao, Y., Kalos, M. and June, C. H. (2013) 'T cells expressing chimeric antigen receptors can cause anaphylaxis in humans', *Cancer Immunol Res*, 1, pp. 26-31.
- Maxwell, J. R., Weinberg, A., Prell, R. A. and Vella, A. T. (2000) 'Danger and OX40 receptor signaling synergize to enhance memory T cell survival by inhibiting peripheral deletion', *J Immunol*, 164(1), pp. 107-12.
- McAdam, A. J., Greenwald, R. J., Levin, M. A., Chernova, T., Malenkovich, N., Ling, V., Freeman, G. J. and Sharpe, A. H. (2001) 'ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching', *Nature*, 409(6816), pp. 102-5.
- McAdam, A. J., Schweitzer, A. N. and Sharpe, A. H. (1998) 'The role of B7 co-stimulation in activation and differentiation of CD4+ and CD8+ T cells', *Immunol Rev*, 165, pp. 231-47.
- McIntyre, B. W. and Allison, J. P. (1983) 'The mouse T cell receptor: structural heterogeneity of molecules of normal T cells defined by xenoantiserum', *Cell*, 34(3), pp. 739-46.
- McKenzie, G. J., Bancroft, A., Grecis, R. K. and McKenzie, A. N. (1998) 'A distinct role for interleukin-13 in Th2-cell-mediated immune responses', *Curr Biol*, 8(6), pp. 339-42.
- Mercier-Letondal, P., Montcuquet, N., Sauce, D., Certoux, J. M., Jeanningros, S., Ferrand, C., Bonyhadi, M., Tiberghien, P. and Robinet, E. (2008) 'Alloreactivity of ex vivo-expanded T cells is correlated with expansion and CD4/CD8 ratio', *Cytotherapy*, 10(3), pp. 275-88.
- Mingueneau, M., Roncagalli, R., Gregoire, C., Kissenpfennig, A., Miazek, A., Archambaud, C., Wang, Y., Perrin, P., Bertosio, E., Sansoni, A., Richelme, S., Locksley, R. M., Aguado, E., Malissen, M. and Malissen, B. (2009) 'Loss of the LAT adaptor converts antigen-responsive T cells into pathogenic effectors that function independently of the T cell receptor', *Immunity*, 31(2), pp. 197-208.
- Mitsdoerffer, M., Lee, Y., Jager, A., Kim, H. J., Korn, T., Kolls, J. K., Cantor, H., Bettelli, E. and Kuchroo, V. K. (2010) 'Proinflammatory T helper type 17 cells are effective B-cell helpers', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(32), pp. 14292-7.
- Molina, T. J., Kishihara, K., Siderovski, D. P., van Ewijk, W., Narendran, A., Timms, E., Wakeham, A., Paige, C. J., Hartmann, K. U., Veillette, A. and et al. (1992) 'Profound block in thymocyte development in mice lacking p56lck', *Nature*, 357(6374), pp. 161-4.
- Moon, B. I., Kim, T. H. and Seoh, J. Y. (2015) 'Functional Modulation of Regulatory T Cells by IL-2', *PLoS One*, 10(11), pp. e0141864.
- Morgan, R. A., Yang, J. C., Kitano, M., Dudley, M. E., Laurencot, C. M. and Rosenberg, S. A. (2010) 'Case report of a serious adverse event following the

administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2', *Mol Ther*, 18(4), pp. 843-51.

Moritz, D. and Groner, B. (1995) 'A spacer region between the single chain antibody- and the CD3 zeta-chain domain of chimeric T cell receptor components is required for efficient ligand binding and signaling activity', *Gene Ther*, 2(8), pp. 539-46.

Moritz, D., Wels, W., Mattern, J. and Groner, B. (1994) 'Cytotoxic T lymphocytes with a grafted recognition specificity for ERBB2-expressing tumor cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(10), pp. 4318-22.

Morris, E. C., Bendle, G. M. and Stauss, H. J. (2003) 'Prospects for immunotherapy of malignant disease', *Clin Exp Immunol*, 131(1), pp. 1-7.

Mosmann, T. R. and Coffman, R. L. (1989) 'TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties', *Annu Rev Immunol*, 7, pp. 145-73.

Mullick Chowdhury, S., Lalwani, G., Zhang, K., Yang, J. Y., Neville, K. and Sitharaman, B. (2013) 'Cell specific cytotoxicity and uptake of graphene nanoribbons', *Biomaterials*, 34(1), pp. 283-93.

Nienhuis, A. W., Dunbar, C. E. and Sorrentino, B. P. (2006) 'Genotoxicity of retroviral integration in hematopoietic cells', *Mol Ther*, 13(6), pp. 1031-49.

Nijhuis, E. W., vd Wiel-van Kemenade, E., Figdor, C. G. and van Lier, R. A. (1990) 'Activation and expansion of tumour-infiltrating lymphocytes by anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies', *Cancer Immunol Immunother*, 32(4), pp. 245-50.

Nika, K., Soldani, C., Salek, M., Paster, W., Gray, A., Etzensperger, R., Fugger, L., Polzella, P., Cerundolo, V., Dushek, O., Hofer, T., Viola, A. and Acuto, O. (2010) 'Constitutively active Lck kinase in T cells drives antigen receptor signal transduction', *Immunity*, 32(6), pp. 766-77.

Nutt, S. L., Hodgkin, P. D., Tarlinton, D. M. and Corcoran, L. M. (2015) 'The generation of antibody-secreting plasma cells', *Nat Rev Immunol*, 15(3), pp. 160-71.

Ohshima, Y., Tanaka, Y., Tozawa, H., Takahashi, Y., Maliszewski, C. and Delespesse, G. (1997) 'Expression and function of OX40 ligand on human dendritic cells', *J Immunol*, 159(8), pp. 3838-48.

Ozaki, K., Spolski, R., Feng, C. G., Qi, C. F., Cheng, J., Sher, A., Morse, H. C., 3rd, Liu, C., Schwartzberg, P. L. and Leonard, W. J. (2002) 'A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production', *Science*, 298(5598), pp. 1630-4.

Palomares, O., Martin-Fontecha, M., Lauener, R., Traidl-Hoffmann, C., Cavkaytar, O., Akdis, M. and Akdis, C. A. (2014) 'Regulatory T cells and immune regulation of allergic diseases: roles of IL-10 and TGF-beta', *Genes Immun*, 15(8), pp. 511-20.

Palomares, O., Yaman, G., Azkur, A. K., Akkoc, T., Akdis, M. and Akdis, C. A. (2010) 'Role of Treg in immune regulation of allergic diseases', *Eur J Immunol*, 40(5), pp. 1232-40.

6 Literaturverzeichnis

6.2 Literaturverzeichnis in alphabetischer Reihenfolge

Pandiyan, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J. and Lenardo, M. J. (2007) 'CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells', *Nat Immunol*, 8(12), pp. 1353-62.

Parkhurst, M. R., Yang, J. C., Langan, R. C., Dudley, M. E., Nathan, D. A., Feldman, S. A., Davis, J. L., Morgan, R. A., Merino, M. J., Sherry, R. M., Hughes, M. S., Kammula, U. S., Phan, G. Q., Lim, R. M., Wank, S. A., Restifo, N. P., Robbins, P. F., Laurencot, C. M. and Rosenberg, S. A. (2011) 'T cells targeting carcinoembryonic antigen can mediate regression of metastatic colorectal cancer but induce severe transient colitis', *Mol Ther*, 19(3), pp. 620-6.

Patel, S. D., Moskalenko, M., Smith, D., Maske, B., Finer, M. H. and McArthur, J. G. (1999) 'Impact of chimeric immune receptor extracellular protein domains on T cell function', *Gene Ther*, 6(3), pp. 412-9.

Peschon, J. J., Morrissey, P. J., Grabstein, K. H., Ramsdell, F. J., Maraskovsky, E., Gliniak, B. C., Park, L. S., Ziegler, S. F., Williams, D. E., Ware, C. B., Meyer, J. D. and Davison, B. L. (1994) 'Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice', *J Exp Med*, 180(5), pp. 1955-60.

Piconese, S., Valzasina, B. and Colombo, M. P. (2008) 'OX40 triggering blocks suppression by regulatory T cells and facilitates tumor rejection', *J Exp Med*, 205(4), pp. 825-39.

Pillai, V., Ortega, S. B., Wang, C. K. and Karandikar, N. J. (2007) 'Transient regulatory T-cells: a state attained by all activated human T-cells', *Clin Immunol*, 123(1), pp. 18-29.

Pipkin, M. E., Sacks, J. A., Cruz-Guilloty, F., Lichtenheld, M. G., Bevan, M. J. and Rao, A. (2010) 'Interleukin-2 and inflammation induce distinct transcriptional programs that promote the differentiation of effector cytolytic T cells', *Immunity*, 32(1), pp. 79-90.

Plank, M. W., Kaiko, G. E., Maltby, S., Weaver, J., Tay, H. L., Shen, W., Wilson, M. S., Durum, S. K. and Foster, P. S. (2017) 'Th22 Cells Form a Distinct Th Lineage from Th17 Cells In Vitro with Unique Transcriptional Properties and Tbet-Dependent Th1 Plasticity', *J Immunol*, 198(5), pp. 2182-2190.

Pollok, K. E., van der Loo, J. C., Cooper, R. J., Kennedy, L. and Williams, D. A. (1999) 'Costimulation of transduced T lymphocytes via T cell receptor-CD3 complex and CD28 leads to increased transcription of integrated retrovirus', *Hum Gene Ther*, 10(13), pp. 2221-36.

Porter, D. L., Levine, B. L., Bunin, N., Stadtmauer, E. A., Luger, S. M., Goldstein, S., Loren, A., Phillips, J., Nasta, S., Perl, A., Schuster, S., Tsai, D., Sohal, A., Veloso, E., Emerson, S. and June, C. H. (2006) 'A phase 1 trial of donor lymphocyte infusions expanded and activated ex vivo via CD3/CD28 costimulation', *Blood*, 107(4), pp. 1325-31.

Porter, D. L., Levine, B. L., Kalos, M., Bagg, A. and June, C. H. (2011) 'Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia', *N Engl J Med*, 365(8), pp. 725-33.

- Powrie, F., Carlino, J., Leach, M. W., Mauze, S. and Coffman, R. L. (1996) 'A critical role for transforming growth factor-beta but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1-mediated colitis by CD45RB(low) CD4+ T cells', *J Exp Med*, 183(6), pp. 2669-74.
- Press, M. F., Cordon-Cardo, C. and Slamon, D. J. (1990) 'Expression of the HER-2/neu proto-oncogene in normal human adult and fetal tissues', *Oncogene*, 5(7), pp. 953-62.
- Puhr, H. C. and Ilhan-Mutlu, A. (2019) 'New emerging targets in cancer immunotherapy: the role of LAG3', *ESMO Open*, 4(2), pp. e000482.
- Pule, M. A., Savoldo, B., Myers, G. D., Rossig, C., Russell, H. V., Dotti, G., Huls, M. H., Liu, E., Gee, A. P., Mei, Z., Yvon, E., Weiss, H. L., Liu, H., Rooney, C. M., Heslop, H. E. and Brenner, M. K. (2008) 'Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma', *Nat Med*, 14(11), pp. 1264-70.
- Pule, M. A., Straathof, K. C., Dotti, G., Heslop, H. E., Rooney, C. M. and Brenner, M. K. (2005) 'A chimeric T cell antigen receptor that augments cytokine release and supports clonal expansion of primary human T cells', *Mol Ther*, 12(5), pp. 933-41.
- Quintarelli, C., Orlando, D., Boffa, I., Guercio, M., Polito, V. A., Petretto, A., Lavarello, C., Sinibaldi, M., Weber, G., Del Bufalo, F., Giorda, E., Scarsella, M., Petrini, S., Pagliara, D., Locatelli, F., De Angelis, B. and Caruana, I. (2018) 'Choice of costimulatory domains and of cytokines determines CAR T-cell activity in neuroblastoma', *Oncoimmunology*, 7(6), pp. e1433518.
- Qureshi, O. S., Zheng, Y., Nakamura, K., Attridge, K., Manzotti, C., Schmidt, E. M., Baker, J., Jeffery, L. E., Kaur, S., Briggs, Z., Hou, T. Z., Futter, C. E., Anderson, G., Walker, L. S. and Sansom, D. M. (2011) 'Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4', *Science*, 332(6029), pp. 600-3.
- Regenauer, A. (2019) 'Gene Therapy for Cancer - A New Dimension and Challenge for Insurers', *J Insur Med*, 48(1), pp. 58-64.
- Reinhardt, R. L., Liang, H. E. and Locksley, R. M. (2009) 'Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire', *Nat Immunol*, 10(4), pp. 385-93.
- Renatus, M., Stennicke, H. R., Scott, F. L., Liddington, R. C. and Salvesen, G. S. (2001) 'Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(25), pp. 14250-5.
- Riddell, S. R., Watanabe, K. S., Goodrich, J. M., Li, C. R., Agha, M. E. and Greenberg, P. D. (1992) 'Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones', *Science*, 257(5067), pp. 238-41.
- Rivera Vargas, T., Humblin, E., Vegran, F., Ghiringhelli, F. and Apetoh, L. (2017) 'TH9 cells in anti-tumor immunity', *Semin Immunopathol*, 39(1), pp. 39-46.

6 Literaturverzeichnis

6.2 Literaturverzeichnis in alphabetischer Reihenfolge

- Robertson, J. M. and Walsh-Weller, J. (1998) 'An introduction to PCR primer design and optimization of amplification reactions', *Methods Mol Biol*, 98, pp. 121-54.
- Rogers, P. R., Song, J., Gramaglia, I., Killeen, N. and Croft, M. (2001) 'OX40 promotes Bcl-xL and Bcl-2 expression and is essential for long-term survival of CD4 T cells', *Immunity*, 15(3), pp. 445-55.
- Rohrbach, S., Niemann, B., Silber, R. E. and Holtz, J. (2005) 'Neuregulin receptors erbB2 and erbB4 in failing human myocardium -- depressed expression and attenuated activation', *Basic Res Cardiol*, 100(3), pp. 240-9.
- Rom-Jurek, E. M., Kirchhammer, N., Ugocsai, P., Ortmann, O., Wege, A. K. and Brockhoff, G. (2018) 'Regulation of Programmed Death Ligand 1 (PD-L1) Expression in Breast Cancer Cell Lines In Vitro and in Immunodeficient and Humanized Tumor Mice', *Int J Mol Sci*, 19(2).
- Rothenberg, E. V. (2019) 'Programming for T-lymphocyte fates: modularity and mechanisms', *Genes Dev*, 33(17-18), pp. 1117-1135.
- Rowe, J. H., Ertelt, J. M., Xin, L. and Way, S. S. (2012) 'Pregnancy imprints regulatory memory that sustains anergy to fetal antigen', *Nature*, 490(7418), pp. 102-6.
- Saarinen, K., Kivisto, K., Blomberg, K., Punnonen, K. and Leino, L. (2000) 'Time-resolved fluorometric assay for leukocyte adhesion using a fluorescence enhancing ligand', *J Immunol Methods*, 236(1-2), pp. 19-26.
- Sadelain, M., Brentjens, R. and Riviere, I. (2009) 'The promise and potential pitfalls of chimeric antigen receptors', *Curr Opin Immunol*, 21(2), pp. 215-23.
- Samelson, L. E., Phillips, A. F., Luong, E. T. and Klausner, R. D. (1990) 'Association of the fyn protein-tyrosine kinase with the T-cell antigen receptor', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(11), pp. 4358-62.
- Sanjabi, S., Oh, S. A. and Li, M. O. (2017) 'Regulation of the Immune Response by TGF-beta: From Conception to Autoimmunity and Infection', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 9(6).
- Sauce, D., Tonnelier, N., Duperrier, A., Petracca, B., de Carvalho Bittencourt, M., Saadi, M., Saas, P., Ferrand, C., Herve, P., Tiberghien, P. and Robinet, E. (2002) 'Influence of ex vivo expansion and retrovirus-mediated gene transfer on primary T lymphocyte phenotype and functions', *J Hematother Stem Cell Res*, 11(6), pp. 929-40.
- Sawicka, M., Stritesky, G. L., Reynolds, J., Abourashchi, N., Lythe, G., Molina-Paris, C. and Hogquist, K. A. (2014) 'From pre-DP, post-DP, SP4, and SP8 Thymocyte Cell Counts to a Dynamical Model of Cortical and Medullary Selection', *Front Immunol*, 5, pp. 19.
- Schaerli, P., Willimann, K., Lang, A. B., Lipp, M., Loetscher, P. and Moser, B. (2000) 'CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function', *J Exp Med*, 192(11), pp. 1553-62.
- Schambach, A., Bohne, J., Chandra, S., Will, E., Margison, G. P., Williams, D. A. and Baum, C. (2006) 'Equal potency of gammaretroviral and lentiviral SIN vectors

for expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in hematopoietic cells', *Mol Ther*, 13(2), pp. 391-400.

Schrödel, A. (2009) 'Trypsinierung von Zellkulturzellen', *Biologie in unserer Zeit*, 39(4).

Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T. and Hume, D. A. (2004) 'Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions', *J Leukoc Biol*, 75(2), pp. 163-89.

Schwartz, R. H., Mueller, D. L., Jenkins, M. K. and Quill, H. (1989) 'T-cell clonal anergy', *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 54 Pt 2, pp. 605-10.

Sdrimas, K., Diaz-Paez, M., Camargo, J. F. and Lekakis, L. J. (2020) 'Progressive multifocal leukoencephalopathy after CAR T therapy', *Int J Hematol*.

Seddon, B., Legname, G., Tomlinson, P. and Zamoyska, R. (2000) 'Long-term survival but impaired homeostatic proliferation of Naive T cells in the absence of p56lck', *Science*, 290(5489), pp. 127-31.

Seif, M., Einsele, H. and Löffler, J. (2019) 'CAR T Cells Beyond Cancer: Hope for Immunomodulatory Therapy of Infectious Diseases', *Front Immunol*, 10, pp. 2711.

Semple, K., Nguyen, A., Yu, Y., Wang, H., Anasetti, C. and Yu, X. Z. (2011) 'Strong CD28 costimulation suppresses induction of regulatory T cells from naive precursors through Lck signaling', *Blood*, 117(11), pp. 3096-103.

Shang, B., Liu, Y., Jiang, S. J. and Liu, Y. (2015) 'Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3+ regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis', *Sci Rep*, 5, pp. 15179.

Sharpe, A. H. (2009) 'Mechanisms of costimulation', *Immunol Rev*, 229(1), pp. 5-11.

Sharpe, A. H., Wherry, E. J., Ahmed, R. and Freeman, G. J. (2007) 'The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection', *Nat Immunol*, 8(3), pp. 239-45.

Shimizu, J., Yamazaki, S. and Sakaguchi, S. (1999) 'Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity', *J Immunol*, 163(10), pp. 5211-8.

Shu, Z., Heimfeld, S. and Gao, D. (2014) 'Hematopoietic SCT with cryopreserved grafts: adverse reactions after transplantation and cryoprotectant removal before infusion', *Bone Marrow Transplant*, 49(4), pp. 469-76.

Siegmund, K., Ruckert, B., Ouaked, N., Burgler, S., Speiser, A., Akdis, C. A. and Schmidt-Weber, C. B. (2009) 'Unique phenotype of human tonsillar and in vitro-induced FOXP3+CD8+ T cells', *J Immunol*, 182(4), pp. 2124-30.

Silbert, S., Yanik, G. A. and Shuman, A. G. (2019) 'How Should We Determine the Value of CAR T-Cell Therapy?', *AMA J Ethics*, 21(10), pp. E844-851.

Simantirakis, E., Atsaves, V., Tsironis, I., Gkyzi, M., Konstantopoulos, K. and Vassilopoulos, G. (2019) 'Foamy Virus Based Vectors for CAR-T Cell Development', *Blood*, 134.

6 Literaturverzeichnis

6.2 Literaturverzeichnis in alphabetischer Reihenfolge

Simantirakis, E., Tsironis, I. and Vassilopoulos, G. (2020) 'FV Vectors as Alternative Gene Vehicles for Gene Transfer in HSCs', *Viruses*, 12(3).

Simms, P. E. and Ellis, T. M. (1996) 'Utility of flow cytometric detection of CD69 expression as a rapid method for determining poly- and oligoclonal lymphocyte activation', *Clin Diagn Lab Immunol*, 3(3), pp. 301-4.

Singh, H., Figliola, M. J., Dawson, M. J., Huls, H., Olivares, S., Switzer, K., Mi, T., Maiti, S., Kebriaei, P., Lee, D. A., Champlin, R. E. and Cooper, L. J. (2011) 'Reprogramming CD19-specific T cells with IL-21 signaling can improve adoptive immunotherapy of B-lineage malignancies', *Cancer Res*, 71(10), pp. 3516-27.

Slamon, D. J., Godolphin, W., Jones, L. A., Holt, J. A., Wong, S. G., Keith, D. E., Levin, W. J., Stuart, S. G., Udove, J., Ullrich, A. and et al. (1989) 'Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer', *Science*, 244(4905), pp. 707-12.

Smyth, M. J. and Trapani, J. A. (1998) 'The relative role of lymphocyte granule exocytosis versus death receptor-mediated cytotoxicity in viral pathophysiology', *J Virol*, 72(1), pp. 1-9.

So, T. and Croft, M. (2007) 'Cutting edge: OX40 inhibits TGF-beta- and antigen-driven conversion of naive CD4 T cells into CD25+Foxp3+ T cells', *J Immunol*, 179(3), pp. 1427-30.

Soeiro, R., Vaughan, M. H. and Darnell, J. E. (1968) 'The effect of puromycin on intranuclear steps in ribosome biosynthesis', *J Cell Biol*, 36(1), pp. 91-101.

Sommermeier, D., Hudecek, M., Kosasih, P. L., Gogishvili, T., Maloney, D. G., Turtle, C. J. and Riddell, S. R. (2016) 'Chimeric antigen receptor-modified T cells derived from defined CD8+ and CD4+ subsets confer superior antitumor reactivity in vivo', *Leukemia*, 30(2), pp. 492-500.

Spencer, D. M., Wandless, T. J., Schreiber, S. L. and Crabtree, G. R. (1993) 'Controlling signal transduction with synthetic ligands', *Science*, 262(5136), pp. 1019-24.

Starr, T. K., Jameson, S. C. and Hogquist, K. A. (2003) 'Positive and negative selection of T cells', *Annu Rev Immunol*, 21, pp. 139-76.

Straathof, K. C., Pule, M. A., Yotnda, P., Dotti, G., Vanin, E. F., Brenner, M. K., Heslop, H. E., Spencer, D. M. and Rooney, C. M. (2005) 'An inducible caspase 9 safety switch for T-cell therapy', *Blood*, 105(11), pp. 4247-54.

Strutt, T. M., McKinstry, K. K., Dibble, J. P., Winchell, C., Kuang, Y., Curtis, J. D., Huston, G., Dutton, R. W. and Swain, S. L. (2010) 'Memory CD4+ T cells induce innate responses independently of pathogen', *Nat Med*, 16(5), pp. 558-64, 1p following 564.

Sun, J. C., Williams, M. A. and Bevan, M. J. (2004) 'CD4+ T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8+ T cells after acute infection', *Nat Immunol*, 5(9), pp. 927-33.

Suzuki, Y., Orellana, M. A., Schreiber, R. D. and Remington, J. S. (1988) 'Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*', *Science*, 240(4851), pp. 516-8.

6 Literaturverzeichnis

6.2 Literaturverzeichnis in alphabetischer Reihenfolge

- Swain, S. L., McKinstry, K. K. and Strutt, T. M. (2012) 'Expanding roles for CD4(+) T cells in immunity to viruses', *Nat Rev Immunol*, 12(2), pp. 136-48.
- Takaba, H. and Takayanagi, H. (2017) 'The Mechanisms of T Cell Selection in the Thymus', *Trends Immunol*, 38(11), pp. 805-816.
- Takenaka, M. C., Robson, S. and Quintana, F. J. (2016) 'Regulation of the T Cell Response by CD39', *Trends Immunol*, 37(7), pp. 427-439.
- Tamada, K., Geng, D., Sakoda, Y., Bansal, N., Srivastava, R., Li, Z. and Davila, E. (2012) 'Redirecting gene-modified T cells toward various cancer types using tagged antibodies', *Clin Cancer Res*, 18(23), pp. 6436-45.
- Tang, Q., Henriksen, K. J., Boden, E. K., Tooley, A. J., Ye, J., Subudhi, S. K., Zheng, X. X., Strom, T. B. and Bluestone, J. A. (2003) 'Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells', *J Immunol*, 171(7), pp. 3348-52.
- Tang, X., Tang, Q., Mao, Y., Huang, X., Jia, L., Zhu, J. and Feng, Z. (2019) 'CD137 Co-Stimulation Improves The Antitumor Effect Of LMP1-Specific Chimeric Antigen Receptor T Cells In Vitro And In Vivo', *Onco Targets Ther*, 12, pp. 9341-9350.
- Thompson, C. B., Lindsten, T., Ledbetter, J. A., Kunkel, S. L., Young, H. A., Emerson, S. G., Leiden, J. M. and June, C. H. (1989) 'CD28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell-derived lymphokines/cytokines', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(4), pp. 1333-7.
- Topalian, S. L., Hodi, F. S., Brahmer, J. R., Gettinger, S. N., Smith, D. C., McDermott, D. F., Powderly, J. D., Carvajal, R. D., Sosman, J. A., Atkins, M. B., Leming, P. D., Spigel, D. R., Antonia, S. J., Horn, L., Drake, C. G., Pardoll, D. M., Chen, L., Sharfman, W. H., Anders, R. A., Taube, J. M., McMiller, T. L., Xu, H., Korman, A. J., Jure-Kunkel, M., Agrawal, S., McDonald, D., Kollia, G. D., Gupta, A., Wigginton, J. M. and Sznol, M. (2012) 'Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer', *N Engl J Med*, 366(26), pp. 2443-54.
- Topp, M. S., Gokbuget, N., Stein, A. S., Zugmaier, G., O'Brien, S., Bargou, R. C., Dombret, H., Fielding, A. K., Heffner, L., Larson, R. A., Neumann, S., Foa, R., Litzow, M., Ribera, J. M., Rambaldi, A., Schiller, G., Bruggemann, M., Horst, H. A., Holland, C., Jia, C., Maniar, T., Huber, B., Nagorsen, D., Forman, S. J. and Kantarjian, H. M. (2015) 'Safety and activity of blinatumomab for adult patients with relapsed or refractory B-precursor acute lymphoblastic leukaemia: a multicentre, single-arm, phase 2 study', *Lancet Oncol*, 16(1), pp. 57-66.
- Tresoldi, E., Dell'Albani, I., Stabilini, A., Jofra, T., Valle, A., Gagliani, N., Bondanza, A., Roncarolo, M. G. and Battaglia, M. (2011) 'Stability of human rapamycin-expanded CD4+CD25+ T regulatory cells', *Haematologica*, 96(9), pp. 1357-65.
- Trifari, S., Kaplan, C. D., Tran, E. H., Crellin, N. K. and Spits, H. (2009) 'Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells', *Nat Immunol*, 10(8), pp. 864-71.

Tsuji, M., Komatsu, N., Kawamoto, S., Suzuki, K., Kanagawa, O., Honjo, T., Hori, S. and Fagarasan, S. (2009) 'Preferential generation of follicular B helper T cells from Foxp3+ T cells in gut Peyer's patches', *Science*, 323(5920), pp. 1488-92.

Tsun, A., Qureshi, I., Stinchcombe, J. C., Jenkins, M. R., de la Roche, M., Kleczkowska, J., Zamoyska, R. and Griffiths, G. M. (2011) 'Centrosome docking at the immunological synapse is controlled by Lck signaling', *J Cell Biol*, 192(4), pp. 663-74.

Ujiie, H. and Shevach, E. M. (2016) 'gammadelta T Cells Protect the Liver and Lungs of Mice from Autoimmunity Induced by Scurfy Lymphocytes', *J Immunol*, 196(4), pp. 1517-28.

Valzasina, B., Guiducci, C., Dislich, H., Killeen, N., Weinberg, A. D. and Colombo, M. P. (2005) 'Triggering of OX40 (CD134) on CD4(+)CD25+ T cells blocks their inhibitory activity: a novel regulatory role for OX40 and its comparison with GITR', *Blood*, 105(7), pp. 2845-51.

Varadaraj, K. and Skinner, D. M. (1994) 'Denaturants or cosolvents improve the specificity of PCR amplification of a G + C-rich DNA using genetically engineered DNA polymerases', *Gene*, 140(1), pp. 1-5.

Varma, T. K., Toliver-Kinsky, T. E., Lin, C. Y., Koutrouvelis, A. P., Nichols, J. E. and Sherwood, E. R. (2001) 'Cellular mechanisms that cause suppressed gamma interferon secretion in endotoxin-tolerant mice', *Infect Immun*, 69(9), pp. 5249-63.

Vasquez, N. J., Kaye, J. and Hedrick, S. M. (1992) 'In vivo and in vitro clonal deletion of double-positive thymocytes', *J Exp Med*, 175(5), pp. 1307-16.

Veiga-Fernandes, H., Walter, U., Bourgeois, C., McLean, A. and Rocha, B. (2000) 'Response of naive and memory CD8+ T cells to antigen stimulation in vivo', *Nat Immunol*, 1(1), pp. 47-53.

Veldhoen, M., Uyttenhove, C., van Snick, J., Helmby, H., Westendorf, A., Buer, J., Martin, B., Wilhelm, C. and Stockinger, B. (2008) 'Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset', *Nat Immunol*, 9(12), pp. 1341-6.

Vieira, P. L., Christensen, J. R., Minaae, S., O'Neill, E. J., Barrat, F. J., Boonstra, A., Barthlott, T., Stockinger, B., Wraith, D. C. and O'Garra, A. (2004) 'IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells', *J Immunol*, 172(10), pp. 5986-93.

Viola, A. and Lanzavecchia, A. (1996) 'T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds', *Science*, 273(5271), pp. 104-6.

Vu, M. D., Xiao, X., Gao, W., Degauque, N., Chen, M., Kroemer, A., Killeen, N., Ishii, N. and Li, X. C. (2007) 'OX40 costimulation turns off Foxp3+ Tregs', *Blood*, 110(7), pp. 2501-10.

Waldmann, T. A. (2007) 'Anti-Tac (daclizumab, Zenapax) in the treatment of leukemia, autoimmune diseases, and in the prevention of allograft rejection: a 25-year personal odyssey', *J Clin Immunol*, 27(1), pp. 1-18.

6 Literaturverzeichnis

6.2 Literaturverzeichnis in alphabetischer Reihenfolge

Wang, Y., Li, D., Nurieva, R., Yang, J., Sen, M., Carreno, R., Lu, S., McIntyre, B. W., Molldrem, J. J., Legge, G. B. and Ma, Q. (2009) 'LFA-1 affinity regulation is necessary for the activation and proliferation of naive T cells', *J Biol Chem*, 284(19), pp. 12645-53.

Weiss, G. and Schaible, U. E. (2015) 'Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria', *Immunol Rev*, 264(1), pp. 182-203.

Wells, A. D., Walsh, M. C., Bluestone, J. A. and Turka, L. A. (2001) 'Signaling through CD28 and CTLA-4 controls two distinct forms of T cell anergy', *J Clin Invest*, 108(6), pp. 895-903.

Wherry, E. J. (2011) 'T cell exhaustion', *Nat Immunol*, 12(6), pp. 492-9.

Wherry, E. J., Ha, S. J., Kaech, S. M., Haining, W. N., Sarkar, S., Kalia, V., Subramaniam, S., Blattman, J. N., Barber, D. L. and Ahmed, R. (2007) 'Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection', *Immunity*, 27(4), pp. 670-84.

Wherry, E. J. and Kurachi, M. (2015) 'Molecular and cellular insights into T cell exhaustion', *Nat Rev Immunol*, 15(8), pp. 486-99.

Willemsen, R. A., Ronteltap, C., Chames, P., Debets, R. and Bolhuis, R. L. (2005) 'T cell retargeting with MHC class I-restricted antibodies: the CD28 costimulatory domain enhances antigen-specific cytotoxicity and cytokine production', *J Immunol*, 174(12), pp. 7853-8.

Williams, M. A., Tyznik, A. J. and Bevan, M. J. (2006) 'Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells', *Nature*, 441(7095), pp. 890-3.

Winiarska, M., Nowis, D., Firczuk, M., Zagozdzon, A., Gabrysiak, M., Sadowski, R., Barankiewicz, J., Dwojak, M. and Golab, J. (2017) 'Selection of an optimal promoter for gene transfer in normal B cells', *Mol Med Rep*, 16(3), pp. 3041-3048.

Wolk, K., Kunz, S., Witte, E., Friedrich, M., Asadullah, K. and Sabat, R. (2004) 'IL-22 increases the innate immunity of tissues', *Immunity*, 21(2), pp. 241-54.

Woo, S. R., Turnis, M. E., Goldberg, M. V., Bankoti, J., Selby, M., Nirschl, C. J., Bettini, M. L., Gravano, D. M., Vogel, P., Liu, C. L., Tansombatvisit, S., Grosso, J. F., Netto, G., Smeltzer, M. P., Chau, A., Utz, P. J., Workman, C. J., Pardoll, D. M., Korman, A. J., Drake, C. G. and Vignali, D. A. (2012) 'Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape', *Cancer Res*, 72(4), pp. 917-27.

Wu, M. R., Zhang, T., Alcon, A. and Sentman, C. L. (2015) 'DNAM-1-based chimeric antigen receptors enhance T cell effector function and exhibit in vivo efficacy against melanoma', *Cancer Immunol Immunother*, 64(4), pp. 409-18.

Xiao, X., Gong, W., Demirci, G., Liu, W., Spoerl, S., Chu, X., Bishop, D. K., Turka, L. A. and Li, X. C. (2012) 'New insights on OX40 in the control of T cell immunity and immune tolerance in vivo', *J Immunol*, 188(2), pp. 892-901.

Xiao, Z., Casey, K. A., Jameson, S. C., Curtsinger, J. M. and Mescher, M. F. (2009) 'Programming for CD8 T cell memory development requires IL-12 or type I IFN', *J Immunol*, 182(5), pp. 2786-94.

- Xu, L., Kitani, A., Fuss, I. and Strober, W. (2007) 'Cutting edge: regulatory T cells induce CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF- β ', *J Immunol*, 178(11), pp. 6725-9.
- Xu, Y., Zhang, M., Ramos, C. A., Durett, A., Liu, E., Dakhova, O., Liu, H., Creighton, C. J., Gee, A. P., Heslop, H. E., Rooney, C. M., Savoldo, B. and Dotti, G. (2014) 'Closely related T-memory stem cells correlate with in vivo expansion of CAR.CD19-T cells and are preserved by IL-7 and IL-15', *Blood*, 123(24), pp. 3750-9.
- Yague, J., White, J., Coleclough, C., Kappler, J., Palmer, E. and Marrack, P. (1985) 'The T cell receptor: the alpha and beta chains define idotype, and antigen and MHC specificity', *Cell*, 42(1), pp. 81-7.
- Ye, Q., Song, D. G., Poussin, M., Yamamoto, T., Best, A., Li, C., Coukos, G. and Powell, D. J., Jr. (2014) 'CD137 accurately identifies and enriches for naturally occurring tumor-reactive T cells in tumor', *Clin Cancer Res*, 20(1), pp. 44-55.
- Yu, F., Sharma, S., Edwards, J., Feigenbaum, L. and Zhu, J. (2015) 'Dynamic expression of transcription factors T-bet and GATA-3 by regulatory T cells maintains immunotolerance', *Nat Immunol*, 16(2), pp. 197-206.
- Zaba, L. C., Fuentes-Duculan, J., Eungdamrong, N. J., Abello, M. V., Novitskaya, I., Pierson, K. C., Gonzalez, J., Krueger, J. G. and Lowes, M. A. (2009) 'Psoriasis is characterized by accumulation of immunostimulatory and Th1/Th17 cell-polarizing myeloid dendritic cells', *J Invest Dermatol*, 129(1), pp. 79-88.
- Zhang, W., Sloan-Lancaster, J., Kitchen, J., Tribble, R. P. and Samelson, L. E. (1998) 'LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation', *Cell*, 92(1), pp. 83-92.
- Zhao, Y., Harrison, D. L., Song, Y., Ji, J., Huang, J. and Hui, E. (2018) 'Antigen-Presenting Cell-Intrinsic PD-1 Neutralizes PD-L1 in cis to Attenuate PD-1 Signaling in T Cells', *Cell Rep*, 24(2), pp. 379-390 e6.
- Zhao, Y., Wang, Q. J., Yang, S., Kochenderfer, J. N., Zheng, Z., Zhong, X., Sadelain, M., Eshhar, Z., Rosenberg, S. A. and Morgan, R. A. (2009) 'A herceptin-based chimeric antigen receptor with modified signaling domains leads to enhanced survival of transduced T lymphocytes and antitumor activity', *J Immunol*, 183(9), pp. 5563-74.
- Zheng, C. and Baum, B. J. (2014) 'All human EF1alpha promoters are not equal: markedly affect gene expression in constructs from different sources', *Int J Med Sci*, 11(5), pp. 404-8.
- Zhou, J., Jin, L., Wang, F., Zhang, Y., Liu, B. and Zhao, T. (2019) 'Chimeric antigen receptor T (CAR-T) cells expanded with IL-7/IL-15 mediate superior antitumor effects', *Protein Cell*, 10(10), pp. 764-769.
- Zhou, X. Y., Yashiro-Ohtani, Y., Nakahira, M., Park, W. R., Abe, R., Hamaoka, T., Naramura, M., Gu, H. and Fujiwara, H. (2002) 'Molecular mechanisms underlying differential contribution of CD28 versus non-CD28 costimulatory molecules to IL-2 promoter activation', *J Immunol*, 168(8), pp. 3847-54.

6 Literaturverzeichnis

6.2 Literaturverzeichnis in alphabetischer Reihenfolge

Zimmermann, C., Prevost-Blondel, A., Blaser, C. and Pircher, H. (1999) 'Kinetics of the response of naive and memory CD8 T cells to antigen: similarities and differences', *Eur J Immunol*, 29(1), pp. 284-90.

Zotos, D., Coquet, J. M., Zhang, Y., Light, A., D'Costa, K., Kallies, A., Corcoran, L. M., Godfrey, D. I., Toellner, K. M., Smyth, M. J., Nutt, S. L. and Tarlinton, D. M. (2010) 'IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism', *J Exp Med*, 207(2), pp. 365-78.

Zufferey, R., Nagy, D., Mandel, R. J., Naldini, L. and Trono, D. (1997) 'Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo', *Nat Biotechnol*, 15(9), pp. 871-5.

Zychlinski, D., Schambach, A., Modlich, U., Maetzig, T., Meyer, J., Grassman, E., Mishra, A. and Baum, C. (2008) 'Physiological promoters reduce the genotoxic risk of integrating gene vectors', *Mol Ther*, 16(4), pp. 718-25.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Medizinischen Klinik (Innere Medizin II) des Universitätsklinikums Tübingen unter Betreuung von Herrn PD Dr.med. Dr.rer.nat. Martin Müller durchgeführt. Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch Dr.rer.nat. Melanie Märklin und David Worbs von mir eigenständig durchgeführt. Die Basis für das Vorgehen zur Virenproduktion bildete das Protokoll der Arbeitsgruppe von Prof. Dr.med. Claudia Lengerke, welche uns auch die Plasmide pRRL.PPT.SF.i2GFP (synthetisiert von der AG Prof. Dr.med. Axel Schambach), pCMV-VSV-G und pCMV-dR8.91 (synthetisiert von Prof. David Baltimore) überließ; verändert wurde die Zahl der eingesetzten HEK293T-Zellen pro Ansatz. Das Protokoll für den Europium-Release-Assay wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr.med. Helmut Salih übernommen.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 10.03.2021

Juliane Rita Lazarus

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die auf vielfältige Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein aufrichtiger Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Dr. Martin Müller für das mir entgegengebrachte Vertrauen bei der Überlassung des Themas, die vielen freundlichen und konstruktiven Diskussionen und seinen stets gerne gewährten Rat.

Herrn Prof. Dr. Peter Lang danke ich für die Übernahme des Korreferats und die interessante Diskussion.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau PD Dr. Melanie Märklin für die intensive Betreuung, die ehrliche und konstruktive Kritik und die tatkräftige Unterstützung.

Vielen Dank auch an alle Mitglieder der Arbeitsgruppen Prof. Dr. Dr. Müller und Prof. Dr. Kopp, die mir mit wertvollen Anregungen geholfen haben, diese Arbeit zu verbessern und in angenehmer Atmosphäre zu erstellen.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Lengerke und Prof. Dr. Salih danke ich für ihre Hilfe bei methodischen Fragen.

Bei meiner Familie und meinen Freunden bedanke ich mich dafür, dass sie mich in dieser Zeit stets verständnisvoll unterstützt, ermutigt und begleitet haben.