

Aus dem Lehrstuhl  
für Gen-Immuntherapie  
Prof. Dr. Hinrich Abken  
der Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

Testung von Sicherheitsmechanismen in T-Zell-Rezeptor  
modifizierten T-Zellen für die adoptive Immuntherapie

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Laura Maria Neuber

2023



Aus dem Lehrstuhl  
für Gen-Immuntherapie  
Prof. Dr. Hinrich Abken  
der Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

Testung von Sicherheitsmechanismen in T-Zell-Rezeptor  
modifizierten T-Zellen für die adoptive Immuntherapie

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Laura Maria Neuber

2023

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Simone Thomas

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Kathrin Renner-Sattler

Tag der mündlichen Prüfung: 27.07.2023

# Inhalt

Inhalt .....	1
1 Einleitung .....	4
1.1 Akute myeloische Leukämie (AML).....	4
1.2 Allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT) .....	5
1.3 T-Zell-Immuntherapie .....	6
1.3.1 Aktivierung von T-Zellen .....	6
1.3.2 Adoptiver T-Zelltransfer .....	7
1.3.3 Suizid-Gen-System als Sicherheitsmechanismus adoptiver T-Zellen .....	10
1.3.4 Invariante Natürliche Killer T (iNKT)-Zellen .....	14
1.4 Projektziel .....	18
2 Material und Methoden .....	19
2.1 Materialliste .....	19
2.1.1 Laborgüter .....	19
2.1.2 Verbrauchsgüter .....	20
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien.....	21
2.1.4 Antikörper/Fluoreszenz-markierte Proteine.....	22
2.1.5 Kits .....	23
2.1.6 Zellkulturmedien und Zusätze.....	23
2.1.7 Puffer und Lösungen .....	25
2.1.8 Dimerisierer.....	26
2.1.9 Zytokine .....	26
2.1.10 Desinfektionsmittel .....	26
2.1.11 Enzyme.....	27
2.1.12 Nukleotide und Oligonukleotide .....	27
2.1.13 Genkonstrukte .....	28
2.1.14 Glykolipide.....	28

2.1.15	Bakterien .....	28
2.1.16	Software .....	29
2.2	Molekularbiologische Methoden .....	30
2.2.1	Gibson Assembly .....	30
2.2.2	Mini-Prep, Testrestriktion und Maxi-Prep .....	32
2.3	Auftauen und Einfrieren von Zellen .....	33
2.4	Retrovirale Transduktion .....	33
2.5	Isolation von PBMCs durch Pancoll-Dichtegradientenzentrifugation .....	35
2.6	Magnetische Zellseparation (MACS) .....	36
2.7	Kultivierung von CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen.....	37
2.8	Fluoreszenzaktivierte Durchflusszytometrie (FACS).....	37
2.9	IFN- $\gamma$ ELISpot zur funktionellen Testung des T-Zell-Rezeptors TZR <sub>DP04</sub> .....	38
2.10	Apoptose-Messungen.....	39
2.11	Lyse-Messungen .....	40
2.12	Expansion der iNKT-Zellen.....	41
2.13	Elektroporation der iNKT-Zellen mit RNA von TZR <sub>DP04</sub> und TZR <sub>DP03</sub> .....	42
3	Ergebnisse.....	43
3.1	Aktivität der induzierbaren Caspase-9 (iC9) und Rapamycin-induzierbaren Caspase-9 (RC9) in T-Zellen .....	43
3.1.1	Expression von TZR <sub>DP04</sub> in iC9- und RC9-transduzierten T-Zellen.....	43
3.1.2	Spezifische TZR <sub>DP04</sub> -vermittelte Reaktivität von iC9- und RC9-transduzierten T-Zellen.....	47
3.1.3	Elimination der iC9- und RC9-transduzierten T-Zellen nach Inkubation mit AP20187 und Rapamycin .....	49
3.1.4	Expression des T-Zell-Rezeptors TZR <sub>DP04</sub> nach Aktivierung von iC9 und RC9 .	53
3.1.5	Analyse der Funktion von iC9 und RC9 mittels Apoptose-Messungen .....	58
3.1.6	Analyse der iC9- und RC9-induzierten Lyse.....	67
3.2	Ergebnisse der invarianten Natürlichen Killer T (iNKT)-Zellen.....	70

3.2.1	Isolation von iNKT-Zellen aus peripherem Blut .....	70
3.2.2	Spezifische TZR-vermittelte Reaktivität von TZR <sub>DP04</sub> - und TZR <sub>DP03</sub> -modifizierten iNKT-Zellen.....	72
4	Diskussion .....	76
4.1	Diskussion der induzierbaren Caspase-9 (iC9) und Rapamycin-induzierbaren Caspase-9 (RC9).....	76
4.1.1	Diskussion der iC9- und RC9-vermittelten Apoptose .....	76
4.1.2	Vergleich von iC9 und RC9 als Sicherheitsmechanismen in der T-Zell-Immuntherapie .....	78
4.2	Modifizierte invariante Natürliche Killer T (iNKT)-Zellen als Sicherheitskonzept in der T-Zell-Immuntherapie .....	80
4.3	Weitere Sicherheitsstrategien in der T-Zell-Immuntherapie .....	81
5	Zusammenfassung .....	83
6	Verzeichnisse.....	85
6.1	Abkürzungsverzeichnis.....	85
6.2	Abbildungsverzeichnis.....	87
6.3	Tabellenverzeichnis .....	89
7	Literatur .....	90
8	Anhang .....	103
8.1	Danksagung .....	103
8.2	Lebenslauf.....	104
8.3	Selbstständigkeitserklärung .....	105

# 1 Einleitung

## 1.1 Akute myeloische Leukämie (AML)

Leukämie ist eine maligne klonale Neoplasie von weißen Blutkörperchen und wird je nach betroffener hämatopoetischer Vorläuferzelle als myeloisch oder lymphatisch bezeichnet. Die akute Form der myeloischen Leukämie (AML) liegt vor, wenn mehr als 20 % unreifzellige Blasten im peripheren Blut oder im Knochenmark vorliegen [1].

Der Ursprung der AML ist die Proliferation einer pathologisch veränderten myeloischen Vorläuferzelle, die dann das Knochenmark infiltriert und die gesunden hämatopoetischen Zellen verdrängt [2].

Häufig werden Mutationen in den Genen FLT3, NPM1, DNMT3A und IDH 1 und 2 nachgewiesen, die einen hohen prognostischen Wert aufweisen [2]. Es wurden 23 Gene gefunden, die bei der AML häufig mutiert sind, und weitere 237 Mutationen kommen unabhängig in zwei oder mehr Fällen vor [3].

Klinisch können die Patienten mit Infektionen durch Granulozytopenie, Blutungen durch Thrombozytopenie und einer Leistungsminderung durch Erythrozytopenie auffallen [4].

Die akute myeloische Leukämie wird bei 1,3 von 100 000 Menschen unter 65 Jahren und bei 12,2 von 100 000 Menschen über 65 Jahren diagnostiziert und bildet etwa 80 % der akuten Leukämien im Erwachsenenalter [4].

Die Ätiologie der AML ist schwer festzulegen, da am wahrscheinlichsten mehrere Faktoren einen Einfluss auf die Entwicklung der Erkrankung haben können. So erfolgt eine Knochenmarkschädigung durch Benzol, Zytostatika wie Alkylanzien und Topoisomerase-II-Inhibitoren, Pestizide, Chloramphenicol, Phenylbutazon und ähnliche Noxen [5]. Beim aktiven Zigarettenrauchen erhöht sich das Risiko um 40 %, eine AML zu entwickeln. Ehemalige Raucher haben noch ein 25 % höheres Risiko gegenüber Nichtrauchern, dies korreliert auch mit der Menge der konsumierten Zigaretten [2]. Ionisierende Strahlen verdoppeln das Leukämierisiko bei einer Ganzkörperdosis von 1 Gy bei Erwachsenen. Genetische Faktoren können ebenso eine Rolle spielen [5]. Die AML kann sich auch aus hämatopoetischen Erkrankungen wie eines myelodysplastischen Syndroms, einer aplastischen Anämie, einer myeloproliferativen Erkrankung oder aus einer paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie entwickeln [5].



Das Ziel der Therapie ist, durch eine Induktion eine komplette Remission (CR) zu erreichen und diesen Status durch eine Postremissionstherapie zu erhalten. Bei jüngeren Patienten wird in der Regel mit einer Induktionstherapie, die sich aus Verabreichung eines Anthrazyklins, wie beispielsweise Daunorubicin [1,4,6,7], über drei Tage und Cytarabin über sieben Tage zusammensetzt, begonnen [2]. Die komplette Remission kann bei 60 % bis 80 % der jungen Erwachsenen und 40 % bis 60 % der über 60-Jährigen erreicht werden [3]. Die Postremissionstherapie oder auch Konsolidierungstherapie erfolgt meist mit hochdosiertem Cytarabin oder einer allogenen Stammzelltransplantation, was vom Risikoprofil der AML und dem Allgemeinzustand des Patienten abhängt [2].

Bei Auftreten eines Rezidivs der AML wird eine remissionsinduzierende Reinduktionstherapie mit intermediär oder hochdosiertem Cytarabin bevorzugt. Eine Möglichkeit für eine Langzeitremission ist die allogene Stammzelltransplantation [2].

## **1.2 Allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT)**

Eine kurative Therapiemöglichkeit der AML ist die allogene hämatopoetische Blutstammzelltransplantation (HSZT). Hierbei werden Blutstammzellen von humanen Leukozyten-Antigene (HLA)-identen Geschwistern, Fremdspendern oder HLA-differenten Spendern gewonnen. Bei der Familienspende sollen die Allele HLA-A, -B, -C und -DRB1 kompatibel sein, während bei der Fremdspende noch zusätzlich HLA-DQB1-Kompatibilität gewährleistet sein sollte [8]. Die HLA-DPB1-Allele unterscheiden sich bei 80% der unverwandten Spender von denen des Stammzellenempfängers, was auch als Mismatch bezeichnet wird [9,10].

Vor dem Transfer der Stammzellen wird der Patient mit einer myeloablativen oder dosisreduzierten Chemo- und/oder fraktionierten Strahlentherapie konditioniert. Anschließend erfolgt die intravenöse Übertragung der Spenderzellen. Der Therapieeffekt der allogenen Blutstammzelltransplantation besteht im immunvermittelten Transplantat-gegen-Leukämie-Effekt (Graft-versus-Leukemia, GvL), wodurch verbliebene Leukämiezellen eliminiert werden [11,12]. Dieser Effekt wird hauptsächlich durch Spender-T-Zellen vermittelt.

Als Komplikation gibt es Leukämie rezidive, die bei bis zu 50 % der Patienten nach der HSZT abhängig von Krankheitsstatus und -ausprägung vorkommen [13]. Die akute Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung (Graft-versus-Host Disease, GvHD) ist eine weitere unerwünschte Folge, die bei 30 % bis 60 % der Patienten nach HSZT auftritt, und bei der die Spenderzellen Gewebezellen und Organe wie Haut, Leber und Darm des Patienten angreifen [14,15].

Während bei sogenannten nicht-permissiven HLA-DPB1-Mismatches ein erhöhtes Risiko für das Auftreten einer GvHD besteht, sind sowohl nicht-permissive als auch permissive HLA-DPB1-Mismatches mit einer geringen Rate an Leukämie-Rezidiven assoziiert [16–19].

Ein entscheidender Faktor für das Auftreten und die Prognose einer GvHD ist die medikamentöse immunsuppressive Therapie, deren Dauer und Intensität wiederum Einfluss auf das Risiko von Infektionen sowie Leukämie-Rezidiven hat [20,21].

## **1.3 T-Zell-Immuntherapie**

### **1.3.1 Aktivierung von T-Zellen**

Ein wichtiger Schritt der adaptiven Immunantwort ist die Erkennung des Antigens durch die T-Zellen. Dies erfolgt in der Regel über die Bindung von Peptidfragmenten, die in HLA-Molekülen präsentiert werden, an den T-Zell-Rezeptor (TZR) auf der Oberfläche der T-Zellen. Der TZR ist ein membran-gebundenes Protein, das mit dem intrazellulärem Signalkomplex CD3 verbunden ist, der dann schließlich die T-Zelle aktiviert. Zwei verschiedene Polypeptidketten  $TZR\alpha$  und  $TZR\beta$ , die sich jeweils aus zwei Immunglobulin (Ig)-Domänen mit einer variablen Region (V) und einer konstanten Region (C) zusammensetzen, bilden den T-Zell-Rezeptor als  $\alpha:\beta$  Heterodimer [22].

Bei der Bindung des Antigens an den TZR hat die variable Domäne der  $\alpha$ -Kette vorwiegend Kontakt zu dem Amino-Ende des Peptids, während die variable Domäne der  $\beta$ -Kette mit dem Carboxy-Ende interagiert. Eine Bindung von verschiedenen, aber ähnlichen Peptiden wird durch die Flexibilität der CDR3-Schleife der variablen Domäne der  $\alpha$ -Kette ermöglicht, indem die Bindung des Peptids eine Konformationsänderung, ähnlich dem „induced fit“-Prinzip, hervorruft [22].

Neben dem TZR spielen bei der Aktivierung von T-Zellen auch Ko-Rezeptoren wie CD4 und CD8 eine wichtige Rolle. Die beiden Ko-Rezeptoren CD4 und CD8 interagieren bei der Erkennung und Bindung des Antigenfragments an den TZR mit den jeweiligen HLA-Molekülen und stabilisieren so die TZR-Bindung [22].

Neben der Abwehr von Krankheitserregern kann die Aktivierung der T-Zellen auch bei der Therapie von Leukämien helfen. So kann der Einsatz von Spender-Lymphozyten nach der allogenen HSZT zur Bekämpfung der Leukämien beitragen, beinhaltet aber wiederum das Risiko einer GvHD-Induktion [14,23].

### 1.3.2 Adoptiver T-Zelltransfer

Um den GvL-Effekt nach allogener HSZT zu fördern, gibt es die Möglichkeit, T-Zellen des Spenders zu infundieren. Nicht manipulierte Donor-Lymphozyten-Infusionen (DLI) können als Prophylaxe zur Vermeidung von Rezidiven oder als Behandlung von Rückfällen eingesetzt werden und können einen GvL-Effekt vermitteln [24–26].

Jedoch steigt nach einer Infusion der Donor-Lymphozyten gleichzeitig das Risiko, eine GvHD zu induzieren. Viele Studien weisen eine starke Korrelation zwischen GvL-Effekt und GvHD auf, sodass die GvHD als häufigste und bedeutendste Komplikation einer DLI genannt wird. Nach Gabe von nicht manipulierten DLIs nach einem Rückfall liegt die Inzidenz einer akuten GvHD Grad III bis IV bei 40 % bis 60 %, die Inzidenz einer chronischen GvHD bei 33 % bis 61 % und die Todesfallzahl bedingt durch GvHD bei 6 % bis 11 % [27].

Um den Schaden an körpereigenem Gewebe möglichst gering zu halten, kann eine verzögerte DLI als T-Zell-Boost oder DLI-Wiederholungen in stufenweiser Dosissteigerung durchgeführt werden [24,28].

Gezieltere Therapien wurden entwickelt, dass nur die Leukämiezellen, jedoch keine gesunden Gewebezellen des Patienten, angegriffen werden. Neben den nicht manipulierten DLIs gibt es auch sogenannte manipulierte DLIs, wie beispielsweise antigenspezifische T-Zellen gegen Leukämiezellen [24].

Die T-Zellen können genetisch verändert werden und beispielsweise mit chimären Antigenrezeptoren (CAR) oder spezifischen TZR ausgestattet werden. Spezifische T-Zell-Therapien können durch Erkennung bestimmter Zielstrukturen an den Leukämiezellen die Anti-Tumor-Immunität verstärken und die GvHD einschränken [24]. Durch den Gentransfer der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette eines TZR in T-Zellen kann die Spezifität des TZR auf andere T-Zellen übertragen werden [29–31].

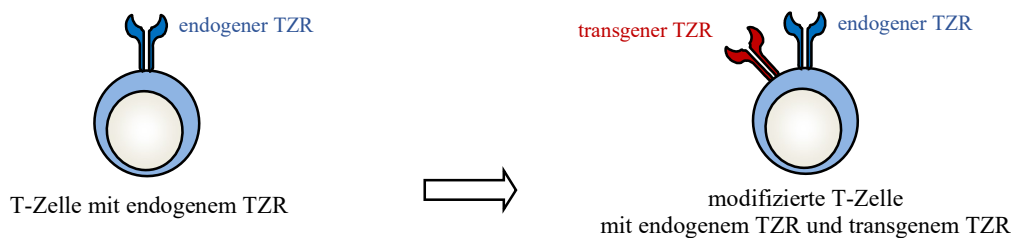
TZR-modifizierte T-Zellen, wie beispielsweise WT-1-spezifische TZR-T-Zellen, konnten eine gute Immunantwort bei WT-1-positiven HLA-A\*24:02-positiven AML-Patienten hervorrufen. Der Einsatz WT-1-spezifischer TZR-T-Zellen nach HSZT konnte das GvHD-Risiko reduzieren [32,33].

Eine mögliche Methode zum Gentransfer eines spezifischen TZR in T-Zellen ist der Einsatz von viralen Vektoren (Abbildung 1). Aktuell werden lentivirale und retrovirale Vektoren breit eingesetzt, da sie einen weiten Zelltropismus [34,35], eine Integration in das Genom und eine stabile Genexpression aufzeigen [36]. Neben den viralen Vektoren gibt es auch nicht virale Methoden für den Gentransfer in der adoptiven T-Zell-Therapie (Abbildung 1).

Beim Gentransfer mit einem Transposon werden das Plasmid, das für den TZR kodiert, und die RNA für die Transposase oder das Transposase-Protein für die Integration der Plasmid-DNA in das Genom verwendet [37]. Die Effizienz des Gentransfers hängt von der Zielzelle und der Größe der Expressionskassette ab [36].

Mit Hilfe von Messenger-RNA (mRNA) kann eine vorübergehende Genexpression erreicht werden. Dies erfolgt meist über eine mRNA-Elektroporation oder durch Umkapselung der mRNA mit Lipid-Nanopartikel [36,38].

TZR-Gentransfer:



Methoden zum TZR-Gentransfer:

	<b>Integration in das Wirtsgenom</b>	<b>Keine Integration in das Wirtsgenom</b>
<b>Nicht virale Methoden</b>	<p>Transposon</p> <p>Das Diagramm zeigt zwei kreisförmige Plasmide. Das linke Plasmid ist als 'Transposase' beschriftet und hat eine grüne Umrandung. Das rechte Plasmid ist als 'Expressionskassette' beschriftet und hat eine blaue Umrandung. Zwischen den Plasmiden sind zwei graue Kreise als 'ITR' (Inverted Terminal Repeats) markiert.</p>	<p>mRNA</p> <p>- Elektroporation - Lipid-Nanopartikel</p>
<b>Virale Methoden</b>	<p>Retrovirale Vektoren</p> <p>Lentivirale Vektoren</p>	

**Abbildung 1: Methoden zum TZR-Gentransfer in der adoptiven T-Zell-Therapie.**

Die verschiedenen Möglichkeiten eines TZR-Gentransfers in eine T-Zelle werden veranschaulicht. Hierbei werden die Methoden in ihre Eigenschaften viral oder nicht viral und Integration oder keine Integration in das Wirtsgenom unterschieden [36].

In der spezifischen T-Zell-Therapie müssen geeignete Antigene zum gezielten Eliminieren von Leukämiezellen vorliegen. Eine mögliche Zielstruktur in der spezifischen T-Zell-Therapie ist das Oberflächenmolekül HLA-DP, das auf myeloischen Zellen und somit auch auf Blasten von Patienten mit AML vorkommt und von anderen Gewebezellen nur während Entzündungsreaktionen exprimiert wird.

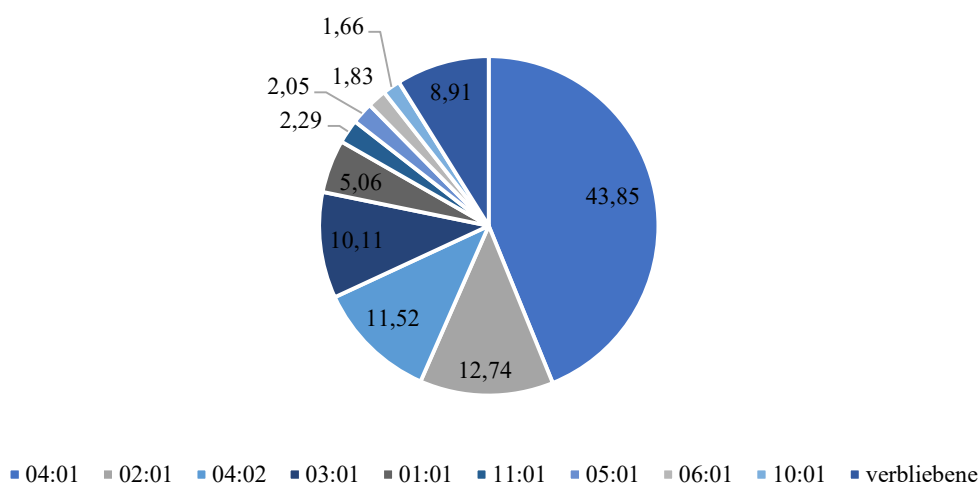
Bei Rezidiven nach allogener Stammzelltransplantation wurde dagegen oft ein Verlust von HLA-DP-Expression auf den Tumorzellen beobachtet (sog. Tumorescape-Mechanismus) [39–41].

Wegen einer schwächeren Ko-Vererbung mit anderen HLA-Loci, unterscheiden sich die HLA-DP-Allele zwischen Patient und Spender in bis zu 80 % der Patienten/Fremdspender-Konstellationen (HLA-Mismatch) [42,43]. Die für das Spenderimmunsystem als „fremd“ erscheinende HLA-DP-Allele auf den malignen Zellen des Patienten könnten dann als effektive Zielstrukturen bei der T-Zell-Immuntherapie verwendet werden [44,45].

So wurden in Vorarbeiten aus unserer Arbeitsgruppe HLA-DP-Mismatch spezifische T-Zell-Rezeptoren (TZR<sub>DP04</sub>, TZR<sub>DP03</sub>) isoliert, welche nach Transfer in gesunde Spender-T-Zellen spezifisch allogene HLA-DPB1\*04:01-positive bzw. HLA-DPB1\*03:01-positive Leukämiezellen erkannten und eliminierten [10].

So könnten AML-Blasten nach allogener Stammzelltransplantation mit allo-HLA-DPB1 TZR-modifizierten Spender-T-Zellen gezielt eliminiert werden. HLA-DPB1\*04:01 ist das HLA-DPB1-Allel mit der größten Häufigkeit in der kaukasischen Bevölkerung (Abbildung 2).

HLA-DPB1 Häufigkeiten in Prozent



**Abbildung 2: HLA-DPB1 Häufigkeit in der kaukasischen Bevölkerung.**

Unterschiedliche Häufigkeiten der einzelnen HLA-DPB1-Allele in der kaukasischen Bevölkerung, prozentual dargestellt in einem Kreisdiagramm [46].

Da HLA-DP-Strukturen auf nicht-hämatopoetischen Zellen bei Entzündungsgeschehen hochreguliert werden, kann es beim Einsatz TZR<sub>DP04</sub>-modifizierter T-Zellen durch die Erkennung von HLA-DPB1\*04:01-exprimierenden Zellen auch zum Angriff gesunden Gewebes kommen. Diese HLA-DPB1\*04:01-gerichtete GvHD als gefährliche Komplikation schränkt die mögliche Anwendung des TZR<sub>DP04</sub> in der T-Zell-Immuntherapie ein und erfordert die Entwicklung von Sicherheitsmechanismen, die man bei Ausbruch der GvHD nutzen kann, um diese zu stoppen.

Im Folgenden werden zwei Suizid-Gen-Systeme und die invarianten Natürlichen Killer T-Zellen als mögliche Sicherheitsstrategien in der adoptiven T-Zell-Immuntherapie vorgestellt.

### **1.3.3 Suizid-Gen-System als Sicherheitsmechanismus adoptiver T-Zellen**

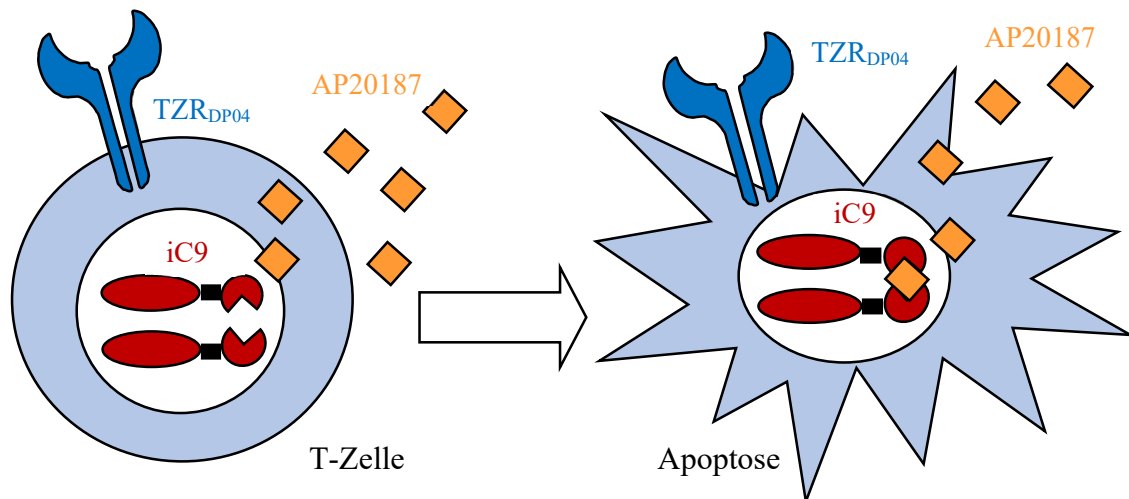
#### *1.3.3.1 Induzierbare Caspase-9 (iC9)*

Ein Suizid-Gen-System wird von der induzierbaren Caspase-9 (iC9) gebildet, die nach Dimerisierung weitere Caspasen aktiviert und die Apoptose einleitet [47,48].

Die Caspase-9 gehört zu der Familie der Cystein-Proteasen und übernimmt wichtige Funktionen bei der Apoptose. Die Caspase-9 wird aus einer N-terminalen Pro-Domäne, einer großen und einer kleinen Untereinheit gebildet [49,50].

Die Caspase-9 wird durch apoptotische Stimuli wie Hypoxie, Chemotherapeutika oder Strahlung aktiviert, indem Cytochrom-c aus Mitochondrien freigesetzt wird [51–53] und an Apaf-1 bindet. Im weiteren Verlauf der Kaskade aktiviert die Caspase-9 die Caspase-3, -6 und -7 [50,54–57]. Ein weiterer Weg der Aktivierung der Apoptose-Kaskade geht über den CD95 (Fas/APO-1)-Todesrezeptor [58], der nach Bindung des Liganden die Caspase-8 oder Caspase-10 aktiviert und damit die Apoptose einleitet [59]. Zytotoxische Granula wie Granzym-B und Perforin können direkt Initiator-Caspasen aktivieren und ebenfalls die Apoptose einleiten [60].

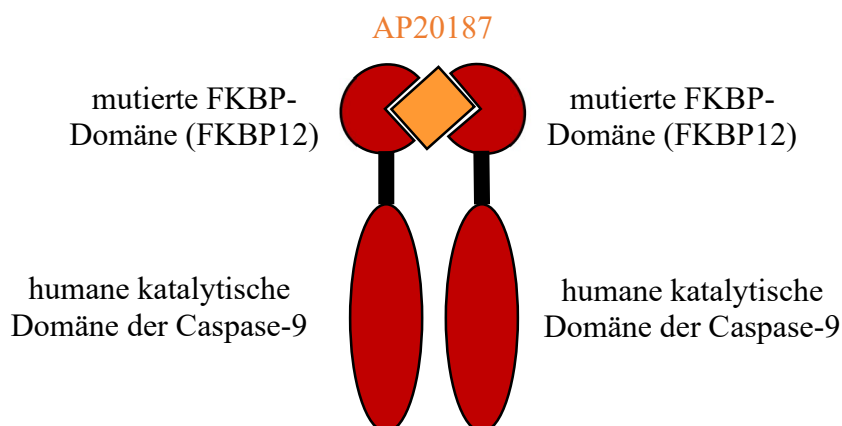
Neben den physiologischen Wegen zur Apoptose kann die Caspase-9 gezielt im Suizid-Gen-System iC9 aktiviert werden, indem ein Dimerisierungsmolekül AP20187 oder AP1903 die Verbindung zweier künstlich eingebrachter Caspase-9-Moleküle vermittelt (Abbildung 3) [47–49].



**Abbildung 3: Apoptose nach Dimerisierung zweier Moleküle der induzierbaren Caspase-9 (iC9) durch den Dimerisierer AP20187.**

Durch die Verbindung zweier iC9-Moleküle durch den Dimerisierer AP20187 wird die induzierbare Caspase-9 aktiviert und die Apoptosekaskade induziert.

Zur Dimerisierung der Caspase-9 wurde ein zellpermeabler synthetischer Ligand wie AP1903 oder AP20187 eingesetzt, der an das FK506-bindende Protein 12 (FKBP12) bindet [47,61,62]. Das Gen von iC9 enthält neben der Sequenz für das intrazelluläre proapoptische humane Caspase-9-Protein zusätzlich als weitere Domäne FKBP12 (Abbildung 4), welche von dem humanen FK506-bindenden Protein abgeleitet ist und die Dimerisierung vermittelt [47,48,62,63]. Bei der Verknüpfung zweier inaktiver Caspase-9-Monomeren werden die Seitenketten von einer hydrophoben Tasche umschlossen. Dadurch wird das Aktivierungssignal an die Umgebung der katalytischen Stelle Cys-285 weitergeleitet und die Caspase-9 ist aktiviert [64–66].



**Abbildung 4: Aufbau der dimerisierten induzierbaren Caspase-9 (iC9).**

Die induzierbare Caspase-9 setzt sich aus der humanen katalytischen Domäne der Caspase-9 und der mutierten FKBP-Domäne FKBP12 zusammen. Das Dimerisierungsmolekül AP20187 verbindet dabei zwei iC9-Moleküle über die FKBP12-Domänen.

Die physiologische Funktion von FKBP12 ist die Bindung von FK506 oder Rapamycin und die Inaktivierung der Proteinphosphatase Calcineurin, was zu einer verminderten TZR-Signalübertragung und Immunsuppression führt [67,68]. Um diese unerwünschte Wirkung der Calcineurin-Inhibition zu umgehen, wurde eine spezifische Bindungstasche in FKBP12 gebildet, indem Phenylalanin durch Valin ersetzt wurde (FKBP12-F36V). Der Ligand hat eine höhere Affinität und Selektivität für FKBP12-F36V und interagiert nur wenig mit dem endogenen FKBP [62,69,70].

Als möglicher Ligand zur Dimerisierung der Caspase-9 wurde im Jahr 2001 das Medikament AP1903 erprobt. Dieses Medikament ist sicher und gut verträglich bis zur Maximaldosis von 1 mg/kg. Die Konzentration im Plasma ist direkt proportional zur verabreichten Dosis von AP1903 und es folgt eine schnelle Reduktion auf 1 % der maximalen Plasmakonzentration innerhalb von 10 Stunden [61].

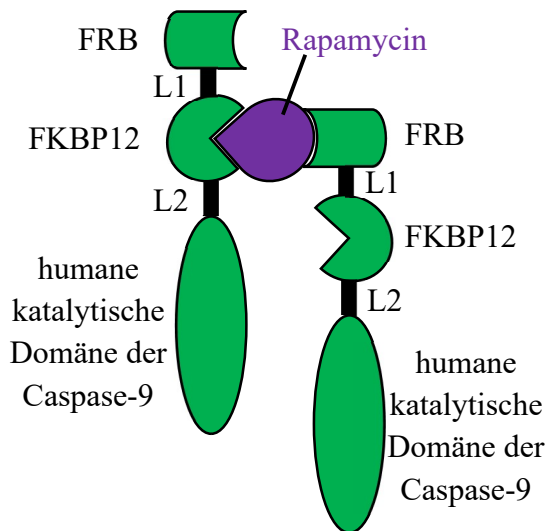
In einer weiteren Studie zeigte sich nach einer Infusion von 0,4 mg/kg Körpergewicht AP1903 über zwei Stunden an Patienten mit GvHD nach Erhalt allodepletierter und mit iC9 genetisch modifizierten T-Zellen, dass nach 30 Minuten 90 % der iC9-exprimierenden T-Zellen eliminiert wurden. Nach wiederholter Exposition mit dem Dimerisierer konnten die verbliebenen iC9-transduzierten Zellen mit einer Apoptoserate von 85 % abgetötet werden, die bis zu neun Monaten nach Infusion anhielt [47].

Bei Einsatz adoptiver T-Zellen mit dem iC9-Sicherheitsmechanismus nach allogener Stammzelltransplantation kann eine schnelle und langzeitige Kontrolle der GvHD erzielt werden [71].

#### *1.3.3.2 Rapamycin-induzierbare Caspase-9 (RC9)*

Eine Alternative für die bislang nur in klinischen Studien eingesetzten Moleküle AP1903 und AP20187 ist die Verwendung des Medikaments Rapamycin (Rmy). Rapamycin kann FKBP12 mit dem FKBP-Rapamycin-bindenden (FRB)-Fragment des Ziels von Rapamycin im Säugetier (mammalian Target of Rapamycin, mTOR) heterodimerisieren und wird als immunsuppressives Pharmatherapeutikum bereits appliziert [72–74]. Hierfür wurde ein Rapamycin-induzierbares Caspase-9-Gen (RC9) entwickelt, welches neben der katalytischen Caspase-9-Domäne auch die Sequenzen der FRB- und FKBP12-Domänen enthält (Abbildung 5). Über eine Dimerisierung der beiden unterschiedlichen Domänen durch Rapamycin wird ähnlich wie beim iC9-System Apoptose induziert [75,76].





**Abbildung 5: Aufbau der dimerisierten Rapamycin-induzierbaren Caspase-9 (RC9).**

Die Rapamycin-induzierbare Caspase-9 setzt sich aus der humanen katalytischen Domäne der Caspase-9 und den Dimerisierungsdomänen FKBP12 und FRB zusammen, die über die Linker L1 zwischen FRB und FKBP12 und L2 zwischen FKBP12 und der katalytischen Domäne verbunden sind. Das Dimerisierungsmolekül Rapamycin (Rmy) verbindet dabei zwei RC9-Moleküle über die FKBP12- und FRB-Domäne.

Im Gegensatz zum iC9-Konstrukt liegt im RC9-Konstrukt die FKBP12-Domäne nicht mutiert vor. Der FKBP12-Rapamycin-Komplex kann mit der Ziel-des-Rapamycin-Komplexes-1 (Target of Rapamycin Complex 1, TORC1)-Proteinkinase interagieren und Calcineurin inhibieren [68,75,77]. Dadurch wurde keine Beeinträchtigung der Apoptoseeffizienz festgestellt [75].

Die Dimerisierung von RC9 erfolgt in Gegenwart von 0,1 nM Rapamycin. Die pharmakologische Aktivitäten und Nebenwirkungen als Immunsuppressivum sind minimal [75].

Hohe Apoptoseeffizienz wurde mit der Konfiguration FRB-FKBP12-Caspase-9 im Mausmodell erreicht. Hier sind die FRB- mit der FKBP12-Domäne und die FKBP12-Domäne mit der katalytischen Domäne der Caspase-9 jeweils über einen Linker aus Serin-Glycin-Verknüpfungen verbunden [75]. Diese Linker müssen eine ausreichende Flexibilität für eine versetzt angeordnete Interaktion aufweisen und dürfen dabei keine intramolekulare Ligation mit Rapamycin erlauben [75].

### 1.3.4 Invariante Natürliche Killer T (iNKT)-Zellen

#### 1.3.4.1 Einteilung und Eigenschaften

TZR<sub>DP04</sub>-exprimierende konventionelle  $\alpha/\beta$  T-Zellen haben auch HLA-DP-exprimierende nicht-hämatopoetische Zellen erkannt. Dies könnte im Patienten schwerwiegende Auswirkungen wie eine GvHD auslösen. Daher ist zu prüfen, den TZR<sub>DP04</sub> in einer anderen Zellpopulation einzusetzen, die zwischen hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zellen unterscheiden kann und idealerweise nur die AML-Blasten eliminiert. Eine Möglichkeit stellen Natürliche Killer T (NKT)-Zellen dar, die durch Eigenschaften von Natürliche Killer (NK)- und T-Zellen charakterisiert sind. Durch diese kombinierten Faktoren zeigen sie hohe antileukämische Aktivitäten und werden im Rahmen dieses Forschungsprojektes mit verschiedenen spezifischen T-Zell-Rezeptoren ausgestattet und funktionell getestet.

NKT-Zellen werden in einer Nische zwischen adaptiver und angeborener Immunantwort eingeordnet [78,79], da sie nach Antigenstimulation große Mengen von Zytokinen freisetzen und auch ohne TZR-Signale Antigene erkennen können [79]. Nach der Entwicklung im Thymus exprimieren NKT-Zellen Rezeptoren für inflammatorische Zytokine wie Interleukin (IL)-12, -18, -25 und -23, wodurch sie ähnlich wie NK-Zellen sehr sensitiv auf Zytokin-Signale reagieren [79–82]. Dadurch können NKT-Zellen mittels Zytokinen auch ohne Antigen-Erkennung über den TZR aktiviert werden [79].

Die NKT-Zellen werden in die Untergruppen Typ I, Typ II und atypische NKT-Zellen unterteilt [83].

Typ I NKT-Zellen werden auch als invariante NKT (iNKT)-Zellen bezeichnet, da sie im Menschen die invariante TZR $\alpha$ -Kette V $\alpha$ 24J $\alpha$ 18 (TRAV10-TRAJ18 nach IMGT-Nomenklatur [83], AV24S1 nach Nomenklatur von Arden [84]) exprimieren. Diese invariante TZR $\alpha$ -Kette wird nur mit einer limitierten Auswahl an TZR $\beta$ -Ketten kombiniert, hauptsächlich mit V $\beta$ 11\* (TRBV25-1 nach IMGT-Nomenklatur [83], BV11S1A1T nach Nomenklatur von Arden [84]) [85–87].

Durch diesen invarianten TZR haben die iNKT-Zellen die besondere Eigenschaft der Erkennung von Lipiden und Glykolipiden, die als Pathogene auf Erregern wie Mykobakterien vorkommen.  $\alpha$ -Galaktosylceramid ( $\alpha$ -GalCer) ist ein Glykolipid, was auch zur *in vitro* Stimulation der iNKT-Zellen verwendet wird [79,88]. Die Ceramid-Base mit der  $\alpha$ -verknüpften Galaktose-Gruppe bindet an den Oberflächenrezeptor CD1d und wird an die Typ I NKT-Zellen präsentiert. Nach der Erkennung des CD1d-gebundenen Lipids über den TZR folgt die Aktivierung der iNKT-Zellen [88–90].

Weitere Eigenschaften der iNKT-Zellen sind die Weiterleitung von Signalen an B-Zellen, Förderung der dendritischen Zell (DC)-Reifung, Verstärkung der Aktivität der NK-Zellen und spezifische adaptive T-Zell-Antworten [91]. iNKT-Zellen haben selbst die zytotoxische Fähigkeit, maligne Zellen mit Granzym B und Perforin oder über Fas/Fas-Ligand abzutöten [92,93].

Im Mausmodell zeigte sich, dass ein iNKT-Zellen zu T-Zellen Verhältnis von 1:20 nach allogener Stammzelltransplantation ausreicht, um vor dem tödlichen Verlauf der GvHD zu schützen [94,95]. Für die Durchführung einer iNKT-Zelltherapie beim Menschen ist jedoch eine *ex vivo* Expansion der iNKT-Zellen erforderlich [95]. Humane iNKT-Zellen machen einen Anteil von 0,09 % der peripheren mononukleären Blutzellen aus und können in einem Bereich von 0,003 % bis 0,63 % je nach Spender schwanken [95].

Typ II NKT-Zellen sind im Vergleich zu Typ I NKT-Zellen bisher noch nicht detailliert charakterisiert wie Typ I NKT-Zellen. Unterschiede sind, dass die Typ II NKT-Zellen keine invariante TZR $\alpha$ -Kette aufweisen, aber eine Häufung der TZR $\alpha$ -Ketten-V-Segmente V $\alpha$ 3, V $\alpha$ 8 und V $\beta$ 8 zeigen. Typ II NKT-Zellen können auch über CD1d präsentierte Lipid-Antigene erkennen, aber kein  $\alpha$ -GalCer [85,96]. Das Antigen, welches im Hinblick auf die Erkennung durch Typ II NKT-Zellen am meisten untersucht wurde, ist Sulphatid, ein sulphatiertes Glykolipid, das in neuronalen Geweben vorkommt [97].

Den atypischen NKT-Zellen werden die NKT-Zellen untergeordnet, die weder Merkmale der Typ I noch der Typ II Gruppe aufweisen oder sowohl Merkmale der Typ I als auch der Typ II NKT-Zellen besitzen [83].

Der Fokus in dieser Forschungsarbeit ist auf die iNKT-Zellen gerichtet.

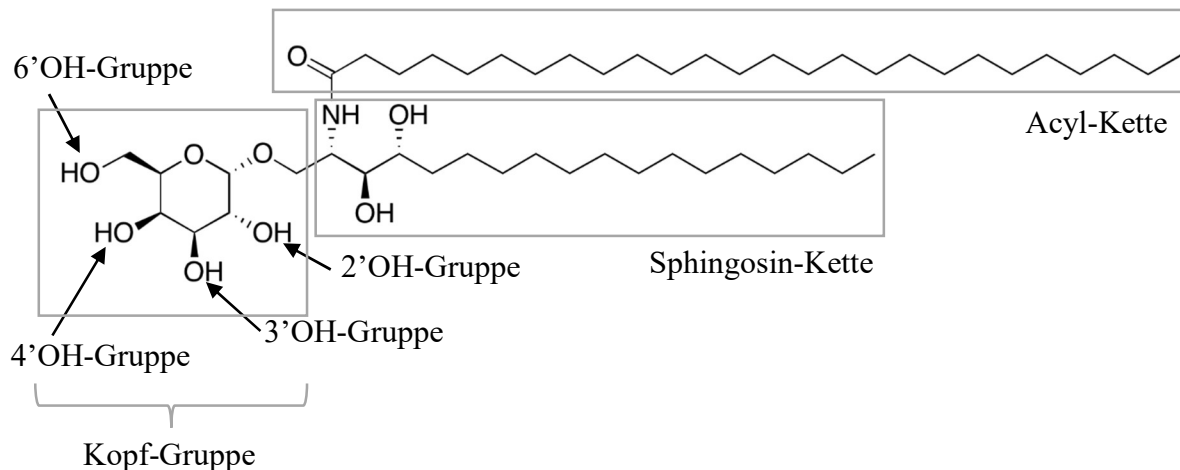
#### 1.3.4.2 Antigenerkennung und Antigene

Die Antigenerkennung durch iNKT-Zellen erfolgt über CD1d-Moleküle. Bei genetisch veränderten Mäusen mit CD1d-Defizit können keine iNKT-Zellen gebildet werden, was als Folge eine Immunsystemstörung mit fehlender Immunabwehr gegen Bakterien, Viren und Pilze mit sich bringt [79,98–100].

Ein CD1-Molekül wird aus zwei hydrophobe Taschen A' und F' zur Bindung des Lipidschwanzes und oberflächlicher Aminosäuren zur Fixierung der hydrophilen Antigen-Kopfgruppe gebildet [91,101]. Die CDR1 $\alpha$ -Schleife des invarianten T-Zell-Rezeptors interagiert direkt mit  $\alpha$ -GalCer (Abbildung 6), während die CDR3 $\alpha$ -Schleife an CD1d und  $\alpha$ -GalCer bindet [102,103].

Die TZR $\alpha$ -Kette interagiert mit der  $\alpha$ -Galaktosyl-Kopfgruppe und ist damit für die Stimulation der Typ I NKT-Zellen entscheidend. Die TZR $\beta$ -Kette bindet an der CDR2 $\beta$ -Schleife über die F'-Tasche von CD1d [83,102]. Für die optimale CD1d-Bindung sitzt Leucin an der Stelle 99 in der CDR3 $\alpha$ -Schleife des TZR $\alpha$ , sodass sich ein hydrophobes Dach über der F'-Tasche formt [103,104]. Zusätzliche Interaktionen der TZR $\alpha$ -Kette erfolgen über besondere CDR3 $\beta$ -Schleifen der TZR $\beta$ -Kette ohne direkten Kontakt mit dem Antigen [83]. Somit wirken sich die Variationen der TZR $\beta$ -Kette indirekt auf die Erkennung der Antigene aus, da dadurch die TZR $\alpha$ -Kette strukturell verändert wird [83,103,105].

Durch Modifikationen der Kopfgruppe, der Acyl-Kette oder der Sphingosin-Kette des Antigens  $\alpha$ -GalCer kann die NKT-TZR-Antigen-CD1d-Interaktion beeinflusst werden (Abbildung 6) [106–109].



**Abbildung 6: Strukturformel von  $\alpha$ -Galactosylceramid ( $\alpha$ -GalCer).**

Die Strukturformel des Moleküls  $\alpha$ -GalCer wird dargestellt [110]. Die Kopfgruppe mit den 2', 3', 4' und 6'OH-Gruppen, die Acyl-Kette und Sphingosin-Kette können mit dem T-Zell-Rezeptor der iNKT-Zellen interagieren. Nach Veränderungen an diesen Strukturen kann die NKT-Zell-Aktivierung beeinflusst werden.

Wenn NKT-Zellen aktiviert werden, wird IFN- $\gamma$  und IL-4 produziert und ausgeschüttet. Die IL-4-Produktion lässt nach wenigen Stunden wieder nach, während die IFN- $\gamma$ -Produktion für zwei bis drei Tage anhält [83,107,111].

Die Faktoren für eine Th1- oder Th2-typische Zytokin-Produktion sind CD1d-Beladung, nachgeschaltete Ereignisse, Interaktion mit antigenpräsentierenden Zellen, Liganden-Stabilität und pharmakologische Eigenschaften der Glykolipide, während die NKT-TZR-Antigen-CD1d-Affinität kaum einen Einfluss hat [83,112,113].

### 1.3.4.3 *Therapeutische Anwendung*

NKT-Zellen haben sowohl vorteilhafte als auch schädliche Eigenschaften im Immunsystem. Als positive Faktoren kann die Verbesserung der Immunität bei Infektionen und bestimmten Tumorerkrankungen und der Schutz vor der Transplantatabstoßung und vor bestimmten Autoimmunformen gezählt werden [83,114]. Teilweise werden aber auch Exazerbationen bei bestimmten Autoimmunerkrankungen ausgelöst und die Abtötung von Tumorzellen bei bestimmten malignen Neoplasien verhindert [83,114,115]. Aufgrund der beschriebenen Funktionen von iNKT-Zellen wird versucht, deren therapeutisches Potential in der Behandlung von Tumorerkrankungen zu nutzen. Eine iNKT-Zell-Stimulation oder ein adoptiver Transfer von iNKT-Zellen können eine starke tumorhemmende Immunantwort auslösen [88,116,117].

$\alpha$ -GalCer ist als iNKT-Zell-Agonist eine Antitumor-Komponente und kann vor Tumorprogression schützen, was in Mausmodellen bei Kolonkarzinom, Melanom und Prostatakarzinom nachgewiesen wurde [116,118,119]. In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass durch eine Injektion von  $\alpha$ -GalCer [120] oder  $\alpha$ -GalCer-beladenen unreifen DCs [121] das Immunsystem aktiviert wurde, aber nur bei einer nachweisbaren Anzahl von NKT-Zellen [122]. In experimentellen Modellen hat eine Aktivierung von iNKT-Zellen eine Tumorabstoßung hervorgerufen, während bei einem iNKT-Defizit verstärktes Tumorwachstum beobachtet wurde [91,123].

Die aktivierten iNKT-Zellen stimulieren regulatorische T (Treg)-Zellen und setzen hohe Mengen an IL-4 frei [124]. Eine iNKT-Zell-Infusion kann somit eine GvHD abmildern, indem die Freisetzung von IFN- $\gamma$  absinkt und die von IL-4 ansteigt [125,126].

In einer anderen Studie war die iNKT-Zell-Aktivierung und Treg-Zell-Expansion essentiell als Schutz vor der GvHD, aber das Anwachsen des Transplantats wurde verzögert oder das Transplantat sogar abgestoßen [127]. Die Ausmaße der GvHD werden von der Produktion von IL-4 durch iNKT-Zellen und die Anwesenheit und Aktivierung der Treg-Zellen beeinflusst [124,128].

Beim Einsatz von iNKT-Zellen, die aus allogenen Blutstammzellen generiert wurden, konnte gezeigt werden, dass das Risiko einer GvHD im Vergleich zu konventionellen T-Zellen erniedrigt ist, da iNKT-Zellen nicht auf Mismatch von HLA-Molekülen und andere Alloantigene reagieren [129,130]. So konnte bei der Modifikation von iNKT-Zellen mit chimären Antigenrezeptor (CAR) im Mausmodell keine GvHD nachgewiesen werden [130]. Ein Ziel dieser Arbeit ist es, die iNKT-Zellen mit spezifischen T-Zell-Rezeptoren TZR<sub>DP04</sub> oder TZR<sub>DP03</sub> zu modifizieren, dass sie als Therapie eingesetzt werden können, wobei sie den GvL-Effekt fördern und die GvHD nach Stammzelltransplantation unterdrücken.

## 1.4 Projektziel

Im Fokus der Arbeit steht die Testung von Sicherheitsmechanismen in TZR-modifizierten T-Zellen für die adoptive Immuntherapie im Kontext der allogenen HSZT. Hierbei sollen TZR-modifizierte T-Zellen selektiv die Leukämiezellen erkennen und dabei keine gesunden Gewebezellen angreifen. Der T-Zell-Rezeptor  $TZR_{DP04}$  erkennt das allogene HLA-DPB1\*04:01-Allel, welches als Oberflächenmolekül auf AML-Blasten von Patienten häufig vorkommt und von anderen Gewebezellen nur bei Entzündungsreaktionen exprimiert wird. Da die HLA-DP-Strukturen auf nicht-hämatopoetischen Zellen bei Entzündungsgeschehen hochreguliert werden, können bei Einsatz von  $TZR_{DP04}$  nicht nur hämatopoetische Zellen des Patienten eliminiert werden, sondern auch gesunde Gewebezellen angegriffen werden.

In diesem Projekt wird untersucht, ob eine gezielte Elimination  $TZR_{DP04}$ -modifizierter T-Zellen durch iC9 oder RC9 möglich ist. Alternativ wurde die Verwendung modifizierter iNKT-Zellen im Hinblick auf ihre GvL- und GvHD-Eigenschaften hin untersucht.

Dazu soll das Konstrukt iC9 zusammen mit  $TZR_{DP04}$  in T-Zellen transduziert und exprimiert werden. iC9 besteht aus dem proapoptotischen Caspase-9-Protein und einer Dimerisierungsdomäne, sodass zwei iC9-Moleküle durch den Dimerisierer AP20187 verbunden werden können und damit die Apoptose eingeleitet wird. Der Einsatz dieses Suizid-Gen-Systems in der Klinik hat das Ziel, bei Auftreten einer GvHD die Symptome durch Elimination der T-Zellen nach Anschalten der Apoptose-Kaskade abzumildern.

Weiterhin soll in dieser Arbeit RC9 untersucht werden, welche neben der Caspase-9 die Dimerisierungsdomänen FRB und FKBP12 enthält. Hier erfolgt die Dimerisierung durch Rapamycin, was als Immunsuppressivum in der Klinik zugelassen ist. RC9 wird als Suizid-Gen-System in Kombination mit  $TZR_{DP04}$  getestet und mit iC9 verglichen.

Als weitere Sicherheitsstrategie sollen iNKT-Zellen mit  $TZR_{DP04}$  oder einem HLA-DPB1\*03:01-spezifischen TZR ausgestattet und bezüglich ihrer Reaktivität gegenüber hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zellen untersucht werden. Das Ziel ist, dass iNKT-Zellen mit HLA-DP-spezifischen T-Zell-Rezeptor bevorzugt AML-Blasten erkennen und so ein geringes Risiko für die Induktion einer GvHD aufweisen.

Insgesamt sollen die Arbeiten dazu beitragen, präklinische Daten zu einer möglichst sicheren und selektiven Aktivierung von  $TZR_{DP}$ -modifizierten T-Zellen für eine therapeutische Anwendung zu gewinnen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialliste

#### 2.1.1 Laborgüter

Tabelle 1: Liste der verwendeten Geräte.

Geräte	Hersteller, Standorte
Abzug Typ TAN 120	Prutscher Laboratory Systems, Neudörfel, AT
Autoklav Varioklav Dampfsterilisator Typ 75S	HP Medizintechnik GmbH, Oberschleißheim, DE
BD FACS Calibur	BD Biosciences GmbH, Heidelberg, DE
Computer Power Mac G4	Apple, Cupertino, US
C. T. L. ELISpot Reader	C. T. L., Shaker Heights, US
Eismaschine AF20	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, US
Freezing Container, Mr. Frosty (Nalgene)	Thermo Fischer Scientific, Waltham, US
Gefrierschrank Forma 900 Series	Thermo Fischer Scientific, Waltham, US
Gene Pulsar Xcell TM Electroporation System	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, US
Heizblock Thermo Top®	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Heraeus Megafuge 16R	Thermo Fischer Scientific, Waltham, US
Heraeus Megafuge 40R	Thermo Fischer Scientific, Waltham, US
Inkubationsschrank Heracell 240i CO2 Inkubator	Thermo Fischer Scientific, Waltham, US
MACS MultiStand	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch-Gladbach, DE
Magnetrührer HR Hei-Standard	Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Schwabach, DE
Milli-Q Q-Pod® Reinstwasseraufbereitungsanlage	Merck Millipore, Billerica, US
Mini Laboratory Pump VP86	VWR International, Radnor, US
NanoDrop 1000	Thermo Fischer Scientific, Waltham, US
pH-Meter 646	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin, DE
Pipetboy 2	Integra Biosciences AG, Hudson, US
Pipette Research® Plus	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Pipette Multichannel	STARLAB International GmbH, Hamburg, DE
Präzisionswaage Kern PCB	Kern & Sohn GmbH, Balingen, DE
Mikroskop PrimoVert	Carl Zeiss AG, Oberkochen, DE
Schüttelgerät 3017	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, DE
Spannungsquelle EV231	Consort BVBA, Turnhout, BE

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller, Standorte</b>
Sterilbank Safe 2020	Thermo Fischer Scientific, Waltham, US
Stickstofftank HEco Series 800-190	Chart MVE BioMedical, San Antonio, US
ThermoMixer C	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Typhoon 9200	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Verotex Genie 2 TM	Bender & Hobein AG, Zürich, CH
Vortex VV3	VWR International, Radnor, US
Wärmebad Typ 1003	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, DE
Zählkammer Neubauer improved bright-line depth 0,1mm	Paul Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen, DE
Zentrifuge 5424 R	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Zentrifugen Tubes Glattrand (Corex Gläser)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
Zentrifugeneinsatz, Gummiadapter für Corex Gläser	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US

## 2.1.2 Verbrauchsgüter

**Tabelle 2: Liste der verwendeten Verbrauchsgüter.**

<b>Verbrauchsgüter</b>	<b>Hersteller, Standorte</b>
Abdeckplatte PS, Hohes Profil 9 mm	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, AT
Cellstar Polypropylen Röhrchen 15 ml und 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, AT
Cryo.s TM 2 ml	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, AT
Elektroporationsküvetten 4 mm	PEQLAB by VWR International GmbH, Erlangen, DE
FACS-Tubes	Becton Dickinson, Franklin Lakes, US
Zentrifugenröhrchen Falcon 15 ml, 50 ml	Thermo Fischer Scientific, Waltham, US
MACS PreSeparation Filter	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch- Gladbach, DE
MACS Separation Columns LS	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch- Gladbach, DE
MultiScreen HTS Filter Plates	Merck Millipore, Billerica, US
Multiwellplatten 6 well, 12 well, 24 well, 48 well, 96 well	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, AT
Nunc™ (Kryoröhrchen)	Thermo Fischer Scientific, Waltham, US
Nitrilhandschuhe	Kimberly-Clark, Irving, US
Parafilm (M)®	Bemis Company Inc., Neenah, US
Petrischalen P10	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, AT



<b>Verbrauchsgüter</b>	<b>Hersteller, Standorte</b>
Pipette ErgoOne 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	STARLAB International GmbH, Hamburg, DE
Pipettenspitzen graduiert 10 µl, 200 µl, 1000 µl	STARLAB International GmbH, Hamburg, DE
Safe Lock Tubes 0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Safe Lock Tubes 0,5 ml, 1,5 ml biopur	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Safe Seal Tips Professional 10 µl, steril	Biozym Scientific GmbH, Hessisch-Oldendorf, DE
Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, AT
Sterican Kanülen 0,4*25 mm 27G*1/2	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Tip One Filter Tip 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	STARLAB International GmbH, Hamburg, DE
Versa Touch Handschuhe	Ansell, Richmond, AUS
Zellkulturflasche T25, T75	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, AT
Zellkulturplatten 96 well, weiß	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, AT
Zellkulturschale P10 und P15	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, AT

### 2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

**Tabelle 3: Liste der verwendeten Chemikalien und Reagenzien.**

<b>Chemikalien/Reagenzien</b>	<b>Hersteller, Standorte</b>
2-Propanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
3-Amino-9-ethyl-carbazol	Sigma-Aldrich, St. Louis, US
Agar-Agar	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Ampicillin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Ampuwa Spüllösung Plastipur	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, DE
Annexin Binding Buffer	BD Biosciences GmbH, Heidelberg, DE
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, US
CutSmart	New England Biolabs, Ipswich, US
Dimethylformamid	Sigma-Aldrich, St. Louis, US
Dimethylsulfoxid (DMSO), BioScience-Grade	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
EDTA	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE
Essigsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, US
Ethanol > 99,8 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
FACS Clean Solution	BD Biosciences GmbH, Heidelberg, DE
FACS Flow Sheath Fluid	BD Biosciences GmbH, Heidelberg, DE
FACS Rinse	BD Biosciences GmbH, Heidelberg, DE
Formaldehyd	Sigma-Aldrich, St. Louis, US

<b>Chemikalien/Reagenzien</b>	<b>Hersteller, Standorte</b>
Gel loading Dye	New England Biolabs, Ipswich, US
Glycerin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Natriumacetat	Ambion by Life Technologies, Carlsbad, US
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Pancoll Human Density	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, DE
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, US
Retronectin	Clontech, Saint-Germain-en-Laye, FR
RNase Zap	Sigma-Aldrich, St. Louis, US
RotiSafe	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
TransIT®-LT1 Transfection Reagent	Mirus Bio, Madison, US
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, US
Trypan blue 0,5 % in physiologischer Kochsalzlösung	Biochrom GmbH, Berlin, DE
Trypton/Pepton aus Casein	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Tween® 20	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich, St. Louis, US

## 2.1.4 Antikörper/Fluoreszenz-markierte Proteine

**Tabelle 4: Liste der verwendeten Antikörper/Fluoreszenz-markierten Proteine.**

<b>Antikörper/Fluoreszenz-markierte Proteine</b>	<b>Hersteller, Standorte</b>
Annexin V-FITC	BD Biosciences GmbH, Heidelberg, DE
Anti-human-Interferon- $\gamma$ mAB 1-D1k	Mabtech AB, Stockholm, SE
Anti-human-Interferon- $\gamma$ mAB 7-B6-1-Biotin	Mabtech AB, Stockholm, SE
Anti-iNKT-MicroBeads	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch-Gladbach, DE
Anti-iNKT-PE (REA1054)	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch-Gladbach, DE
CD3-APC (UCHT1)	BD Biosciences GmbH, Heidelberg, DE
CD3/28-Beads	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch-Gladbach, DE
CD4-APC (RPA-T4)	BD Biosciences GmbH, Heidelberg, DE
CD8-APC (RPA-T8)	BD Biosciences GmbH, Heidelberg, DE
CD4-MicroBeads	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch-Gladbach, DE

<b>Antikörper/Fluoreszenz-markierte Proteine</b>	<b>Hersteller, Standorte</b>
CD8-MicroBeads	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch-Gladbach, DE
CD3-PE (UCHT1)	BD Biosciences GmbH, Heidelberg, DE
Mucβ-PE (H57-597)	BD Biosciences GmbH, Heidelberg, DE
PBS57 Tetramer-PE	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD. Dr. Schneidawind der AG Schneidawind, Tübingen, DE
Vβ13.2-PE (JU74.3)	Beckman Coulter, Brea, US

## 2.1.5 Kits

**Tabelle 5: Liste der verwendeten Kits.**

<b>Kits</b>	<b>Hersteller, Standorte</b>
CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay	Promega GmbH, Madison, US
Dynabeads Human T-Activator CD3/28	Gibco® by Life Technologies, Carlsbad, US
EndoFree® Plasmid Maxi Kit	QIAGEN N. V., Venlo, NL
Gibson Assembly Kit	New England Biolabs, Ipswich, US
Miltenyi Naive CD4 <sup>+</sup> T Cell Isolation Kit human	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch-Gladbach, DE
Miltenyi Naive CD8 <sup>+</sup> T Cell Isolation Kit human	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch-Gladbach, DE
QIAfilter Plasmid Mini Prep Kit	QIAGEN N. V., Venlo, NL
Vectastain ABC-Kit	Vector Laboratories Inc., Burlingame, US

## 2.1.6 Zellkulturmedien und Zusätze

**Tabelle 6: Liste der verwendeten Zellkulturmedien und Zusätze.**

<b>Zellkulturmedien/Zusätze</b>	<b>Hersteller, Standorte</b>
Glutamax	Gibco® by Life Technologies, Carlsbad, US
HEPES-Puffer (1 M)	Sigma-Aldrich, St. Louis, US
Humanes Serum (HS)	Blutspendedienst des Deutschen Roten Kreuzes gemeinnützige GmbH, München, DE
L-Glutamin	Gibco® by Life Technologies, Carlsbad, US
2-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
MEM NEAA	Gibco® by Life Technologies, Carlsbad, US
Natriumpyruvat	Gibco® by Life Technologies, Carlsbad, US
OptiMem	Gibco® by Life Technologies, Carlsbad, US

Zellkulturmedien/Zusätze	Hersteller, Standorte
Penicillin/Streptomycin (PenStrep)	Gibco® by Life Technologies, Carlsbad, US
Puromycin	Thermo Fischer Scientific, Waltham, US
RPMI Medium 1640	Gibco® by Life Technologies, Carlsbad, US
RPMI Medium 1640 (1x) ohne Phenolrot	Gibco® by Life Technologies, Carlsbad, US
Trypsin 0,05 % - EDTA (1x)	Thermo Fischer Scientific, Waltham, US
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, DE
AIM V Medium	Gibco® by Life Technologies, Carlsbad, US
DMEM	Gibco® by Life Technologies, Carlsbad, US

### Medium zur Kultivierung von Zellen

Zur Kultivierung der Zellen wurde das Zellmedium nach den Datenbanken des DSMZ (Leibniz-Institut Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) oder ATCC (American Type Culture Collection) ausgewählt und, wenn nicht anders angegeben, mit 30 mmol/l HEPES-Puffer, 120 IU/ml Penicillin, 0,12 mg/ml Streptomycin und 2 mmol/l Glutamin versetzt.

### Medium zur Expansion von iNKT-Zellen (iNKT-Medium)

500 ml RPMI-Medium + 5 ml FCS + 5,5 µl 2-Mercaptoethanol  
+ 500 ml HEPES  
+ 500 ml MEM NEA  
+ 500 ml Glutamax  
+ 500 ml Natriumpyruvat  
+ 500 ml Penicillin-Streptomycin.

### Medium zur Kryokonservierung von Zellen

Fetales Kälberserum (FCS), 10 Vol.-% DMSO.

### LB-Medium (flüssig) zur Kultivierung von Bakterien

900 ml destilliertes Wasser  
+ 10 g Trypton  
+ 5 g Hefeextrakt  
+ 10 g NaCl  
Anschließend auf pH = 7,0 eingestellt und autoklaviert.

### **SOC-Medium**

900 ml destilliertes Wasser

+ 20 g Trypton

+ 5 g Hefeextrakt

+ 0,5 g NaCl

+ 2,5 ml 1 M KCl

+ 10 mM MgCl<sub>2</sub>

+ 10 mM MgSO<sub>4</sub>

+ 20 mM Glucose

Anschließend auf pH = 7,0 eingestellt und autoklaviert.

### **Agar-Platten**

900 ml Aqua bidest.

+ 10 g Trypton

+ 5 g Hefeextrakt

+ 10 g NaCl

→ pH 7,0 mit 10 M NaOH einstellen

+ 15 g Agar-Agar

→ Autoklavieren für 30 min bei 122 °C

→ in Platten gießen, Lagerung bei 4 °C.

## **2.1.7 Puffer und Lösungen**

### **MACS-Puffer (10x)**

500 ml PBS

+ 0,5 % (w/v) BSA

+ 2 mM EDTA.

### **FACS-Fixans**

PBS + 1 Vol.-% Formaldehyd.

### **Acetat-Puffer**

985,3 ml Millipore-H<sub>2</sub>O

+ 2,88 g Natriumacetat

+ 14,7 ml 100 % Essigsäure.

## AEC Lösung

- 10 AEC Tabletten in 25 ml Dimethylformamid in Zentrifugenröhrchen lösen  
→ Auffüllen auf 500 ml mit Acetat-Puffer in Glasflasche → steriles Filtrieren  
→ Lagerung im Dunklen bei 4 °C  
→ erst vor Gebrauch Zugabe von 0,5 µl/ml 30 Vol.-% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## 10x PBS

Lösen einer VP-Einheit PBS-Pulver in 1 l Millipore Wasser.

## PBS Tween 0,05 %

Zugabe von 5,0 ml 10 Vol.-% Tween pro Liter 1x PBS.

### 2.1.8 Dimerisierer

Tabelle 7: Liste der verwendeten Dimerisierer.

Dimerisierer	Hersteller, Standorte
AP20187	Takara Bio Inc., Kusatsu, JPN
Rapalog	Takara Bio Inc., Kusatsu, JPN
Rapamycin	Takara Bio Inc., Kusatsu, JPN

### 2.1.9 Zytokine

Tabelle 8: Liste der verwendeten Zytokine.

Zytokine	Hersteller, Standorte
rh-IL-2	Novartis AG, Basel, CH
rh-IL-7	R&D Systems Inc., Minneapolis, US
rh-IL-15	PeptoTech Inc., Rocky Hill, US
rh-IFN-γ	eBioscience Inc., San Diego, US

### 2.1.10 Desinfektionsmittel

Tabelle 9: Liste der verwendeten Desinfektionsmittel.

Desinfektionsmittel	Hersteller, Standorte
Desinfektionsmittel Purosept®-A Xpress	Merz Hygiene GmbH, Frankfurt, DE
Desinfektionstücher Desco Wipes	Dr. Schumacher GmbH, Malsfeld, DE
Händedesinfektionslösung Manisoft	Ecolab Inc., St. Paul, US

<b>Desinfektionsmittel</b>	<b>Hersteller, Standorte</b>
Händedesinfektionslösung Mucasept-A	Merz Hygiene GmbH, Frankfurt, DE
Incidin® Plus	Ecolab Inc., St. Paul, US

### 2.1.11 Enzyme

**Tabelle 10: Liste der verwendeten Enzyme.**

<b>Enzyme</b>	<b>Hersteller, Standorte</b>
Alkalische Phosphatase (CIP)	New England Biolabs, Ipswich, US
EcoRI	New England Biolabs, Ipswich, US
SpeI	New England Biolabs, Ipswich, US
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Ipswich, US
XbaI	New England Biolabs, Ipswich, US
XhoI	New England Biolabs, Ipswich, US

### 2.1.12 Nukleotide und Oligonukleotide

**Tabelle 11: Liste der verwendeten Nukleotide und Oligonukleotide.**

<b>Nukleotide/Oligonukleotide</b>	<b>Hersteller, Standorte</b>
2log DNA Ladder	New England Biolabs, Ipswich, US
Primer #69 CAC GTG AAG GCT GCC GAC	Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg, DE
Primer #70 CAA GCG GCT TCG GCC AGT A	Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg, DE
Primer #312 CTG CCT GTT CAC CGA CTT TG	Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg, DE
Primer #402 CCA GCG CCA GCT ACC ATC AG	Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg, DE
Deoxynucleotide Solution Mix	New England Biolabs, Ipswich, US
Oligo(dT) Primer	Thermo Fischer Scientific, Waltham, US

### 2.1.13 Genkonstrukte

**Tabelle 12: Liste der verwendeten Genkonstrukte.**

<b>Genkonstrukte</b>	<b>Hersteller, Standorte</b>
Vektor pMXs-IRES Puro [131]	BioCat GmbH, Heidelberg, DE
Gensequenz des chimären TZR <sub>DP04</sub> [10] → codonoptimierte chimäre $\alpha$ - und $\beta$ -Kette von TZR <sub>DP04</sub> bestehend aus humaner variabler TZR $\alpha$ - bzw. TZR $\beta$ -Domäne und muriner konstanter TZR $\alpha$ - bzw. TZR $\beta$ -Domäne; die TZR $\alpha$ - und TZR $\beta$ -Kette ist über ein P2A-Element fusioniert [10]	Geneart AG, Regensburg, DE
Gensequenz des chimären TZR <sub>DP03</sub> [10] → codonoptimierte chimäre $\alpha$ - und $\beta$ -Kette von TZR <sub>DP03</sub> bestehend aus humaner variabler TZR $\alpha$ - bzw. TZR $\beta$ -Domäne und muriner konstanter TZR $\alpha$ - bzw. TZR $\beta$ -Domäne; die TZR $\alpha$ - und TZR $\beta$ -Kette ist über ein P2A-Element fusioniert [10]	Geneart AG, Regensburg, DE
Gensequenz iC9 [75] → humane katalytische Domäne der Caspase-9 und mutierte FKBP12-Domäne [75]	Geneart AG, Regensburg, DE
Gensequenz RC9 [75] → humane katalytische Domäne der Caspase-9, Dimerisierungsdomänen FKBP12 und FRB mit Linker L1 zwischen FRB und FKBP12 und L2 zwischen FKBP12 und der katalytischen Domäne [75]	Geneart AG, Regensburg, DE

### 2.1.14 Glykolipide

**Tabelle 13: Liste der verwendeten Glykolipide.**

<b>Glykolipide</b>	<b>Hersteller, Standorte</b>
$\alpha$ -GalCer	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD. Dr. Schneidawind der AG Schneidawind, Tübingen, DE
KRN7000	Sigma-Aldrich, St. Louis, US

### 2.1.15 Bakterien

**Tabelle 14: Liste der verwendeten Bakterien.**

<b>Bakterien</b>	<b>Hersteller, Standorte</b>
Kompetente Bakterien C2987	New England Biolabs, Ipswich, US
Kompetente Bakterien JM100	New England Biolabs, Ipswich, US



## 2.1.16 Software

**Tabelle 15: Liste der verwendeten Softwares.**

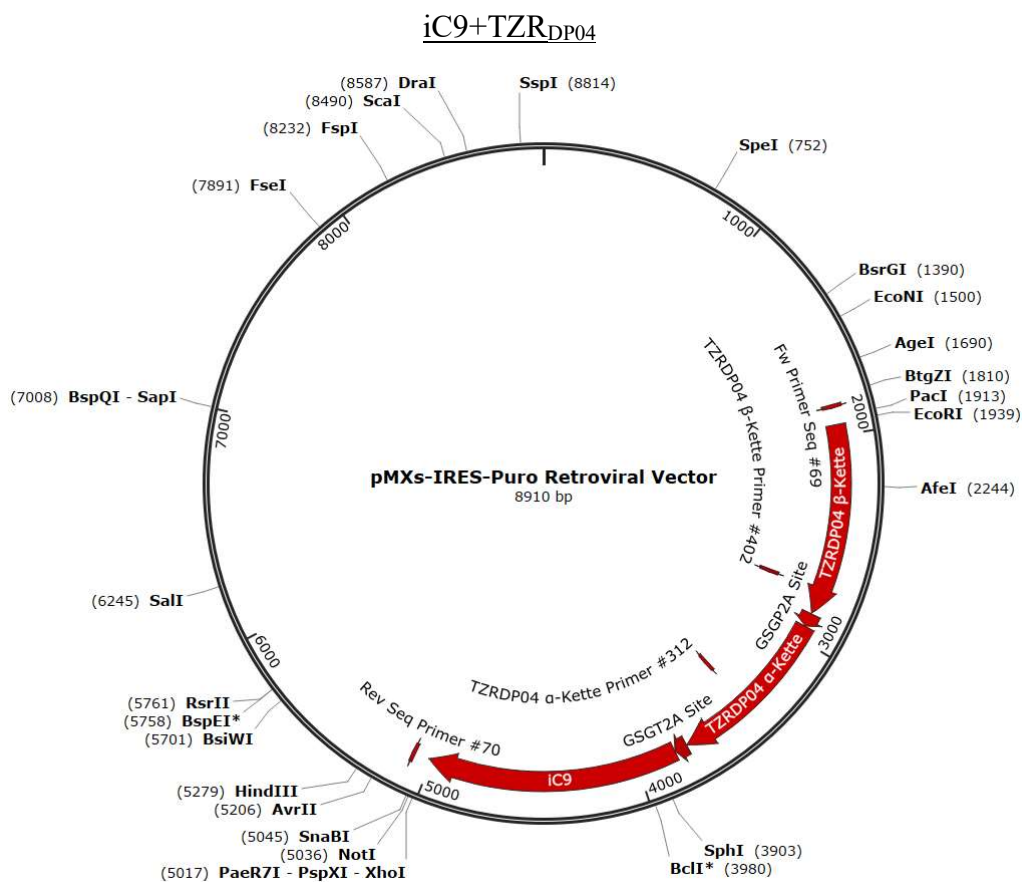
<b>Software</b>	<b>Hersteller, Standorte</b>
CellQuest Pro	BD Biosciences GmbH, Heidelberg, DE
CloneManager 9	Scientific and Educational Software, Morrisville, US
FlowJo v10.7	FlowJo LLC, Ashland, US
GraphPad Prism Version 9	GraphPad Software Inc., San Diego, US
ImmunoSpot	Cellular Technology Limited (CTL), Shaker Heights, US
ImmunoCapture	Cellular Technology Limited (CTL), Shaker Heights, US

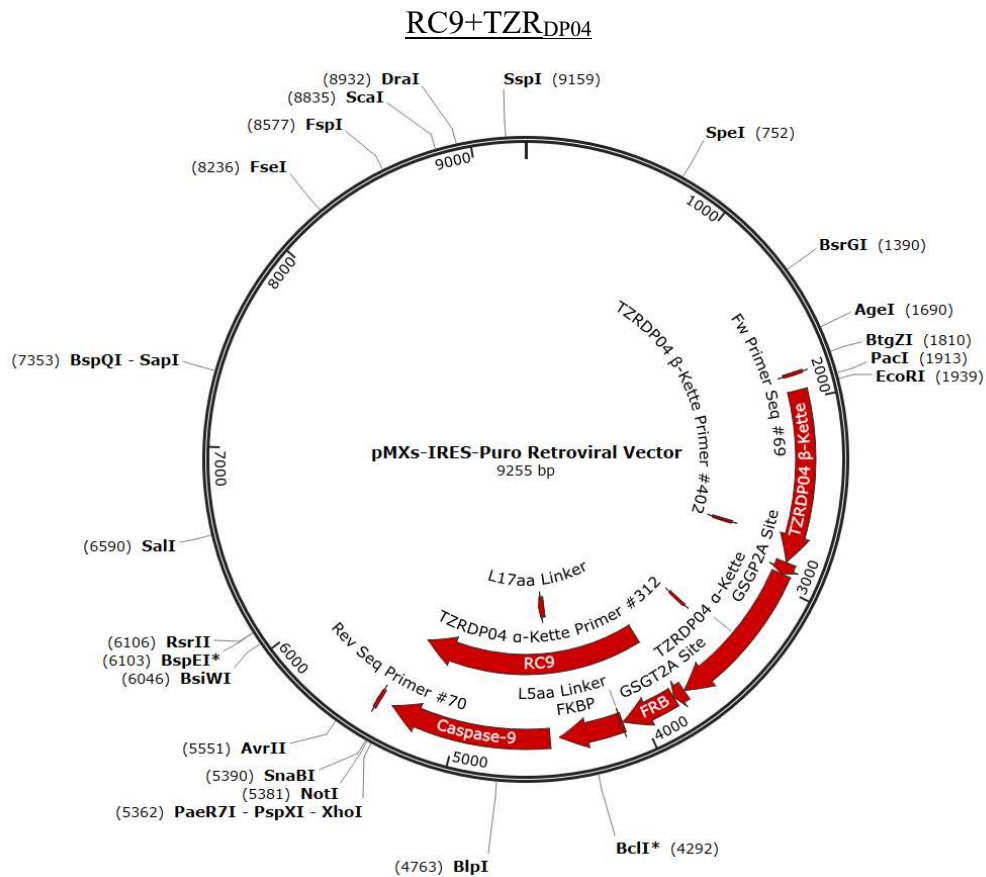
## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Gibson Assembly

Beim ersten Schritt zur Generierung einer TZR-modifizierten T-Zelle muss ein retroviraler Vektor mit DNA-Sequenzen kodierend für einen definierten TZR hergestellt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde hierzu ein Gibson Assembly durchgeführt. Als Gibson Assembly wird eine Methode zum nahtlosen Zusammenbau von DNA in der korrekten Reihenfolge mit Hilfe von Enzymen bezeichnet. Die Reaktion wird unter isothermalen Bedingungen mit drei Enzymen durchgeführt: eine 5' Exonuklease zur Bildung von langen Überhängen, eine DNA-Polymerase zum Ausfüllen der Lücken von Einzelstrang-Regionen und eine DNA-Ligase zum Verbinden der DNA-Sequenzen [132,133].

Hierzu sollte die kodierende Sequenz für die induzierbare Caspase-9 oder Rapamycin-induzierbare Caspase-9 und die kodierende Sequenz der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette des T-Zell-Rezeptors TZR<sub>DP04</sub> in den definierten Klonierungsbereich des retroviralen Vektors pMXs-IRES-Puro eingebaut werden (Abbildung 7).





**Abbildung 7: Vektorkarte des Vektors pMXs-IRES-Puro mit der kodierenden Sequenz der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette von TZR<sub>DP04</sub> [10] und iC9 oder RC9 [75].**

Für die folgenden Experimente mit dem Suizid-Gen-System iC9 oder RC9 wurde die Sequenz der induzierbaren Caspase-9 oder Rapamycin-induzierbaren Caspase-9 zusammen mit der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette des T-Zell-Rezeptors TZR<sub>DP04</sub> in den Vektor pMXs-IRES-Puro integriert.

Nachdem der Vektor mittels Restriktionsverdau linearisiert wurde, wurden 50 ng Vektor pMXs-IRES-Puro, der aus 5800 bp besteht, mit zwei jeweils überlappenden Fragmenten, die das Insert aus induzierbaren Caspase-9 [75] und TZR<sub>DP04</sub> [10] bilden, versetzt.

Es wurden nach Herstellerangaben jeweils 41 ng von Fragment 1 (1590 bp) und von Fragment 2 (1603 bp) eingesetzt. Nach Zugabe des Gibson Assembly Mastermix wurde diese Mischung eine Stunde bei 50 °C inkubiert. Die im Mastermix enthaltenen Enzyme Exonuklease, DNA-Polymerase und DNA-Ligase führen zum Einbau der Fragmente in den Vektor. Die Vektor-DNA wurde dann in chemisch kompetente *E. coli* (C2987) transformiert.

Das Bakterien-Vektor-Gemisch wurde nach der Inkubation für 30 Minuten auf Eis einem Hitzeschock bei 42 °C für 45 Sekunden unterzogen.

Nachdem die Proben für eine Minute auf Eis inkubiert wurden, wurden die Bakterien in antibiotikafreiem SOC-Medium für 60 Minuten bei 37 °C und 280 rpm geschüttelt.

Danach wurden die Bakterien in unterschiedlichen Mengen jeweils auf zwei Ampicillin enthaltenen Agarplatten über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach 14 bis 16 Stunden Inkubation wurden die Platten mit Parafilm umwickelt und bis zur weiteren Verarbeitung bei 8 °C gelagert. Transformierte Bakterien exprimierten die auf dem pMXs-IRES-Puro-Vektor kodierte Ampicillinresistenz und bildeten Kolonien.

### **2.2.2 Mini-Prep, Testrestriktion und Maxi-Prep**

Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte mittels Mini-Prep Kit nach Herstellerangabe von QIAGEN. Zuerst wurde eine alkalische Lyse der Bakterienzellen durchgeführt. Dann folgte die Adsorption der DNA über eine Siliciumdioxid-Membran in den QIA prep spin columns bei hoher Salzkonzentration. Nach mehreren Waschschritten konnte die DNA aus der Säule eluiert werden [134].

Zur Kontrolle der korrekten Insertion der Fragmente in den Vektor wurde ein Testverdau mit EcoRI und XhoI, da entsprechende Restriktionsstellen vor und nach dem Insert liegen, durchgeführt. Mittels Gel-Elektrophorese wurden 2 Banden (Insert 3193 bp und Vektor 5800 bp) nachgewiesen. Zur Vorbereitung der Sequenzierung wurden jeweils 5 µl der DNA-Proben, die zwei Banden mit entsprechender Basenpaaranzahl von Vektor und Insert zeigten, mit jeweils 5 µl Primer #69 (Forward), Primer #70 (Reverse) und Primer #402 und #312 für den Abschnitt zwischen Forward und Reverse versetzt. Primer sind Oligonukleotide, die den Startpunkt bei der Vervielfältigung der DNA anzeigen [135]. Die Proben wurden dann zur Sequenzierung des Inserts zu Eurofins Genomic geschickt. Mit dem Klon, dessen Sequenz zu 100 % mit der gewünschten Sequenz übereinstimmt, wurde eine Retransformation durchgeführt.

Der nächste Schritt war eine Maxi-Prep zur Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA. Die Durchführung erfolgte nach QIAGEN-Herstellerangaben. Wie bei der Mini-Prep erfolgte zuerst die alkalische Lyse der Bakterienzellen. Anschließend wurde das Lysat über QIAfilter Midi Cartridge filtriert und über QIAGEN-tips aufgereinigt [136]. Nach Elution der DNA konnte die DNA-Konzentration mit einem Spektralphotometer gemessen werden.

Die Gewinnung des Vektors mit dem Insert aus TZR<sub>DP04</sub> und Rapamycin-induzierbare Caspase-9 (RC9) erfolgte mit den gleichen weiter oben beschriebenen Schritten analog der Gewinnung des Vektors mit dem Insert der induzierbaren Caspase-9: Gibson Assembly, Mini-Prep, Testrestriktion, Sequenzierung und Maxi-Prep.

## 2.3 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Zum Auftauen von Zellen wurden die Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank zuerst im Wasserbad kurz angetaut. Sofort überführte man die Zellen in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen mit 25 ml angewärmten Medium DMEM und zentrifugierte die Zellsuspension bei 1500 rpm für fünf Minuten. Dann wurde der Überstand verworfen und die Zellen wurden in Medium resuspendiert. Im Anschluss wurden die Zellen gezählt und in den Versuchen verwendet.

Beim Wegfrieren von Zellen wurde zuerst die Zellzahl bestimmt. Nach der Zentrifugation der Zellen bei 1500 rpm für fünf Minuten wurde das Zellpellet in Einfriermedium resuspendiert, dass die gewünschte Zellzahl pro Ampulle in 1 ml Einfriermedium enthalten ist.

Als Einfriermedium wurde fetales Kälberserum (FCS) mit 10 Vol.-% Dimethylsulfoxid (DMSO) versetzt. Es wurde jeweils 1 ml Zellsuspension pro Ampulle verteilt. Die Ampullen wurden dann bei -80 °C im Stickstofftank eingefroren.

## 2.4 Retrovirale Transduktion

Die retrovirale Transduktion wurde zur stabilen Integration von TZR<sub>DP04</sub> und iC9 oder RC9 in T-Zellen durchgeführt. Virusproduzierende Zellen (PLAT-A Verpackungszelllinie) wurden mit der Plasmid-DNA der Caspase-/TZR-Konstrukte transfiziert und dann die T-Zellen mit den gewonnenen Viren im Überstand transduziert (Tabelle 16).

**Tabelle 16: Zeitlicher Ablauf der retroviralen Transduktion.**

Übersichtliche Darstellung, an welchen Tagen nacheinander die einzelnen Arbeitsschritte der retroviralen Transduktion Auftauen und Aussäen der PLAT-A-Zellen, MACS der T-Zellen, Transfektion der PLAT-A-Zellen mit Caspase-/TZR-Plasmid-Konstrukten, Retronectin-Beschichtung, Transduktion I/II der T-Zellen und Aussaat der T-Zellen durchgeführt wurden.

Tag	Arbeitsschritt
1	Auftauen der PLAT-A-Zellen
4	Aussäen der PLAT-A-Zellen MACS der T-Zellen
5	Transfektion der PLAT-A-Zellen mit Caspase-/TZR-Plasmid-Konstrukten
6	Beschichten der Platte mit Retronectin für die Transduktion
7	Transduktion I der T-Zellen
8	Transduktion II der T-Zellen Aussaat der T-Zellen

Für die Transfektion wurde die Verpackungszelllinie PLAT-A, die retrovirale iC9/RC9+TZR<sub>DP04</sub>-kodierende Viruspartikel für die Transduktion produzieren können, einen Tag vor der Transfektion ausgesät. Bei der Transfektion wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe des Transfektionsreagens in eukaryotische Zellen eingeschleust. Durch die Helferplasmide pCOLT-GALV und pHIT60 wurde die Plasmid-DNA in retrovirale Partikel verpackt, die über die Transduktion in die T-Zellen integriert wurden [137].

Pro Transfektionsansatz benötigte man 1,9 ml OptiMEM, je 6,5 µg der Helferplasmide (pCOLT-GALV und pHIT60), 11,5 µg Plasmid-DNA und 60 µl Transfektionslösung (TransIT®-LT1 Transfection Reagent). Für die Plasmid-DNA wurden ein Plasmid mit iC9 oder RC9 jeweils mit TZR<sub>DP04</sub> und als Kontrollen ein Plasmid nur mit TZR<sub>DP04</sub> und ein Leervektor verwendet. Der Transfektionsansatz wurde langsam unter ständigem Schwenken der PLAT-A-Zellen in die Zellkulturflasche getropft und die Flaschen bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach 48 Stunden konnte dann der retrovirale Überstand mit der Plasmid-DNA der transfizierten PLAT-A-Zellen geerntet werden.

Für die weitere Vorbereitung der Transduktion wurden CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> HLA-DPB1\*04:01-negative T-Zellen aus monozytären Zellen aus dem peripheren Blut (PBMCs) mittels magnetischer Zellseparation (MACS) isoliert (2.6).

Zur Vorbereitung wurde 16 bis 24 Stunden vor der Transduktion eine 12-Well-Platte mit 2 ml Retronectin pro Well beschichtet. Retronectin bindet Viren und Zielzellen über Bindungsdomänen und bewirkt damit, dass sich die Viren und T-Zellen am Boden der Well-Platte anreichern, wodurch die Übertragung der Plasmid-DNA vom Virus in die T-Zellen erleichtert wird [138].

Am darauffolgenden Tag fand die Transduktion I statt, also die Übertragung der Plasmid-DNA mit Hilfe der Viruspartikel in die T-Zelle. Dazu wurden 2 ml PBS mit 2 % BSA in die Retronectin-beschichtete Platte gegeben und für 30 Minuten inkubiert, um die unspezifischen Bindungen zu blockieren. Währenddessen wurde der Virusüberstand geerntet. Nach Entfernung des PBS mit 2 % BSA aus der 12-Well-Platte wurden jeweils 4 ml des jeweiligen Virusüberstandes in die 12-Well-Platte gegeben und zentrifugiert.

Danach wurden die Virus-Überstände mit jeweils ca. 4 bis 5 Mio. T-Zellen in 500 µl T-Zell-Medium tropfenweise versetzt. Zu jedem Ansatz wurde noch 300 U IL-2 gegeben und die Platten zentrifugiert, damit sich die Viruspartikel und T-Zellen in räumlicher Nähe befinden. Anschließend wurde die fertige 12-Well-Platte für einen Tag bei 37 °C inkubiert.

Am nächsten Tag erfolgte die Transduktion II, welche aus den gleichen Schritten wie die Transduktion I besteht. Zum Abschluss wurden die T-Zellen der Transduktion II für etwa fünf Stunden bei 37 °C inkubiert. Zum Stoppen der Transduktion wurden die T-Zellen resuspendiert, gezählt und in einer 24-Well-Platte wie unter 2.7 beschrieben kultiviert.

Nach drei Tagen Inkubation bei 37 °C wurde die Transduktionseffizienz mittels fluoreszenzaktivierter Durchflusszytometrie (FACS) mit den Färbungen CD4-APC oder CD8-APC und Vβ13.2-PE ermittelt (2.8). Während CD4-APC oder CD8-APC die Oberflächenmoleküle CD4 der CD4<sup>+</sup> T-Zellen oder CD8 der CD8<sup>+</sup> T-Zellen markieren, bindet der FACS-Antikörper Vβ13.2-PE an TZR<sub>DP04</sub> über die Erkennung der TZRβ-Kette der Vβ13.2-Subfamilie.

Um nicht-transduzierte Zellen zu entfernen, folgte die Selektion der transduzierten T-Zellen mit Puromycin. Puromycin ist als Resistenzgen im Leervektor enthalten. Mit einer Durchflusszytometrie mit CD4-APC oder CD8-APC und Vβ13.2-PE wurde nach drei Tagen Inkubation die Selektionseffizienz ermittelt. Die Selektionseffizienz zeigte an, wie viele von den vorliegenden kultivierten Zellen nach Selektion mit Puromycin TZR<sub>DP04</sub> exprimieren.

Um den Anteil an TZR<sub>DP04</sub>-exprimierenden Zellen noch zu erhöhen, wurde ein Teil der iC9/RC9+TZR<sub>DP04</sub>- und TZR<sub>DP04</sub>-transduzierten T-Zellen nach TZR<sub>DP04</sub>-hochexprimierenden T-Zellen über FACS mit Hilfe von Vβ13.2-PE sortiert.

## **2.5 Isolation von PBMCs durch Pancoll-Dichtegradientenzentrifugation**

Um isolierte monozytäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) zu erhalten, wurde eine Pancoll-Dichtegradientenzentrifugation von peripherem Blut freiwilliger Spender durchgeführt. Hierbei wurden mononukleäre Zellen aufgrund verschiedener Dichten von anderen Zellen getrennt.

Zuerst wurden 15 ml Pancoll als Trennlösung aus dem neutralen, hochvernetzten, hydrophilen Polymer der Sucrose [139] in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gefüllt. Das periphere Blut (PB) wurde mit PBS im Verhältnis 1:1 gemischt, um dann Pancoll mit dem PB-PBS-Gemisch zu beschichten.

Anschließend erfolgte eine Zentrifugation des Zentrifugenröhrchens bei 2200 rpm für 20 Minuten. Danach wurde die Interphase, die die mononukleären Zellen enthält, mit der Pipette abgenommen und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben. Nach dem Auffüllen mit PBS auf 50 ml erfolgte eine Zentrifugation bei 1500 rpm für sieben Minuten.

Der Überstand wurde abgeschüttet und es wurde erneut mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und bei 1500 rpm für sieben Minuten zentrifugiert. Dann wurde das Zellpellet mit PBS resuspendiert. Die isolierten mononukleären Zellen wurden mittels Trypanblaufärbung in der Neubauer-Zählkammer gezählt und für die weiteren Versuche, wie MACS oder iNKT-Zellexpansion, eingesetzt.

## 2.6 Magnetische Zellseparation (MACS)

Zur Transduktion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit TZR<sub>DP04</sub> mussten die T-Zellen zuerst aus PBMCs eines gesunden Spenders, die mit Hilfe der Pancoll-Dichtegradientenzentrifugation erhalten wurden, separiert werden. Dies erfolgte mit Hilfe von Beads, Antikörper-gebundenen magnetischen Partikeln, und einem Magneten von Miltenyi.

Durch den Magneten konnten die gewünschten Zellen abgetrennt werden, da nur diese Zellen durch die gebundenen Beads magnetisch sind. So konnten CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit CD4-Beads, CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit CD8-Beads und iNKT-Zellen mit Anti-iNKT-Beads aus PBMCs gewonnen werden. Während die CD4-Beads oder CD8-Beads die Oberflächenmoleküle CD4 der CD4<sup>+</sup> T-Zellen oder CD8 der CD8<sup>+</sup> T-Zellen erkennen, binden die Anti-iNKT-Beads die invariante TZR $\alpha$ -Kette V $\alpha$ 24J $\alpha$ 18 der iNKT-Zellen.

Nach dem Auftauen von PBMCs eines gesunden Spenders wurde das Pellet in 144  $\mu$ l MACS-Puffer und 36  $\mu$ l Beads resuspendiert und für 20 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden 10 ml MACS-Puffer zugegeben und nochmals bei 1 500 rpm für fünf Minuten zentrifugiert. Die LS-Säule wurde in den Magnetständer eingebaut und ein 50 ml Zentrifugenröhrchen darunter gestellt. Zuerst ließ man 3 ml MACS-Puffer per Schwerkraft durch die Säule laufen. Nachdem das Pellet in 500  $\mu$ l MACS-Puffer resuspendiert wurde, wurde die Zellsuspension auf die Säule gegeben und per Schwerkraft durchlaufen gelassen. Es folgten dann drei Waschgänge mit jeweils 3 ml MACS-Puffer durch die Säule zur Entfernung der nicht-magnetischen Zellen. Nach dem Entnehmen der Säule vom Magneten wurde zwei Mal jeweils 5 ml MACS-Puffer auf die Säule gegeben und mit dem Stempel wurde die Flüssigkeit durch die Säule gedrückt. Dabei wurde die Zellsuspension der markierten Zellen in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Die isolierten CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/iNKT-Zellen wurden mittels Trypanblaufärbung in der Neubauer-Zählkammer gezählt und in einer 24-Well-Platte kultiviert und stimuliert, bis die Zellen in den weiteren Versuchen wie retrovirale Transduktion oder Elektroporation eingesetzt wurden.



## **2.7 Kultivierung von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen**

Nach Durchführung der magnetischen Zellseparation wurden die isolierten CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen in einer 24-Well-Platte mit AIM-V und 10 Vol.-% Humanserum ausgesät. Hierfür wurden jeweils 2 Mio. T-Zellen in 2 ml pro Well verteilt. Zur Stimulation der T-Zellen wurden 4 µl/ml (100 U/ml) IL-2, 1 µl/ml (5 ng/ml) IL-7, 1 µl/ml (5 ng/ml) IL-15 und 5 µl/ml CD3/CD28-Beads zugesetzt und bei 37 °C inkubiert. Nach Vermehrung der T-Zellen auf 1,5 bis 2 Mio. pro ml wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 gesplittet und 1 ml AIM-V mit 10 Vol.-% Humanserum und 4 µl/ml (100 U/ml) IL-2 hinzugefügt.

## **2.8 Fluoreszenzaktivierte Durchflusszytometrie (FACS)**

Zur Analyse der Expression der T-Zell-Rezeptoren an der Zelloberfläche wurden die T-Zellen mittels fluoreszenzaktivierter Durchflusszytometrie (FACS) untersucht. Vor der Durchflusszytometrie wird ein fluoreszierender Antikörper an die Zellen konjugiert. Bei der Durchflusszytometrie werden einzelne Zellen in einem Flüssigkeitsstrom mit Hilfe von Laserstrahlen untersucht. Die vom Laserstrahl getroffenen Zellen erzeugen unterschiedliche Lichtstreuung und fluoreszierende Lichtsignale, welche von Detektoren gemessen werden. Das Streulicht wird in zwei verschiedenen Richtungen detektiert. Mit dem Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) kann die Zellgröße bestimmt werden und mit dem Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC) kann die interne Komplexität und Granulation der Zelle analysiert werden [140].

Es wurden jeweils 0,1 Mio. Zellen pro Ansatz in FACS-Tubes überführt und mit 1 ml PBS und 2 Vol.-% FCS gewaschen. Die Zellpellets wurden dann mit dem jeweiligen FACS-Antikörper resuspendiert und zur Bindung des Antigens für 30 Minuten im Kühlschrank inkubiert (Tabelle 17). Im Anschluss wurden die FACS-Tubes mit 1 ml PBS und 2 Vol.-% FCS gewaschen, um überschüssige Antikörper zu entfernen. Die Zellpellets wurden in 200 µl FACS-Fix resuspendiert und die Durchflusszytometrie wurde mit BD FACS Calibur durchgeführt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte über die Software FlowJo.

**Tabelle 17: Markierung von Oberflächenmolekülen durch bestimmte FACS-Antikörper.**

In der Tabelle werden die eingesetzten FACS-Antikörper mit zugehörigem Konjugat und Klon aufgelistet. In den weiteren Spalten werden die eingesetzte Menge der FACS-Antikörper angegeben und die Oberflächenmoleküle beschrieben, die in der Durchflusszytometrie durch die FACS-Antikörper erkannt werden.

<b>FACS-Antikörper</b>	<b>Konjugat</b>	<b>Klon</b>	<b>Eingesetzte Menge des Antikörpers</b>	<b>Markiertes Oberflächenmolekül</b>
CD4	APC	RPA-T4	1 µl	CD4 der CD4 <sup>+</sup> T-Zellen
CD8	APC	RPA-T8	1 µl	CD8 der CD8 <sup>+</sup> T-Zellen
CD3	APC	UCHT1	2 µl	CD3 der T-Zellen
Vβ13.2	PE	JU74.3	2,5 µl	TZRβ-Kette von TZR <sub>DP04</sub> der Vβ13.2-Subfamilie
Mucβ	PE	H57-597	2,5 µl	murine konstante TZRβ-Kette von TZR <sub>DP03</sub>
Anti-iNKT	PE	REA1054	2 µl	invariante TZRα-Kette Vα24Jα18 der iNKT-Zellen
PBS57 Tetramer	PE		1 µl	invariante TZRα-Kette Vα24Jα18 der iNKT-Zellen

## **2.9 IFN-γ ELISpot zur funktionellen Testung des T-Zell-Rezeptors TZR<sub>DP04</sub>**

Mit Hilfe des IFN-γ ELISpots wurde die TZR<sub>DP04</sub>-vermittelte Reaktivität der T-Zellen oder iNKT-Zellen untersucht.

Der enzymgekoppelte Immun-Spot-Test (Enzyme-linked immunosorbent spot, ELISpot) ist eine quantitative Methode zur Messung relevanter Parameter der T-Zell-Aktivierung. Das Prinzip des IFN-γ ELISpots ist der Nachweis des Zytokins IFN-γ, welches bei der T-Zell-Aktivierung ausgeschüttet wird, mittels zweier IFN-γ spezifischer Antikörper (AK) [141].

Am Vortag des ELISpot-Nachweises wurde die Polyvinylidenfluorid-Membran auf der Platte aktiviert. Die Wells der ELISpot-Platte wurden jeweils mit 20 µl 35 % Ethanol benetzt und danach mit PBS gewaschen. Dann wurde die Platte mit dem ersten Antikörper Anti-human IFN-γ-Mab1-D1k versetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Zur Blockade unspezifischer Bindungen wurden 100 µl AIM V mit 10 Vol.-% Humanserum pro Well verwendet. Es wurden Responder-Zellen (T-Zellen/iNKT-Zellen) ausgesät und danach wurden Target-Zellen (LCLs/Fibroblasten/AML-Blasten) zugetropft. Anschließend wurde die pipettierte IFN- $\gamma$  ELISpot-Platte für 20 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Nach 20 Stunden Inkubation wurden die Zellen abgenommen und die Platte sechs Mal mit PBS 0,05 % TWEEN gewaschen. Der zweite Antikörper Anti-human IFN- $\gamma$  mAB 7-B6-1-Biotin wurde zugegeben und die Platte für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Platte erneut wie oben erläutert gewaschen. Der Streptavidin-Peroxidase ABC-Komplex (Vectastain) wurde zugegeben, für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert und drei Mal mit Waschpuffer und drei Mal mit PBS gewaschen. Der Streptavidin-Peroxidase ABC-Komplex bindete an den zweiten Antikörper, der mit Biotin gekoppelt war. Zur Farbreaktion wurde das AEC-Substrat (3-Amino-9-Ethyl-carbazole) zugegeben. Das AEC-Substrat wurde von der Peroxidase, die im ABC-Komplex mit Streptavidin enthalten war, zu einem roten Farbstoff umgesetzt [141]. Die rot gefärbten Punkte wurden mittels C.T.L. Immunospot Reader gescannt und gezählt.

## 2.10 Apoptose-Messungen

Um die Funktion der induzierbaren Caspase-9 zu testen, wurden die Apoptoseraten der transduzierten T-Zellen nach Behandlung mit Dimerisierer AP20187 mittels Durchflusszytometrie und der Färbung Annexin V-FITC ermittelt.

Annexin V bindet an Phosphatidylserin, ein Bestandteil der Lipiddoppelschicht von Zellmembranen. Das Phosphatidylserin befindet sich meist an der inneren Lipidschicht der Zellmembran. Bei Apoptose-Vorgängen wandert Phosphatidylserin jedoch an die Außenseite der Zellmembran [142], kann dort Annexin V binden und markiert so apoptotische Zellen [143–145].

Für die Apoptose-Messungen wurden die transduzierten T-Zellen, die TZR<sub>DP04</sub> und iC9 exprimieren, und als Kontrolle nur TZR<sub>DP04</sub>-exprimierende T-Zellen, in eine 48-Well-Platte in ca. 1 Mio. T-Zellen pro ml Medium AIM V mit 10 % Humanserum und 2 µl/ml (50 U/ml) IL-2, 1 µl/ml (5 ng/ml) IL-7, 1 µl/ml (5 ng/ml) IL-15 ausgesät. Dann wurden 24 Stunden und 48 Stunden vor der FACS-Messung verschiedene Konzentrationen von 0 bis 1000 nmol/l Dimerisierer AP20187 in die entsprechenden Wells zugegeben. Nach der jeweiligen Inkubationszeit erfolgte die Durchflusszytometrie mit Annexin V-FITC.

Zuerst wurden die toten und lebenden Zellen in den verschiedenen Ansätzen jeweils zwei Mal mittels Trypanblaufärbung in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Für die FACS-Färbung wurden pro Ansatz 0,1 Mio. T-Zellen in FACS-Tubes übernommen und zwei Mal mit PBS gewaschen. Dann wurden 100 µl Annexin-Bindungspuffer und 3 µl Annexin V-FITC hinzugegeben.

Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit wurde nochmals 100 µl Annexin-Bindungspuffer hinzugegeben, gevortext und anschließend folgte die FACS-Messung innerhalb einer Stunde.

Die Apoptose-Messungen wurden auch zur funktionellen Testung der Rapamycin-induzierbaren Caspase-9 (RC9) analog zur induzierbaren Caspase-9 (iC9) durchgeführt. Hierfür wurden die jeweiligen Dimerisierer Rapamycin oder Rapalog für RC9 und AP20187 für iC9 zur Aktivierung der Suizid-Gen-Systeme eingesetzt.

## 2.11 Lyse-Messungen

Als weitere Methode zur Ermittlung der Apoptoseraten nach Behandlung mit Dimerisierer AP20187 wurde das CytoTox-Glo Zytotoxizitäts-Assay Kit von Promega angewandt. Das Prinzip beruht auf der Bestimmung der Anzahl toter Zellen durch Lumineszenzmessung. Das luminogene Peptidsubstrat Acetylaminofluoren-Aminoluciferin wurde nach Freisetzung der Protease Tripeptidyl Peptidase II aus den toten Zellen in Acetylaminofluoren und Aminoluciferin gespalten [146]. Mit Hilfe einer katalytischen Substratumsetzung durch die Luciferase wurden die Lumineszenzwerte bestimmt, die mit der Anzahl toter Zellen korrelierten [147].

Es wurden jeweils ca. 20 000 transduzierte T-Zellen pro Ansatz in eine weiße 96-Well-Platte pipettiert. Auch hier wurden iC9+TZR<sub>DP04</sub>-transduzierte T-Zellen und als Kontrolle nur TZR<sub>DP04</sub>-transduzierte T-Zellen verwendet und alle T-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Dimerisierer AP20187 für 24 Stunden beziehungsweise 48 Stunden exponiert.

Das Cyto Tox Glo-Substrat Acetylaminofluoren-Aminoluciferin wurde zugegeben, was durch die Protease der toten Zellen so umgewandelt wurde, dass mit Hilfe einer katalytischen Reaktion durch die Luciferase die Lumineszenz gemessen werden konnte [147]. Nach der ersten Lumineszenzmessung folgte die Zugabe des Lyse-Reagenzes und die zweite Lumineszenzmessung zur Bestimmung der maximalen Lyse nach Abtöten aller vorliegenden Zellen.

Von dem ersten Lumineszenzwert und der maximalen Lyse wurde jeweils der Lumineszenzwert der Kontrolle ohne Zellen subtrahiert und diese beiden Werte dividiert. Das Ergebnis ergab die Lyse in Prozent.

Die Lyse-Messungen wurden analog zur Bestimmung der Lyse von RC9-transduzierten T-Zellen nach Aktivierung von RC9 durch Rapamycin mit RC9+TZR<sub>DP04</sub>- und TZR<sub>DP04</sub>-transduzierten T-Zellen durchgeführt.

## 2.12 Expansion der iNKT-Zellen

Die invarianten Natürlichen Killer T (iNKT)-Zellen kann man aus frischem peripherem Blut gewinnen. Wegen dem geringen iNKT-Zellanteil im peripheren Blut müssen die iNKT-Zellen zuerst expandiert werden. Nach der Pancoll-Durchführung wurden die vorliegenden PBMCs in ca. 2 Mio. Zellen pro ml iNKT-Medium aufgenommen und mit 4 µl/ml (100 U/ml) IL-2 und 0,5 µl/ml (100 ng/ml) Glykolipid KRN7000 in eine 24-Well-Platte ausgesät. Das Glykolipid KRN7000 ist ein Analogon von α-Galactosylceramid, welches *in vitro* zur Stimulation der iNKT-Zellen eingesetzt wird [79,88].

Nach sieben Tagen Inkubation bei 37 °C wurde der Anteil an iNKT-Zellen in der Kultur mittels Durchflusszytometrie mit CD3-APC und PBS57 Tetramer-PE oder Anti-iNKT-PE ermittelt. PBS57 ist wie KRN7000 ein Analogon von α-Galactosylceramid und ist über die ungesättigte Acyl-Kette an vier CD1d-Molekülen gebunden. Dadurch kann PBS57 Tetramer-PE wie Anti-iNKT-PE an den T-Zell-Rezeptor mit der invarianten TZRα-Kette Vα24Jα18 der iNKT-Zellen binden [95]. Die kultivierten Zellen wurden dann mit Glykolipid-beladenen und mit 30 Gy bestrahlten allogenen PBMCs als Feeder-Zellen im Verhältnis 1:2 restimuliert. Von diesen wurden wieder ca. 2 Mio. kultivierte Zellen pro ml iNKT-Medium mit 4 µl/ml (100 U/ml) IL-2 und 0,5 µl/ml (100 ng/ml) KRN7000 in eine 12-Well-Platte ausgesät.

Nach 14 Tagen Kultivierung wurde die Restimulierung wie am Tag 7 wiederholt und die kultivierten Zellen wieder mit den Feeder-Zellen in Verhältnis 1:2 in ca. 2 Mio./ml mit 4 µl/ml (100 U/ml) IL-2 und 0,5 µl/ml (100 ng/ml) KRN7000 in eine 6-Well-Platte ausgesät. An Tag 14 oder 21 konnten die iNKT-Zellen mittels MACS mit Anti-iNKT-Beads nach Anleitung von Miltenyi isoliert werden (2.6).

## 2.13 Elektroporation der iNKT-Zellen mit RNA von TZR<sub>DP04</sub> und TZR<sub>DP03</sub>

Um die Eigenschaften der iNKT-Zellen als adoptive T-Zellen testen zu können, wurde für den T-Zell-Rezeptor TZR<sub>DP04</sub> oder TZR<sub>DP03</sub> kodierende *in vitro*-transkribierte mRNA, die im Labor schon vorhanden war, über eine Elektroporation in die isolierten iNKT-Zellen eingebracht. Durch einen Strompuls wurde die Zellmembran kurzzeitig permeabel und die RNA konnte in das Zellinnere eingeschleust werden.

Es wurden jeweils 3 Mio. iNKT-Zellen für die drei Ansätze Mock, TZR<sub>DP04</sub> und TZR<sub>DP03</sub> eingesetzt. Nach Zentrifugation der iNKT-Zellen bei 1 000 rpm wurden diese zuerst mit farblosem RPMI-Medium und anschließend mit OptiMEM gewaschen. Der Elektroporator wurde angeschaltet und das Standardprogramm mit den Eingaben Square Wave 3, Spannung 5 ms, Puls 1, Intervall 0, Küvetten 4 mm und Spannung 500 V eingestellt.

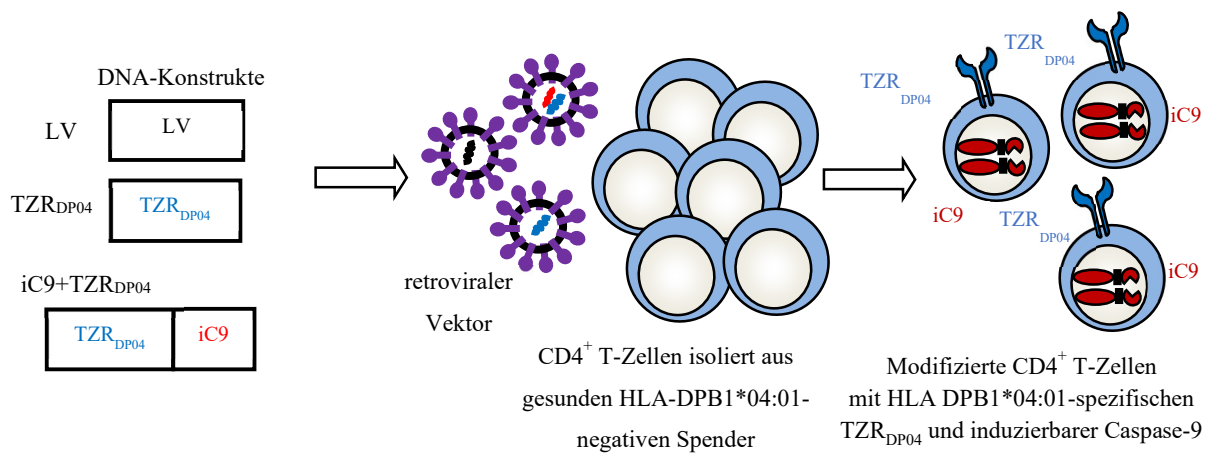
Es wurden jeweils 10 µg RNA TZR<sub>DP04</sub> oder TZR<sub>DP03</sub> in der Küvette vorgelegt und die iNKT-Zellsuspension hinzugegeben. Beim Ansatz Mock wurde nur die Zellsuspension in die Küvette überführt. Nach Abgabe des Strompulses konnte die Zellsuspension in das vorgelegte Medium überführt werden und bei 37 °C für vier bis zehn Stunden inkubiert werden. Zur Kontrolle der Elektroporation wurde eine Durchflusszytometrie mit Vβ13.2-PE zur Erkennung der TZRβ-Kette der Vβ13.2-Subfamilie von TZR<sub>DP04</sub> und Mucβ-PE zur Erkennung der murinen konstanten TZRβ-Kette von TZR<sub>DP03</sub> zum Nachweis der jeweiligen TZR-RNA in den Zellen durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Aktivität der induzierbaren Caspase-9 (iC9) und Rapamycin-induzierbaren Caspase-9 (RC9) in T-Zellen

##### 3.1.1 Expression von TZR<sub>DP04</sub> in iC9- und RC9-transduzierten T-Zellen

Die Aktivität der Suizid-Gen-Systeme iC9 und RC9 in TZR<sub>DP04</sub>-exprimierenden T-Zellen wurde untersucht. Dazu wurden T-Zellen eines gesunden HLA-DPB1\*04:01-negativen Spenders verwendet und mit den verschiedenen Konstrukten Leervektor (LV), HLA-DPB1\*04:01-spezifischer T-Zell-Rezeptor (TZR<sub>DP04</sub>) und induzierbare Caspase-9 kombiniert mit TZR<sub>DP04</sub> (iC9+TZR<sub>DP04</sub>) transduziert (Abbildung 8).

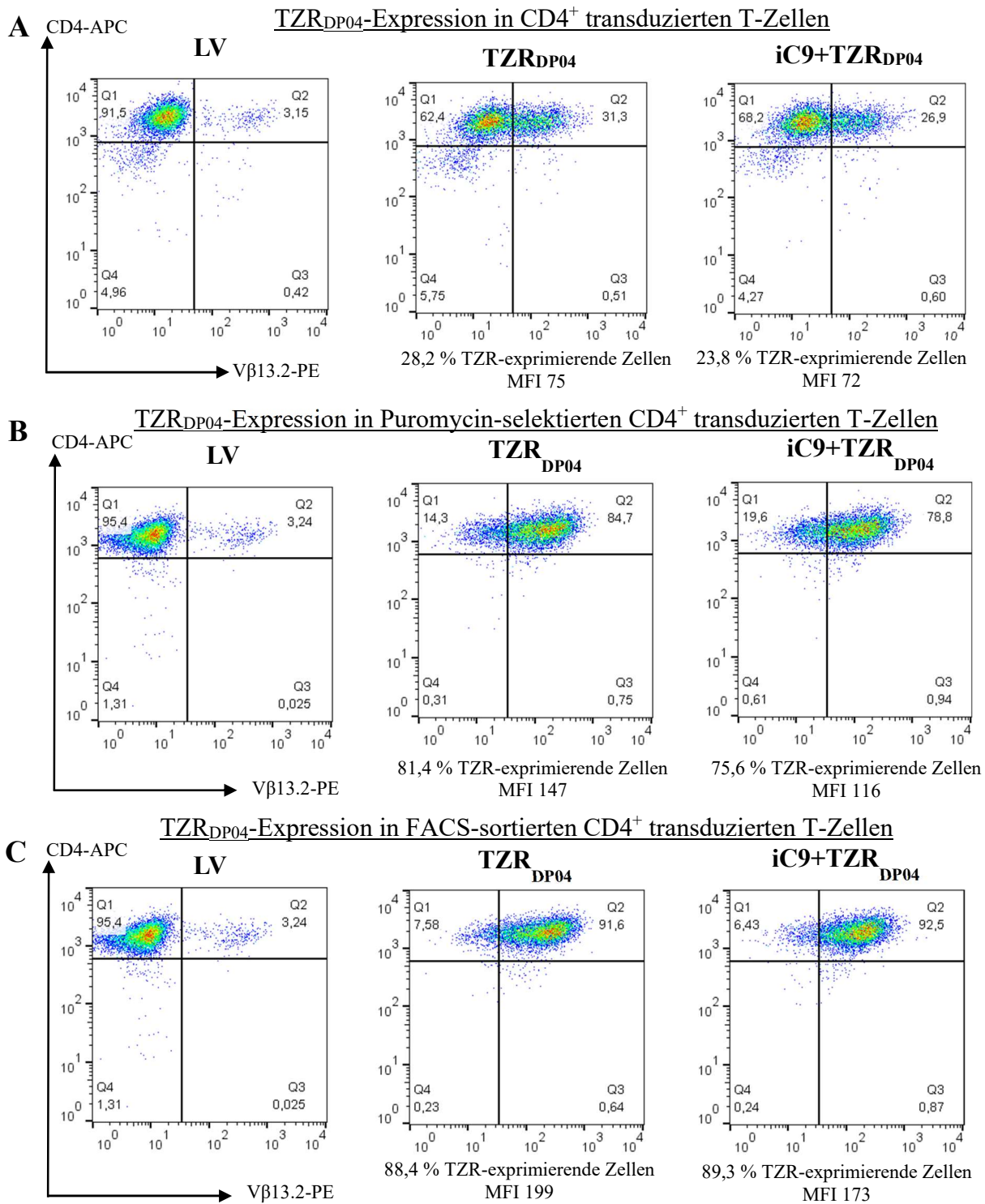


**Abbildung 8: Schematische Darstellung der Transduktion der DNA-Konstrukte LV, TZR<sub>DP04</sub> und iC9+TZR<sub>DP04</sub> in T-Zellen eines gesunden HLA-DPB1\*04:01-negativen Spenders.**

Für die Versuche mit dem Suizid-Gen-System induzierbare Caspase-9 wurden die verschiedenen DNA-Konstrukte LV, TZR<sub>DP04</sub> und iC9+TZR<sub>DP04</sub> mittels retroviraler Transduktion in die T-Zellen eines HLA-DPB1\*04:01-negativen Spenders eingebracht.

Die Transduktionseffizienz von Donor 199 lag bei TZR<sub>DP04</sub>-transduzierten T-Zellen bei 28,2 % und bei iC9+TZR<sub>DP04</sub>-transduzierten T-Zellen bei 23,8 % (Abbildung 9A). Nach Selektion mit Puromycin (Puro) lagen 75 % bis 80 % TZR<sub>DP04</sub>-exprimierende T-Zellen vor (Abbildung 9B). Um den Anteil der TZR<sub>DP04</sub>-hochexprimierenden T-Zellen zu erhöhen, wurden alternativ zur Puromycin-Selektion T-Zellen nach der Transduktion mit Hilfe der Durchflusszytometrie auf Vβ13.2 sortiert. Hierbei wurden ca. 90 % TZR<sub>DP04</sub>-hochexprimierende T-Zellen erhalten (Abbildung 9C).

**Donor 199**



**Abbildung 9: Expression von TZR<sub>DP04</sub> in CD4<sup>+</sup> iC9+TZR<sub>DP04</sub>- und TZR<sub>DP04</sub>-transduzierten T-Zellen von Spender 199.**

CD4<sup>+</sup> T-Zellen des HLA-DPB1\*04:01-negativen Spenders 199 wurden mit Leervektor (LV), TZR<sub>DP04</sub> und iC9+TZR<sub>DP04</sub> transduziert. Die Transduktionseffizienz wird unter (A) gezeigt. Anschließend wurden die transduzierten T-Zellen bei (B) mit Puromycin selektiert und bei (C) nach TZR<sub>DP04</sub>-hochexprimierenden T-Zellen mittels FACS sortiert. Nach Färbung mit CD4-APC und Vβ13.2-PE wurde der Anteil an TZR<sub>DP04</sub>-exprimierenden T-Zellen ermittelt. Der FACS-Antikörper CD4-APC erkennt CD4 auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Vβ13.2-PE-Antikörper markiert TZR<sub>DP04</sub> über die Erkennung der TZRβ-Kette der Vβ13.2-Subfamilie. Diese Abbildung ist eine repräsentative Abbildung von Spender 199 und ist gleich mit den Ergebnissen der Versuche mit Donor 232, 221 und 170.



Neben dem Konstrukt der induzierbaren Caspase-9 (iC9) wurde im Rahmen dieses Projekts auch die Rapamycin-induzierbare Caspase-9 (RC9) getestet. Zum Vergleich der beiden Caspase-Konstrukte wurden T-Zellen eines gesunden HLA-DPB1\*04:01-negativen Spenders mit RC9+TZR<sub>DP04</sub> oder iC9+TZR<sub>DP04</sub> transduziert. Als Kontrollen wurden nur TZR<sub>DP04</sub> und Leervektor (LV) in T-Zellen mittels Transduktion eingeschleust.

Die Expression von TZR<sub>DP04</sub> wurde wieder im Anschluss mittels einer Durchflusszytometrie mit CD4-APC und V $\beta$ 13.2-PE ermittelt.

Die T-Zellen mit Leervektor zeigten bis zu ca. 3 % an V $\beta$ 13.2-positive Zellen, was auf die endogene Expression von V $\beta$ 13.2-positiven T-Zell-Rezeptoren zurückzuführen ist.

Die Transduktionseffizienz von Donor 149 vor der Puromycin-Selektion lag bei TZR<sub>DP04</sub>-transduzierten T-Zellen bei 45,6 %, bei iC9+TZR<sub>DP04</sub>-transduzierten T-Zellen bei 20,8 % und bei RC9+TZR<sub>DP04</sub>-transduzierten T-Zellen bei 13,5 % (Abbildung 10A).

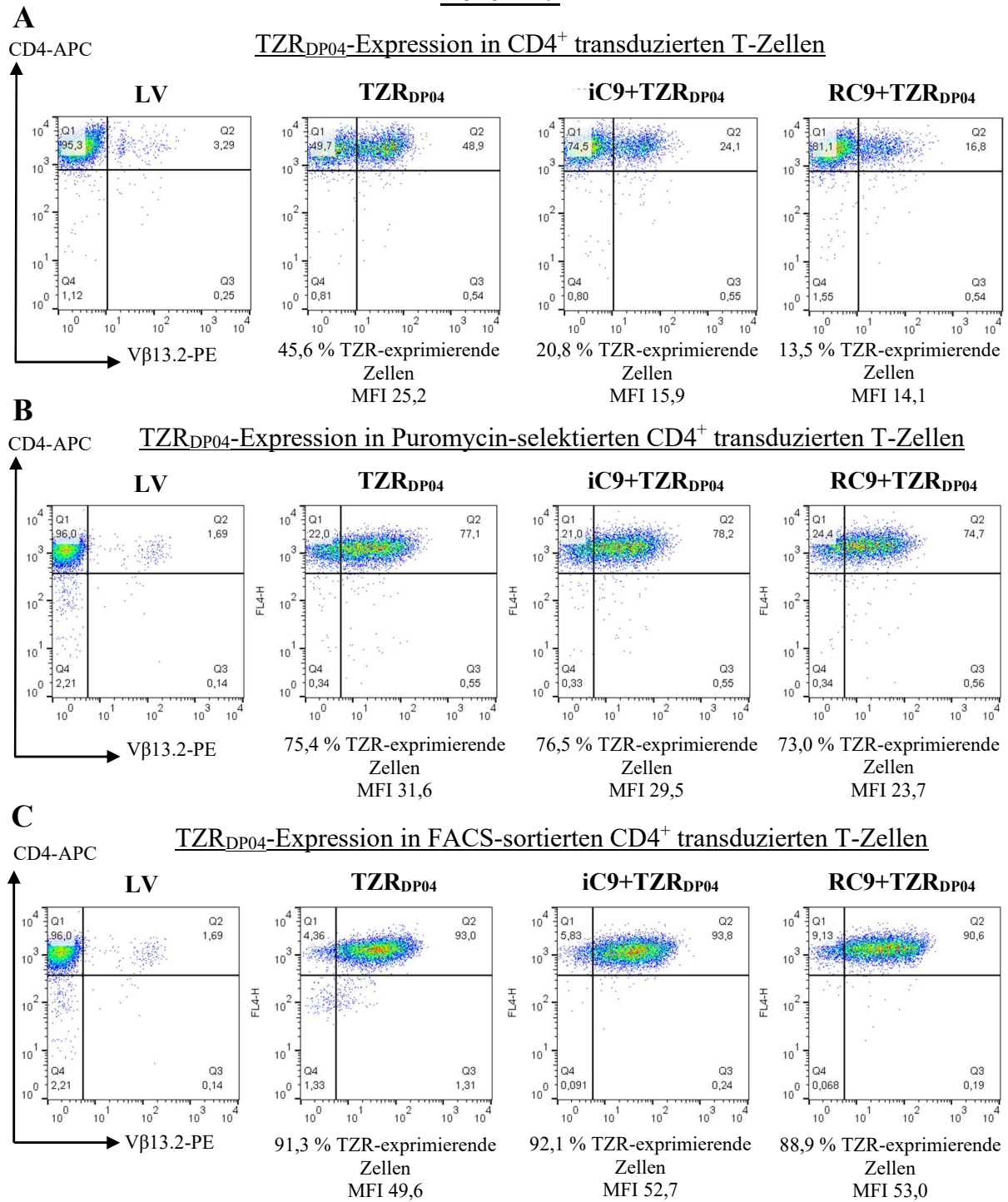
Nach der Selektion mit Puromycin wurde ein Anteil von ca. 75 % TZR<sub>DP04</sub>-exprimierenden T-Zellen in allen Ansätzen erreicht (Abbildung 10B).

Dagegen lagen nach dem Sortieren von TZR<sub>DP04</sub>-hochexprimierenden T-Zellen mittels FACS bis zu 90 % V $\beta$ 13.2-positive T-Zellen vor (Abbildung 10C).

Somit konnte der T-Zell-Rezeptor TZR<sub>DP04</sub> erfolgreich zusammen mit der induzierbaren Caspase-9 oder Rapamycin-induzierbaren Caspase-9 exprimiert werden. Dabei ist die TZR-Expression unverändert im Vergleich zu TZR<sub>DP04</sub>-transduzierten T-Zellen.

Während der Kultivierung der transduzierten T-Zellen war auffällig, dass sich die Expression von TZR<sub>DP04</sub> über die Zeit kontinuierlich verändert hat. Allgemein war eine verminderte Expression nach längerer Kultivierung nachweisbar. Die TZR<sub>DP04</sub>-Expression variierte auch durch die Art der Stimulation, die Zugabe von CD3/28-Beads allein oder der zusätzlichen Zugabe von Zytokinen IL-2, IL-7 und IL-15. Wir vermuten, dass die unterschiedliche Stimulation zu unterschiedlichen Zellkonzentrationen und Wachstumseigenschaften führte. Wenn die T-Zellen stark proliferiert haben, wurde eine eher höhere Expression von TZR<sub>DP04</sub> beobachtet. Durch die unterschiedliche TZR<sub>DP04</sub>-Expression wurden dann auch die Ergebnisse in den nachfolgenden Analysen der Apoptose und Lyse beeinflusst.

### Donor 149



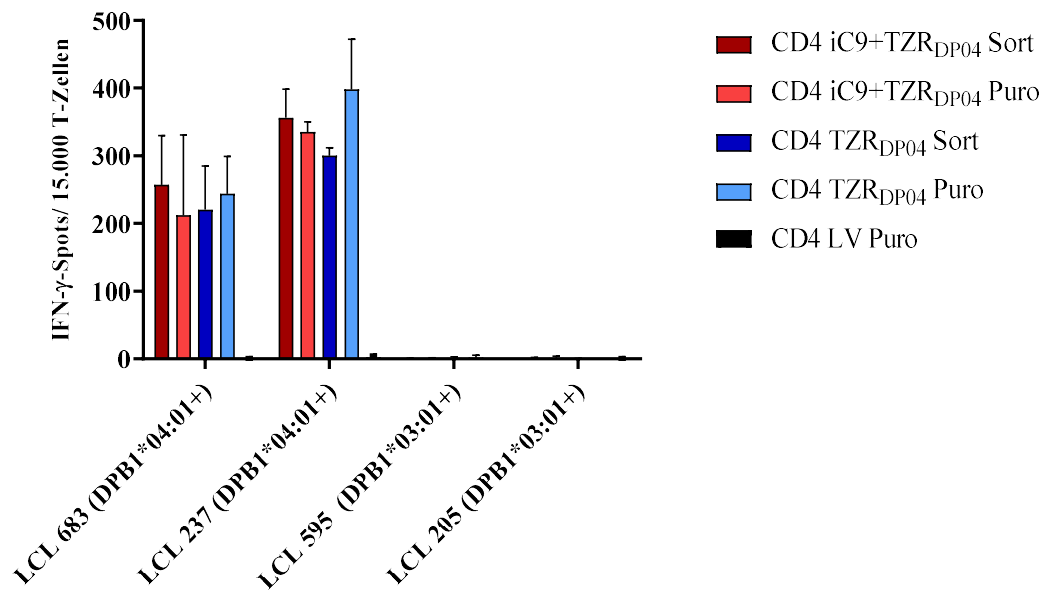
**Abbildung 10: Expression von TZR<sub>DP04</sub> in CD4<sup>+</sup> RC9+TZR<sub>DP04</sub>-, iC9+TZR<sub>DP04</sub>- und TZR<sub>DP04</sub>-transduzierten T-Zellen von Donor 149.**

CD4<sup>+</sup> T-Zellen des HLA-DPB1\*04:01-negativen Spenders 149 wurden mit Leervektor (LV), TZR<sub>DP04</sub>, iC9+TZR<sub>DP04</sub> und RC9+TZR<sub>DP04</sub> transduziert. Die Transduktionseffizienz wird unter (A) gezeigt. Die transduzierten T-Zellen bei (B) wurden mit Puromycin selektiert und bei (C) nach TZR<sub>DP04</sub>-hochexprimierenden T-Zellen mittels FACS sortiert. Nach Färbung mit CD4-APC und Vβ13.2-PE wurde mittels Durchflusszytometrie mit einem Gate auf die lebenden Zellen (FSC/SSC) der Anteil an TZR<sub>DP04</sub>-exprimierenden T-Zellen ermittelt. Der FACS-Antikörper CD4-APC erkennt CD4 auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Vβ13.2-PE-Antikörper markiert TZR<sub>DP04</sub> über die Erkennung der TZRβ-Kette der Vβ13.2-Subfamilie. Diese Abbildung ist eine repräsentative Abbildung von Spender 149 und ist gleich mit den Ergebnissen der Versuche mit Donor 165.

### 3.1.2 Spezifische TZR<sub>DP04</sub>-vermittelte Reaktivität von iC9- und RC9-transduzierten T-Zellen

Die Funktionalität der transduzierten T-Zellen wurde im IFN- $\gamma$  ELISpot getestet. Die Fragestellung war, ob die spezifische TZR<sub>DP04</sub>-vermittelte Reaktivität von der Expression der Caspase-Konstrukten iC9 oder RC9 unbeeinflusst bleibt. Es wurden CD4<sup>+</sup> iC9+TZR<sub>DP04</sub>- und TZR<sub>DP04</sub>-transduzierte T-Zellen als Responder-Zellen und HLA-DPB1\*04:01-positive und negative lymphoblastoide Zellen (LCLs) als Target-Zellen im IFN- $\gamma$  ELISpot eingesetzt. Bei der Auswertung des IFN- $\gamma$  ELISpots war die Anzahl der IFN- $\gamma$ -Spots pro 15 000 T-Zellen nach Erkennung von HLA-DPB1\*04:01 durch TZR<sub>DP04</sub> bei den iC9+TZR<sub>DP04</sub>-exprimierenden T-Zellen gleich den nur TZR<sub>DP04</sub>-exprimierenden T-Zellen (Abbildung 11). Die Expression von iC9 beeinflusst nicht die Spezifität von TZR<sub>DP04</sub>.

Die spezifische TZR<sub>DP04</sub>-vermittelte Reaktivität von iC9+TZR<sub>DP04</sub>- und TZR<sub>DP04</sub>-transduzierten T-Zellen zeigte keinen Unterschied zwischen den Puromycin-selektierten und FACS-sortierten T-Zellen.



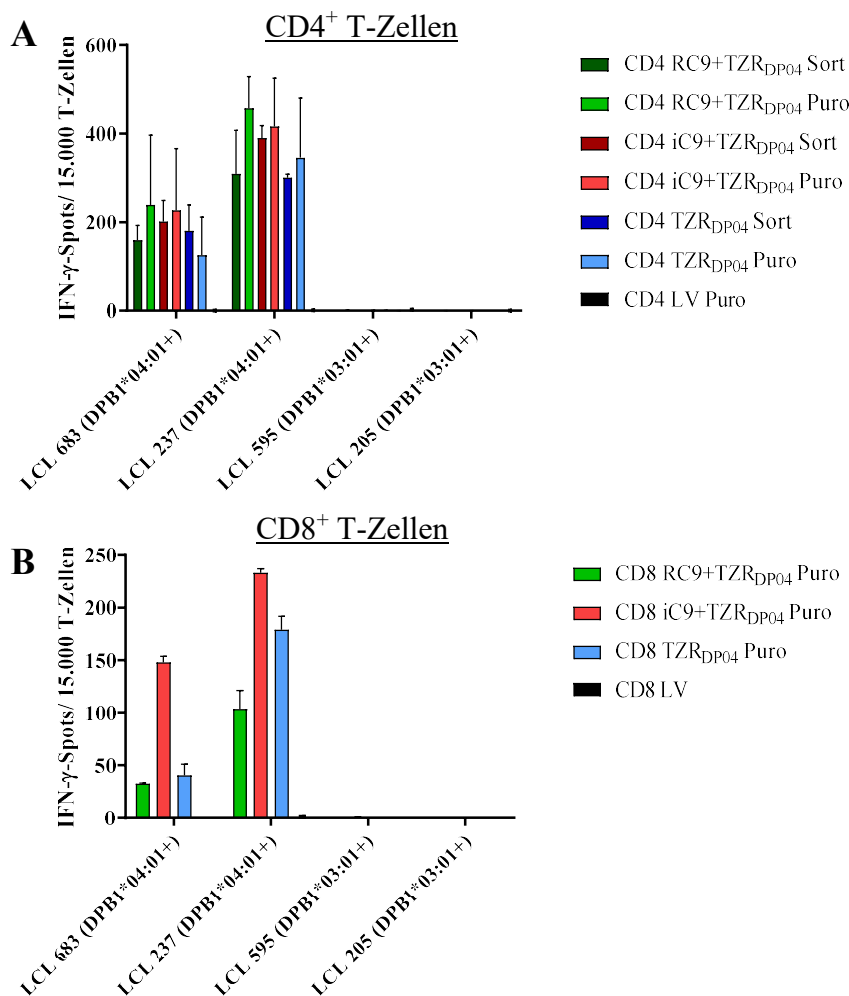
**Abbildung 11: Spezifische TZR<sub>DP04</sub>-vermittelte Reaktivität der CD4<sup>+</sup> iC9+TZR<sub>DP04</sub>- und TZR<sub>DP04</sub>-transduzierten T-Zellen von Spender 199 und 165 gegenüber HLA-DPB1\*04:01-positive oder -negative LCLs.**

Jeweils 50 000 HLA-DPB1\*04:01-positive oder -negative lymphoblastoide Zellen (LCL 683, LCL 237, LCL 595, LCL 205) wurden zusammen mit jeweils 15 000 transduzierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die iC9+TZR<sub>DP04</sub>, nur TZR<sub>DP04</sub> oder den Leervektor (LV) exprimieren, im IFN- $\gamma$  ELISpot angesetzt. Sort steht für nach TZR<sub>DP04</sub>-hochexprimierenden mittels FACS sortierten T-Zellen und Puro für Puromycin-selektiert. Gezeigt sind die Mittelwerte der gepoolten Daten von Spender 199 und 165 (jeweils zwei technische Replikate) mit Standardabweichung. Diese Abbildung ist eine repräsentative Abbildung von Spender 199 und 165 und ist gleich mit den Ergebnissen der Versuche mit Donor 232, 221 und 170.

Wie bei iC9 wurde auch bei RC9 die Funktion des T-Zell-Rezeptors  $TZR_{DP04}$  überprüft. Es ergab sich eine ähnliche Anzahl der Spots im IFN- $\gamma$  ELISpot bei den  $RC9+TZR_{DP04-}$ ,  $iC9+TZR_{DP04-}$  und  $TZR_{DP04}$ -exprimierenden T-Zellen nach Erkennung der HLA-DPB1\*04:01-positiven LCLs (Abbildung 12).

Bei den  $CD8^+$  T-Zellen wurde insgesamt eine geringere Anzahl an IFN- $\gamma$ -Spots nach Erkennung von HLA-DPB1\*04:01-positiven LCLs durch  $RC9+TZR_{DP04-}$ ,  $iC9+TZR_{DP04-}$  und  $TZR_{DP04}$ -exprimierenden T-Zellen im Vergleich zu  $CD4^+$  T-Zellen gemessen.

Es wurde gezeigt, dass iC9 und RC9 keinen Einfluss auf die  $TZR_{DP04}$ -Expression und  $TZR_{DP04}$ -vermittelte IFN- $\gamma$ -Freisetzung der transduzierten T-Zellen haben.



**Abbildung 12: Spezifische  $TZR_{DP04}$ -vermittelte Reaktivität der  $CD4^+$  und  $CD8^+$   $RC9+TZR_{DP04-}$ ,  $iC9+TZR_{DP04-}$  und  $TZR_{DP04}$ -transduzierten T-Zellen von Spender 165 und 149 gegenüber HLA-DPB1\*04:01-positive oder -negative LCLs.**

Jeweils 15 000 (A)  $CD4^+$  und (B)  $CD8^+$   $RC9+TZR_{DP04-}$ ,  $iC9+TZR_{DP04-}$  und  $TZR_{DP04}$ -transduzierte T-Zellen von Spender 165 und 149 wurden mit jeweils 50 000 HLA-DPB1\*04:01-positiven oder -negativen lymphoblastoiden Zellen (LCL 683, LCL 237, LCL 595, LCL 205) in einer IFN- $\gamma$  ELISpot-Platte angesetzt und die  $TZR$ -vermittelte Reaktivität konnte durch IFN- $\gamma$ -Aktivierung gemessen werden. Sort steht für nach  $TZR_{DP04}$ -hochexprimierenden mittels FACS sortierten T-Zellen und Puro für Puromycin-selektiert. Gezeigt sind die Mittelwerte der gepoolten Daten von Spender 165 und 149 (jeweils zwei technische Replikate) mit Standardabweichung. Alle Versuche mit dem Konstrukt  $RC9+TZR_{DP04}$ -transduzierten T-Zellen wurden jeweils mit T-Zellen des Spenders 149 und 165 durchgeführt.

### 3.1.3 Elimination der iC9- und RC9-transduzierten T-Zellen nach Inkubation mit AP20187 und Rapamycin

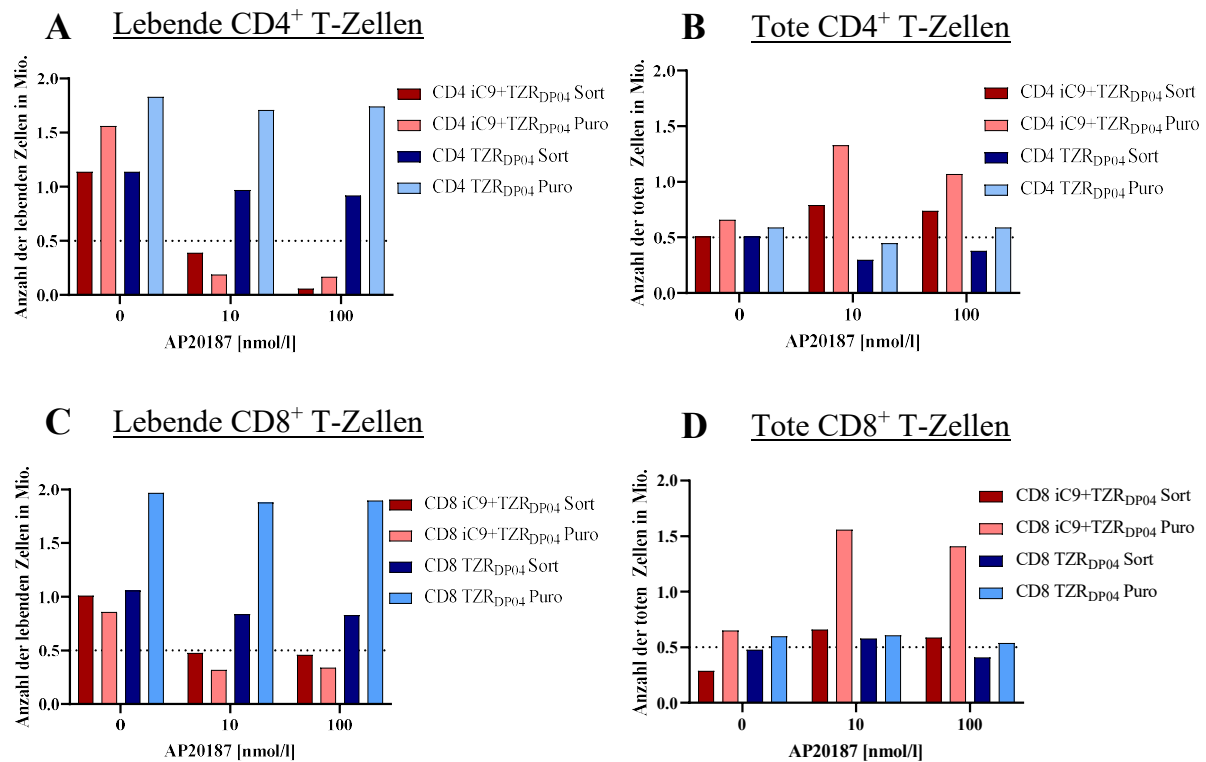
Vor Durchführung der Durchflusszytometrie mit Annexin V wurden die Zellzahlen der verschiedenen Ansätze der iC9/RC9+TZR<sub>DP04</sub>-transduzierten T-Zellen und TZR<sub>DP04</sub>-transduzierten T-Zellen nach Exposition mit verschiedenen Konzentrationen an AP20187 oder Rapamycin bestimmt. Die Zellzählung erfolgte mittels Trypanblaufärbung in einer Neubauer-Zählkammer. Es wurden jeweils zwei Mal pro Ansatz die lebenden und die toten Trypanblau-positiven Zellen gezählt und der Mittelwert der beiden Zellzahlen ermittelt.

Die lebenden Zellzahlen stiegen bei den Ansätzen ohne AP20187 und nur TZR<sub>DP04</sub>-exprimierenden T-Zellen von ca. 0,5 Mio. pro Well in einer 48-Well-Platte am Tag 0 auf bis zu ca. 2 Mio. am Tag 2 an. Bei iC9+TZR<sub>DP04</sub>-exprimierenden T-Zellen nach Behandlung mit AP20187 wurde am Tag 2 eine Abnahme der lebenden Zellzahlen von ca. 0,5 Mio. auf bis zu ca. 0,1 Mio. festgestellt (Abbildung 13A und C).

Dagegen zeigte die Anzahl toter Zellen gegenteilige Veränderungen. Nachdem 0,5 Mio. T-Zellen pro Well in eine 48-Well-Platte ausgesät und mit 10 nM und 100 nM AP20187 inkubiert wurden, wurden 48 Stunden später in den Kontrollen bis zu ca. 0,5 Mio. tote Zellen gezählt, während nach Aktivierung der Caspase-9 mit AP20187 in den iC9-exprimierenden Zellen bis zu ca. 1,5 Mio. tote Zellen vorlagen (Abbildung 13B und D).

Die Inkubation der iC9-exprimierenden T-Zellen mit 10 nM oder 100 nM Dimerisierer AP20187 zeigte keinen Unterschied (Abbildung 13).

Die CD8<sup>+</sup> transduzierten T-Zellen zeigten ein ähnliches Verhalten wie die CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Bei den CD8<sup>+</sup> T-Zellen fiel auf, dass nach Puromycin-Selektion eine höhere Anzahl der lebenden TZR<sub>DP04</sub>-exprimierenden T-Zellen und eine höhere Anzahl der toten iC9+TZR<sub>DP04</sub>-exprimierenden T-Zellen nach Exposition mit AP20187 im Vergleich zu den FACS-sortierten T-Zellen bestimmt werden konnte (Abbildung 13C und D). Dieses Verhalten der Puromycin-selektierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen lässt sich nicht weiter erklären.

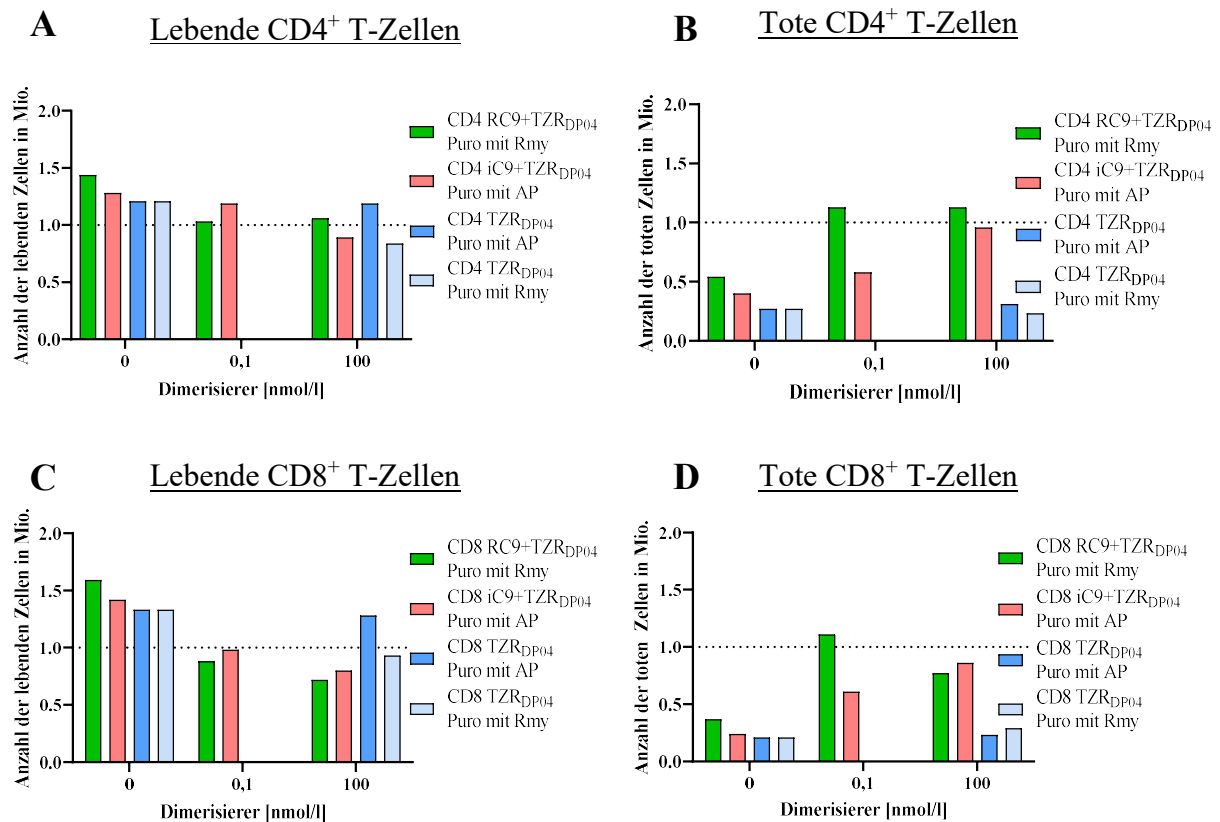


**Abbildung 13: Mittelwerte der Anzahl der lebenden und toten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> iC9+TZR<sub>DP04</sub>- und TZR<sub>DP04</sub>-transduzierten T-Zellen von Spender 170 nach Behandlung mit AP20187 für 48 h.**

Bei (A) und (B) wurden 0,5 Mio. CD4<sup>+</sup> und bei (C) und (D) CD8<sup>+</sup> iC9+TZR<sub>DP04</sub>- und TZR<sub>DP04</sub>-transduzierte T-Zellen von Spender 170 pro Ansatz ausgesät und für 48 Stunden mit 0 nM, 10 nM und 100 nM AP20187 behandelt. Die Anzahl der lebenden Zellen wird unter (A) und (C) und die Anzahl der toten Zellen unter (B) und (D) dargestellt. Sort steht für nach TZR<sub>DP04</sub>-hochexprimierenden mittels FACS sortierten T-Zellen und Puro für Puromycin-selektiert. Diese Abbildung ist eine repräsentative Abbildung von Spender 170 und ist gleich mit den Ergebnissen mit Donor 221, 199 und 232.

Bei den Zellzahlen der RC9- und iC9-exprimierenden T-Zellen nach Induktion der Apoptose mit den jeweiligen Dimerisierer Rapamycin (Rmy) oder AP20187 (AP) war nach Aussäen von 1 Mio. T-Zellen 48 Stunden später eine geringere Anzahl lebender Zellen von bis zu ca. 0,8 Mio. auszumachen. Die Anzahl der lebenden Zellen ist in den Kontrollen im Vergleich zu den RC9- und iC9-exprimierenden T-Zellen mit Dimerisierer bis auf ca. 1,2 Mio. Zellen gestiegen (Abbildung 14A und C).

Die Zahlen der toten CD4<sup>+</sup> RC9-exprimierenden T-Zellen zeigten dagegen nach Aktivierung von RC9 einen Anstieg bis auf ca. 1,2 Mio. Zellen, wohingegen in den Kontrollen ohne aktivierter Caspase-9 ca. 0,2 Mio. tote Zellen gezählt wurden (Abbildung 14B). Bei den CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden zwischen 0,7 Mio. bis 1,2 Mio. tote Zellen bei den RC9- und iC9-exprimierenden T-Zellen nach Behandlung mit Rapamycin oder AP20187 gezählt (Abbildung 14D).

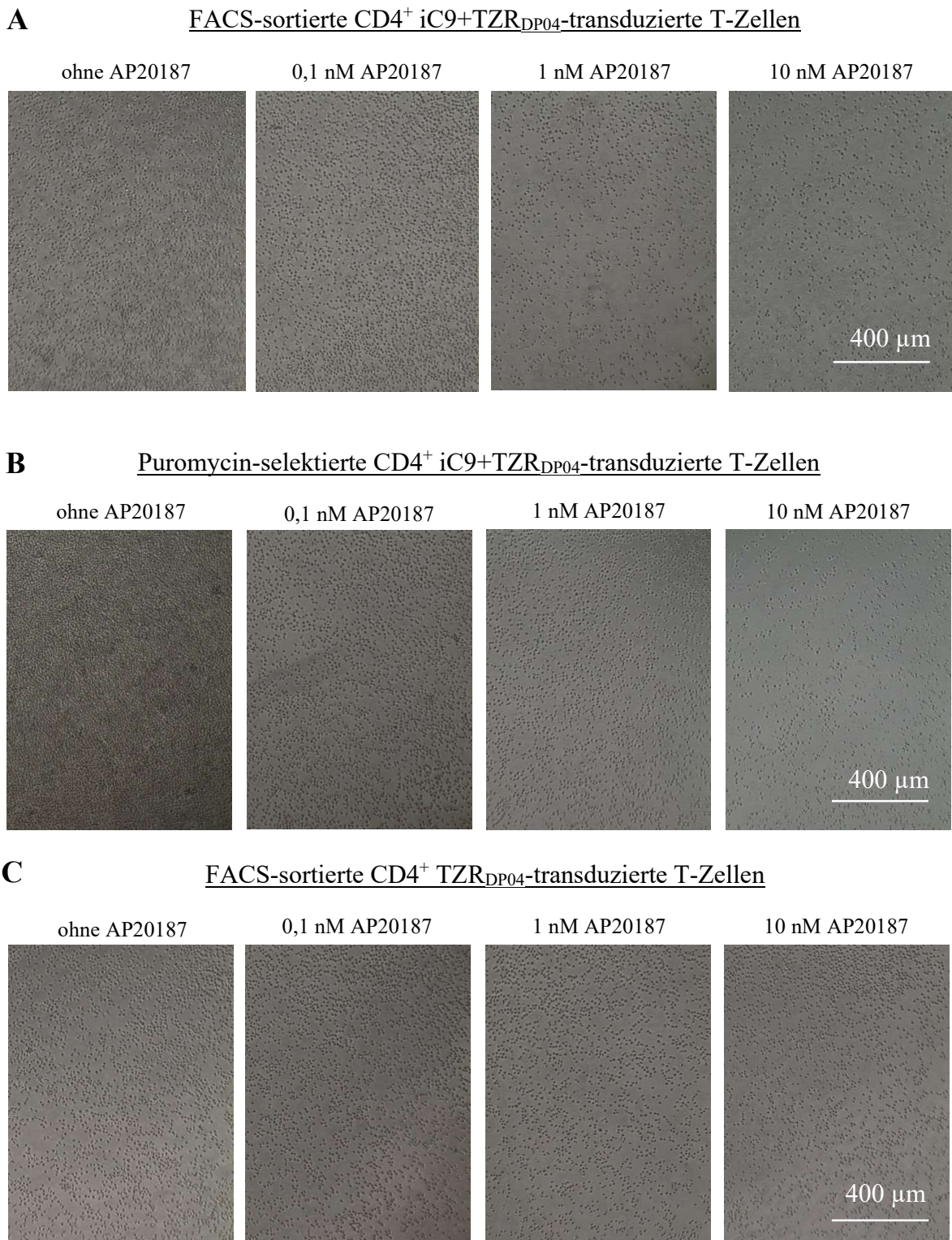


**Abbildung 14: Mittelwerte der Anzahl der lebenden und toten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> RC9+TZR<sub>DP04</sub>, iC9+TZR<sub>DP04</sub>- und TZR<sub>DP04</sub>-transduzierten T-Zellen von Spender 149 nach Behandlung mit Rapamycin oder AP20187 für 48 h.**

Bei (A) und (B) wurden 1 Mio. CD4<sup>+</sup> und bei (C) und (D) CD8<sup>+</sup> RC9+TZR<sub>DP04</sub>-, iC9+TZR<sub>DP04</sub>- und TZR<sub>DP04</sub>-transduzierte T-Zellen von Spender 149 pro Ansatz ausgesät und für 48 Stunden mit 0 nM, 0,1 nM und 100 nM Rapamycin (Rmy) oder AP20187 (AP) behandelt. Die Anzahl der lebenden Zellen wird unter (A) und (C) und die Anzahl der toten Zellen unter (B) und (D) dargestellt. Sort steht für nach TZR<sub>DP04</sub>-hochexprimierenden mittels FACS sortierten T-Zellen und Puro für Puromycin-selektiert. Die Zellzahlen der TZR<sub>DP04</sub>-transduzierten T-Zellen als Kontrollen wurden nur nach Inkubation mit 0 nM und 100 nM Dimerisierer bestimmt, da das Ergebnis nach Exposition mit 0,1 nM Dimerisierer nicht relevant ist. Diese Abbildung ist eine repräsentative Abbildung von Spender 149 und ist gleich mit den Ergebnissen mit Donor 165.

Neben der Zellzählung wurden die Ansätze der iC9+TZR<sub>DP04</sub>-transduzierten T-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an AP20187 für 48 Stunden im Vergleich zu den TZR<sub>DP04</sub>-transduzierten T-Zellen mikroskopisch untersucht. Bei den Kontrollen ohne AP20187 und den TZR<sub>DP04</sub>-exprimierenden T-Zellen wurde im Mikroskop bei zehnfacher Vergrößerung nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an AP20187 für 48 Stunden eine gleichmäßig dichte Verteilung der Zellen beobachtet. Im Gegensatz dazu fällt bei den iC9-exprimierenden T-Zellen nach Aktivierung der induzierbaren Caspase-9 durch AP20187 eine sichtbare Verringerung der Zellzahl auf (Abbildung 15A, B und C). Offensichtlich nimmt die Zellzahl dosisabhängig von 0,1 nM zu 10 nM AP20187 ab.

## Donor 221



**Abbildung 15: Zehnfache Vergrößerung der iC9+TZR<sub>DP04</sub>- und TZR<sub>DP04</sub>-transduzierten T-Zellen von Spender 221 nach Inkubation mit AP20187 für 48 h.**

Es wurden (A) FACS-sortierte und (B) Puromycin-selektierte CD4<sup>+</sup> iC9+TZR<sub>DP04</sub>-transduzierte T-Zellen und als Kontrolle (C) FACS-sortierte CD4<sup>+</sup> TZR<sub>DP04</sub>-transduzierte T-Zellen von Spender 221 mit 0 nM, 0,1 nM, 1 nM und 10 nM AP20187 behandelt. Nach 48 Stunden wurde im Mikroskop bei zehnfacher Vergrößerung die Zelldichte der verschiedenen Ansätze betrachtet.



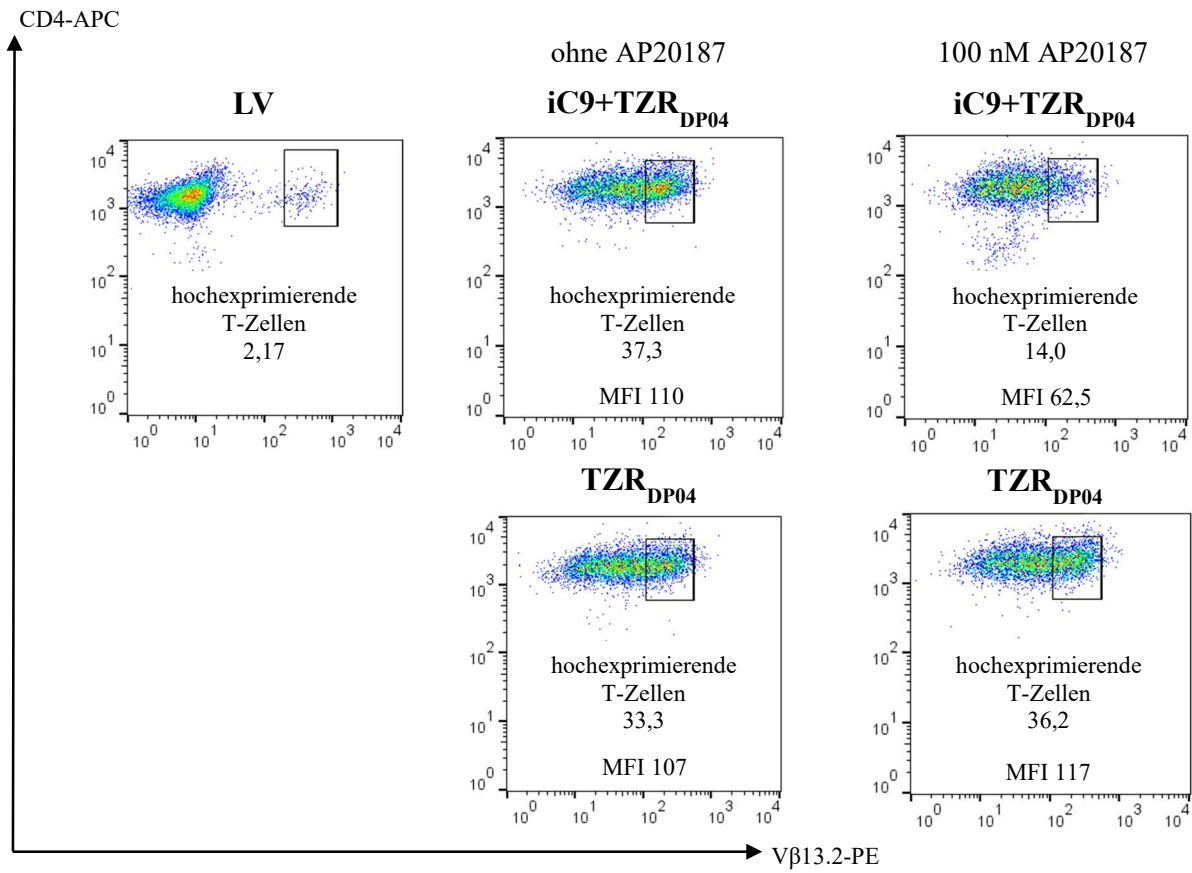
### 3.1.4 Expression des T-Zell-Rezeptors TZR<sub>DP04</sub> nach Aktivierung von iC9 und RC9

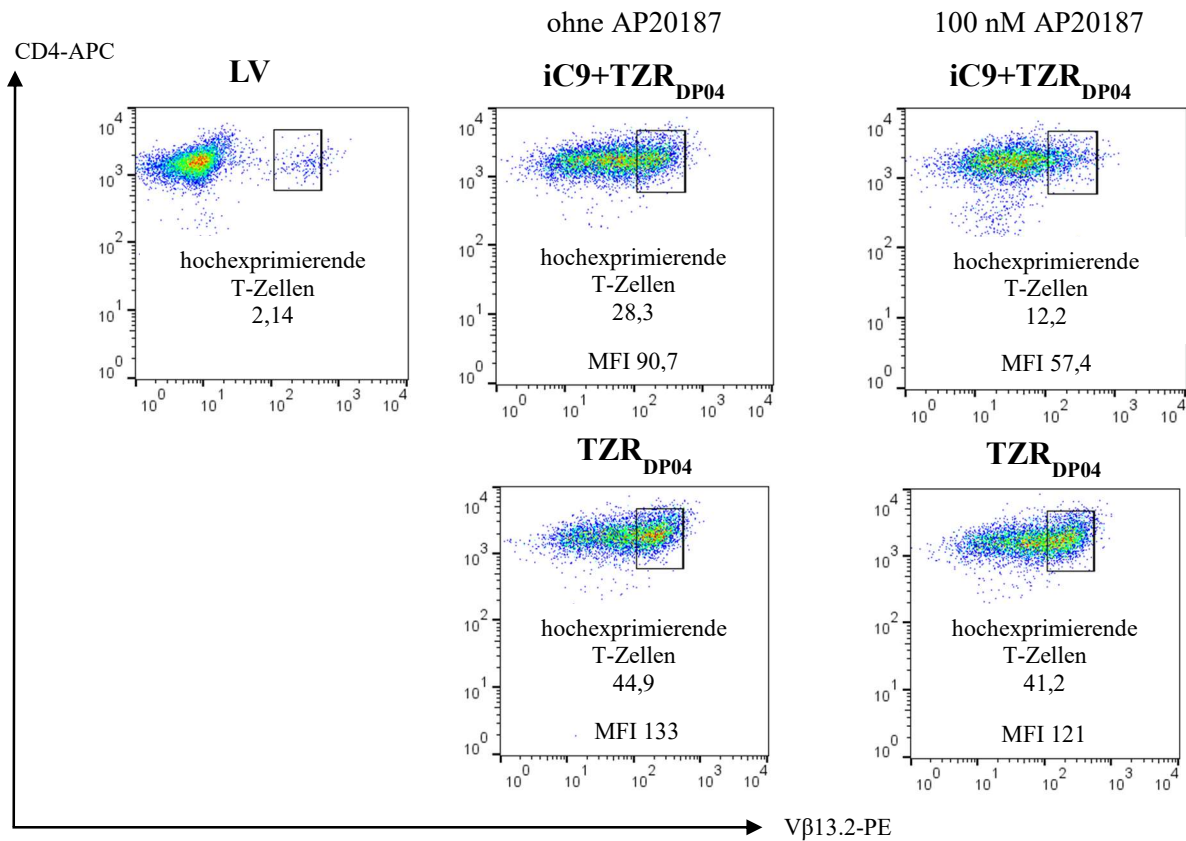
Die beiden Caspase-Konstrukte liegen intrazellulär und können dadurch nicht wie der T-Zell-Rezeptor TZR<sub>DP04</sub> oberflächlich markiert werden. Da kein FACS-Antikörper für die Expression von iC9 oder RC9 zur Verfügung stand, wurde ein indirekter Nachweis der iC9/RC9-Expression über die Messung der Expression von TZR<sub>DP04</sub> durchgeführt. Die Caspase-Konstrukte iC9 oder RC9 wurden zusammen mit TZR<sub>DP04</sub> in den gleichen Vektor integriert, sodass wir die gleiche Expression von TZR<sub>DP04</sub> und iC9 oder RC9 erwarten. Die Hypothese war, dass nach Aktivierung von iC9 oder RC9 in den iC9+TZR<sub>DP04</sub>- oder RC9+TZR<sub>DP04</sub>-transduzierten T-Zellen durch die Dimerisierer AP20187 oder Rapamycin eine niedrigere Expression von iC9, RC9 und TZR<sub>DP04</sub> zu erwarten ist. So konnte iC9 oder RC9 in den hier durchgeführten Experimenten nur indirekt nachgewiesen werden, indem die Expression des T-Zell-Rezeptors TZR<sub>DP04</sub> vor und nach Aktivierung der Caspase-Konstrukte in den transduzierten T-Zellen bestimmt wurde. Vor der Durchflusszytometrie wurden die iC9- und TZR<sub>DP04</sub>-transduzierten T-Zellen ohne AP20187 und mit 10 nmol Dimerisierer AP20187 für 48 Stunden inkubiert.

Bei der Durchflusszytometrie mit V $\beta$ 13.2-PE spezifischen Antikörper zum Nachweis der Expression des T-Zell-Rezeptors TZR<sub>DP04</sub> ist aufgefallen, dass die Expression von TZR<sub>DP04</sub> deutlich herabgesenkt ist, nachdem die iC9+TZR<sub>DP04</sub>-transduzierten T-Zellen mit dem Dimerisierungsmolekül AP20187 behandelt wurden. So lag der Anteil der FACS-sortierten und Puroselektierten T-Zellen ohne Behandlung mit AP20187 und ohne Expression von iC9 zwischen 30 % und 45 %. Die iC9-exprimierenden T-Zellen nach Inkubation mit AP20187 sind auf 10 % bis 15 % abgesunken. Die Zellpopulation, die TZR<sub>DP04</sub> hochexprimiert hat, ist nach Aktivierung der induzierbaren Caspase-9 deutlich gesunken und sehr wahrscheinlich durch die induzierte Apoptose eliminiert (Abbildung 16A und B). Beim Vergleich der medianen Fluoreszenz-Intensität (MFI) des TZR sieht man ebenfalls den Unterschied. So lag der MFI-Wert bezogen auf das Gate der lebenden Lymphozyten (FSC/SSC) bei den FACS-sortierten T-Zellen ohne Behandlung mit AP20187 und ohne iC9-Expression über 100 und die iC9-exprimierenden T-Zellen nach Behandlung mit AP20187 bei 62,5. Die MFI-Werte der Puromycin-selektierten T-Zellen zeigten das gleiche Verhalten (Abbildung 16B). Die Behandlung der TZR<sub>DP04</sub>-transduzierten T-Zellen ohne iC9 induzierte keine Änderung der Expressionsstärke des TZR.

**A Donor 199**

FACS-sortierte T-Zellen



**B Donor 199**Puromycin-selektierte T-Zellen

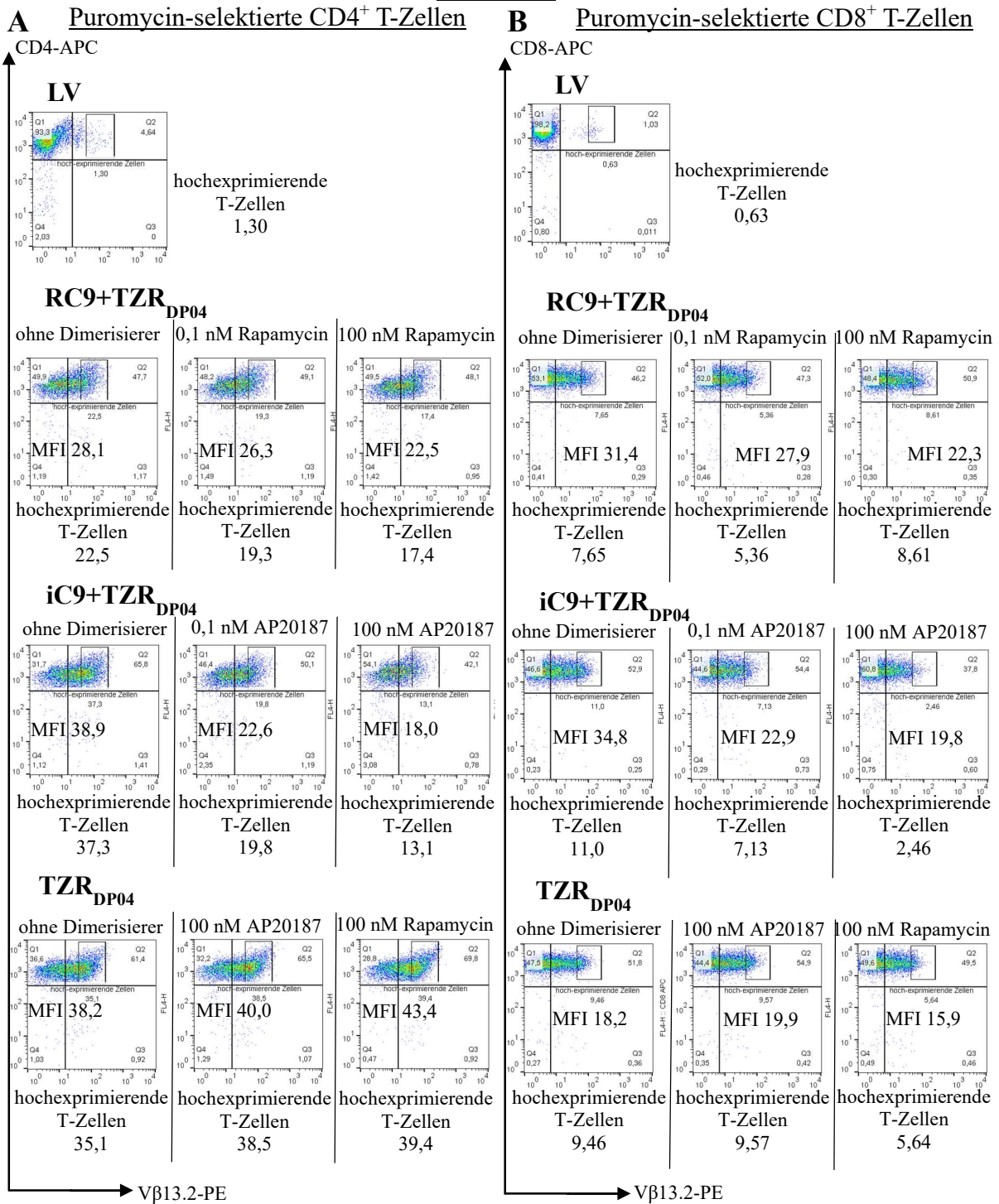
**Abbildung 16: Expression von TZR<sub>DP04</sub> in CD4<sup>+</sup> iC9+TZR<sub>DP04</sub>- und TZR<sub>DP04</sub>-transduzierten T-Zellen von Donor 199 nach Behandlung mit AP20187 für 48 h.**

CD4<sup>+</sup> T-Zellen des HLA-DPB1\*04:01-negativen Spenders 199 wurden mit Leervektor (LV), TZR<sub>DP04</sub> und iC9+TZR<sub>DP04</sub> transduziert und bei (A) nach TZR<sub>DP04</sub>-hochexprimierenden T-Zellen mittels FACS sortiert oder bei (B) mit Puromycin selektiert. Vor der Durchflusszytometrie wurden die CD4<sup>+</sup> iC9+TZR<sub>DP04</sub>- und TZR<sub>DP04</sub>-transduzierten T-Zellen für 48 Stunden mit 0 nM und 100 nM AP20187 behandelt. Nach Färbung mit CD4-APC und Vβ13.2-PE wurde mittels Durchflusszytometrie mit einem Gate auf die lebenden Zellen (FSC/SSC) der Anteil an TZR<sub>DP04</sub>-hochexprimierenden T-Zellen ermittelt. Der FACS-Antikörper CD4-APC erkennt CD4 auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen und Vβ13.2-PE-Antikörper markiert TZR<sub>DP04</sub> über die Erkennung der TZRβ-Kette der Vβ13.2-Subfamilie. Diese Abbildung ist eine repräsentative Abbildung von Spender 199 und ist gleich mit den Ergebnissen der Versuche mit Donor 232, 221 und 170.

Auch nach Behandlung der RC9+TZR<sub>DP04</sub>-transduzierten T-Zellen mit Rapamycin wurde besonders die Veränderung der TZR<sub>DP04</sub>-hochexprimierenden T-Zellen betrachtet und mit dem Verhalten der iC9+TZR<sub>DP04</sub>-transduzierten T-Zellen nach Inkubation mit AP20187 verglichen. Als Kontrolle wurden nur TZR<sub>DP04</sub>-transduzierte T-Zellen verwendet. Nach Aktivierung der Caspasen mit den jeweiligen Dimerisierer sank der Anteil der TZR<sub>DP04</sub>-hochexprimierenden T-Zellen ab, während bei den TZR<sub>DP04</sub>-exprimierenden T-Zellen als Kontrollen keine Änderung sichtbar wurde. In der folgenden Abbildung 17 werden die Ergebnisse der Durchflusszytometrie von RC9+TZR<sub>DP04</sub>-exprimierenden T-Zellen nach Behandlung mit Rapamycin und iC9+TZR<sub>DP04</sub>-exprimierenden T-Zellen nach Inkubation mit AP20187 zur Veranschaulichung und zum Vergleich der beiden Sicherheitssysteme noch einmal gegenübergestellt (Abbildung 17A und B). Hierbei wird deutlich, dass TZR<sub>DP04</sub> in Kombination mit RC9 niedriger exprimiert wurde als nur TZR<sub>DP04</sub> oder TZR<sub>DP04</sub> in Kombination mit iC9. Damit sank der Anteil der TZR<sub>DP04</sub>-hochexprimierenden T-Zellen nach Aktivierung von RC9 durch Rapamycin weniger deutlich im Vergleich zur TZR<sub>DP04</sub>-Expression nach Aktivierung von iC9 durch AP20187. Bei den Experimenten mit anderen Spendern zeigte sich ebenfalls, dass RC9 eine geringere Apoptoseeffizienz induziert als iC9.

Die transduzierten T-Zellen, die iC9/RC9+TZR<sub>DP04</sub> hochexprimierten, wurden nach Zugabe von AP20187 oder Rapamycin abgetötet. Die überlebenden Zellen, bei denen das Suizid-Gen-System nicht aktiviert wurde, exprimierten iC9/RC9+TZR<sub>DP04</sub> nur niedrig oder überhaupt nicht. Somit war ein Ziel, durch das Sortieren mittels FACS nur TZR<sub>DP04</sub>-hochexprimierende Zellen zu erhalten, die zuverlässig die gewünschte Wirkung von iC9 oder RC9 ausführen könnten. Nach dem Sortieren nach TZR<sub>DP04</sub>-hochexprimierenden Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde in den FACS-Messungen im Anschluss zwischen 60 % und 80 % TZR<sub>DP04</sub>-Expression nachgewiesen. In den anschließend durchgeführten Versuchen wurde dann nur eine Apoptoserate zwischen 60 % und 80 % erreicht.

**Donor 149**



**Abbildung 17: Expression von TZR<sub>DP04</sub> in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> RC9+TZR<sub>DP04</sub>-, iC9+TZR<sub>DP04</sub>- und TZR<sub>DP04</sub>-transduzierten T-Zellen von Donor 149 nach Behandlung mit Rapamycin oder AP20187 für 48 h.**

Puromycin-selektierte (A) CD4<sup>+</sup> und (B) CD8<sup>+</sup> RC9+TZR<sub>DP04</sub>-, iC9+TZR<sub>DP04</sub>- und TZR<sub>DP04</sub>-transduzierte T-Zellen wurden für 48 Stunden mit 0 nM, 0,1 nM und 100 nM Rapamycin oder AP20187 behandelt. Nach Färbung mit CD4-APC und ∇β13.2-PE wurde mittels Durchflusszytometrie mit einem Gate auf die lebenden Zellen (FSC/SSC) der Anteil an TZR<sub>DP04</sub>-hoch-exprimierenden T-Zellen ermittelt. Der FACS-Antikörper CD4-APC erkennt CD4 auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen und ∇β13.2-PE-Antikörper markiert TZR<sub>DP04</sub> über die Erkennung der TZRβ-Kette der ∇β13.2-Subfamilie. Diese Abbildung ist eine repräsentative Abbildung von Spender 149 und ist gleich mit den Ergebnissen der Versuche mit Donor 165.

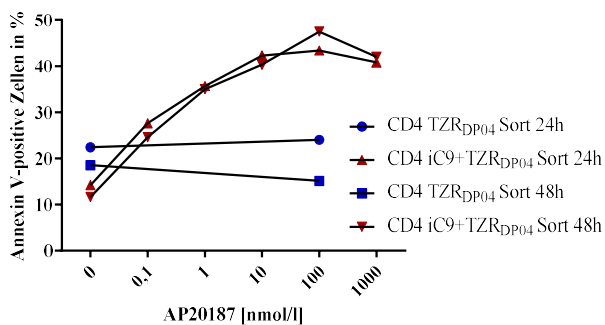
### 3.1.5 Analyse der Funktion von iC9 und RC9 mittels Apoptose-Messungen

Die induzierbare Caspase-9 als Suizid-Gen-System wurde durch Zugabe des Dimerisierungsmoleküls AP20187 aktiviert, sodass die Apoptose-Kaskade induziert wurde und die T-Zelle abstarb. Die Apoptoserate wurde mittels Durchflusszytometrie mit Annexin V-FITC bestimmt. Annexin V bindet an Phosphatidylserin, ein Bestandteil der Lipiddoppelschicht von Zellmembranen. Das Phosphatidylserin befindet sich normalerweise an der inneren Lipidschicht der Zellmembran. Bei Apoptose-Vorgängen wandert Phosphatidylserin jedoch an die Außenseite der Zellmembran [142], kann dort Annexin V binden und markiert so apoptotische Zellen [143–145]. Der Anteil an Annexin V-positiven Zellen entspricht der Anzahl der apoptotischen Zellen.

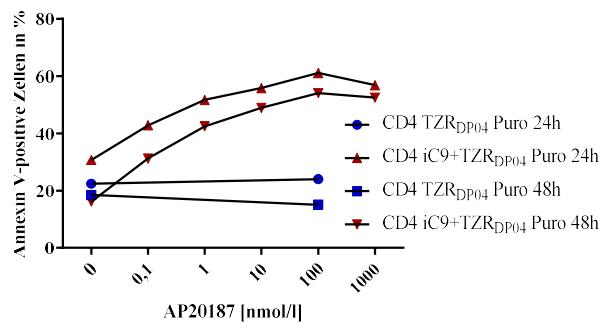
Bei der Durchführung der Apoptose-Messungen wurden die transduzierten T-Zellen von Spender 199 mit steigender Konzentration von AP20187 für 24 oder 48 Stunden versetzt. Es ist ein dosisabhängiger Anstieg der Apoptose mit einem maximalen Anteil an apoptotischen Zellen ab 10 nM AP20187 zu erkennen (Abbildung 18).

#### Donor 199

##### A FACS-sortierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen



##### B Puromycin-selektierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen



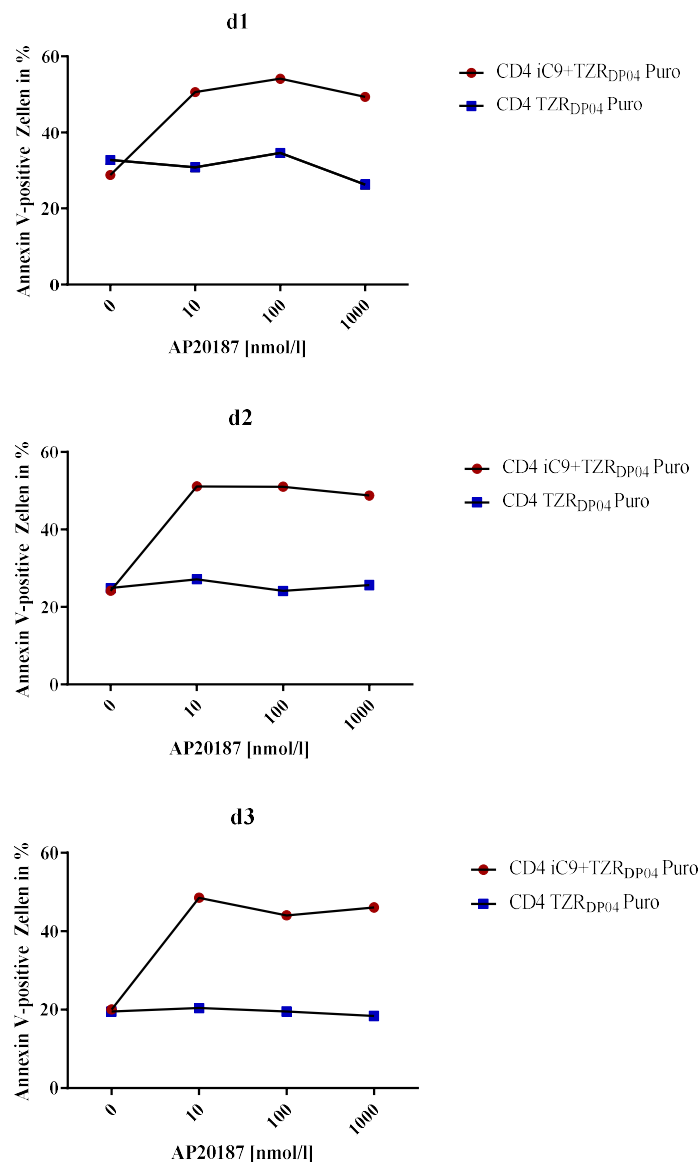
**Abbildung 18: Anteil der Annexin V-positiven CD4<sup>+</sup> iC9+TZR<sub>DP04</sub>- und TZR<sub>DP04</sub>-transduzierten T-Zellen von Donor 199 in Abhängigkeit von der Konzentration von AP20187.**

(A) FACS-sortierte und (B) Puro-selektierte CD4<sup>+</sup> iC9+TZR<sub>DP04</sub>- und TZR<sub>DP04</sub>-transduzierte T-Zellen von Spender 199 wurden mit 0 nM, 0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM und 1000 nM AP20187 inkubiert. Nach 24 Stunden und 48 Stunden wurde jeweils der Anteil an apoptotischen Zellen durch Durchflusszytometrie mit Annexin V-FITC mit einem Gate auf die toten Zellen ermittelt. Annexin V bindet an Phosphatidylserin an der Außenseite von apoptotischen Zellen und ist damit ein Marker für Apoptose. Sort steht für nach TZR<sub>DP04</sub>-hochexprimierenden mittels FACS sortierten T-Zellen und Puro für Puromycin-selektiert. Diese Abbildung ist eine repräsentative Abbildung von Spender 199 und ist gleich mit den Ergebnissen der Versuche mit Donor 221, 232 und 170.

Bei einem weiteren Versuch wurden die transduzierten T-Zellen von Spender 232 für bis zu drei Tage mit 0 nM, 10 nM, 100 nM und 1000 nM AP20187 inkubiert.

Da zwischen dem zweiten und dritten Tag keine Veränderungen im Anteil der Annexin V-positiven Zellen ausgemacht werden konnten (Abbildung 19), wurde in den anschließenden Versuchen die Durchflusszytometrie mit Annexin V-FITC immer nach 24 und 48 Stunden durchgeführt.

### Donor 232

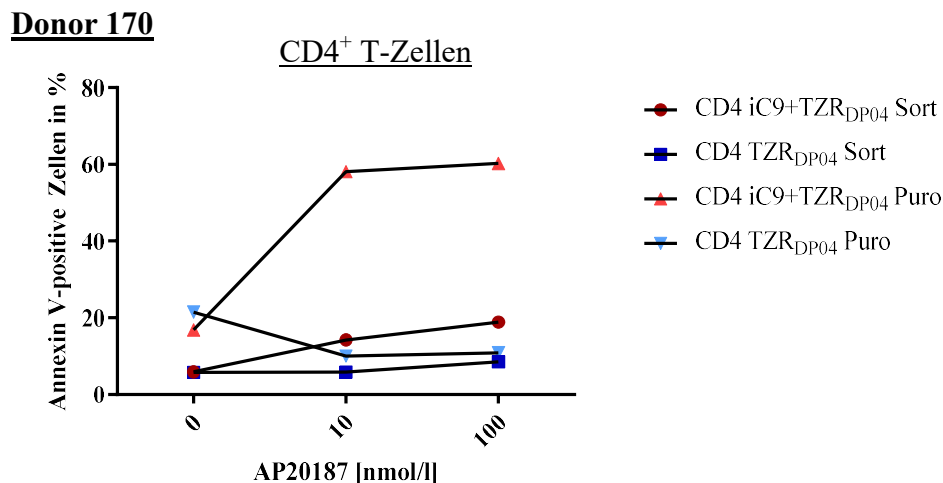


**Abbildung 19: Anteil der Annexin V-positiven CD4<sup>+</sup> iC9+TZRDP04<sup>-</sup> und TZRDP04-transduzierten T-Zellen von Donor 232 in Abhängigkeit von der Konzentration von AP20187.**

Puro-selektierte (Puro) CD4<sup>+</sup> iC9+TZRDP04<sup>-</sup> und TZRDP04-exprimierende T-Zellen von Spender 232 wurden mit 0 nM, 10 nM, 100 nM und 1000 nM AP20187 inkubiert. Nach einem Tag (d1), nach zwei Tagen (d2) und nach drei Tagen (d3) wurde jeweils der Anteil an apoptotischen Zellen durch Durchflusszytometrie mit Annexin V-FITC mit einem Gate auf die toten Zellen ermittelt. Annexin V bindet an Phosphatidylserin an der Außenseite von apoptotischen Zellen und ist damit ein Marker für Apoptose. Diese Abbildung ist eine repräsentative Abbildung von Spender 232 und ist gleich mit den Ergebnissen der Versuche mit Donor 221, 199 und 170.

Weiterhin wurden FACS-sortierte und Puromycin-selektierte CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> iC9+TZR<sub>DP04</sub>- und TZR<sub>DP04</sub>-transduzierte T-Zellen von Spender 170 für 48 Stunden mit 0 nM, 10 nM und 100 nM Dimerisierer AP20187 behandelt, um den Anteil der toten Zellen mittels Annexin V-Färbung in der Durchflusszytometrie zu bestimmen.

Bei der Auswertung lagen die Prozentzahlen an toten Zellen ohne AP20187 und bei TZR<sub>DP04</sub>-exprimierenden T-Zellen als Kontrollen bei ca. 10 %. Die Aktivierung der Apoptose durch iC9 mit AP20187 spiegelte sich in der Anzahl der Puromycin-selektierten CD4<sup>+</sup> iC9+TZR<sub>DP04</sub>-exprimierenden T-Zellen mit bis zu 60 % apoptotischer Zellen wider, während bei den FACS-sortierten T-Zellen nur ca. 20 % apoptotische Zellen nachgewiesen wurden (Abbildung 20). Wir nehmen an, dass die unterschiedliche Apoptosefrequenz auf eine unterschiedlich hohe Expression von iC9 und damit auch Aktivierung von iC9 zurückzuführen ist.



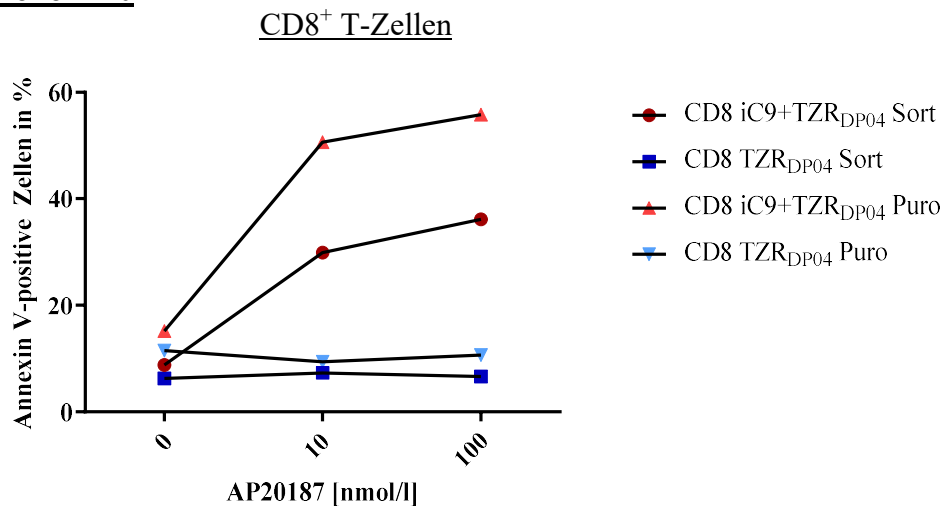
**Abbildung 20: Anteil der Annexin V-positiven CD4<sup>+</sup> iC9+TZR<sub>DP04</sub>- und TZR<sub>DP04</sub>-transduzierten T-Zellen von Donor 170 in Abhängigkeit von der Konzentration von AP20187.**

FACS-sortierte und Puro-selektierte CD4<sup>+</sup> iC9+TZR<sub>DP04</sub>- und TZR<sub>DP04</sub>-transduzierte T-Zellen von Spender 170 wurden mit 0 nM, 10 nM und 100 nM AP20187 inkubiert. Nach 48 Stunden wurde jeweils der Anteil an apoptotischen Zellen durch Durchflusszytometrie mit Annexin V-FITC mit einem Gate auf die toten Zellen ermittelt. Annexin V bindet an Phosphatidylserin an der Außenseite von apoptotischen Zellen und ist damit ein Marker für Apoptose. Sort steht für nach TZR<sub>DP04</sub>-hochexprimierenden mittels FACS sortierten T-Zellen und Puro für Puromycin-selektiert. Diese Abbildung ist eine repräsentative Abbildung von Spender 170 und ist gleich mit den Ergebnissen der Versuche mit Donor 221, 199 und 232.

Im Vergleich zu den CD4<sup>+</sup> T-Zellen zeigten die CD8<sup>+</sup> iC9+TZR<sub>DP04</sub>- und TZR<sub>DP04</sub>-transduzierten T-Zellen von Spender 170 nach Inkubation mit 0 nM, 10 nM und 100 nM Dimerisierer AP20187 für 48 Stunden bis zu 55 % Puromycin-selektierte apoptotische Zellen und ca. 36 % FACS-sortierte apoptotische Zellen auf (Abbildung 21).



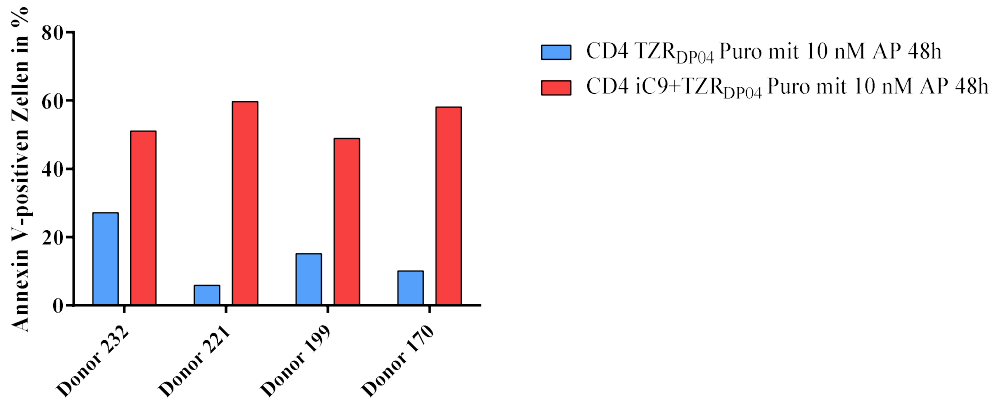
## Donor 170



**Abbildung 21: Anteil der Annexin V-positiven CD8<sup>+</sup> iC9+TZR<sub>DP04</sub>- und TZR<sub>DP04</sub>-transduzierten T-Zellen von Donor 170 in Abhängigkeit von der Konzentration von AP20187.**

FACS-sortierte und Puro-selektierte CD8<sup>+</sup> iC9+TZR<sub>DP04</sub>- und TZR<sub>DP04</sub>-transduzierte T-Zellen von Spender 170 wurden mit 0 nM, 10 nM und 100 nM AP20187 inkubiert. Nach 48 Stunden wurde jeweils der Anteil an apoptotischen Zellen durch Durchflusszytometrie mit Annexin V-FITC mit einem Gate auf die toten Zellen ermittelt. Annexin V bindet an Phosphatidylserin an der Außenseite von apoptotischen Zellen und ist damit ein Marker für Apoptose. Sort steht für nach TZR<sub>DP04</sub>-hochexprimierenden mittels FACS sortierten T-Zellen und Puro für Puromycin-selektiert. Diese Abbildung ist eine repräsentative Abbildung von Spender 170 und ist gleich mit den Ergebnissen der Versuche mit Donor 221, 199 und 232.

Insgesamt wurden im Rahmen dieses Projektes T-Zellen der vier Spender 232, 221, 199 und 170 mit iC9+TZR<sub>DP04</sub>, TZR<sub>DP04</sub> und Leervektor transduziert und die Funktion der induzierbaren Caspase-9 in mehreren Versuchen getestet. Beim Vergleich der Ergebnisse bei allen vier Spendern wurden maximal 25 % Annexin V-positiv Zellen bei TZR<sub>DP04</sub>-exprimierenden T-Zellen gemessen. Dagegen ist der Anteil an apoptotischen Zellen bei iC9+TZR<sub>DP04</sub>-exprimierenden T-Zellen nach Exposition mit AP20187 höher und liegt je nach Spender zwischen 50 % und 60 % (Abbildung 22).



**Abbildung 22: Vergleich der Annexin V-positiven Zellen der vier Spender 232, 221, 199 und 170 nach Behandlung der CD4<sup>+</sup> iC9+TZR<sub>DP04</sub>- und TZR<sub>DP04</sub>-transduzierten T-Zellen mit 10 nM AP20187 (AP) für 48 h.**

Puromycin-selektierte (Puro) CD4<sup>+</sup> iC9+TZR<sub>DP04</sub>- und TZR<sub>DP04</sub>-exprimierende T-Zellen der Spender 232, 221, 199 und 170 wurden mit 10 nM AP20187 (AP) inkubiert. Nach 48 Stunden wurde jeweils der Anteil an apoptotischen Zellen durch Durchflusszytometrie mit Annexin V-FITC mit einem Gate auf die toten Zellen ermittelt. In dieser Abbildung werden die Ergebnisse der vier Spender zum Vergleich nebeneinander dargestellt. Annexin V bindet an Phosphatidylserin an der Außenseite von apoptotischen Zellen und ist damit ein Marker für Apoptose.

Neben iC9 wurden auch mit RC9 Apoptose-Messungen mittels Durchflusszytometrie mit Annexin V-FITC durchgeführt. Hierzu wurden die RC9+TZR<sub>DP04</sub>-transduzierten T-Zellen mit Rapamycin, die iC9+TZR<sub>DP04</sub>-transduzierten T-Zellen mit AP20187 und die TZR<sub>DP04</sub>-transduzierten T-Zellen mit beiden Dimerisierern behandelt, um den Anteil der Annexin V-positiven Zellen in den verschiedenen Ansätzen zu ermitteln. Alle transduzierten T-Zellen wurden außerdem auch mit 500 nM Rapalog versetzt. Rapalog ist ein Analogon von Rapamycin und bindet ebenfalls an FKBP12 und FRB [148].

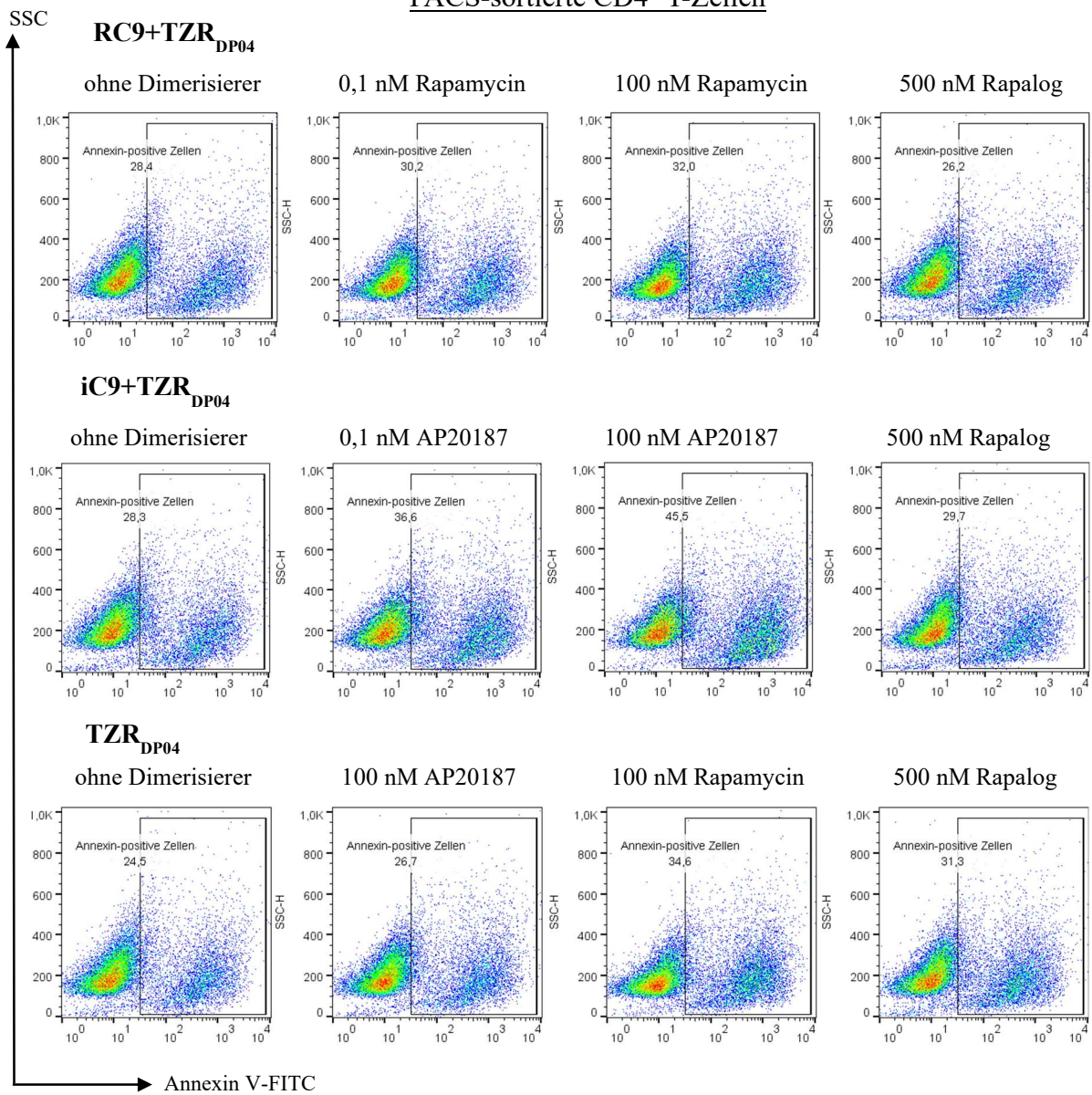
Hierbei zeigten die CD4<sup>+</sup> RC9-exprimierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Donor 149 nach Inkubation mit 100 nM Rapamycin zwischen 20 % und 30 % apoptotische Zellen, wobei in den Kontrollen ohne Rapamycin eine gleiche oder niedrigere Anzahl an Annexin V-positiven Zellen gemessen wurde (Abbildung 23A und B).

Bei den RC9-transduzierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen konnte in diesem Versuch keine Apoptose durch das Suizid-Gen-System RC9 nachgewiesen werden, da in der Kontrolle ohne Rapamycin der Anteil der Annexin V-positiven Zellen genauso hoch wie nach Behandlung RC9-exprimierender Zellen mit 100 nM Rapamycin war (Abbildung 23C).

Die Apoptoseinduktion durch iC9 war effektiver, da die iC9-exprimierenden T-Zellen zwischen 20 % bis 45 % apoptotische Zellen nach Inkubation mit 100 nM AP20187 zeigten (Abbildung 23A, B und C).

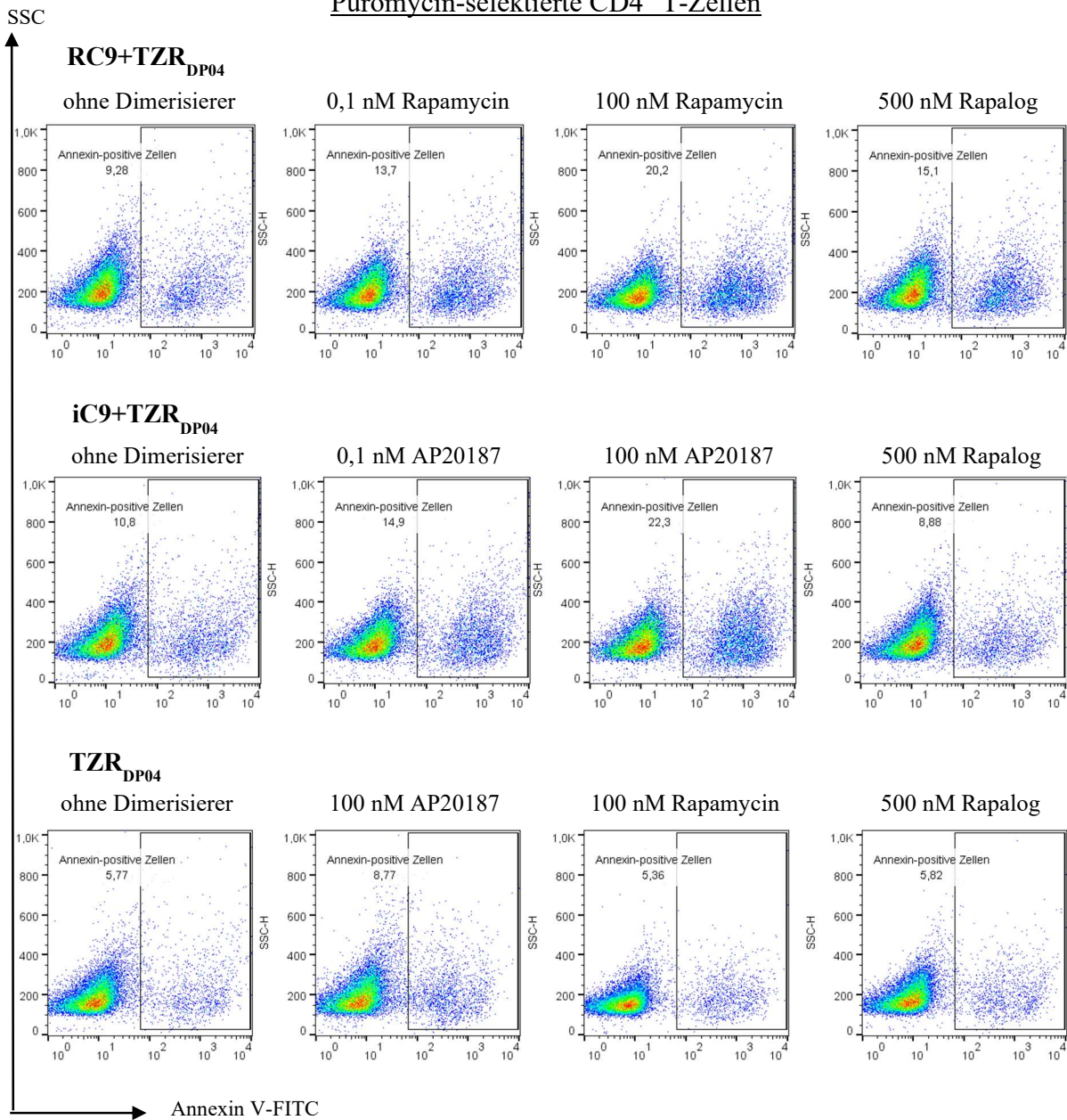
**A Donor 149**

**FACS-sortierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen**

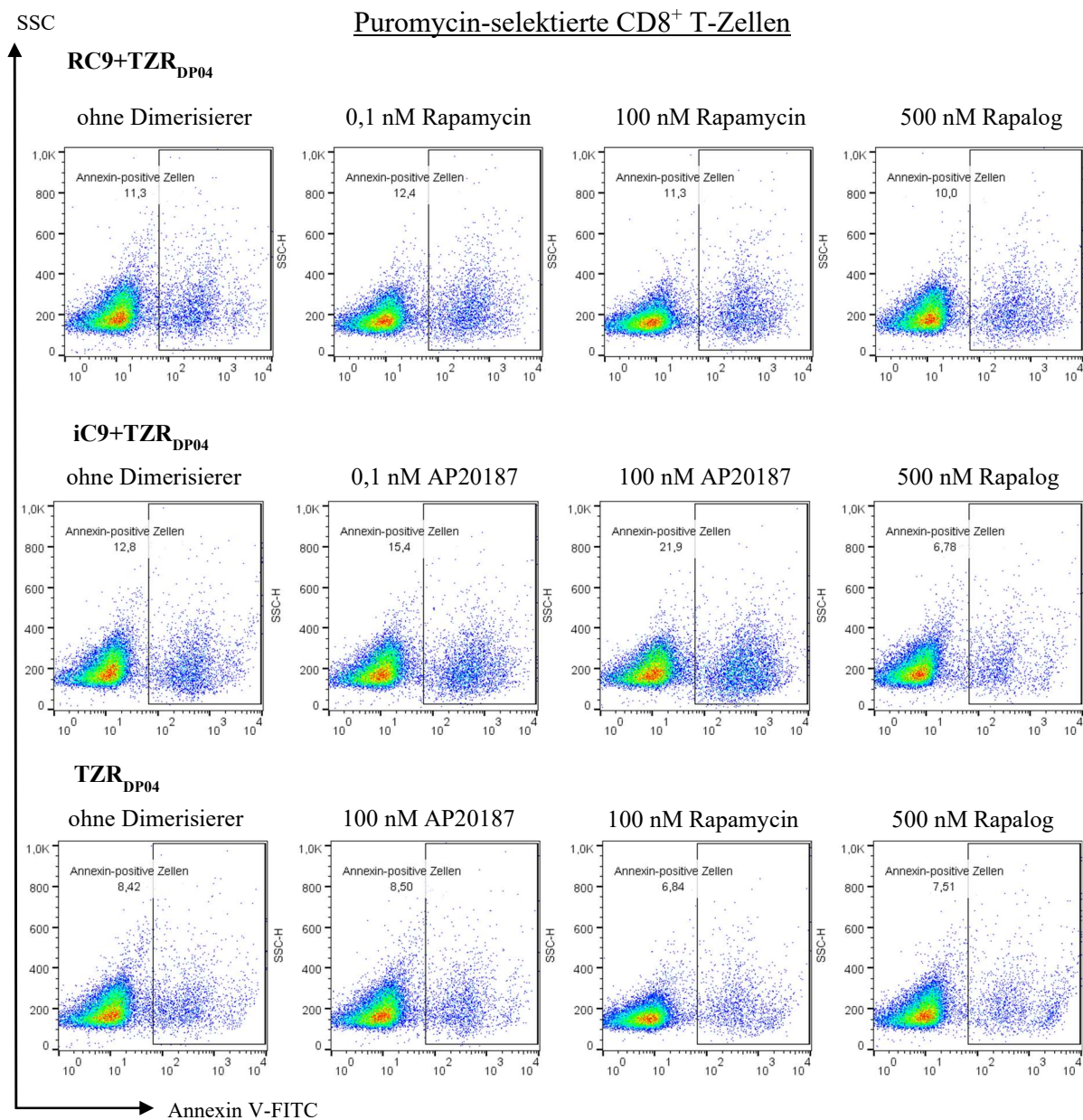


**B Donor 149**

**Puromycin-selektierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen**



**C Donor 149**

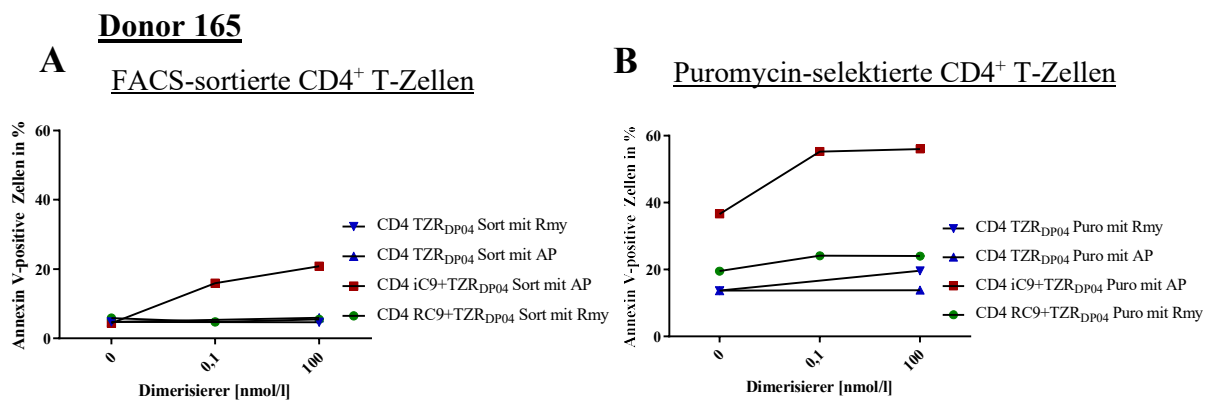


**Abbildung 23: Anteil der Annexin V-positiven RC9+TZR<sub>DP04</sub>-, iC9+TZR<sub>DP04</sub>- und TZR<sub>DP04</sub>-transduzierten T-Zellen von Donor 149 nach Behandlung mit Dimerisierer Rapamycin, Rapalog oder AP20187 für 48 h.**

(A) FACS-sortierte CD4<sup>+</sup> und (B) Puro-selektierte CD4<sup>+</sup> und (C) Puro-selektierte CD8<sup>+</sup> RC9+TZR<sub>DP04</sub>-, iC9+TZR<sub>DP04</sub>- und TZR<sub>DP04</sub>-transduzierte T-Zellen von Spender 149 wurden mit 0 nM, 0,1 nM oder 100 nM Rapamycin oder AP20187 und 500 nM Rapalog inkubiert. Nach 48 Stunden wurde jeweils der Anteil an apoptotischen Zellen durch Durchflusszytometrie mit Annexin V-FITC mit einem Gate auf die toten Zellen ermittelt. Annexin V bindet an Phosphatidylserin an der Außenseite von apoptotischen Zellen und ist damit ein Marker für Apoptose. Diese Abbildung ist eine repräsentative Abbildung von Spender 149 und ist gleich mit den Ergebnissen der Versuche mit Donor 165.

Die Aktivierung von RC9 durch 500 nM Rapalog wurde nachgewiesen, ist aber weniger effektiv als durch Rapamycin (Abbildung 23A, B und C).

Die Apoptose-Messungen wurden mit RC9+TZR<sub>DP04</sub><sup>-</sup>, iC9+TZR<sub>DP04</sub><sup>-</sup> und TZR<sub>DP04</sub><sup>-</sup> transduzierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Spender 165 mit den Dimerisierer Rapamycin und AP20187 wiederholt. Hier zeigten nur die Puromycin-selektierten CD4<sup>+</sup> transduzierten T-Zellen einen höheren Anteil an Annexin-V-positiven Zellen bei RC9+TZR<sub>DP04</sub><sup>-</sup> transduzierten T-Zellen im Vergleich zu den Kontrollen mit TZR<sub>DP04</sub><sup>-</sup> transduzierten T-Zellen (Abbildung 24A und B). Bei Spender 165 und 149 war die Aktivierung von RC9 durch Rapamycin weniger effizient als im Falle der Dimerisierung von iC9 durch AP20187.



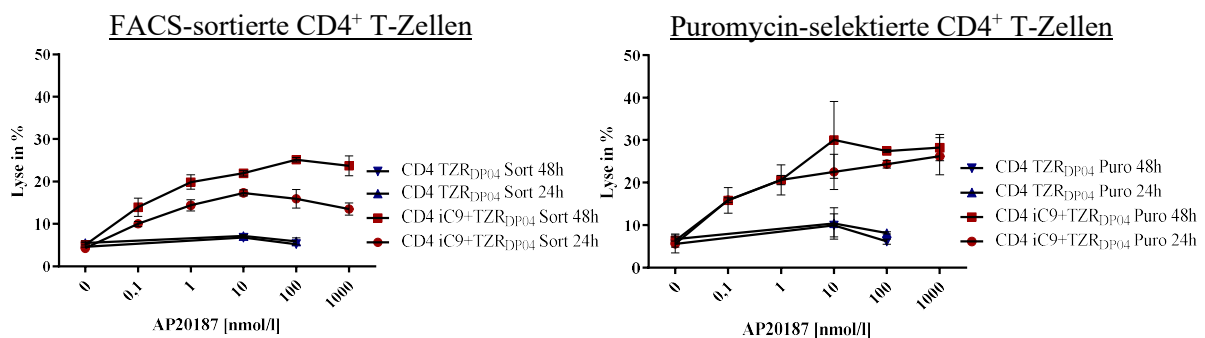
**Abbildung 24: Anteil der Annexin V-positiven CD4<sup>+</sup> RC9+TZR<sub>DP04</sub><sup>-</sup>, iC9+TZR<sub>DP04</sub><sup>-</sup> und TZR<sub>DP04</sub><sup>-</sup> transduzierten T-Zellen von Donor 165 nach Behandlung mit Dimerisierer Rapamycin (Rmy) oder AP20187 (AP) für 48 h.**

(A) FACS-sortierte und (B) Puro-selektierte CD4<sup>+</sup> RC9+TZR<sub>DP04</sub><sup>-</sup>, iC9+TZR<sub>DP04</sub><sup>-</sup> und TZR<sub>DP04</sub><sup>-</sup> transduzierte T-Zellen von Spender 165 wurden mit 0 nM, 0,1 nM oder 100 nM Rapamycin (Rmy) oder AP20187 (AP) behandelt. Nach 48 Stunden wurde jeweils der Anteil an apoptotischen Zellen durch Durchflusszytometrie mit Annexin V-FITC mit einem Gate auf die toten Zellen bestimmt. Annexin V bindet an Phosphatidylserin an der Außenseite von apoptotischen Zellen und ist damit ein Marker für Apoptose. Sort steht für nach TZR<sub>DP04</sub>-hochexprimierenden mittels FACS sortierten T-Zellen und Puro für Puromycin-selektiert. Diese Abbildung ist eine repräsentative Abbildung von Spender 165 und ist gleich mit den Ergebnissen der Versuche mit Donor 149.

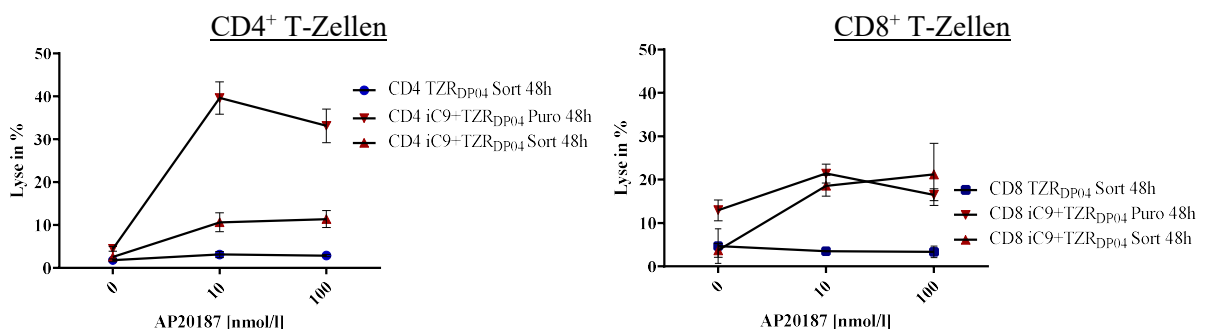
### 3.1.6 Analyse der iC9- und RC9-induzierten Lyse

Die Lyse der iC9/RC9+TZR<sub>DP04</sub>- und TZR<sub>DP04</sub>-transduzierten T-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von AP20187 oder Rapamycin wurde mittels CytoTox-Glo Zytotoxizitäts-Assay bestimmt. Acetylaminofluoren-Aminoluciferin wird durch Freisetzung der Protease Tripeptidyl Peptidase II aus den toten Zellen in Acetylaminofluoren und Aminoluciferin gespalten. Mit Hilfe der Luciferase kann anschließend die Lumineszenz gemessen werden [146]. Die Lumineszenzwerte korrelieren mit der Anzahl toter Zellen. Dadurch erhalten wir eine Aussage über die Apoptoseeffizienz der Caspase-Konstrukte iC9 und RC9 [147]. Bei den Lyse-Messungen wurde wie bei den Apoptose-Messungen der maximale Anteil an toten Zellen bei einer Konzentration von 10 nM AP20187 erreicht. Die iC9-exprimierenden T-Zellen zeigten ähnlich wie bei der Durchflusszytometrie mit Annexin V einen höheren Anteil an lysierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollen (Abbildung 25A und B).

#### A Donor 221



#### B Donor 170

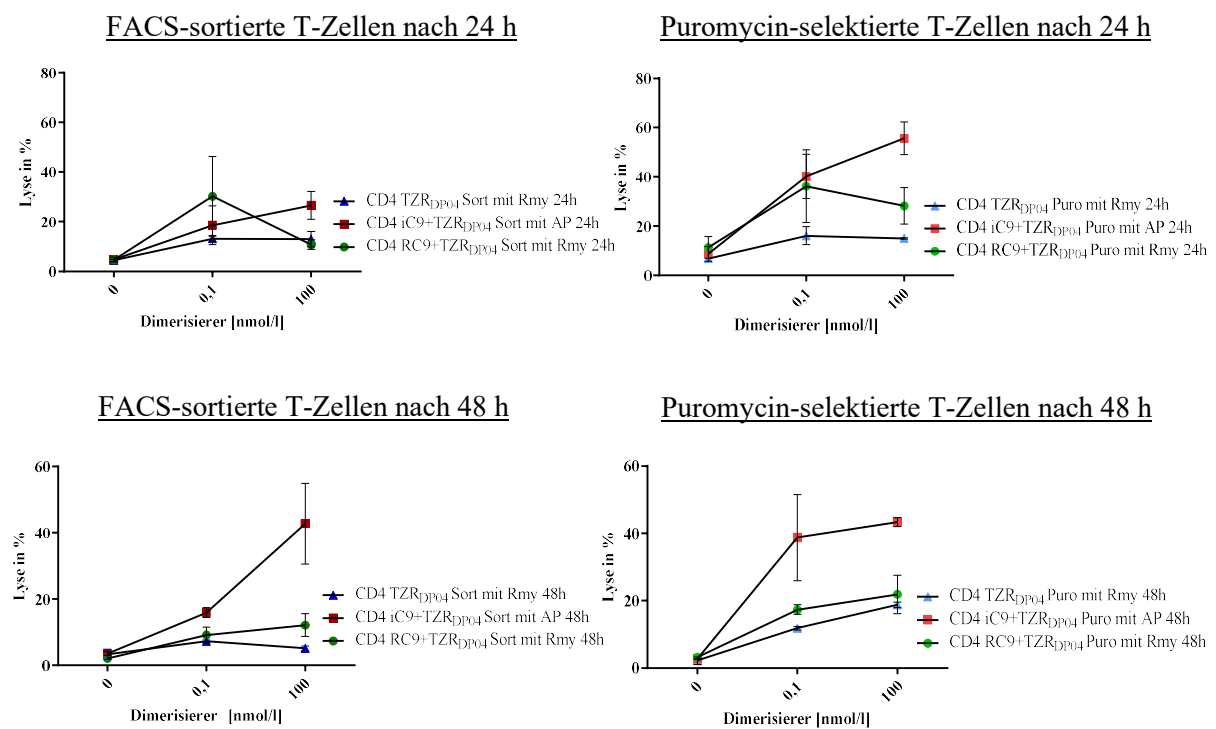


**Abbildung 25: Anteil an lysierten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> iC9+TZR<sub>DP04</sub>- und TZR<sub>DP04</sub>-transduzierten T-Zellen von Spender 221 und 170 in Abhängigkeit von der Konzentration von AP20187.**

(A) FACS-sortierte und Puro-selektierte CD4<sup>+</sup> iC9+TZR<sub>DP04</sub>- und TZR<sub>DP04</sub>-transduzierte T-Zellen von Spender 221 und (B) CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Puro-selektierte iC9+TZR<sub>DP04</sub>- und TZR<sub>DP04</sub>-transduzierte T-Zellen von Spender 170 wurden mit 0 nM, 0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM oder 1000 nM AP20187 für 24 h und 48 h versetzt. Der Anteil an lysierten Zellen wurde mittels CytoTox-Glo Zytotoxizitäts-Assay bestimmt. Sort steht für nach TZR<sub>DP04</sub>-hochexprimierenden mittels FACS sortierten T-Zellen und Puro für Puromycin-selektiert. Gezeigt sind die Mittelwerte von Spender 221 oder 170 (jeweils zwei technische Replikate) mit Standardabweichung. Diese Abbildung ist eine repräsentative Abbildung von Spender 221 und 170 und ist gleich mit den Ergebnissen der Versuche mit Donor 232 und 199.

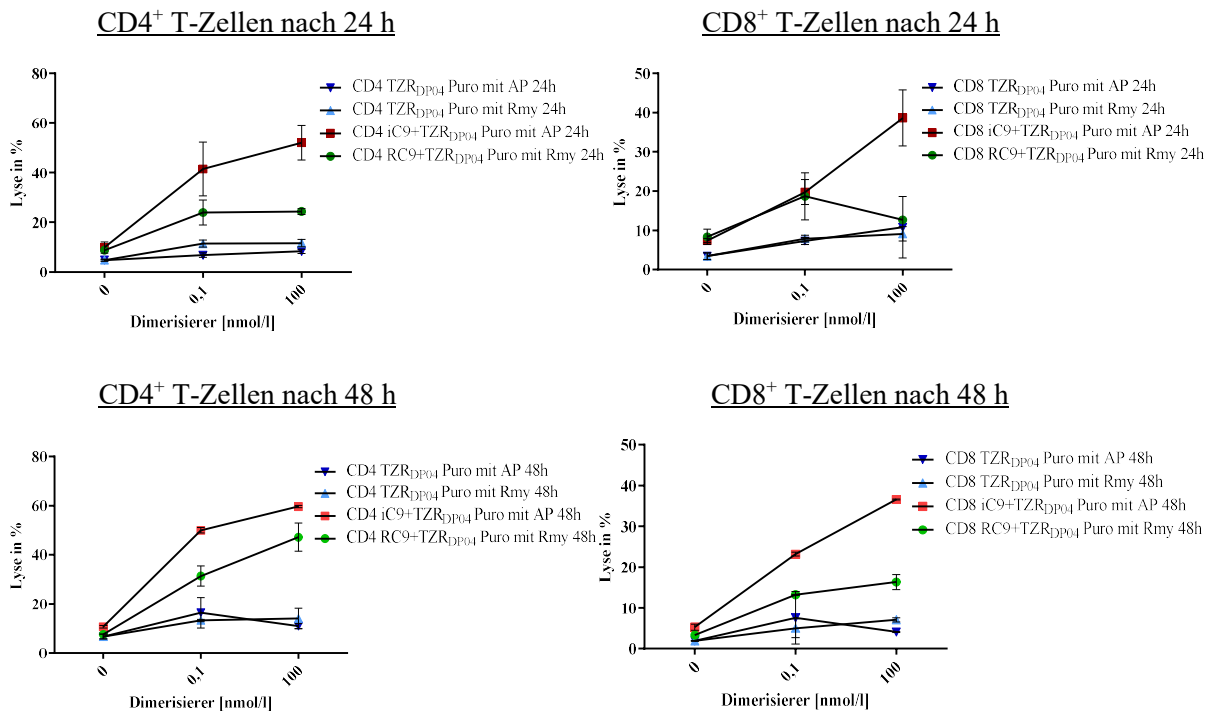
Zur Bestimmung der Apoptoseeffizienz von RC9 wurden ebenfalls Lyse-Messungen durchgeführt. Hierbei wurde RC9 mit dem Konstrukt iC9 verglichen und als Kontrolle T-Zellen verwendet, die nur TZR<sub>DP04</sub> exprimieren. Bei den Ergebnissen wurde ein Unterschied im Lyse-Anteil zwischen den Caspase-Konstrukten und den Kontrollen deutlich. Der Dimerisierer hat keinen direkten toxischen Effekt, da TZR<sub>DP04</sub>-exprimierende T-Zellen ohne iC9 oder RC9 eine konstant niedrige Lyse zeigten, die sich auch nach Zugabe der verschiedenen Dimerisierer in verschiedenen Konzentrationen nicht erhöht hat. Dagegen stieg der Anteil an lysierten Zellen bei iC9 und RC9 nach Zugabe des jeweiligen Dimerisierers AP20187 und Rapamycin an. In den Lyse-Messungen wurde wie in den Apoptose-Messungen eine weniger effiziente T-Zell-Reduktion durch Apoptose beim Konstrukt RC9 nach Anschalten mit dem Dimerisierer Rapamycin als bei iC9 nach Aktivierung durch AP20187 beobachtet (Abbildung 26A und B).

## A Donor 165





## B Donor 149



**Abbildung 26: Anteil an lysierten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> RC9+TZR<sub>DP04</sub>-, iC9+TZR<sub>DP04</sub>- und TZR<sub>DP04</sub>-transduzierten T-Zellen von Donor 165 und 149 in Abhängigkeit von der Konzentration des Dimerisierers.**

(A) FACS-sortierte und Puro-selektierte CD4<sup>+</sup> RC9+TZR<sub>DP04</sub>-, iC9+TZR<sub>DP04</sub>- und TZR<sub>DP04</sub>-transduzierte T-Zellen von Spender 165 und (B) CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Puro-selektierte RC9+TZR<sub>DP04</sub>-, iC9+TZR<sub>DP04</sub>- und TZR<sub>DP04</sub>-transduzierte T-Zellen von Spender 149 wurden für 24 h und 48 h mit 0 nM, 0,1 nM und 100 nM Rapamycin (Rmy) oder AP20187 (AP) inkubiert. Mittels CytoTox-Glo Zytotoxizitäts-Assay wurde durch Lumineszenz-Messung die Lyse in den verschiedenen Ansätzen bestimmt. Sort steht für nach TZR<sub>DP04</sub>-hochexprimierenden mittels FACS sortierten T-Zellen und Puro für Puromycin-selektiert. Gezeigt sind die Mittelwerte von Spender 165 oder 149 (jeweils zwei technische Replikate) mit Standardabweichung. Für alle Versuche mit dem Konstrukt RC9+TZR<sub>DP04</sub> wurden immer die Spender 165 und 149 eingesetzt.

Die Expression von TZR<sub>DP04</sub> und die TZR<sub>DP04</sub>-vermittelte Reaktivität der RC9+TZR<sub>DP04</sub>-, iC9+TZR<sub>DP04</sub>- und TZR<sub>DP04</sub>-transduzierten T-Zellen blieb durch die Caspase-Konstrukte unbeeinflusst. Die Aktivierung von iC9 durch AP20187 oder von RC9 durch Rapamycin induzierte bis zu 60 % Annexin V-positive Zellen und bis zu 40 % lysierte Zellen. Bei allen durchgeführten Experimenten wurde jedoch mit RC9 immer eine geringere Apoptoserate im Vergleich zu iC9 erreicht.

## 3.2 Ergebnisse der invarianten Natürlichen Killer T (iNKT)-Zellen

### 3.2.1 Isolation von iNKT-Zellen aus peripherem Blut

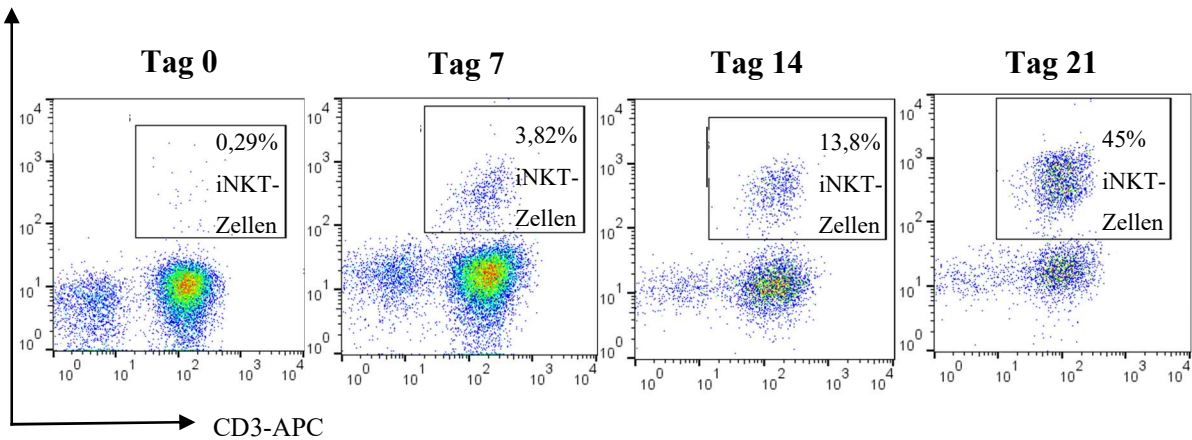
Als weitere Sicherheitsstrategie in der T-Zell-Immuntherapie wurden iNKT-Zellen, die Charakterzüge sowohl von T-Zellen als auch von NK-Zellen aufweisen, mit den T-Zell-Rezeptoren  $TZR_{DP04}$  und  $TZR_{DP03}$  ausgestattet. Das Ziel dieses Projekts war es zu testen, ob TZR-modifizierte iNKT-Zellen im Gegensatz zu T-Zellen zwischen hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zellen unterscheiden können und damit beim Einsatz in der T-Zell-Immuntherapie nur AML-Blasten und keine gesunden Körperzellen wie Fibroblasten angreifen.

Für die Experimente mit den iNKT-Zellen war zunächst deren Expansion *ex vivo* notwendig, da die Frequenz von iNKT-Zellen mit einem Anteil von 0,09 % der peripheren mononukleären Blutzellen im Blut zu niedrig für die folgenden Analysen ist. Es wurde Blut von mehreren gesunden Spendern hinsichtlich iNKT-Zellzahlen gescreent und die iNKT-Zellen über drei Wochen kultiviert. Hierbei wurde ein Spender identifiziert, bei dem am Tag 0 mit 0,29 % iNKT-Zellen (insgesamt ca. 30 000 iNKT-Zellen) im peripheren Blut eine Expansion auf 45 % (insgesamt ca. 5 Mio. iNKT-Zellen) am Tag 21 erreicht wurde (Abbildung 27A). Der Anteil an iNKT-Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie mit PBS57 Tetramer-PE bestimmt, indem PBS57 Tetramer als Analogon von  $\alpha$ -GalCer den T-Zell-Rezeptor der iNKT-Zellen mit der invarianten  $TZR\alpha$ -Kette  $V\alpha24J\alpha18$  markiert. Im Anschluss wurden die iNKT-Zellen durch iNKT-Zell-spezifischer Beads, die auch die invariante  $TZR\alpha$ -Kette  $V\alpha24J\alpha18$  der iNKT-Zellen binden, mittels MACS isoliert.

Bei einem weiteren Spender wurden die iNKT-Zellen vom Tag 0 mit 0,54 % (insgesamt ca. 60 000 iNKT-Zellen) bis Tag 14 mit 43 % iNKT-Zellanteil (insgesamt ca. 5,9 Mio. iNKT-Zellen) stimuliert (Abbildung 27B). Die Isolation der iNKT-Zellen mittels MACS erfolgte in diesem Fall wegen der erfolgreichen Expansion schon am Tag 14, sodass auf die Restimulation und Kultivierung bis zum Tag 21 verzichtet werden konnte.

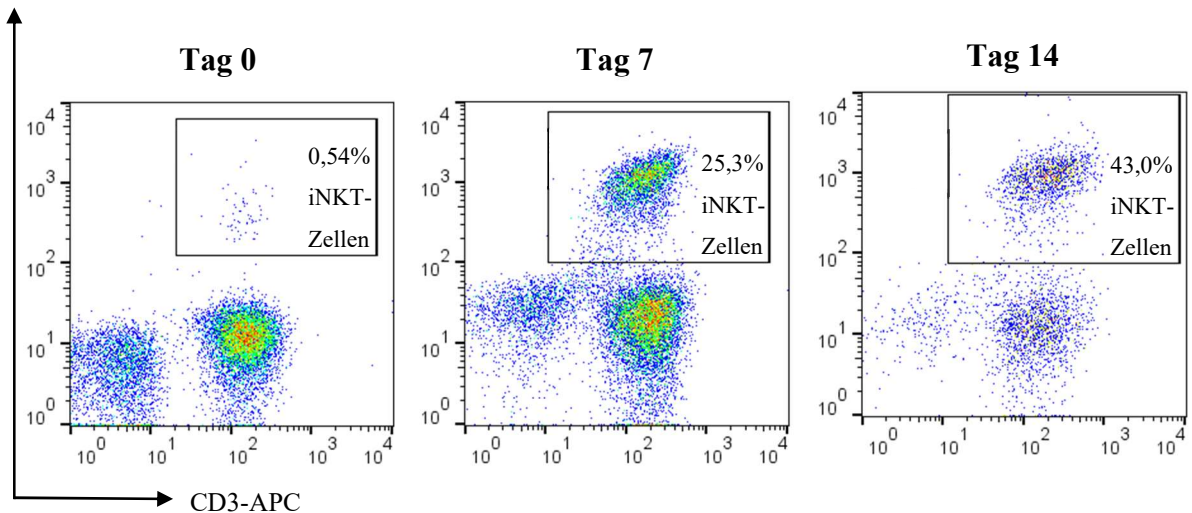
### A Spender 4

PBS57 Tetramer-PE



### B Spender 5

PBS57 Tetramer-PE



**Abbildung 27: Expansion der iNKT-Zellen von Spender 4 und 5.**

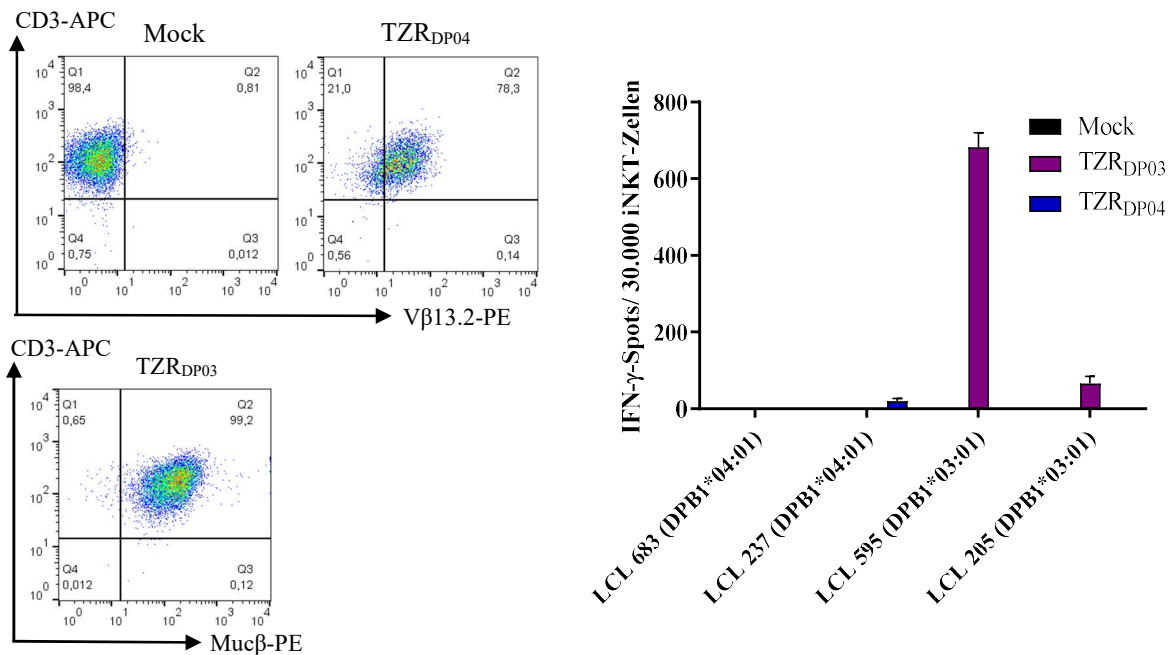
Es wurden PBMCs aus peripherem Blut von (A) Spender 4 und (B) Spender 5 isoliert und zur Expansion der iNKT-Zellen mit 4  $\mu\text{l/ml}$  (100 U/ml) IL-2 und 0,5  $\mu\text{l/ml}$  (100 ng/ml) Glykolipid KRN7000 stimuliert. An Tag 0, 7, 14 und 21 wurde jeweils der iNKT-Zellanteil mittels Durchflusszytometrie mit CD3-APC und PBS57 Tetramer-PE bestimmt. Bei (B) Spender 5 wurde der iNKT-Zellanteil nur an Tag 0, 7 und 14 gemessen, da durch den hohen Anteil an 43,0 % iNKT-Zellen die iNKT-Zellen schon am Tag 14 mittels MACS mit spezifischen Anti-iNKT-Beads, die die invariante TZR $\alpha$ -Kette Va24Ja18 der iNKT-Zellen erkennen, zur weiteren Testung isoliert wurden. Die Durchflusszytometrie wurde mit den FACS-Antikörpern CD3-APC zur Markierung von CD3 auf T-Zellen und PBS57 Tetramer-PE zur Erkennung der invariante TZR $\alpha$ -Kette Va24Ja18 der iNKT-Zellen durchgeführt. Der Anteil an iNKT-Zellen wurde mit einem Gate auf die lebenden Zellen bestimmt. Alle Experimente mit iNKT-Zellen wurden jeweils mit den Spendern 4 und 5 durchgeführt.

### **3.2.2 Spezifische TZR-vermittelte Reaktivität von TZR<sub>DP04</sub>- und TZR<sub>DP03</sub>-modifizierten iNKT-Zellen**

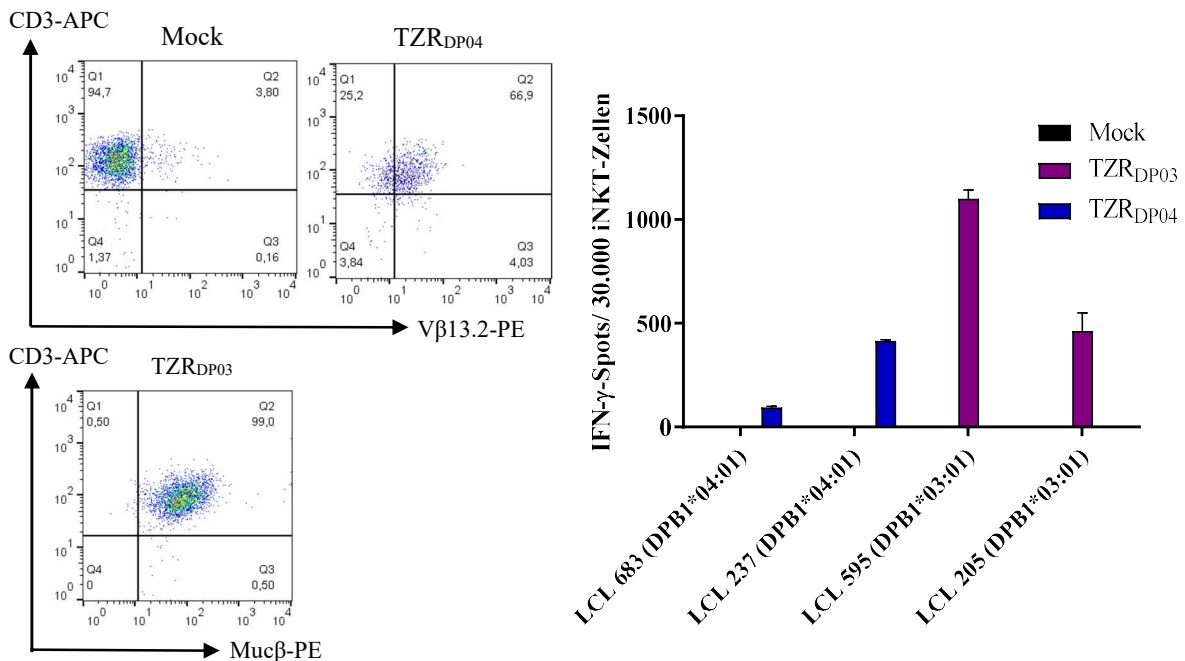
Für die funktionelle Testung der iNKT-Zellen wurden die Zellen mit TZR<sub>DP04</sub>- und TZR<sub>DP03</sub>-kodierender mRNA elektroporiert und die TZR-Spezifität in einem IFN- $\gamma$  ELISpot mit HLA-DPB1\*04:01- und HLA-DPB1\*03:01-positiven lymphoblastoiden Zellen (LCLs) ermittelt. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Expression des TZR<sub>DP04</sub> mit Hilfe des V $\beta$ 13.2-PE-Antikörpers zur Erkennung der V $\beta$ 13.2 TZR $\beta$ -Kette und des TZR<sub>DP03</sub> mit Hilfe des Muc $\beta$ -PE-Antikörper zur Erkennung der murinen konstanten TZR $\beta$ -Kette nachgewiesen. Dabei fällt auf, dass TZR<sub>DP04</sub> mit dem MFI-Wert 30,1 von Spender 4 und 22,5 von Spender 5 geringer exprimiert wird als TZR<sub>DP03</sub> mit dem MFI-Wert 189 von Spender 4 und 120 von Spender 5.

Nach Expression des TZR<sub>DP04</sub> und TZR<sub>DP03</sub> wiesen die iNKT-Zellen eine spezifische Erkennung der HLA-DPB1\*03:01-positiven LCLs durch TZR<sub>DP03</sub> und HLA-DPB1\*04:01-positiven LCLs durch TZR<sub>DP04</sub> in diesem Versuch auf, während die Zellen ohne transgenen TZR die jeweiligen Zellen nicht erkennen (Abbildung 28A und B). Die TZR<sub>DP04</sub>-modifizierten iNKT-Zellen von Spender 4 haben die HLA-DPB1\*04:01-positiven LCLs nicht erkannt (Abbildung 28A).

## A Spender 4



## B Spender 5



**Abbildung 28: Expression von TZRD<sub>DP04</sub> und TZRD<sub>DP03</sub> in iNKT-Zellen und spezifische TZR-vermittelte Reaktivität der TZRD<sub>DP04</sub>- und TZRD<sub>DP03</sub>-modifizierten iNKT-Zellen von Spender 4 und 5 gegenüber lymphoblastoide Zellen (LCLs).**

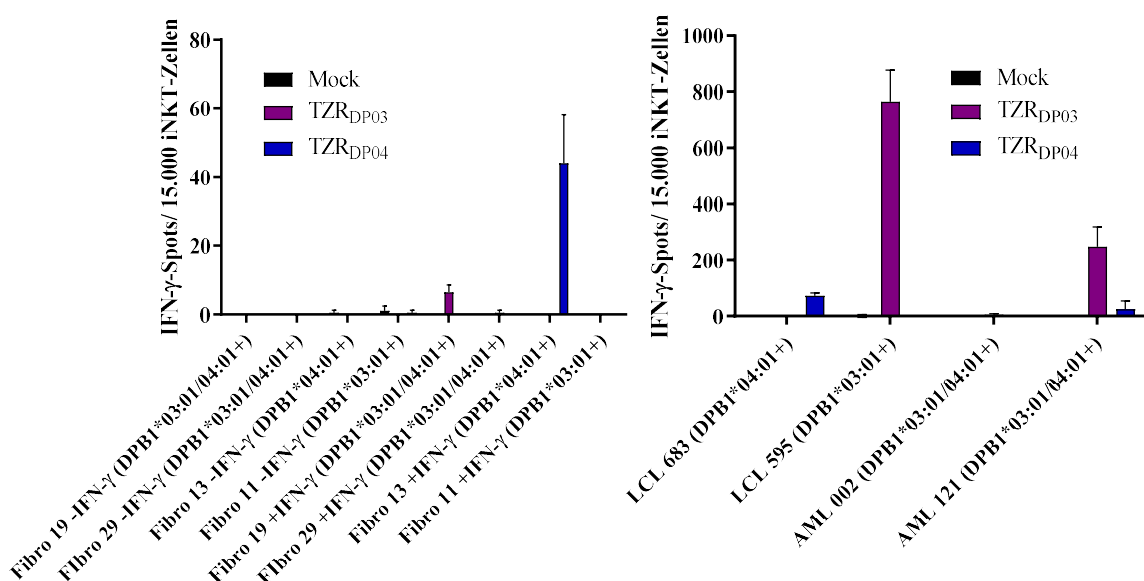
Nach Elektroporation der iNKT-Zellen von (A) Spender 4 und (B) Spender 5 mit TZRD<sub>DP04</sub>- und TZRD<sub>DP03</sub>-kodierender mRNA wurde die Expression von TZRD<sub>DP04</sub> mit Vβ13.2-PE und die Expression von TZRD<sub>DP03</sub> mit Mucβ-PE sowie mit CD3-APC zur Erkennung von T-Zellen mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Der FACS-Antikörper Vβ13.2-PE markiert TZRD<sub>DP04</sub> über die TZRβ-Kette der Vβ13.2-Subfamilie, während TZRD<sub>DP03</sub> über die Erkennung der murinen konstanten TZRβ-Kette nachgewiesen werden konnte. Mock steht für nicht mit RNA elektroporierte Zellen. Die TZR-vermittelte Reaktivität der elektroporierten iNKT-Zellen gegenüber HLA-DPB1\*04:01- oder HLA-DPB1\*03:01-positiven lymphoblastoide Zellen (LCL 683, LCL 237, LCL 595, LCL 205) wurde im IFN-γ ELISpot gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte von Spender 4 oder 5 (jeweils zwei technische Replikate) mit Standardabweichung. Alle Experimente mit iNKT-Zellen wurden jeweils mit den Spender 4 und 5 durchgeführt.

Die Hypothese der Sicherheitsstrategie für den Einsatz von iNKT-Zellen statt konventionellen T-Zellen ist, dass iNKT-Zellen nur AML-Blasten erkennen und nicht-hämatopoetische Zellen wie Fibroblasten nicht angreifen. Bei inflammatorischen Geschehen im Körper wird HLA-DP auf nicht-hämatopoetischen Zellen durch IFN- $\gamma$ -Ausschüttung hochreguliert und TZR<sub>DP04</sub>- oder TZR<sub>DP03</sub>-transduzierte T-Zellen würden neben den HLA-DPB1\*04:01- oder HLA-DPB1\*03:01-positiven AML-Blasten auch körpereigene nicht-hämatopoetische Gewebe zerstören. In weiteren Versuchen sollte nun untersucht werden, ob TZR<sub>DP04</sub>- oder TZR<sub>DP03</sub>-modifizierte iNKT-Zellen keine HLA-DP-hochregulierende Fibroblasten (als Surrogatzellen für nicht-hämatopoetische Gewebe), sondern nur AML-Blasten angreifen.

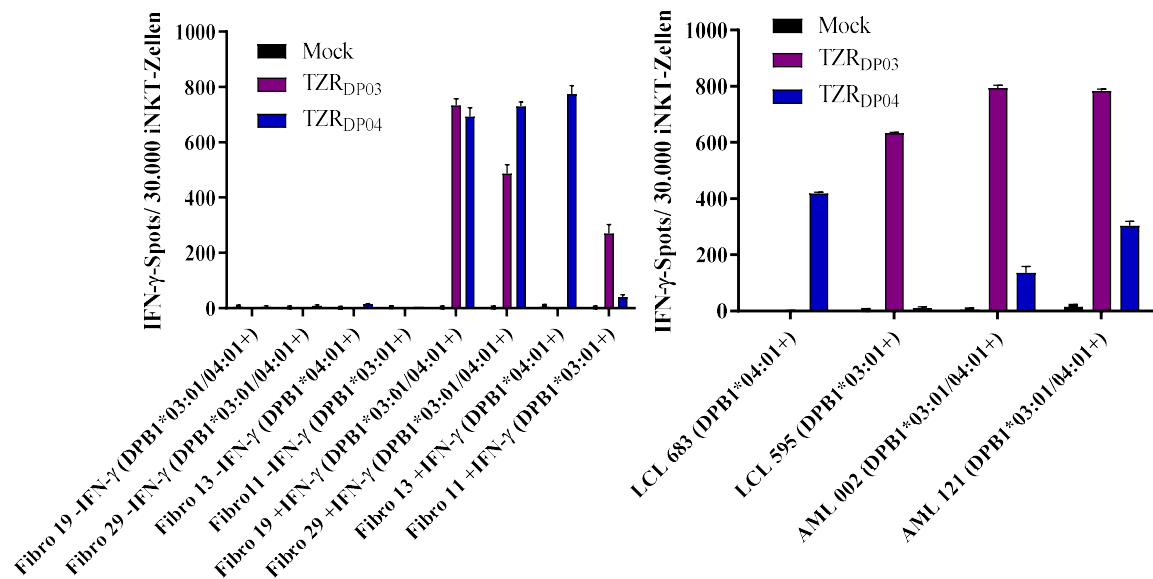
Daher wurde ein IFN- $\gamma$  ELISpot zur Testung der iNKT-Zellen mit TZR<sub>DP04</sub> und TZR<sub>DP03</sub> gegen AML-Blasten und Fibroblasten, die nach IFN- $\gamma$ -Inkubation HLA-DP hochreguliert haben, durchgeführt.

Die unbehandelten Fibroblasten wurden von den TZR-modifizierten iNKT-Zellen nicht erkannt. Bei den Fibroblasten, die 96 Stunden mit IFN- $\gamma$  behandelt wurden und damit HLA-DP hochreguliert haben, war eine deutliche IFN- $\gamma$ -Ausschüttung bei HLA-DPB1\*04:01-exprimierenden Fibroblasten durch Erkennung über TZR<sub>DP04</sub> und bei HLA-DPB1\*03:01-exprimierende Fibroblasten über TZR<sub>DP03</sub> messbar. Dies ist insbesondere bei Spender 5 der Fall. Als positive Kontrolle werden die HLA-DPB1\*04:01- und HLA-DPB1\*03:01-positiven AML-Blasten von TZR<sub>DP04</sub>- und TZR<sub>DP03</sub>-exprimierenden iNKT-Zellen erkannt (Abbildung 29A und B).

### A Spender 4



## B Spender 5



**Abbildung 29: Spezifische TZR-vermittelte Reaktivität der TZR<sub>DP04</sub>- und TZR<sub>DP03</sub>-modifizierten iNKT-Zellen von Spender 4 und 5 gegenüber lymphoblastoide Zellen (LCLs), Fibroblasten (Fibro) mit und ohne IFN- $\gamma$ -Vorbehandlung und AML-Blasten.**

Nach Elektroporation der iNKT-Zellen von (A) Spender 4 und (B) Spender 5 mit TZR<sub>DP04</sub>- und TZR<sub>DP03</sub>-kodierender RNA wurde die TZR-vermittelte Reaktivität der iNKT-Zellen gegenüber HLA-DPB1\*04:01- oder HLA-DPB1\*03:01-positiven lymphoblastoide Zellen (LCL 683, LCL 595), unbehandelte Fibroblasten (Fibro 19/29/13/11 -IFN- $\gamma$ ), Fibroblasten nach Behandlung mit IFN- $\gamma$  für 96 h (Fibro 19/29/13/11 + IFN- $\gamma$ ) und HLA-DPB1\*04:01- und HLA-DPB1\*03:01-positiven AML-Blasten (AML 002, AML 121) im IFN- $\gamma$  ELISpot gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte von Spender 4 oder 5 (jeweils zwei technische Replikate) mit Standardabweichung. Mock steht für nicht mit RNA elektroporierten Zellen. Alle Experimente mit iNKT-Zellen wurden jeweils mit den Spendern 4 und 5 durchgeführt.

In den hier durchgeführten Experimenten wurde die spezifische TZR-vermittelte Reaktivität von TZR<sub>DP04</sub>- oder TZR<sub>DP03</sub>-elektroporierten iNKT-Zellen durch Erkennung HLA-DPB1\*04:01- oder HLA-DPB1\*03:01-positiver LCLs und AML-Blasten durch IFN- $\gamma$ -Freisetzung gezeigt. Neben den AML-Blasten und LCLs wurden auch Fibroblasten, die HLA-DPB1\*04:01 oder HLA-DPB1\*03:01 nach IFN- $\gamma$ -Exposition hochreguliert haben, erkannt. Somit konnte die Eigenschaft der Unterscheidung zwischen hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zellen bei den iNKT-Zellen in diesen hier durchgeführten Versuchen nicht nachgewiesen werden.

## 4 Diskussion

### 4.1 Diskussion der induzierbaren Caspase-9 (iC9) und Rapamycin-induzierbaren Caspase-9 (RC9)

#### 4.1.1 Diskussion der iC9- und RC9-vermittelten Apoptose

Das Ziel der Arbeit war es, mit Hilfe der Caspase-Konstrukte iC9 oder RC9 modifizierte T-Zellen gezielt zu eliminieren. Dabei wurden für die Anwendung in der T-Zell-Immuntherapie zwei alternative Verfahren untersucht: iC9 und RC9 wurden in iC9+TZR<sub>DP04</sub>- oder RC9+TZR<sub>DP04</sub>-transduzierten T-Zellen durch Behandlung mit den Dimerisierern AP20187 oder Rapamycin bei Komplikationen gezielt angeschaltet und die T-Zellen eliminiert.

Nach Inkubation von iC9+TZR<sub>DP04</sub>- und TZR<sub>DP04</sub>-transduzierten T-Zellen mit 100 nM AP20187 für 48 Stunden wurde eine Reduktion der lebenden und Zunahme der toten Zellen beobachtet (Abbildung 13). In bis zu 60 % der Zellen wurde die Apoptose induziert (Abbildung 20 und Abbildung 21) und in bis zu 40 % der Zellen wurde nach Aktivierung von iC9 eine Lyse-Reaktion nachgewiesen (Abbildung 25).

Bei den Ergebnissen der TZR<sub>DP04</sub>-Expression, die mit einer Durchflusszytometrie mit Vβ13.2-PE-Antikörper ermittelt wurde, wird deutlich, dass die Induktion der Apoptose von der iC9-Expressionsstärke abhängig ist, da die Anzahl der TZR<sub>DP04</sub>-hochexprimierenden Zellen nach Aktivierung der Caspase-9 stärker sinkt als bei TZR<sub>DP04</sub>-niedrigexprimierenden Zellen (Abbildung 16). Somit wird die induzierbare Caspase-9 nach Zugabe von AP20187 hauptsächlich in den hochexprimierenden T-Zellen angeschaltet. Niedrigexprimierende T-Zellen überleben den Prozess der Dimerisierung der Caspase-9. Für den Einsatz der induzierbaren Caspase-9 wurde nur der Anteil hochexprimierender T-Zellen sortiert, um beim Anschalten von iC9 durch AP20187 eine maximale Apoptoserate zu erzielen.

Die Funktion der induzierbaren Caspase-9 als Suizid-Gen-System wird in der Literatur als sehr potent und sicher angesehen, da mehr als 85 % bis 90 % der iC9-transduzierten Zellen schon nach einer Gabe des Dimerisierers AP1903 innerhalb von zwei Stunden eliminiert wurden [47,149,150]. Dies wurde in CD19-CAR-T-Zellen mit Apoptoseeffizienz von über 90 % nach Aktivierung von iC9 mittels 10 nM bis 20 nM Dimerisierer nachgewiesen [151] und auch in dem hier gewählten System der iC9+TZR<sub>DP04</sub>-exprimierenden T-Zellen beobachtet.

Des Weiteren führte die einmalige Dosis des Dimerisierers im Maus-humanen Xenograft Modell zur Apoptose von über 99 % der Epstein Barr-Virus-spezifischen iC9-positiven zytotoxischen T-Lymphozyten [152].



Nach einer einmaligen Gabe des Dimerisierers in einer klinischen Studie kann eine kleine Zellpopulation, die eine geringe iC9-Expression aufweist, überleben [71]. Somit sollte die Gefahr einer anhaltenden oder erneut auftretenden GvHD durch TZR<sub>DP04</sub>-exprimierende T-Zellen verringert sein, ein Rezidivrisiko bleibt jedoch bestehen.

Durch die Gabe von 0,4 mg/kg Dimerisierer AP1903 in einer klinischen Studie wurde iC9 in alloreaktiven T-Zellen des Patienten nach einer haploidenten humanen Blutstammzelltransplantation aktiviert [153] und damit konnten die Symptome einer systemischen Entzündungsreaktion durch T-Zell-Aktivierung bei der GvHD kontrolliert werden [149,150,153].

In klinischen Studien wurden bei einem Leukämieresidiv nach Stammzelltransplantation iC9-positive CD19-spezifische Donor T-Zellen verabreicht. Nach Einsetzen von GvHD-assoziierten Hauterscheinungen wurden diese nach einer einmaligen Gabe von AP1903 durch eine Reduktion der transduzierten T-Zellen um 90 % ohne Effekt auf endogene T-Zellen nach 24 Stunden erfolgreich beseitigt [152]. Bei Langzeitbeobachtungen dieser Studie wurde eine erfolgreiche Wiederherstellung des Immunsystems durch virusspezifische T-Zellen nachgewiesen und eine GvHD ist bis dreieinhalb Jahre nach der initialen T-Zell-Infusion nicht wiederholt aufgetreten [149].

Neben der induzierbaren Caspase-9 wurde auch das Suizid-Gen-System Rapamycin-induzierbare Caspase-9 als alternativer Mechanismus getestet, was aus zwei verschiedenen Dimerisierungsdomänen FRB und FKBP12 aufgebaut ist und durch Rapamycin dimerisiert und aktiviert werden kann.

Bei der Durchflusszytometrie mit Annexin V wurde ein Anteil an apoptotischen Zellen von 20 % bis 40 % durch die Aktivierung von RC9 beobachtet (Abbildung 23 und Abbildung 24). In den Lyse-Messungen konnten meist um die 20 % tote Zellen nach Induktion von RC9 durch Rapamycin erreicht werden (Abbildung 26). Dies ist deutlich geringer als in dem iC9-System. In anderen Experimenten mit dem Konstrukt FRB-FKBP-RC9 konnten bis zu 90 % tote Zellen nach Induktion der Apoptose durch Rapamycin nachgewiesen werden [75].

Die Induktion der Apoptose erfolgte ebenfalls in einem präklinischen Mausmodell, indem Mäuse nach Injektion von Tumorzellen mit RC9-CAR-T-Zellen behandelt wurden. Drei Tage nach der T-Zell-Infusion wurde an einen Teil der Mäuse 5 mg/kg Rapamycin verabreicht.

Nach Inkubation von Rapamycin für drei Tage konnte in den mit Rapamycin-behandelten Mäusen keine RC9-CAR-T-Zellen mehr nachgewiesen werden, während in den Mäusen ohne Rapamycin-Gabe eine höhere Anzahl an T-Zellen zu beobachten war [75].

In einer anderen Studie zeigte sich *in vitro* eine hohe Aktivität von RC9 bei Behandlung mit 100 pM Rapamycin, bei niedriger Konzentration konnte weiterhin eine Aktivierung von RC9 bei langsamerer Kinetik beobachtet werden [76].

Die Funktion der induzierbaren Caspase-9 und Rapamycin-induzierbaren Caspase-9 in modifizierten T-Zellen wurde wie in der Literatur auch in dieser Arbeit mit TZR<sub>DP04</sub> nachgewiesen. Eine möglichst hohe Apoptoseeffizienz kann aber bevorzugt beim Einsatz hochexprimierender T-Zellen erreicht werden.

#### **4.1.2 Vergleich von iC9 und RC9 als Sicherheitsmechanismen in der T-Zell-Immuntherapie**

Neben der induzierbaren Caspase-9 (iC9), die durch Homodimerisierung mit AP20187 aktiviert wird, gibt es die Rapamycin-induzierbare Caspase-9 (RC9) als Sicherheitskonstrukt. Im Unterschied zu iC9 benötigt RC9 die zwei verschiedenen Dimerisierungsdomänen FRB und FKBP12, die durch den Heterodimerisierer Rapamycin verbunden werden können.

Unter den verschiedenen Konstruktionsmöglichkeiten, in denen zwei katalytische Domänen über unterschiedliche Dimerisierungsdomänen zusammengebaut werden können, wurde die Kombination FRB-FKBP-Caspase-9 als effizientes Suizid-Gen-System mit maximaler Apoptoseeffizienz beschrieben [75]. Diese Struktur wurde auch im Rahmen dieser Arbeit mit der induzierbaren Caspase-9 verglichen.

Bei allen durchgeführten Experimenten im Rahmen dieses Projektes wurde jedoch mit RC9 immer eine reduzierte Apoptoserate im Vergleich zu iC9 erreicht.

Zum Vergleich von iC9 und RC9 zeigte sich, dass nach Induktion von RC9 durch die Zugabe von Rapamycin die Anzahl an Annexin V-positiven Zellen niedriger war als nach Aktivierung von iC9 durch die Zugabe von AP20187. Bei der Durchflusszytometrie mit Annexin V wurde nur ein Anteil an apoptotischen Zellen von 20 % bis 40 % durch Aktivierung von RC9 beobachtet, während nach Aktivierung von iC9 Apoptoseraten zwischen 40 % bis 60 % gefunden wurden.

Bei den RC9-exprimierenden T-Zellen war die Differenz der Annexin V-positiven Zellen mit und ohne Zugabe von Rapamycin gering. Dies zeigt nochmals die deutlich schlechtere Effizienz des Apoptose-Konstrukts RC9 (Abbildung 23 und Abbildung 24).

Dieses Ergebnis wurde durch Lyse-Messungen bestätigt, bei denen die Anzahl an lysierten Zellen bei Aktivierung von RC9 immer unter dem Lyse-Anteil nach Induktion von iC9 lag (Abbildung 26).

Dagegen wurden in der Literatur kaum Unterschiede in der Effizienz von iC9 und RC9 aufgezeigt. Im Mausmodell beim Vergleich von iC9-exprimierenden T-Zellen mit AP20187 und RC9-transduzierten T-Zellen mit Rapamycin wurden in allen Mäusen bei beiden Suizid-Gen-Systemen nahezu keine Signale mehr nachgewiesen, sodass in der T-Zell-Reduktion zwischen RC9 und iC9 kein signifikanter Unterschied beobachtet wurde [75].

Bei *in vivo* Experimenten mit genmodifizierten T-Zell-Injektion in Mäuse wurden die Caspase-Konstrukte iC9 und RC9 mit 5 mg/kg AP20187 und 10 mg/kg Rapamycin aktiviert und mehr als 80 % T-Zell-Reduktion konnte sowohl durch iC9 als auch durch RC9 nachgewiesen werden [76].

Der Vergleich verschiedener Kombinationen von Caspase-9, FKBP12 und FRB zeigte, dass die Apoptoseeffizienz bei zwei getrennten Caspase-9-Konstrukten mit jeweils FKBP12- oder FRB-Domäne bei 100 % liegt, während nur ca. 30 % der Jurkat-Zellen mit dem kompakten Konstrukt Caspase-FKBP12-FRB nach Zugabe von Rapamycin getötet wurden [75].

Der Vorteil der Verwendung der Rapamycin-induzierbaren Caspase-9 besteht darin, dass Rapamycin ein zugelassenes Medikament darstellt und als Immunsuppressivum in Kliniken eingesetzt wird. Die immunsuppressive Wirkung würde bei der Verwendung als Dimerisierer bei der T-Zell-Immuntherapie keinen Nachteil darstellen, da die Reduktion der T-Zellen im Therapiestadium beim Einsatz der modifizierten T-Zellen sogar erwünscht wäre.

Zusammenfassend kann die Verwendung der Rapamycin-induzierbaren Caspase-9 in modifizierten T-Zellen mit TZR<sub>DP04</sub> ein vielversprechender Ansatz sein, wenn weitere Optimierungen zur Konstruktion von RC9, Verbesserung der Expression des Konstrukts und Sortieren nur der hochexprimierenden Zellen mittels Durchflusszytometrie angegangen werden. Hierfür können verschiedene Kombinationen der Bestandteile Caspase-9, FKBP12 und FRB oder die getrennten Konstrukte Caspase-9 mit FKBP12 und Caspase-9 mit FRB getestet werden [75]. Außerdem können die Einzelkomponenten Caspase-9, FKBP12 und FRB über unterschiedlich lange flexible Aminosäure-Linker verbunden werden [75]. Ziel ist es, eine möglichst hohe Expression von RC9 in den transduzierten T-Zellen und eine möglichst effiziente Aktivierung von RC9 durch Rapamycin zu erreichen.

## 4.2 Modifizierte invariante Natürliche Killer T (iNKT)-Zellen als Sicherheitskonzept in der T-Zell-Immuntherapie

Es wurden iNKT-Zellen für die Therapie der AML evaluiert, da die Ausmaße der GvHD sowohl von der Produktion von IL-4 durch iNKT-Zellen als auch der Anwesenheit und Aktivierung der Treg-Zellen beeinflusst werden und geringer sind als bei T-Zellen [93]. So wurde als weitere Sicherheitsstrategie in der T-Zell-Immuntherapie die Modifikation von iNKT-Zellen mit spezifischen T-Zell-Rezeptoren untersucht.

Es wurde die Fragestellung angegangen, ob TZR-modifizierte iNKT-Zellen zwischen AML-Blasten und Fibroblasten nach IFN- $\gamma$ -Exposition unterscheiden können.

Nach der Elektroporation der iNKT-Zellen mit TZR<sub>DP04</sub> und TZR<sub>DP03</sub> wurden HLA-DPB1\*04:01-positive LCLs und AML-Blasten durch TZR<sub>DP04</sub> erkannt und HLA-DPB1\*03:01-positive LCLs und AML-Blasten durch TZR<sub>DP03</sub>. Doch auch die Erkennung HLA-DPB1\*04:01- oder HLA-DPB1\*03:01-positiver Fibroblasten nach IFN- $\gamma$ -Behandlung wurde im IFN- $\gamma$  ELISpot nachgewiesen (Abbildung 29).

Dagegen konnte beim Einsatz von iNKT-Zellen, die aus allogenen Blutstammzellen generiert wurden, gezeigt werden, dass das Risiko einer GvHD im Vergleich zu konventionellen T-Zellen deutlich erniedrigt ist. So konnte nachgewiesen werden, dass die iNKT-Zellen die Tumorzellen über multiple Mechanismen mit einer höheren Effizienz angreifen, solide Tumore besser infiltrieren, das immunsuppressive Mikromilieu von soliden Tumoren ändern und nur geringe GvHD induzieren [116,129,130]. Da iNKT-Zellen nicht auf Mismatch von HLA-Molekülen und Protein-Alloantigene reagieren, besteht beim Einsatz dieser Zellen kein GvHD-Risiko [129,130]. Bei der Modifikation von iNKT-Zellen mit chimären Antigenrezeptor (CAR) gegen das B-Zell-Reifung-Antigen (B-Cell Maturation Antigen, BCMA) wurde im Mausmodell keine GvHD nachgewiesen [130].

Im Gegensatz zu naiven T-Zellen und NK-Zellen haben iNKT-Zellen in Studien die besondere Eigenschaft gezeigt, dass diese Zellgruppe bei der Interaktion mit unterschiedlichen Zelltypen durch verschiedene Signale aktiviert oder inhibiert werden können. Je nach Typ der antigenpräsentierenden Zellen, welche die iNKT-Zellen über CD1d-Expression aktivieren, können iNKT-Zellen sowohl pro- als auch antiinflammatorisch wirken [154]. Bei fehlender CD1d-Expression von intestinalen Epithelzellen zeigte sich eine gesteigerte Inflammation, während bei CD1d-Deletion von hämatopoetischen Zellen ein gegenteiliger Effekt beobachtet wurde [154,155].

So können die iNKT-Zellen mit hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zellen unterschiedlich interagieren, wie beispielsweise mit einer verminderten Inflammation bei CD1d-Expression nicht-hämatopoetischer Zellen im Magen-Darm-Trakt und in der Leber [154]. Dadurch begründet sich die Hypothese, dass iNKT-Zellen bei den gesunden Fibroblasten antiinflammatorisch wirken und damit die GvHD abmildern könnten, während sich bei den AML-Blasten der proinflammatorische Charakter durchsetzen und den GvL-Effekt verstärken könnte.

In den hier durchgeführten Experimenten konnte die spezifische Aktivierung der TZR<sub>DP04</sub>- und TZR<sub>DP03</sub>-modifizierten iNKT-Zellen anhand der IFN- $\gamma$ -Sekretion gezeigt werden. Nachdem hier die AML-Blasten wie auch die Fibroblasten erkannt wurden, stellt der Einsatz von iNKT Zellen bei Verwendung eines transgenen allo-HLA-DP-spezifischen TZRs vermutlich keinen Vorteil dar. Da hier nur zwei Spender untersucht wurden, kann die Aussage noch nicht dahingehend verallgemeinert werden, ob TZR-modifizierte iNKT-Zellen als Sicherheitskonzept eine GvHD vermeiden können. Eine Limitierung in der breiten Anwendung von iNKT-Zellen besteht darin, dass die Zellen in geringer Frequenz im Blut vorliegen und *ex vivo* amplifiziert werden müssen. Um die Anzahl an isolierten iNKT-Zellen noch zu erhöhen, können die einzelnen Schritte der Kultivierung und Isolation über Einsatz von Zytokinen und Feederzellen, Veränderung des Mediums und Verlängerung der Intervalle optimiert werden [95]. Zur Modifikation der iNKT-Zellen mit spezifischen T-Zell-Rezeptoren können die verschiedenen Methoden des TZR-Gentransfers untersucht werden.

### **4.3 Weitere Sicherheitsstrategien in der T-Zell-Immuntherapie**

Neben der induzierbaren Caspase-9 gibt es noch weitere Sicherheitsmechanismen in der T-Zell-Immuntherapie, die zur Abmilderung der GvHD eingesetzt werden könnten. Das Ziel ist dabei, die Nebenwirkungen durch An- oder Abschalten der Funktion der T-Zellen zu kontrollieren.

Zum Abschalten der modifizierten T-Zellen kann ein Konstrukt aus gekürzten epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (huEGFRt) als Oberflächenstruktur und Cetuximab angewendet werden. So wird neben dem spezifischen T-Zell-Rezeptor TZR<sub>DP04</sub> auch huEGFRt in die T-Zellen transduziert. Cetuximab wird als Antikörper gegen EGFR eingesetzt [156], wenn die T-Zell-Funktion bei schweren Auswirkungen der GvHD gestoppt werden soll.

Cetuximab vermittelt die Interaktion zwischen NK-Zellen und dendritischen Zellen über die Bindung des Rezeptors Fc $\gamma$ RIIa und aktiviert damit die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität [156–158]. So kann durch Zugabe von Cetuximab über die Bindung an EGFR der transduzierten T-Zelle und Ausschüttung von Perforin und Granzymen durch die aktivierte NK-Zelle die T-Zelle lysiert werden und damit die GvHD abgemildert werden. Das Sicherheitssystem aus huEGFRt wurde in Kombination mit CD19-spezifischen chimärischen Antigenrezeptor (CAR) T-Zellen als Therapie gegen B-Zell-Malignome entwickelt und angewendet [159].

Im Mausmodell konnten die CD19 CAR T-Zellen mit huEGFRt gezielt maligne B-Zellen eliminieren, was nach Gabe von Cetuximab unterbrochen wurde. Ein Anstieg der B-Zell-Zahlen und der Immunglobulin-Produktion konnte beobachtet werden [159].

Ein Nachteil von Sicherheitssystemen wie iC9, RC9 oder huEGFRt ist, dass nach Abschalten der Funktion der Donor T-Zellen zwar die GvHD abgemildert werden kann, dadurch aber gleichzeitig die therapeutischen T-Zellen eliminiert werden und auch das Abstoppen der Therapie gegen die AML in Kauf genommen werden muss.

Eine weitere Möglichkeit als Sicherheitsmechanismus in der T-Zell-Immuntherapie ist ein System aus sogenanntem On- und Off-Switch. Diese Sicherheitsstrategie wurde bereits für CAR T-Zellen getestet. Ein On-Switch-CAR besteht aus einer extrazellulären spezifischen Antigen-Bindungsdomäne (single chain variable fragment, scFV) mit costimulatorischen Domänen zur Antigenerkennung und getrennt davon die Immunrezeptor-Tyrosin-Aktivatorsequenz (ITAM) der T-Zell-Rezeptor-Untereinheit CD3 $\zeta$  zur Signalaktivierung [160]. Nach Erkennung des Tumorantigens und in Anwesenheit eines kleinen Moleküls, welches die Bindung der beiden getrennten Strukturen vermittelt, kann die modifizierte CAR T-Zelle aktiviert werden [160,161]. Durch Zugabe des kleinen Moleküls kann die Wirkdauer, die Lokalisation und die T-Zell-Aktivität titrierbar und reversibel kontrolliert und damit auch die Toxizität abgemildert werden [160,162]. So konnten genetisch-veränderte CAR T-Zellen entwickelt werden, die in Abhängigkeit von der Konzentration des kleinen Moleküls AP21967 unterschiedliche hohe zytolytische Aktivitäten aufweisen konnten [160,163].

Die Übertragbarkeit des On/Off-Switches auf TZR-modifizierte T-Zellen könnte schwierig sein, da ein T-Zell-Rezeptor jeweils aus einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette aufgebaut ist, während der chimäre Antigenrezeptor aus einer Kette besteht. So konnten die On- und Off-Switch-Systeme bisher nur bei CAR T-Zellen angewandt werden und der Einsatz in TZR-veränderten T-Zellen noch nicht gezeigt werden.

## 5 Zusammenfassung

Im Fokus der Arbeit steht die Testung von Sicherheitsmechanismen in AML-spezifischen T-Zellen im Kontext der allogenen hämatopoetischen Blutstammzelltransplantation. Zur Verbesserung der Therapie der AML können bei der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation Donor T-Zellen eingesetzt werden, die bestimmte Zielstrukturen auf den AML-Blasten erkennen und diese anschließend eliminieren. HLA-DP Antigene werden hauptsächlich an der Oberfläche von hämatopoetischen Zellen exprimiert und sind daher als Zielstruktur für den TZR-Transfer gut geeignet. So können Donor T-Zellen mit dem T-Zell-Rezeptor  $TZR_{DP04}$  ausgestattet werden, der spezifisch allogene HLA-DPB1\*04:01-positive AML-Blasten des Patienten erkennt und eliminiert. Bei Entzündungsreaktionen wird die Expression von HLA-DP-Antigenen jedoch auch in nicht-hämatopoetischen Zellen hochreguliert. So könnte eine HLA-DP-gerichtete GvHD entstehen und somit auch gesunde Gewebezellen angegriffen und beschädigt werden. In diesem Fall wäre eine gezielte Abschaltung der transferierten HLA-DP-spezifischen T-Zellen wünschenswert. Ziel dieser Arbeit war es daher, verschiedene Sicherheitsmechanismen hinsichtlich ihrer Effektivität, modifizierte T-Zellen zu depletieren, zu untersuchen.

Die induzierbare Caspase-9 (iC9) ist ein Suizid-Gen-System, was zusammen mit dem spezifischen T-Zell-Rezeptor  $TZR_{DP04}$  in die T-Zelle transduziert werden kann. Es besteht aus dem proapoptotischen Caspase-9-Protein und einer Dimerisierungsdomäne FKBP12. Bei ersten Symptomen der GvHD könnte die induzierbare Caspase-9 durch Homodimerisierung zweier iC9-Moleküle durch den Dimerisierer AP20187 aktiviert werden und die Apoptose der T-Zelle eingeleitet werden, sodass die Schäden an nicht-hämatopoetischen Geweben abgemildert werden. Der Effekt der induzierbaren Caspase-9 konnte *in vitro* nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang konnten wir nachweisen, dass vor allem die iC9+ $TZR_{DP04}$ -modifizierten T-Zellen durch Zugabe von AP20187 innerhalb von 24 Stunden *in vitro* absterben, nicht jedoch die nicht-modifizierten T-Zellen.

Als Alternative wurde ein Rapamycin-induzierbares Caspase-9 (RC9)-System mit den Dimerisierungsdomänen FRB und FKBP12 untersucht. Die Apoptosekaskade wird über Heterodimerisierung zweier RC9-Moleküle durch Rapamycin, ein zugelassenes Immunsuppressivum, aktiviert.

Die Experimente zum Vergleich der beiden Suizid-Gen-Systemen zeigten eine niedrigere Apoptoseeffizienz von RC9 durch Rapamycin im Vergleich zu iC9 durch AP20187. So lag die Anzahl Annexin V-positiver Zellen nach Aktivierung von RC9 durch Rapamycin immer unter dem Apoptose-Anteil nach Anschalten von iC9 durch AP20187.

Dies zeigte sich entsprechend in der Anzahl lysierter Zellen bei RC9 im Unterschied zu iC9 nach Induktion der Apoptosekaskaden durch den jeweiligen Dimerisierer.

Neben dem Einsatz verschiedener Apoptose-induzierbarer Systeme wurde untersucht, ob der TZR-Transfer in alternativen T-Zell-Subpopulationen vorteilhaft hinsichtlich einer Unterscheidung von malignen und nicht-malignen Zellen ist.

Von besonderem Interesse sind dabei invariante Natürliche Killer T (iNKT)-Zellen, da sie aufgrund ihrer kombinierten Eigenschaften von NK- und T-Zellen hämatopoetische und nicht-hämatopoetische Zellen unterscheiden können. Die Hypothese ist dadurch begründet, dass durch die Bindung von inhibitorischen Rezeptoren der iNKT-Zellen an gesunde Zellen eine Aktivierung des HLA-DP-spezifischen TZR entgegengewirkt werden könnte und somit diese Zellen nicht abgetötet würden. Hingegen könnten AML-Blasten durch fehlende inhibitorische Signale erkannt werden.

Die iNKT-Zellen von zwei verschiedenen Spendern erkennen sowohl AML-Blasten als auch gesunde Fibroblasten. In diesem Projekt ist kein Vorteil in der Modifikation von iNKT-Zellen mit spezifischen T-Zell-Rezeptoren im Vergleich zu T-Zellen beobachtet worden. Es konnte in den durchgeführten Versuchen nicht bestätigt werden, dass TZR<sub>DP04</sub>- oder TZR<sub>DP03</sub>-modifizierte iNKT-Zellen zwischen hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zellen unterscheiden könnten.

Nachdem in diesem Projekt das Potential verschiedener Sicherheitsstrategien in der adoptiven Immuntherapie orientierend untersucht wurde, zeigt das iC9-System Vorteile gegenüber RC9. Allerdings bedarf es weitere Verbesserungen der Struktur, der Expression und der Aktivierung der Caspase-Konstrukte sowie der Expansion und Modifikation von iNKT-Zellen, um solche Methoden im Kontext einer HLA-DP-gerichteten Immuntherapie in den Klinikbereich einzuführen.



## 6 Verzeichnisse

### 6.1 Abkürzungsverzeichnis

AEC	3-Amino-9-Ethyl-Carbazol
$\alpha$ -GalCer	$\alpha$ -Galactosylceramid
AK	Antikörper
Allo	allogen
AML	akute myeloische Leukämie
AP	AP20187
APC	Allophycocyanin
ATP	Adenosintriphosphat
BCMA	B-Cell Maturation Antigen (B-Zell-Reifung-Antigen)
bp	Basenpaar
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CAR	chimärer Antigenrezeptor
CD	Cluster of differentiation
ch	chimär
CR	komplette Remission
DAG	Diacylglycerol
DC	dendritische Zelle
DLI	Donor-Lymphozyten-Infusion
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISpot	enzyme-linked immunosorbent spot (Enzym-gekoppelter Immun-Spot)
FACS	fluorescence-activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
FCS	fetales Kälberserum
FITC	fluorescein isothiocyanate
FKBP12	FK506-bindendes Protein
FRB	FKBP–Rapamycin-bindende Domäne von mTOR
FSC	Vorwärtsstreulicht
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
Gly	Glycin
GvHD	Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung (Graft-versus-Host Disease)
GvL	Transplantat-gegen-Leukämie (Graft-versus-Leukemia)
Gy	Gray
h	Stunde
HLA	human leucocyte antigen (humane Leukozyten-Antigene)
HS	Humanserum
HSZT	hämatopoetische Stammzelltransplantation
iC9	induzierbare Caspase-9
iC9+TZR <sub>DP04</sub>	induzierbare Caspase-9 und T-Zell-Rezeptor TZR <sub>DP04</sub>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iNKT-Zelle	invariante Natürliche Killer T-Zelle
ITAM	Immunrezeptor-Tyrosin-Aktivatorsequenzen

ITR .....	inverted terminal repeats (umgekehrte terminale Wiederholungen)
L .....	Linker
LCL .....	lymphoblastoide Zelllinie
LV .....	Leervektor
MACS .....	magnetic activated cell sorting (magnetische Zellseparation)
mg .....	Milligramm
MHC .....	Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
min .....	Minute
Mio. ....	Million
ml .....	Milliliter
mm .....	Millimeter
mRNA .....	Messenger-Ribonukleinsäure
ms .....	Millisekunde
mTOR .....	mammalian Target of Rapamycin (Ziel des Rapamycins im Säugetier)
NK-Zelle .....	Natürliche Killer-Zelle
nM .....	Nanomolar
PB .....	peripheres Blut
PBMC .....	monozytäre Zellen aus dem peripherem Blut
PBS .....	phosphate-buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PE .....	Phycoerythrin
pM .....	Pikomolar
Puro .....	Puromycin
RC9 .....	Rapamycin-induzierbare Caspase-9
RC9+TZR <sub>DP04</sub> .....	Rapamycin-induzierbare Caspase-9 und T-Zell-Rezeptor TZR <sub>DP04</sub>
rh .....	recombinant human
Rmy .....	Rapamycin
RNA .....	Ribonukleinsäure
rpm .....	Umdrehungen pro Minute
scFv .....	Einzelketten-variables Fragment (single chain variable fragment)
sog. ....	sogenannter
Ser .....	Serin
SSC .....	Seitenstreulicht
Th1 .....	T-Helfer-Zelle 1
Th2 .....	T-Helfer-Zelle 2
TORC1 .....	Ziel-des-Rapamycin-Komplexes-1 (Target of Rapamycin Complex 1)
Treg .....	regulatorische T-Zelle
TZR .....	T-Zell-Rezeptor
U .....	Units
V .....	Volt
Vol.-% .....	Volumenprozent
w/v .....	Gewichtsprozent

## 6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Methoden zum TZR-Gentransfer in der adoptiven T-Zell-Therapie. ....	8
Abbildung 2: HLA-DPB1 Häufigkeit in der kaukasischen Bevölkerung. ....	9
Abbildung 3: Apoptose nach Dimerisierung zweier Moleküle der induzierbaren Caspase-9 (iC9) durch den Dimerisierer AP20187. ....	11
Abbildung 4: Aufbau der dimerisierten induzierbaren Caspase-9 (iC9). ....	11
Abbildung 5: Aufbau der dimerisierten Rapamycin-induzierbaren Caspase-9 (RC9). ....	13
Abbildung 6: Strukturformel von $\alpha$ -Galactosylceramid ( $\alpha$ -GalCer). ....	16
Abbildung 7: Vektorkarte des Vektors pMXs-IRES-Puro mit der kodierenden Sequenz der $\alpha$ - und $\beta$ -Kette von TZR <sub>DP04</sub> [10] und iC9 oder RC9 [75]. ....	31
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Transduktion der DNA-Konstrukte LV, TZR <sub>DP04</sub> und iC9+TZR <sub>DP04</sub> in T-Zellen eines gesunden HLA-DPB1*04:01-negativen Spenders. ....	43
Abbildung 9: Expression von TZR <sub>DP04</sub> in CD4 <sup>+</sup> iC9+TZR <sub>DP04</sub> <sup>-</sup> und TZR <sub>DP04</sub> <sup>-</sup> -transduzierten T-Zellen von Spender 199. ....	44
Abbildung 10: Expression von TZR <sub>DP04</sub> in CD4 <sup>+</sup> RC9+TZR <sub>DP04</sub> <sup>-</sup> , iC9+TZR <sub>DP04</sub> <sup>-</sup> und TZR <sub>DP04</sub> <sup>-</sup> -transduzierten T-Zellen von Donor 149. ....	46
Abbildung 11: Spezifische TZR <sub>DP04</sub> -vermittelte Reaktivität der CD4 <sup>+</sup> iC9+TZR <sub>DP04</sub> <sup>-</sup> und TZR <sub>DP04</sub> <sup>-</sup> -transduzierten T-Zellen von Spender 199 und 165 gegenüber HLA-DPB1*04:01-positive oder -negative LCLs. ....	47
Abbildung 12: Spezifische TZR <sub>DP04</sub> -vermittelte Reaktivität der CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> RC9+TZR <sub>DP04</sub> <sup>-</sup> , iC9+TZR <sub>DP04</sub> <sup>-</sup> und TZR <sub>DP04</sub> <sup>-</sup> -transduzierten T-Zellen von Spender 165 und 149 gegenüber HLA-DPB1*04:01-positive oder -negative LCLs. ....	48
Abbildung 13: Mittelwerte der Anzahl der lebenden und toten CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> iC9+TZR <sub>DP04</sub> <sup>-</sup> und TZR <sub>DP04</sub> <sup>-</sup> -transduzierten T-Zellen von Spender 170 nach Behandlung mit AP20187 für 48 h. ....	50
Abbildung 14: Mittelwerte der Anzahl der lebenden und toten CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> RC9+TZR <sub>DP04</sub> <sup>-</sup> , iC9+TZR <sub>DP04</sub> <sup>-</sup> und TZR <sub>DP04</sub> <sup>-</sup> -transduzierten T-Zellen von Spender 149 nach Behandlung mit Rapamycin oder AP20187 für 48 h. ....	51
Abbildung 15: Zehnfache Vergrößerung der iC9+TZR <sub>DP04</sub> <sup>-</sup> und TZR <sub>DP04</sub> <sup>-</sup> -transduzierten T-Zellen von Spender 221 nach Inkubation mit AP20187 für 48 h. ....	52
Abbildung 16: Expression von TZR <sub>DP04</sub> in CD4 <sup>+</sup> iC9+TZR <sub>DP04</sub> <sup>-</sup> und TZR <sub>DP04</sub> <sup>-</sup> -transduzierten T-Zellen von Donor 199 nach Behandlung mit AP20187 für 48 h. ....	55

Abbildung 17: Expression von TZR <sub>DP04</sub> in CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> RC9+TZR <sub>DP04</sub> <sup>-</sup> , iC9+TZR <sub>DP04</sub> <sup>-</sup> und TZR <sub>DP04</sub> -transduzierten T-Zellen von Donor 149 nach Behandlung mit Rapamycin oder AP20187 für 48 h. ....	57
Abbildung 18: Anteil der Annexin V-positiven CD4 <sup>+</sup> iC9+TZR <sub>DP04</sub> <sup>-</sup> und TZR <sub>DP04</sub> -transduzierten T-Zellen von Donor 199 in Abhängigkeit von der Konzentration von AP20187.....	58
Abbildung 19: Anteil der Annexin V-positiven CD4 <sup>+</sup> iC9+TZR <sub>DP04</sub> <sup>-</sup> und TZR <sub>DP04</sub> -transduzierten T-Zellen von Donor 232 in Abhängigkeit von der Konzentration von AP20187.....	59
Abbildung 20: Anteil der Annexin V-positiven CD4 <sup>+</sup> iC9+TZR <sub>DP04</sub> <sup>-</sup> und TZR <sub>DP04</sub> -transduzierten T-Zellen von Donor 170 in Abhängigkeit von der Konzentration von AP20187.....	60
Abbildung 21: Anteil der Annexin V-positiven CD8 <sup>+</sup> iC9+TZR <sub>DP04</sub> <sup>-</sup> und TZR <sub>DP04</sub> -transduzierten T-Zellen von Donor 170 in Abhängigkeit von der Konzentration von AP20187.....	61
Abbildung 22: Vergleich der Annexin V-positiven Zellen der vier Spendern 232, 221, 199 und 170 nach Behandlung der CD4 <sup>+</sup> iC9+TZR <sub>DP04</sub> <sup>-</sup> und TZR <sub>DP04</sub> -transduzierten T-Zellen mit 10 nM AP20187 (AP) für 48 h.....	62
Abbildung 23: Anteil der Annexin V-positiven RC9+TZR <sub>DP04</sub> <sup>-</sup> , iC9+TZR <sub>DP04</sub> <sup>-</sup> und TZR <sub>DP04</sub> -transduzierten T-Zellen von Donor 149 nach Behandlung mit Dimerisierer Rapamycin, Rapalog oder AP20187 für 48 h.....	65
Abbildung 24: Anteil der Annexin V-positiven CD4 <sup>+</sup> RC9+TZR <sub>DP04</sub> <sup>-</sup> , iC9+TZR <sub>DP04</sub> <sup>-</sup> und TZR <sub>DP04</sub> -transduzierten T-Zellen von Donor 165 nach Behandlung mit Dimerisierer Rapamycin (Rmy) oder AP20187 (AP) für 48 h.....	66
Abbildung 25: Anteil an lysierten CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> iC9+TZR <sub>DP04</sub> <sup>-</sup> und TZR <sub>DP04</sub> -transduzierten T-Zellen von Spender 221 und 170 in Abhängigkeit von der Konzentration von AP20187.....	67
Abbildung 26: Anteil an lysierten CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> RC9+TZR <sub>DP04</sub> <sup>-</sup> , iC9+TZR <sub>DP04</sub> <sup>-</sup> und TZR <sub>DP04</sub> -transduzierten T-Zellen von Donor 165 und 149 in Abhängigkeit von der Konzentration des Dimerisierers. ....	69
Abbildung 27: Expansion der iNKT-Zellen von Spender 4 und 5.....	71
Abbildung 28: Expression von TZR <sub>DP04</sub> und TZR <sub>DP03</sub> in iNKT-Zellen und spezifische TZR-vermittelte Reaktivität der TZR <sub>DP04</sub> - und TZR <sub>DP03</sub> -modifizierte iNKT-Zellen von Spender 4 und 5 gegenüber lymphoblastoide Zellen (LCLs).....	73

Abbildung 29: Spezifische TZR-vermittelte Reaktivität der TZR <sub>DP04</sub> - und TZR <sub>DP03</sub> - modifizierten iNKT-Zellen von Spender 4 und 5 gegenüber lymphoblastoide Zellen (LCLs), Fibroblasten (Fibro) mit und ohne IFN- $\gamma$ -Vorbehandlung und AML-Blasten. .....	75
---	----

### 6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der verwendeten Geräte.....	19
Tabelle 2: Liste der verwendeten Verbrauchsgüter.....	20
Tabelle 3: Liste der verwendeten Chemikalien und Reagenzien. ....	21
Tabelle 4: Liste der verwendeten Antikörper/Fluoreszenz-markierten Proteine. ....	22
Tabelle 5: Liste der verwendeten Kits.....	23
Tabelle 6: Liste der verwendeten Zellkulturmedien und Zusätze. ....	23
Tabelle 7: Liste der verwendeten Dimerisierer. ....	26
Tabelle 8: Liste der verwendeten Zytokine. ....	26
Tabelle 9: Liste der verwendeten Desinfektionsmittel.....	26
Tabelle 10: Liste der verwendeten Enzyme. ....	27
Tabelle 11: Liste der verwendeten Nukleotide und Oligonukleotide. ....	27
Tabelle 12: Liste der verwendeten Genkonstrukte.....	28
Tabelle 13: Liste der verwendeten Glykolipide. ....	28
Tabelle 14: Liste der verwendeten Bakterien.....	28
Tabelle 15: Liste der verwendeten Softwares. ....	29
Tabelle 16: Zeitlicher Ablauf der retroviralen Transduktion. ....	33
Tabelle 17: Markierung von Oberflächenmolekülen durch bestimmte FACS-Antikörper.....	38

## 7 Literatur

- 1 *Estey EH*. Acute myeloid leukemia: 2014 Update on risk-stratification and management. *Am. J. Hematol.* 2014; 89(11): 1063–1081.
- 2 *Onkopedia*. Akute Myeloische Leukämie (AML). In: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/akute-myeloische-leukaemie-aml/@@guideline/html/index.html>.
- 3 *Döhner H, Estey E, Grimwade D et al*. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* 2017; 129(4): 424–447.
- 4 *Kouchkovsky I de, Abdul-Hay M*. 'Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update'. *Blood cancer journal* 2016; 6(7): e441.
- 5 *Deschler B, Lübbert M*. Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer* 2006; 107(9): 2099–2107.
- 6 *Gong Q, Zhou L, Xu S et al*. High Doses of Daunorubicin during Induction Therapy of Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Clinical Trials. *PloS one* 2015; 10(5): e0125612.
- 7 *Li X, Xu S, Tan Y, Chen J*. The effects of idarubicin versus other anthracyclines for induction therapy of patients with newly diagnosed leukaemia. *The Cochrane database of systematic reviews* 2015(6): CD010432.
- 8 *Fleischhauer Kea*. Deutscher Konsensus 2021 zur Spenderauswahl für die allogene Stammzelltransplantation 2021.
- 9 *Petersdorf EW, Gooley T, Malkki M et al*. The biological significance of HLA-DP gene variation in haematopoietic cell transplantation. *British journal of haematology* 2001; 112(4): 988–994.
- 10 *Klobuch S, Hammon K, Vatter-Leising S et al*. HLA-DPB1 Reactive T Cell Receptors for Adoptive Immunotherapy in Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Cells* 2020; 9(5).
- 11 *Kolb H-J, Schmid C, Barrett AJ, Schendel DJ*. Graft-versus-leukemia reactions in allogeneic chimeras. *Blood* 2004; 103(3): 767–776.
- 12 *Falkenburg JHF, Heslop HE, Barrett AJ*. T cell therapy in allogeneic stem cell transplantation. *Biology of blood and marrow transplantation journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 2008; 14(1 Suppl 1): 136–141.
- 13 *Zeiser R, Beelen DW, Bethge W et al*. Biology-Driven Approaches to Prevent and Treat Relapse of Myeloid Neoplasia after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation.

- Biology of blood and marrow transplantation journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation 2019; 25(4): e128-e140.
- 14 Ferrara JLM, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *The Lancet* 2009; 373(9674): 1550–1561.
  - 15 Shlomchik WD. Graft-versus-host disease. *Nature reviews. Immunology* 2007; 7(5): 340–352.
  - 16 Petersdorf EW, Malkki M, O'hUigin C et al. High HLA-DP Expression and Graft-versus-Host Disease. *The New England journal of medicine* 2015; 373(7): 599–609.
  - 17 Fleischhauer K, Locatelli F, Zecca M et al. Graft rejection after unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation for thalassemia is associated with nonpermissive HLA-DPB1 disparity in host-versus-graft direction. *Blood* 2006; 107(7): 2984–2992.
  - 18 Fleischhauer K, Shaw BE, Gooley T et al. Effect of T-cell-epitope matching at HLA-DPB1 in recipients of unrelated-donor haemopoietic-cell transplantation: a retrospective study. *The Lancet Oncology* 2012; 13(4): 366–374.
  - 19 Zino E, Frumento G, Marktel S et al. A T-cell epitope encoded by a subset of HLA-DPB1 alleles determines nonpermissive mismatches for hematologic stem cell transplantation. *Blood* 2004; 103(4): 1417–1424.
  - 20 Junghanss C, Marr KA, Carter RA et al. Incidence and outcome of bacterial and fungal infections following nonmyeloablative compared with myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a matched control study. *Biology of blood and marrow transplantation journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 2002; 8(9): 512–520.
  - 21 Penack O, Marchetti M, Ruutu T et al. Prophylaxis and management of graft versus host disease after stem-cell transplantation for haematological malignancies: updated consensus recommendations of the European Society for Blood and Marrow Transplantation. *The Lancet Haematology* 2020; 7(2): e157-e167.
  - 22 Murphy KM, Weaver C, Janeway C. *Janeway's immunobiology*. New York, NY: Garland Science/Taylor & Francis Group; 2017.
  - 23 Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM et al. Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood* 1995; 86(5): 2041–2050.
  - 24 Greiner J, Götz M, Bunjes D et al. Immunological and Clinical Impact of Manipulated and Unmanipulated DLI after Allogeneic Stem Cell Transplantation of AML Patients. *Journal of clinical medicine* 2019; 9(1).

- 25 *Zeiser Rea*. Leitlinien zur allogenen Stammzelltransplantation von der Deutschen Arbeitsgemeinschaft für Knochenmark- und Blutstammzelltransplantation (DAG-KBT): Prävention und Behandlung von Rezidiven nach allogener Stammzelltransplantation. DAG-KBT 2020.
- 26 *Abbi KKS, Zhu J, Ehmman WC et al*. G-CSF mobilized vs conventional donor lymphocytes for therapy of relapse or incomplete engraftment after allogeneic hematopoietic transplantation. *Bone marrow transplantation* 2013; 48(3): 357–362.
- 27 *Frey NV, Porter DL*. Graft-versus-host disease after donor leukocyte infusions: presentation and management. *Best practice & research. Clinical haematology* 2008; 21(2): 205–222.
- 28 *Barrett AJ, Mavroudis D, Tisdale J et al*. T cell-depleted bone marrow transplantation and delayed T cell add-back to control acute GVHD and conserve a graft-versus-leukemia effect. *Bone marrow transplantation* 1998; 21(6): 543–551.
- 29 *Heemskerk MHM, Hoogeboom M, Hagedoorn R et al*. Reprogramming of virus-specific T cells into leukemia-reactive T cells using T cell receptor gene transfer. *The Journal of Experimental Medicine* 2004; 199(7): 885–894.
- 30 *Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR et al*. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* 2006; 314(5796): 126–129.
- 31 *Griffioen M, van Egmond HME, Barnby-Porritt H et al*. Genetic engineering of virus-specific T cells with T-cell receptors recognizing minor histocompatibility antigens for clinical application. *Haematologica* 2008; 93(10): 1535–1543.
- 32 *Tawara I, Kageyama S, Miyahara Y et al*. Safety and persistence of WT1-specific T-cell receptor gene-transduced lymphocytes in patients with AML and MDS. *Blood* 2017; 130(18): 1985–1994.
- 33 *Chapuis AG, Egan DN, Bar M et al*. T cell receptor gene therapy targeting WT1 prevents acute myeloid leukemia relapse post-transplant. *Nature medicine* 2019; 25(7): 1064–1072.
- 34 *Ferrari G, Rossini S, Giavazzi R et al*. An in vivo model of somatic cell gene therapy for human severe combined immunodeficiency. *Science* 1991; 251(4999): 1363–1366.
- 35 *Hacein-Bey-Abina S, Le Deist F, Carlier F et al*. Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *The New England journal of medicine* 2002; 346(16): 1185–1193.
- 36 *Manfredi F, Cianciotti BC, Potenza A et al*. TCR Redirected T Cells for Cancer Treatment: Achievements, Hurdles, and Goals. *Frontiers in immunology* 2020; 11: 1689.



- 37 *Hua-Van A, Le Rouzic A, Maisonhaute C, Capy P.* Abundance, distribution and dynamics of retrotransposable elements and transposons: similarities and differences. *Cytogenetic and genome research* 2005; 110(1-4): 426–440.
- 38 *Kowalski PS, Rudra A, Miao L, Anderson DG.* Delivering the Messenger: Advances in Technologies for Therapeutic mRNA Delivery. *Molecular therapy the journal of the American Society of Gene Therapy* 2019; 27(4): 710–728.
- 39 *Christopher MJ, Petti AA, Rettig MP et al.* Immune Escape of Relapsed AML Cells after Allogeneic Transplantation. *The New England journal of medicine* 2018; 379(24): 2330–2341.
- 40 *Noviello M, Manfredi F, Ruggiero E et al.* Bone marrow central memory and memory stem T-cell exhaustion in AML patients relapsing after HSCT. *Nature communications* 2019; 10(1): 1065.
- 41 *Crucitti L, Crocchiolo R, Toffalori C et al.* Incidence, risk factors and clinical outcome of leukemia relapses with loss of the mismatched HLA after partially incompatible hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia* 2015; 29(5): 1143–1152.
- 42 *Herr W, Eichinger Y, Beshay J et al.* HLA-DPB1 mismatch alleles represent powerful leukemia rejection antigens in CD4 T-cell immunotherapy after allogeneic stem-cell transplantation. *Leukemia* 2017; 31(2): 434–445.
- 43 *Crocchiolo R, Zino E, Vago L et al.* Nonpermissive HLA-DPB1 disparity is a significant independent risk factor for mortality after unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2009; 114(7): 1437–1444.
- 44 *Stevanović S, Griffioen M, Nijmeijer BA et al.* Human allo-reactive CD4+ T cells as strong mediators of anti-tumor immunity in NOD/scid mice engrafted with human acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2012; 26(2): 312–322.
- 45 *Rutten CE, van Luxemburg-Heijs SAP, Griffioen M et al.* HLA-DP as specific target for cellular immunotherapy in HLA class II-expressing B-cell leukemia. *Leukemia* 2008; 22(7): 1387–1394.
- 46 *Hollenbach JA, Madbouly A, Gragert L et al.* A combined DPA1~DPB1 amino acid epitope is the primary unit of selection on the HLA-DP heterodimer. *Immunogenetics* 2012; 64(8): 559–569.
- 47 *Di Stasi A, Tey S-K, Dotti G et al.* Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *The New England journal of medicine* 2011; 365(18): 1673–1683.
- 48 *Straathof KC, Pulè MA, Yotnda P et al.* An inducible caspase 9 safety switch for T-cell therapy. *Blood* 2005; 105(11): 4247–4254.

- 49 *Kuida K.* Caspase-9. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2000; 32(2): 121–124.
- 50 *Thornberry NA, Lazebnik Y.* Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281(5381): 1312–1316.
- 51 *Adrain C, Martin SJ.* The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends in Biochemical Sciences* 2001; 26(6): 390–397.
- 52 *Wang X.* The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes & development* 2001; 15(22): 2922–2933.
- 53 *Zamzami N, Kroemer G.* The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2001; 2(1): 67–71.
- 54 *Hu Y, Ding L, Spencer DM, Núñez G.* WD-40 repeat region regulates Apaf-1 self-association and procaspase-9 activation. *The Journal of biological chemistry* 1998; 273(50): 33489–33494.
- 55 *Li P, Nijhawan D, Budihardjo I et al.* Cytochrome c and dATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade. *Cell* 1997; 91(4): 479–489.
- 56 *Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES.* Autoactivation of Procaspase-9 by Apaf-1-Mediated Oligomerization. *Molecular Cell* 1998; 1(7): 949–957.
- 57 *Slee EA, Harte MT, Kluck RM et al.* Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *The Journal of cell biology* 1999; 144(2): 281–292.
- 58 *Logue SE, Martin SJ.* Caspase activation cascades in apoptosis. *Biochemical Society transactions* 2008; 36(Pt 1): 1–9.
- 59 *Sprick MR, Rieser E, Stahl H et al.* Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8. *The EMBO journal* 2002; 21(17): 4520–4530.
- 60 *Waterhouse NJ, Trapani JA.* CTL: Caspases Terminate Life, but that's not the whole story. *Tissue antigens* 2002; 59(3): 175–183.
- 61 *Iuliucci JD, Oliver SD, Morley S et al.* Intravenous safety and pharmacokinetics of a novel dimerizer drug, AP1903, in healthy volunteers. *Journal of clinical pharmacology* 2001; 41(8): 870–879.
- 62 *Clackson T, Yang W, Rozamus LW et al.* Redesigning an FKBP-ligand interface to generate chemical dimerizers with novel specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998; 95(18): 10437–10442.

- 63 *Spencer DM, Belshaw PJ, Chen L et al.* Functional analysis of Fas signaling in vivo using synthetic inducers of dimerization. *Current Biology* 1996; 6(7): 839–847.
- 64 *Renatus M, Stennicke HR, Scott FL et al.* Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001; 98(25): 14250–14255.
- 65 *Li P, Zhou L, Zhao T et al.* Caspase-9: structure, mechanisms and clinical application. *Oncotarget* 2017; 8(14): 23996–24008.
- 66 *Chao Y, Shiozaki EN, Srinivasula SM et al.* Engineering a dimeric caspase-9: a re-evaluation of the induced proximity model for caspase activation. *PLoS biology* 2005; 3(6): e183.
- 67 *Clipstone NA, Crabtree GR.* Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* 1992; 357(6380): 695–697.
- 68 *Kasahara K.* Physiological function of FKBP12, a primary target of rapamycin/FK506: a newly identified role in transcription of ribosomal protein genes in yeast. *Current genetics* 2021; 67(3): 383–388.
- 69 *Chang DW, Yang X.* Activation of procaspases by FK506 binding protein-mediated oligomerization. *Science's STKE signal transduction knowledge environment* 2003; 2003(167): PL1.
- 70 *Chang DW, Xing Z, Pan Y et al.* c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. *The EMBO journal* 2002; 21(14): 3704–3714.
- 71 *Zhou X, Brenner MK.* Improving the safety of T-Cell therapies using an inducible caspase-9 gene. *Experimental hematology* 2016; 44(11): 1013–1019.
- 72 *Sabatini DM, Erdjument-Bromage H, Lui M et al.* RAFT1: A mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell* 1994; 78(1): 35–43.
- 73 *Brown EJ, Albers MW, Shin TB et al.* A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature* 1994; 369(6483): 756–758.
- 74 *Kunz J, Henriquez R, Schneider U et al.* Target of rapamycin in yeast, TOR2, is an essential phosphatidylinositol kinase homolog required for G1 progression. *Cell* 1993; 73(3): 585–596.
- 75 *Stavrou M, Philip B, Traynor-White C et al.* A Rapamycin-Activated Caspase 9-Based Suicide Gene. *Molecular therapy the journal of the American Society of Gene Therapy* 2018; 26(5): 1266–1276.
- 76 *Duong MT, Collinson-Pautz MR, Morschl E et al.* Two-Dimensional Regulation of CAR-T Cell Therapy with Orthogonal Switches. *Molecular therapy oncolytics* 2019; 12: 124–137.

- 77 Yang H, Rudge DG, Koos JD et al. mTOR kinase structure, mechanism and regulation. *Nature* 2013; 497(7448): 217–223.
- 78 Godfrey DI, Uldrich AP, McCluskey J et al. The burgeoning family of unconventional T cells. *Nature immunology* 2015; 16(11): 1114–1123.
- 79 Kohlgruber AC, Donado CA, LaMarche NM et al. Activation strategies for invariant natural killer T cells. *Immunogenetics* 2016; 68(8): 649–663.
- 80 Cohen NR, Brennan PJ, Shay T et al. Shared and distinct transcriptional programs underlie the hybrid nature of iNKT cells. *Nature immunology* 2013; 14(1): 90–99.
- 81 Engel I, Seumois G, Chavez L et al. Innate-like functions of natural killer T cell subsets result from highly divergent gene programs. *Nature immunology* 2016; 17(6): 728–739.
- 82 Watarai H, Sekine-Kondo E, Shigeura T et al. Development and function of invariant natural killer T cells producing T(h)2- and T(h)17-cytokines. *PLoS biology* 2012; 10(2): e1001255.
- 83 Rossjohn J, Pellicci DG, Patel O et al. Recognition of CD1d-restricted antigens by natural killer T cells. *Nature reviews. Immunology* 2012; 12(12): 845–857.
- 84 Arden B, Clark SP, Kabelitz D, Mak TW. Human T-cell receptor variable gene segment families. *Immunogenetics* 1995; 42(6): 455–500.
- 85 Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M et al. NKT cells: what's in a name? *Nature reviews. Immunology* 2004; 4(3): 231–237.
- 86 Dellabona P, Padovan E, Casorati G et al. An invariant V alpha 24-J alpha Q/V beta 11 T cell receptor is expressed in all individuals by clonally expanded CD4-8- T cells. *The Journal of Experimental Medicine* 1994; 180(3): 1171–1176.
- 87 Salio M, Silk JD, Jones EY, Cerundolo V. Biology of CD1- and MR1-restricted T cells. *Annual review of immunology* 2014; 32: 323–366.
- 88 Kawano T, Cui J, Koezuka Y et al. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of alpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* 1997; 278(5343): 1626–1629.
- 89 Burdin N, Brossay L, Degano M et al. Structural requirements for antigen presentation by mouse CD1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000; 97(18): 10156–10161.
- 90 Burdin N, Brossay L, Koezuka Y et al. Selective ability of mouse CD1 to present glycolipids: alpha-galactosylceramide specifically stimulates V alpha 14+ NK T lymphocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 1998; 161(7): 3271–3281.
- 91 Mori L, Lepore M, Libero G de. The Immunology of CD1- and MR1-Restricted T Cells. *Annual review of immunology* 2016; 34: 479–510.

- 92 *Wingender G, Krebs P, Beutler B, Kronenberg M.* Antigen-specific cytotoxicity by invariant NKT cells in vivo is CD95/CD178-dependent and is correlated with antigenic potency. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 2010; 185(5): 2721–2729.
- 93 *Kawano T, Cui J, Koezuka Y et al.* Natural killer-like nonspecific tumor cell lysis mediated by specific ligand-activated V $\alpha$ 14 NKT cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998; 95(10): 5690–5693.
- 94 *Schneidawind D, Pierini A, Alvarez M et al.* CD4<sup>+</sup> invariant natural killer T cells protect from murine GVHD lethality through expansion of donor CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Blood* 2014; 124(22): 3320–3328.
- 95 *Schmid H, Schneidawind C, Jahnke S et al.* Culture-Expanded Human Invariant Natural Killer T Cells Suppress T-Cell Alloreactivity and Eradicate Leukemia. *Frontiers in immunology* 2018; 9: 1817.
- 96 *Rhost S, Sedimbi S, Kadri N, Cardell SL.* Immunomodulatory type II natural killer T lymphocytes in health and disease. *Scandinavian journal of immunology* 2012; 76(3): 246–255.
- 97 *Jahng A, Maricic I, Aguilera C et al.* Prevention of autoimmunity by targeting a distinct, noninvariant CD1d-reactive T cell population reactive to sulfatide. *The Journal of Experimental Medicine* 2004; 199(7): 947–957.
- 98 *Brigl M, Bry L, Kent SC et al.* Mechanism of CD1d-restricted natural killer T cell activation during microbial infection. *Nature immunology* 2003; 4(12): 1230–1237.
- 99 *Chandra S, Kronenberg M.* Activation and Function of iNKT and MAIT Cells. *Advances in immunology* 2015; 127: 145–201.
- 100 *Cohen NR, Garg S, Brenner MB.* Chapter 1 Antigen Presentation by CD1. In: Elsevier; 2009: 1–94.
- 101 *Rossjohn J, Gras S, Miles JJ et al.* T cell antigen receptor recognition of antigen-presenting molecules. *Annual review of immunology* 2015; 33: 169–200.
- 102 *Borg NA, Wun KS, Kjer-Nielsen L et al.* CD1d-lipid-antigen recognition by the semi-invariant NKT T-cell receptor. *Nature* 2007; 448(7149): 44–49.
- 103 *Pellicci DG, Patel O, Kjer-Nielsen L et al.* Differential recognition of CD1d-alpha-galactosyl ceramide by the V beta 8.2 and V beta 7 semi-invariant NKT T cell receptors. *Immunity* 2009; 31(1): 47–59.
- 104 *Li Y, Girardi E, Wang J et al.* The V $\alpha$ 14 invariant natural killer T cell TCR forces microbial glycolipids and CD1d into a conserved binding mode. *The Journal of Experimental Medicine* 2010; 207(11): 2383–2393.

- 105 *Patel O, Pellicci DG, Uldrich AP et al.* V $\beta$ 2 natural killer T cell antigen receptor-mediated recognition of CD1d-glycolipid antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011; 108(47): 19007–19012.
- 106 *Miyamoto K, Miyake S, Yamamura T.* A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing TH2 bias of natural killer T cells. *Nature* 2001; 413(6855): 531–534.
- 107 *Schmieg J, Yang G, Franck RW, Tsuji M.* Superior protection against malaria and melanoma metastases by a C-glycoside analogue of the natural killer T cell ligand alpha-Galactosylceramide. *The Journal of Experimental Medicine* 2003; 198(11): 1631–1641.
- 108 *Aspeshlagh S, Li Y, Yu ED et al.* Galactose-modified iNKT cell agonists stabilized by an induced fit of CD1d prevent tumour metastasis. *The EMBO journal* 2011; 30(11): 2294–2305.
- 109 *Yu KOA, Im JS, Molano A et al.* Modulation of CD1d-restricted NKT cell responses by using N-acyl variants of alpha-galactosylceramides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005; 102(9): 3383–3388.
- 110 *lktlabs.com.* alpha-galactosylceramide. <https://lktlabs.com/product/alpha-galactosylceramide>.
- 111 *Sullivan BA, Nagarajan NA, Wingender G et al.* Mechanisms for glycolipid antigen-driven cytokine polarization by Valpha14i NKT cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 2010; 184(1): 141–153.
- 112 *Wun KS, Cameron G, Patel O et al.* A molecular basis for the exquisite CD1d-restricted antigen specificity and functional responses of natural killer T cells. *Immunity* 2011; 34(3): 327–339.
- 113 *Im JS, Arora P, Bricard G et al.* Kinetics and cellular site of glycolipid loading control the outcome of natural killer T cell activation. *Immunity* 2009; 30(6): 888–898.
- 114 *Godfrey DI, Kronenberg M.* Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *The Journal of clinical investigation* 2004; 114(10): 1379–1388.
- 115 *Berzofsky JA, Terabe M.* NKT cells in tumor immunity: opposing subsets define a new immunoregulatory axis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 2008; 180(6): 3627–3635.
- 116 *Exley MA, Friedlander P, Alatrakchi N et al.* Adoptive Transfer of Invariant NKT Cells as Immunotherapy for Advanced Melanoma: A Phase I Clinical Trial. *Clinical cancer research an official journal of the American Association for Cancer Research* 2017; 23(14): 3510–3519.

- 117 Cui J, Shin T, Kawano T et al. Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. *Science* 1997; 278(5343): 1623–1626.
- 118 Nakagawa R, Motoki K, Ueno H et al. Treatment of hepatic metastasis of the colon26 adenocarcinoma with an alpha-galactosylceramide, KRN7000. *Cancer research* 1998; 58(6): 1202–1207.
- 119 Nowak M, Arredouani MS, Tun-Kyi A et al. Defective NKT cell activation by CD1d+ TRAMP prostate tumor cells is corrected by interleukin-12 with  $\alpha$ -galactosylceramide. *PloS one* 2010; 5(6): e11311.
- 120 Giaccone G, Punt CJA, Ando Y et al. A phase I study of the natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide (KRN7000) in patients with solid tumors. *Clinical cancer research an official journal of the American Association for Cancer Research* 2002; 8(12): 3702–3709.
- 121 Nieda M, Okai M, Tazbirkova A et al. Therapeutic activation of Valpha24+Vbeta11+ NKT cells in human subjects results in highly coordinated secondary activation of acquired and innate immunity. *Blood* 2004; 103(2): 383–389.
- 122 Webb TJ, Bieler JG, Schneck JP, Oelke M. Ex vivo induction and expansion of natural killer T cells by CD1d1-Ig coated artificial antigen presenting cells. *Journal of immunological methods* 2009; 346(1-2): 38–44.
- 123 McEwen-Smith RM, Salio M, Cerundolo V. The regulatory role of invariant NKT cells in tumor immunity. *Cancer immunology research* 2015; 3(5): 425–435.
- 124 Mavers M, Maas-Bauer K, Negrin RS. Invariant Natural Killer T Cells As Suppressors of Graft-versus-Host Disease in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Frontiers in immunology* 2017; 8: 900.
- 125 Heine A, Brossart P. A party of three: iNKT cells in GVHD prevention. *Blood* 2015; 125(22): 3374–3375.
- 126 Leveson-Gower DB, Olson JA, Segal EI et al. Low doses of natural killer T cells provide protection from acute graft-versus-host disease via an IL-4-dependent mechanism. *Blood* 2011; 117(11): 3220–3229.
- 127 Haraguchi K, Takahashi T, Matsumoto A et al. Host-residual invariant NK T cells attenuate graft-versus-host immunity. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 2005; 175(2): 1320–1328.
- 128 Du J, Paz K, Thangavelu G et al. Invariant natural killer T cells ameliorate murine chronic GVHD by expanding donor regulatory T cells. *Blood* 2017; 129(23): 3121–3125.

- 129 *Haraguchi K, Takahashi T, Hiruma K et al.* Recovery of Valpha24+ NKT cells after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone marrow transplantation* 2004; 34(7): 595–602.
- 130 *Li Y-R, Zhou Y, Kim YJ et al.* Development of allogeneic HSC-engineered iNKT cells for off-the-shelf cancer immunotherapy. *Cell reports. Medicine* 2021; 2(11): 100449.
- 131 *Cell Biolabs Inc.* pMXs-IRES-Puro Retroviral Vector: Product Data Sheet. <https://www.cellbiolabs.com/sites/default/files/RTV-014-pmxs-ires-puro-retroviral-vector.pdf> (18.03.2022).
- 132 *Gibson DG, Young L, Chuang R-Y et al.* Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature methods* 2009; 6(5): 343–345.
- 133 *Gibson DG, Glass JI, Lartigue C et al.* Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science* 2010; 329(5987): 52–56.
- 134 *QIAGEN.* QIAprep® Miniprep Handbook: For purification of molecular biology–grade DNA; 2020. [file:///C:/Users/laune/Downloads/HB-1206-007\\_HB\\_QIAprep\\_Miniprep\\_1220\\_WW%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/laune/Downloads/HB-1206-007_HB_QIAprep_Miniprep_1220_WW%20(1).pdf).
- 135 *Green MR, Sambrook J.* Nested Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harbor protocols* 2019; 2019(2).
- 136 *QIAGEN.* QIAGEN® Plasmid Purification Handbook: QIAGEN Plasmid Mini, Midi, Maxi, Mega, and Giga Kits For purification of ultrapure, transfection-grade plasmid DNA; 2021. [file:///C:/Users/laune/Downloads/HB-1193-005\\_HB\\_PlasmidPurif\\_0221\\_WW.pdf](file:///C:/Users/laune/Downloads/HB-1193-005_HB_PlasmidPurif_0221_WW.pdf) (27.08.2022).
- 137 *Weijtens ME, Willemsen RA, Hart EH, Bolhuis RL.* A retroviral vector system 'STITCH' in combination with an optimized single chain antibody chimeric receptor gene structure allows efficient gene transduction and expression in human T lymphocytes. *Gene therapy* 1998; 5(9): 1195–1203.
- 138 *Lamers CHJ, van Elzaker P, van Steenberg SCL et al.* Retronectin-assisted retroviral transduction of primary human T lymphocytes under good manufacturing practice conditions: tissue culture bag critically determines cell yield. *Cytotherapy* 2008; 10(4): 406–416.
- 139 *PAN-Biotech GmbH.* Pancoll human, Density: 1.077 g/ml. <https://www.pan-biotech.de/Pancoll-human-Density-1.077-g-ml/P04-60500> (31.03.2022).
- 140 *McKinnon KM.* Flow Cytometry: An Overview. *Current protocols in immunology* 2018; 120: 5.1.1-5.1.11.



- 141 *Ranieri E, Popescu I, Gigante M.* CTL ELISPOT assay. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 2014; 1186: 75–86.
- 142 *Bratton DL, Fadok VA, Richter DA et al.* Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *The Journal of biological chemistry* 1997; 272(42): 26159–26165.
- 143 *Elmore S.* Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology* 2007; 35(4): 495–516.
- 144 *van Engeland M, Nieland LJ, Ramaekers FC et al.* Annexin V-Affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 1998; 31(1): 1–9.
- 145 *Arur S, Uche UE, Rezaul K et al.* Annexin I Is an Endogenous Ligand that Mediates Apoptotic Cell Engulfment. *Developmental Cell* 2003; 4(4): 587–598.
- 146 *Niles AL, Moravec RA, Eric Hesselberth P et al.* A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers. *Analytical biochemistry* 2007; 366(2): 197–206.
- 147 *Promega Corporation.* CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay: Instructions for Use of Products G9290, G9291 and G9292; 2017.
- 148 *Meng L, Zheng XFS.* Toward rapamycin analog (rapalog)-based precision cancer therapy. *Acta pharmacologica Sinica* 2015; 36(10): 1163–1169.
- 149 *Zhou X, Di Stasi A, Tey S-K et al.* Long-term outcome after haploidentical stem cell transplant and infusion of T cells expressing the inducible caspase 9 safety transgene. *Blood* 2014; 123(25): 3895–3905.
- 150 *Zhou X, Dotti G, Krance RA et al.* Inducible caspase-9 suicide gene controls adverse effects from alloplete T cells after haploidentical stem cell transplantation. *Blood* 2015; 125(26): 4103–4113.
- 151 *Diaconu I, Ballard B, Zhang M et al.* Inducible Caspase-9 Selectively Modulates the Toxicities of CD19-Specific Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells. *Molecular therapy the journal of the American Society of Gene Therapy* 2017; 25(3): 580–592.
- 152 *Gargett T, Brown MP.* The inducible caspase-9 suicide gene system as a "safety switch" to limit on-target, off-tumor toxicities of chimeric antigen receptor T cells. *Frontiers in pharmacology* 2014; 5: 235.

- 153 *Zhou X, Naik S, Dakhova O et al.* Serial Activation of the Inducible Caspase 9 Safety Switch After Human Stem Cell Transplantation. *Molecular therapy the journal of the American Society of Gene Therapy* 2016; 24(4): 823–831.
- 154 *Crosby CM, Kronenberg M.* Tissue-specific functions of invariant natural killer T cells. *Nature reviews. Immunology* 2018; 18(9): 559–574.
- 155 *Olszak T, Neves JF, Dowds CM et al.* Protective mucosal immunity mediated by epithelial CD1d and IL-10. *Nature* 2014; 509(7501): 497–502.
- 156 *Mazzarella L, Guida A, Curigliano G.* Cetuximab for treating non-small cell lung cancer. *Expert opinion on biological therapy* 2018; 18(4): 483–493.
- 157 *Srivastava RM, Trivedi S, Concha-Benavente F et al.* CD137 Stimulation Enhances Cetuximab-Induced Natural Killer: Dendritic Cell Priming of Antitumor T-Cell Immunity in Patients with Head and Neck Cancer. *Clinical cancer research an official journal of the American Association for Cancer Research* 2017; 23(3): 707–716.
- 158 *Wang X, Chang W-C, Wong CW et al.* A transgene-encoded cell surface polypeptide for selection, in vivo tracking, and ablation of engineered cells. *Blood* 2011; 118(5): 1255–1263.
- 159 *Paszkiewicz PJ, Fräßle SP, Srivastava S et al.* Targeted antibody-mediated depletion of murine CD19 CAR T cells permanently reverses B cell aplasia. *The Journal of clinical investigation* 2016; 126(11): 4262–4272.
- 160 *Yu S, Yi M, Qin S, Wu K.* Next generation chimeric antigen receptor T cells: safety strategies to overcome toxicity. *Molecular cancer* 2019; 18(1): 125.
- 161 *Weiss A, Littman DR.* Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* 1994; 76(2): 263–274.
- 162 *Wu C-Y, Roybal KT, Puchner EM et al.* Remote control of therapeutic T cells through a small molecule-gated chimeric receptor. *Science* 2015; 350(6258): aab4077.
- 163 *Juillerat A, Marechal A, Filhol J-M et al.* Design of chimeric antigen receptors with integrated controllable transient functions. *Scientific reports* 2016; 6: 18950.

## 8 Anhang

### 8.1 Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Simone Thomas herzlich bedanken, da sie mir die Promotion in ihrer Arbeitsgruppe ermöglicht und mir dieses Projekt zugeteilt hat. Ich hatte sehr viel Freude, an diesem Thema zu forschen und habe dadurch ein reges Interesse und eine große Neugier an der T-Zell-Immuntherapie entwickelt.

Ein ganz großes Dankeschön geht auch an Herrn Dr. Sebastian Klobuch, der mir jederzeit bei allen Problemen mit Ratschlägen und Tipps zur Seite stand. Besonders zu Beginn hat er mir viele Hilfestellungen und Ideen zum Planen der Experimente gegeben und mir im Hinblick auf meine Fragen bei den regelmäßigen Besprechungen mit Antworten und Verbesserungsvorschlägen stets weitergeholfen.

Vielen lieben Dank sage ich an Frau Dr. Kathrin Hammon, die immer ein offenes Ohr für mich hatte. Bei den vielen Fragen rund um die praktische Durchführung im Labor hat sie mir immer wieder herzlich und liebevoll weitergeholfen. Ich erinnere mich gerne an die Diskussionen im Büro, die mich wieder auf neue Ideen und andere Perspektiven zu dem Thema gebracht haben. Carina Mirbeth und Regina Fichtner waren auch eine große Hilfe und Unterstützung im Labor, denen ich daher ebenso herzlich danken möchte. Bei jeder Kleinigkeit und Frage von mir waren sie stets bereit, mir Auskunft und Ratschläge zu erteilen, und sorgten immer für Aufmunterung und einer positiven Stimmung im Labor. Vielen herzlichen Dank für die tolle Zeit in der Arbeitsgruppe Thomas.

Bei der Arbeitsgruppe Schneidawind aus Tübingen bedanke ich mich sehr für die zur Verfügung gestellten Materialien und der Versuchsanleitung zur Kultivierung der iNKT-Zellen. Ich schätze es sehr, dass Herr PD Dr. Schneidawind sich die Zeit genommen hat, sich mit mir telefonisch mit der Versuchsanleitung zur Kultivierung der iNKT-Zellen auseinanderzusetzen.

Ich bedanke mich auch bei Frau Irina Fink und Herrn Rüdiger Eder, die immer einen Termin für mich frei hatten und die transduzierten T-Zellen sortiert haben.

Und vielen Dank an alle freiwilligen Blutspender für die Experimente mit den iNKT-Zellen.

Zum Schluss bedanke ich mich bei meiner Familie, meinem Freund und seiner Familie, die mir immer zur Seite standen, mich stets motiviert und unterstützt haben. Vielen lieben Dank.

## 8.2 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Geburtsdatum:	27. September 1996
Geburtsort:	Oberviechtach
Eltern:	Maria und Dr. Christian Neuber
Staatsangehörigkeit:	deutsch

### Beruf

seit 04/2022	Weiterbildung zur Fachärztin für Allgemeinmedizin im Weiterbildungsverbund Allgemeinmedizin Regensburg im Krankenhaus Barmherzige Brüder Regensburg
--------------	---

### Studium

11/2021	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Approbation
06/2021 – 10/2021	Drittes Tertial im praktischen Jahr in der Inneren Medizin im Krankenhaus Barmherzige Brüder in Regensburg
03/2021 – 06/2021	Zweites Tertial im praktischen Jahr in der Chirurgie im Caritas-Krankenhaus St. Josef in Regensburg
11/2020 – 03/2021	Erstes Tertial im praktischen Jahr im Wahlfach Kinder- und Jugendmedizin in der Klinik St. Hedwig in Regensburg
10/2020	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
seit 03/2019	Beginn der Promotion über T-Zell-Immuntherapie in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Simone Thomas
03/2019	Famulatur auf der hämato-onkologischen Station im Uniklinikum Regensburg
09/2018	Famulatur in der Interdisziplinären Notaufnahme im Uniklinikum Regensburg
08/2018	Famulatur auf der kardiologischen Station im Uniklinikum Regensburg
03/2018	Famulatur in der allgemeinmedizinischen Praxis bei Herrn Wolfgang Hatzold in Himmelkron
09/2017	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2016	Pflichtpflegepraktikum in der Klinik Hohe Warte Bayreuth
09/2015	Immatrikulation für Humanmedizin an der Universität Regensburg
2015 – 2022	Stipendiatin des Max Weber-Programm Bayerns
07/2015 – 09/2015	Pflichtpflegepraktikum in der Klinik Hohe Warte Bayreuth
05/2015	Teilnahme am „Test für medizinische Studiengänge“

### Schulausbildung

06/2015	Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife
09/2007 – 06/2015	Graf-Münster-Gymnasium in Bayreuth (mathematisch-naturwissenschaftlicher Zweig)
09/2005 – 07/2007	St. Georgen Grundschule in Bayreuth
09/2003 – 07/2005	Pavillonschule in Bayreuth

### 8.3 Selbstständigkeitserklärung

„Ich, Laura Maria Neuber geboren am 27.09.1996 in Oberviechtach, erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.“

---

Ort, Datum

---

Unterschrift