

Modulation der Funktion regulatorischer T-Zellen durch einen CD25 spezifischen CAR oder durch einen synthetischen IL-2 Rezeptor

EIN WEG ZUR ZELLULÄREN THERAPIE VON AUTOIMMUNERKRANKUNGEN



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

Vorgelegt von

Marcell Kaljanac

Aus Mühldorf am Inn

Im Jahr

2023

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am:

09.07.2023

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. Hinrich Abken

Unterschrift:

An erster Stelle möchte ich denen danken, die mich so warmherzig in die Arbeitsgruppe aufgenommen haben. Lieben Dank Astrid, Anja, Linda und Hinrich.

Herzlichen Dank an die gesamte Arbeitsgruppe für das offene und gute Arbeitsklima und im Speziellen an Valerie und Jordan, mit denen ich die gesamte Zeit meines Doktorats verbracht habe. Danke für die gute Freundschaft, die Unterstützung und den Zusammenhalt. Besten Dank gilt auch Dr. Sebastian Bittner für den freundschaftlichen und offenen Austausch über Tregs und deren genetische Modifikation.

Ein riesiges Dankeschön möchte ich an dieser Stelle auch an Johanna Kaljanac richten, die mir unentwegt den Rücken stärkt und meine Vorhaben unterstützt.

Der AG Beckhove danke ich für die großartige gemeinsame Zeit im BioPark.

Großer Dank gilt Dr. Petra Hoffmann für die gute Kooperation und ihre Unterstützung in allen Fragen zu regulatorischen T Zellen. Claudia Weber aus der AG Edinger/ Hoffmann kann ich nicht genug Danken für ihren unermüdlichen Einsatz und ihre Unterstützung in Sachen Suppression Assay und murine Treg Kulturen.

Ebenso großer Dank gilt Prof. Dr. Ralf Linker und seiner Expertise und Unterstützung im gemeinsamen Projekt. Spezieller Dank geht an dieser Stelle an Silvia Seubert und ihre riesige Erfahrung mit den Experimenten der EAE. Danke an Magdalena Lippert für ihre Unterstützung in der Ausführung diverser Experimente. Danke an die gesamte AG Linker für die freundschaftliche Kooperation.

Herzlichen Dank and die Kooperationspartner Prof. Dr. Hansmann, Dr. Udo Hartwig, Dr. Thomas Robeck und Prof. Dr. Simone Thomas für die gute Zusammenarbeit und die interessanten Einblicke in die verschiedenartigsten Projekte.

Prof. Dr. Niels Schaft und Prof. Dr. Frank Sprenger danke ich vielmals für ihre Unterstützung und die Übernahme des Mentorats.

Ein herzliches Dankeschön geht an Prof. Dr. Philipp Beckhove für die Unterstützung des Projekts und die Übernahme der Supervision dieser Dissertation.

Prof. Dr. Hinrich Abken kann ich an dieser Stelle nicht genug danken. Das würde die Seite sprengen. Danke für alles Hinrich.

„Das Ich wird erst durch das Du zum Ich“- Martin Buber, 1923

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden regulatorische T Zellen mit einem CAR, synthetischen Zytokin- Molekülen oder Rezeptoren ausgestattet. Das Ziel dabei ist eine Aktivierung, ein Proliferations und ein Überlebenssignal selektiv am Ort der Inflammation zu induzieren. Als murines Krankheitsmodell wurde dafür die Experimentelle Akute Enzephalomyelitis (EAE) gewählt.

Der murine CD25 CAR wird in murinen Treg Zellen stabil exprimiert und ist funktional aktiv. CD25 CAR Tregs sind CAR abhängig aktivierbar und zeigen suppressive Kapazität gleichermaßen wie nicht- modifizierte Tregs. Auf CD25 CAR Treg Zellen ist CD25 nicht mehr nachweisbar. Treg Zellen mit CD25 CAR weisen eine Blockade der IL-2 Signalkaskade auf, was zu verringerter Phosphorylierung von STAT5, reduzierter Proliferation und Viabilität führt. Gleichzeitig blieb die FoxP3 Expression erhalten. Im Modell der EAE- Prophylaxe wird die Injektion einer Therapie vor Krankheitsbeginn durchgeführt. Ziel ist es einen verzögerten Krankheitsbeginn und einen milderen Verlauf der Krankheit zu erreichen. Die CD25 CAR Treg therapierte Gruppe zeigt eine signifikant verringerte Infiltration von CD4 und CD8 Lymphozyten in das Rückenmark, jedoch führt dies nicht zum verzögerten Krankheitsbeginn oder zum milderen Krankheitsverlauf.

Des Weiteren wurden, drei verschiedene Membran gebundene IL-2 (mbIL-2) Konstrukte synthetisiert, auf humanen regulatorischen T Zellen exprimiert und auf ihre biologische Aktivität getestet und untereinander verglichen. Zum anderen wurde ein spezifisch induzierbarer divalenter „Switch Rezeptor“ (dSWR) konstruiert. Der dSWR besteht aus einem extrazellulären, Liganden- bindenden Anteil und intrazellulär aus den Signalketten des IL-2 Rezeptors, CD122 und CD132. Ziel ist es nach Gabe des Liganden ein IL-2 Signal zu induzieren. Der synthetische Rezeptor wird stabil auf humanen Treg Zellen exprimiert und sind biologisch funktional. Die mbIL-2 Konstrukte induzieren konstitutive STAT5 Phosphorylierung und damit einhergehende Proliferation unter IL-2 limitierenden Bedingungen. Die Viabilität und der Phänotyp blieben unter IL-2 limitierenden Kulturbedingungen erhalten und Proliferation induziert. Der dSWR ist durch seinen Liganden spezifisch induzierbar und zeigt die Phosphorylierung von STAT5 und damit einhergehende Proliferation unter IL-2 limitierenden Bedingungen. Mit dieser Arbeit werden mögliche Wege zu einer Therapie von Autoimmunkrankheiten, mit modifizierten regulatorischen T Zellen elaboriert.

Abstract

In the present work, an attempt is made to modify regulatory T cells with a CAR, synthetic cytokine molecules or receptors. The aim is to induce activation, proliferation, and survival signals, selectively at the site of inflammation. Experimental Acute Encephalomyelitis (EAE) was chosen as the murine disease model for this purpose.

The murine CD25 CAR is stably expressed in murine Treg cells and is functionally active. CD25 CAR Tregs are activated by the CAR and exhibit suppressive capacity to the same extent as non-modified Tregs. CD25 is not detectable on CD25 CAR Treg cells. Treg cells with CD25 CAR undergo a blockade of the IL-2 signaling cascade, resulting in decreased phosphorylation of STAT5, reduced proliferation and viability. At the same time, FoxP3 expression was preserved. In the model of EAE prophylaxis, injection of therapy is performed before disease onset. The goal is to achieve delayed disease onset and a milder course of the disease. The CD25 CAR Treg treated group shows significantly reduced infiltration of CD4 and CD8 lymphocytes into the spinal cord, but this does not lead to delayed disease onset or milder disease course.

Furthermore, three different membrane-bound IL-2 (mbIL-2) constructs were synthesized, expressed on human regulatory T cells, tested for their biological activity, and compared with each other. Second, a divalent specific inducible "switch receptor" (dSWR) was synthesized. The dSWR consists of an extracellular, ligand-binding part and intracellularly of the signal chains from the IL-2 receptor, CD122 and CD132. The goal is to induce IL-2 signaling after administration of the ligand. The synthetic receptor is stably expressed on human Treg cells and is biologically functional. The mbIL-2 constructs induce constitutive STAT5 phosphorylation and concomitant proliferation under IL-2 limiting conditions. Viability and phenotype were maintained, and proliferation induced under IL-2 limiting culture conditions. The dSWR is specifically inducible by its ligand and shows phosphorylation of STAT5 and concomitant proliferation under IL-2 limiting conditions. This work elaborates possible routes to a therapy of autoimmune diseases with modified regulatory T cells.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	iii
Abstract	iv
Abbildungsverzeichnis.....	viii
Tabellenverzeichnis.....	x
Abkürzungsverzeichnis.....	xi
1 Einleitung.....	1
1.1 Regulatorische T Zellen.....	1
1.2 Adoptive Treg Zell Therapie.....	2
1.3 Treg Spezifität und CAR Tregs	3
CD28 als ko- stimulatorische Domäne	3
1.4 CAR Tregs in der Immuntherapie.....	5
1.5 Daclizumab – ein anti CD25 Antikörper in der Behandlung schubförmiger Multipler Sklerose.....	7
1.6 Die Rolle von IL2 in der Funktion regulatorischer T Zellen	9
1.7 Ziele	11
2 Ergebnisse	12
2.1 Expression des CD25-spezifischen CARs reduziert das intrazelluläre IL-2 Rezeptor-Signal und führt zur eingeschränkten T Zell Funktion	12
2.1.1 Struktureller Aufbau des murinen CD25 CARs.....	12
2.1.2 Der murine und der humane CD25 CAR werden auf der Oberfläche humaner T Zellen exprimiert.....	13
2.1.3 Der humane und murine CAR induziert IFN- γ Sekretion in humanen T Zellen nach Antigen Bindung.....	15
2.1.4 CD25 CARs werden auf murinen regulatorischen T Zellen exprimiert	15
2.1.5 Murine konventionelle und regulatorische T Zellen zeigen dosisabhängige Expression des Aktivierungsmarkers LAG-3 nach CAR Aktivierung.....	18
2.1.6 CD25 CARs beeinträchtigen die Proliferation und die Viabilität von T Zellen.....	19
2.1.7 In CD25 CAR Tkonv ist CD25 nicht mehr nachweisbar und in CD25 CAR Tregs ist die Reduktion an CD25 Expression stärker in trans als in cis.....	20
2.1.8 In CD25 CAR Tregs ist CD25 signifikant reduziert, FoxP3 Expression hingegen ist stabilisiert und signifikant höher als in Mock Treg Zellen	21
2.1.9 Die Depletion der CD25+ Zellen durch CD25 CAR Tkonv erfordert Zell-Zell Kontakt	23

2.1.10	CD25 CARs reduzieren die phosphoryliertes STAT5 in konventionellen und regulatorischen T Zellen.....	23
2.1.11	CD25 CAR Tregs zeigen keine verminderte suppressive Kapazität	25
2.1.12	CD25 CAR Tkonv Zellen begehen Fratrizid	27
2.1.13	CD25 CAR Tregs reduzieren signifikant die Infiltration von CD4/ CD8 Lymphozyten ins Rückenmark in der experimentellen autoimmun Enzephalomyelitis. ...	27
2.2	Membrangebundenes IL-2 stabilisiert FoxP3 Expression, Viabilität und induziert Proliferation in humanen regulatorischen T Zellen.....	30
2.3	Switch Rezeptor Prototyp induziert IL-2 Signalweg und stabilisiert Phänotyp und Viabilität in regulatorischen T Zellen nach Ligandenbindung	32
3	Diskussion.....	35
4	Material	43
4.1	Chemikalien und Reagenzien	43
4.2	Kits	44
4.3	Zellkulturmedium.....	44
4.4	Puffer und Nährmedien für Bakterien	45
4.5	Antikörper	45
4.5.1	Unkonjugierte Antikörper	45
4.5.2	Konjugierte anti- human Antikörper	46
4.5.3	Konjugierte anti- Maus und Ratten Antikörper.....	47
4.6	Zytokine	48
4.7	Plasmid Vektoren	49
4.8	Bakterienstamm	51
4.9	Zelllinien.....	52
4.10	Primärzellen.....	52
4.11	Software.....	53
5	Methoden.....	54
5.1	Arbeiten mit Bakterien	54
5.1.1	Transformation von <i>E.coli</i> DH5 α Bakterien (SOP 2-4 Version001)	54
5.1.2	Long term storage of transformed bacteria in glycerol stocks (SOP 2-6 Version001).....	54
5.1.3	MiniPrep (SOP 2-5 Version001) PureLink™ Quick Plasmid MiniPrep-Kit.....	54
5.1.4	MidiPrep (SOP 2-7 Version002).....	55
5.2	Molekularbiologische Arbeiten.....	55
5.2.1	Klonieren (SOP 1-7 Ver001)	55

5.2.2	Agarose Gel Elektrophorese	56
5.2.3	Quantifizierung von DNA.....	56
5.2.4	Sequenzierung	56
5.3	Arbeiten mit eukaryotischen Zellkulturen.....	56
5.3.1	Zellkultur Bedingungen	56
5.3.2	Passagieren adhärenter Zellen.....	57
5.3.3	Kryokonservierung und Auftauen von Zelllinien und primären Zellen.....	57
5.3.4	Zellzählung	57
5.3.5	Arbeiten mit primären humanen Zellen.....	57
5.3.6	Transfektion von HEK293T Zellen für die Lentivirale Transduktion	60
5.3.7	Lentivirale Transduktion von HEK293 Zellen	61
5.3.8	Retrovirale Transduktion	62
5.3.9	FACS- Analyse; Basisprotokoll zum Färben mit konjugierten Antikörpern.....	64
5.3.10	Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).....	64
5.3.11	Aktivierungs- Assay via CAR crosslinking	65
5.3.12	Proliferations Assay	66
5.3.13	Suppressions Assay	66
6	Literaturverzeichnis.....	67
7	Anhang	77
7.1	Gensequenzen von Plasmid Vektor Inserts.....	77
7.1.1	#607 pBullet-BW43126scFv-Fc-CD28(tm+iz)-ζ.....	77
7.1.2	#2134 pBullet_anti-mCD25scFv-mFc-mCD4TM-mCD28-mCD3z.....	80
7.1.3	#2196 pMSCV_leer vector_IRES_mCD90.1.....	83
7.1.4	#2214 pMSCV_mCD25_mFc_mCD4TM_mCD28_mCD3zeta_P2A_LNGFR.....	85
7.1.5	#2239 pMSCV_lk_SP6_mIgG_mCD4TM_mCD28IC_mCD3zeta_P2A_LNGFR.....	89
7.1.6	#2431 pBullet_TGFbR_PDGFRb(TM)_IL2Rb(IC)_P2A_mCD90.1	93
7.1.7	#2432 pBullet_memhIL-2long_P2A_mCD90.1.....	96
7.1.8	#2433 pBullet_memhIL-2short_P2A_mCD90.1.....	98
7.1.9	#2434 pBullet_cSWR_TGFbR2-PDGFRbTM-IL2Rb_TGFbR1-PDGFRbTM-IL2Rg_T2A_mCD90.1.....	100
7.2	Publikationslizenzen Biorender.....	104

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schemazeichnung suppressiver Mechanismen regulatorischer T Zellen.....	2
Abbildung 2: Schemazeichnung und modularer Aufbau von Chimären Antigen Rezeptoren und ihrer Funktionen.....	4
Abbildung 3: Schematische Übersicht der ex vivo CAR Treg Herstellung und Therapie am Beispiel der Nierentransplantation.....	7
Abbildung 4: Daclizumabs Wirkmechanismus und Grund der schwerwiegenden Nebenwirkungen als Schemazeichnung.....	8
Abbildung 5: Schema Diagramm der Transkript Regulation des FoxP3 Lokus.....	9
Abbildung 6: Darstellung des retroviralen pMSCV Vektors #2214, der für den murinen anti-CD25 CAR und den Marker Δ LNDR als ko-exprimiertes Molekül kodiert.....	13
Abbildung 7: Der murine wie der humane CD25 CAR ist auf humanen T Zellen exprimiert.....	13
Abbildung 8: Humane T Zellen mit murinem und humanem CD25 CAR sezernieren IFN- γ nach Antigen Bindung.....	15
Abbildung 9: Der CD25 CAR wird nach Transduktion auf murinen regulatorischen T Zellen exprimiert.....	17
Abbildung 10: Maus CD25 CAR Tkonv und Treg zeigen exprimieren LAG-3 nach CAR Vernetzung via anti Maus IgG Antikörper.....	18
Abbildung 11: CD25 CARs beeinträchtigen die Proliferation und die Viabilität von CD25 CAR humanen wie murinen Tkonv und Treg Zellen.....	19
Abbildung 12: CD25 CAR Tkonv depletieren CD25+ Zellen. CD25 CAR Tregs weisen ebenso keine CD25 Expression auf, jedoch beschränkt sich dieser Effekt auf cis. In trans ist die CD25 Expression reduziert.....	20
Abbildung 13: CD25 CAR Tregs zeigen eine signifikant reduzierte CD25 Expression bei gleichzeitig stabiler FoxP3 Expression.....	22
Abbildung 14: Die Depletion von CD25+ Zellen erfolgt durch Zell-Zell Kontakt.....	23
Abbildung 15: CD25 CAR Tkonv und Treg zeigen reduzierte Phosphorylierung von STAT5....	24
Abbildung 16: CD25 CAR Treg Zellen zeigen keine verminderte suppressive Aktivität im Vergleich zu Mock Tregs.....	26
Abbildung 17: CD25 CAR Tkonv Zellen zeigen verringerte Viabilität und einen dezimierten Anteil integrierter Zellen an der Gesamtpopulation, im Vergleich zu CAR Tkonv irrelevanter Spezifität und Mock Tkonv.....	27
Abbildung 18: CD25 CAR Treg Zellen reduzieren signifikant die Rückenmarksinfiltration von CD4+ und CD8+ Lymphozyten, in der experimentellen autoimmun Enzephalomyelitis. Der Krankheitsverlauf ist im Vergleich zu den Kontrollen nicht signifikant unterschiedlich.....	29
Abbildung 19: Membran verankertes IL-2 führt zu Proliferation, Phosphorylierung von STAT5, stabiler Expression von FoxP3 und verhindert Apoptose unter IL-2 depletierten Bedingungen in humanen Tregs.....	31

Abbildung 20: Der Switch Rezeptor Prototyp induziert selektiv Proliferation, Phosphorylierung von STAT5, stabilisierter Expression von FoxP3 und verhindert Apoptose nach Ligandenbindung unter IL-2 depletierten Bedingungen in humanen Tregs.....	33
Abbildung 21: Graphische Modelldarstellung des Blockademechanismus des IL-2 Signalwegs durch CD25 CAR Moleküle.	39
Abbildung 22: Graphisches Modell der mbIL-2 Molekül Bindung and den IL-2 Rezeptor in cis, mit Signaltransduktion.	40
Abbildung 23: Graphisches Modell der Funktionsweise des induzierbaren divalenten Switch Rezeptors.....	42

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der verwendeten Chemikalien und Reagenzien.	44
Tabelle 2: Liste der verwendeten Kits und deren Hersteller	44
Tabelle 3: Liste der verwendeten Zellkulturmeiden und FCS.....	45
Tabelle 4: Liste der verwendeten Puffer und Nährmedien für die Kultivierung von Bakterien.45	
Tabelle 5: Liste der verwendeten nicht konjugierte Antikörper.....	46
Tabelle 6: Liste der konjugierten anti- Human Antikörper	47
Tabelle 7: Lister der verwendeten konjugierten anti- Maus Antikörper.....	48
Tabelle 8: Liste der verwendeten Zytokine	48
Tabelle 9: Liste der verwendeten Plasmide mit laborinterner ID, Bezeichnungen und Eigenschaften.....	51
Tabelle 10: Beschreibung des verwendeten Bakterienstamms	51
Tabelle 11: Liste der verwendeten Zelllinien	52
Tabelle 12: Liste der verwendeten Software und deren Anbieter	53
Tabelle 13: Zusammensetzung des Antikörper Färbeansatzes, für die Sortierung von naiven humanen Treg und Tkonv	58
Tabelle 14: Zusammensetzung des Antikörper Färbeansatzes, für die Sortierung von naiven murinen Treg und Tkonv	60
Tabelle 15: Übersicht des Transfektionsschemas für die Transfektion von HEK293T.....	61
Tabelle 16: Plasmide welche für die Produktion von Lentiviren verwendet wurden	61
Tabelle 17: Übersicht des Transfektionsschemas für die Transfektion von Platinum-A Zellen.62	
Tabelle 18: Volumen und Zusammensetzung der DNA in Transfektionsansätzen der retroviralen Transduktion von humanen T Zellen	62
Tabelle 19: Übersicht des Transfektionsschemas für die Transfektion von Phoenix ECO Zellen	63
Tabelle 20: Volumen und Zusammensetzung der DNA in Transfektionsansätzen der retroviralen Transduktion von murinen T Zellen.....	64
Tabelle 21: Übersicht der Komponenten die für die Detektion von IFN- γ verwendet wurden	65

Abkürzungsverzeichnis

ACT	Adoptive Zelltherapie
Ag	Antigen
APS	Autoimmun polyendokrines Syndrom
Breg	Regulatorische B Zelle
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CFA	Complete Freund's Adjuvant
CNI	Calcineurin Inhibitor
DAC	Daclizumab
DC	Dendritische Zellen
DR5	Death receptor 5
EAE	Experimentelle akute Enzephalomyelitis
ECD	Extrazelluläre Domäne
FCS/ FBS	Fötales Kälber/ Bovine Serum
GvHD	Graft-versus-Host Erkrankung
HSCT	Hämatopoetische Stammzelltransplantation
i.n.	intranasal
I-κ	Kappa Leader Signalpeptid
mbIL-2	Membran gebundenes IL-2
MCS	Multiple Klonierungsstellen
MFI	Mittlere Fluoreszenz Intensität
MHCII	Major Histocompatibility Complex II
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MS	Multiple Sklerose

PI	Propidiumiodid
pTregs	Periphere regulatorische T Zellen
PTX	Pertussis Toxin
RMS	Remittierende Multiple Sklerose
T1D	Typ-1 Diabetes
tTregs	Thymus Tregs
TILs	Tumor infiltrierende Lymphozyten
TRAIL	TNF- related apoptosis- inducing ligand
Treg	Regulatorische T Zelle
TSDR	Treg spezifisch demethylierte Region
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Regulatorische T Zellen

Regulatorische T Zellen sind eine spezialisierte Subpopulation CD4 positiver T Zellen, die eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der Immunhomöostase einnehmen und in der Lage sind, Autoimmunerkrankungen zu verhindern und die Toleranz in der Peripherie aufrecht zu erhalten.¹ In Menschen sind regulatorische T Zellen charakterisiert durch ihre konstitutiv hohe Expression der IL-2 Rezeptor α Kette (CD25), FoxP3 und einer niedrigen Expression der IL-7 Rezeptor α Kette (CD127).² Das X- chromosomale Immun- Dysregulation- Polyendokrino- pathie- Enteropathie- Syndrom (IPEX) wird ausgelöst durch eine Mutation mit Funktionsverlust im FoxP3 Gen. Das IPEX- Syndrom ist eine schwere systemische Autoimmunerkrankung mit refraktärer Diarrhö, Endokrinopathien, Hautsymptomen und Infektionsneigung. Es zählt zu den autoimmunen polyendokrinen Syndromen (APS). Das IPEX Syndrom kann durch die Herstellung der normalen Treg Zellpopulation mittels hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSCT) geheilt werden.^{3,4} Das Unterstreicht den Stellenwert den die Anzahl und die Funktionsweise der Tregs in der Immuntoleranz einnehmen.

Regulatorische T Zellen supprimieren Immunreaktionen gegen Selbst- und Fremdantigene, in dem sie durch eine Vielzahl an Mechanismen die Aktivität und Proliferation anderer T Zellen limitieren. In Studien wurde ihre suppressive Wirkungsweise auf Lymphozyten und NK Zellen, aber auch auf Makrophagen und dendritischen Zellen (DCs), nachgewiesen.⁵ Diese Mechanismen umfassen zum einen Antigen spezifische Suppressionsmechanismen, welche durch die Treg-DC Interaktion und TCR-MHCII Antigenerkennung vermittelt wird. Letztendlich führt diese Interaktion zu einer Antigen spezifischen tolerogenen DC. Die Mechanismen, umfassen die Bindung der ko- stimulatorischen Moleküle CD80/86 auf DCs durch CTLA-4⁶, die Aufnahme von Antigen-MHCII von der DC Zelloberfläche durch Transendozytose⁷⁻⁹ und eine CTLA-4 vermittelte Zunahme derIDO Expression in der DC, welche die Konzentration von Tryptophan erniedrigt und dadurch die Proliferation von T Effektorzellen hemmt.¹⁰ Diese Mechanismen beeinträchtigen die Ag Präsentation, was zu Anergie in T Effektor Zellen und zur Antigen spezifischen Induktion von peripheren regulatorischen T Zellen (pTreg) führt.

Antigen unspezifische Suppressionsmechanismen umfassen die Expression von Ectonucleotidasen CD39 und CD73 auf der Zelloberfläche, die ATP zu Adenosin hydrolysieren. Eine Zunahme an Adenosin im Microenvironment inhibiert DCs und supprimiert die Proliferation von aktivierten T Effektor Zellen.¹¹ Weitere Suppressionsfaktoren sind die sezernierten Zytokine TGF- β , IL-10 und IL-35. Diese Zytokine unterdrücken zum einen die Aktivierung und die Proliferation von T und B Zellen, zum anderen können sie auch direkt pTregs und regulatorische B Zellen (Bregs) induzieren.¹²⁻¹⁴ Des Weiteren reduziert TGF- β und IL-10 die Präsentation von Antigen und fördert somit tolerogene DCs, was wiederum pTregs induzieren kann.¹⁵⁻¹⁹ Zwei pTreg Subpopulationen zeichnen sich durch eine hohe TGF- β und IL-10 Sekretion aus, Th3 und Tr1 Tregs. Diesen Subpopulationen wird eine zentrale Rolle in der oralen Toleranzinduktion und bei der Verhinderung der Autoimmun- Kolitis zugeschrieben.²⁰

Die kontaktabhängigen Suppressionsmechanismen umfassen die Intervention in der Ca²⁺ Versorgung von Effektor T Zellen^{21,22}, Perforin- Granzym vermittelte Zytolyse von CD4+ und CD8+ Effektor T Zellen²³, die Interaktion von TNF- related apoptosis inducing ligand (TRAIL) auf der Treg Seite und Death Receptor 5 (DR5) auf der Seite der Effektor Lymphozyten.

Letzterer Mechanismus induziert Apoptose durch die Aktivierung von Caspase-8.^{24,25} Tregs exprimieren gleichzeitig PD-1 und PD-L1. Die Interaktion von DC PD-L1 und Treg PD-1 führt zu tolerogenen DCs. Treg PD-1 Interaktion mit T Effektor PD-L1 induziert Anergie und kann darüber hinaus zur pTreg Konversion führen. Das PD1 Signal ist für die Treg Zelle inhärent wichtig, um die FoxP3 Expression und die Immunhomöostase aufrechtzuerhalten.^{26,27}

Treg zellen spielen bei der Karzinogenese und der Tumor Evasion vor CD8 und NK Lymphozyten eine Rolle.²⁷ Durch die hohe Expression von CD25 fungieren Tregs im Mikromilieu als IL-2 Senke, was sich negativ auf die Proliferation der CD8 und NK, aber auch negativ auf CD4 Effektor Lymphozyten auswirkt (Abbildung 1).²⁸ Über ihre suppressive Funktion hinaus regulieren Tregs die Reparatur und Regeneration von Geweben.^{29,30}

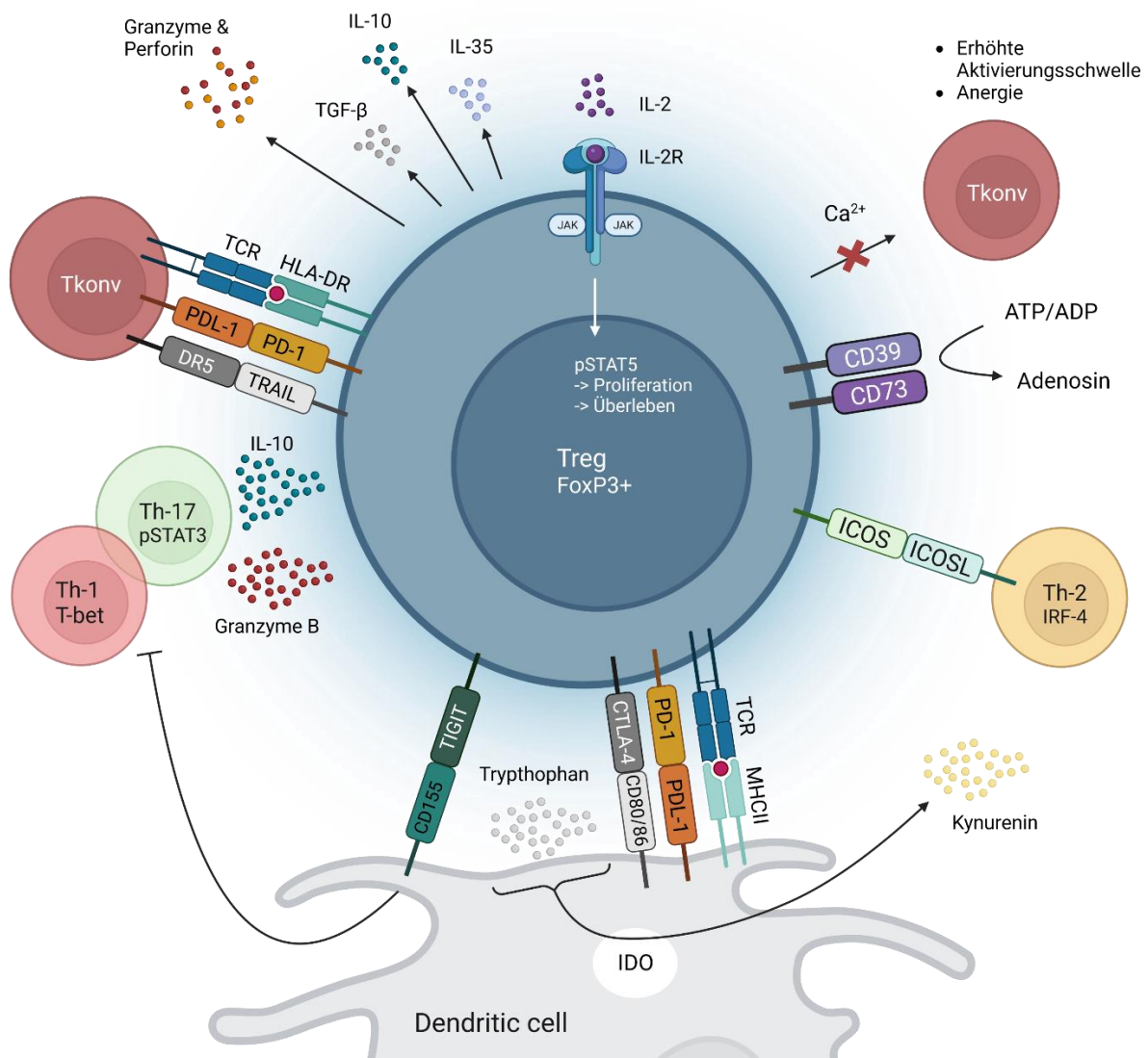


Abbildung 1: Schemazeichnung suppressiver Mechanismen regulatorischer T Zellen.

1.2 Adoptive Treg Zell Therapie

Das große Interesse an adoptiven T Zelltherapien liegt in den jüngsten Erfolgen genetisch modifizierter T Zellen in der Krebstherapie begründet. Die CD19 CAR T Zelltherapie hat die

Behandlung der Akuten Lymphatischen B-Zell Leukämie (B-ALL) und damit auch das gesamte Forschungsfeld revolutioniert. Folgerichtig wird nun erforscht, wie man diese Strategie oder Therapieansatz nutzen kann, um bei Autoimmunerkrankungen, allogener Organtransplantation, chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (CEDs), Allergien und der Transplant gegen Wirt Erkrankung (GvHD) Immuntoleranz zu induzieren. Hierfür werden regulatorische T Zellen als Ausgangsprodukt verwendet und modifiziert.³¹⁻³⁸

Bei ihrer erstmaligen Beschreibung 1995 durch Prof. Shimon Sakaguchi, wurden Tregs zunächst als homogener T Zell Subtyp definiert. Im Laufe der Zeit wurden jedoch weitere Untergruppen entdeckt, welche aufgrund ihrer Expression an Oberflächenproteinen, sekretierten Zytokinen und Suppressionsmechanismen eingruppiert werden können. Derzeit werden naive CD4+CD25+CD127^{niedrig}CD45RA+ Thymus Treg Zellen (tTregs) für die adoptive Zell Therapie (ACT) verwendet. Dennoch könnten wiederum andere Pathologien von verschiedenen peripher induzierten Treg (pTreg) Untergruppen profitieren, wie zum Beispiel den IL-10 produzierenden Tr1 oder die TGF- β sekretierenden LAP+ Th3 Tregs.³⁹⁻⁴¹ Die Rationale für den adoptiven Zelltransfer von Tregs basiert auf der Annahme, dass durch das Verschieben der Immunhomöostase zugunsten von Tregs die Suppression akut und chronisch inflammatorischer Erkrankungen erreicht werden kann. Zahlreiche erfolgreiche Tierversuche⁴²⁻⁴⁵ führten zum Einsatz von polyklonal expandierten Tregs in klinischen Studien, für die Behandlung von Typ-1 Diabetis (T1D)^{31,32,46}, Morbus Chron³³, Transplantabstoßung^{34,35} und GvHD.^{37,38,47-50} Der Transfer regulatorischer T Zellen ist sicher und führt zu nachhaltiger Reduktion von Entzündungsfaktoren.

1.3 Treg Spezifität und CAR Tregs

CD28 als ko- stimulatorische Domäne

Regulatorische T Zellen können Effektor T Zell Aktivität durch antigenabhängige und indirekte Mechanismen modulieren.⁵¹ Es wird angenommen, dass Polyklonale Tregs in autoimmun- und autoinflammatorischen Erkrankungsbildern dann von Vorteil sein können, wenn das Zielantigen unbekannt ist, oder eine Vielzahl an Autoantigenen und Geweben beteiligt sind.^{52,53} Diese Art der Behandlung könnte auch in der Transplantabstoßung wirksam sein.^{32,35}

Im Gegensatz dazu zeigen Antigen spezifische Tregs erhöhte Effizienz in Bezug auf ihre Migration zu Zielantigenen und Gewebs- drainierende Lymphknoten, wodurch eine erhöhte spezifische Gewebsinfiltration bei gleichzeitig geringerer systemischer Treg Zirkulation erreicht wird.⁵⁴⁻⁵⁶ Antigen spezifische Tregs können durch den Gentransfer von TCRs, CARs oder die selektive Expansion mit Zielantigen hergestellt werden. In Maus Modellen wurde gezeigt, dass Alloantigen reaktive Treg inflammatorische Immunreaktionen effektiver supprimieren als polyklonal expandierte Treg.^{43,57}

Vor diesem Hintergrund werden derzeit Strategien erprobt, die darauf abzielen, Spender Alloantigen- spezifische Tregs in der Organtransplantation gegen Transplantabstoßung einzusetzen.⁵⁸ Alloantigen spezifische Tregs werden in vitro in der ersten Stimulationsrunde selektiv mit Spender Tregs expandiert. Im Anschluss folgt eine weitere polyklonale Expansionsphase um therapeutisch relevante Zellzahlen für den adoptiven Transfer zu erreichen.⁵⁹ Dieser Prozess ist komplex, arbeitsintensiv und ineffizient, da alloreaktive Tregs durchschnittlich 10% der naiven Treg Population einnehmen.⁶⁰

Der Erfolg der Amplifikation der Treg Zellen und somit der adoptiven Zelltherapie mit Treg Zellen ist von der Startgröße dieser Population im Primärisolat abhängig. Diese technischen Schwierigkeiten limitieren den Einsatz auf weiter Front. Die repetitive Stimulation durch den T Zell Rezeptor (TCR) könnte den Treg Phänotyp und die funktionale Kapazität verändern, was Relevanz für die Qualität der Immunsuppression in transplantierten Patienten hat. Antigen-spezifische Tregs in großen Mengen zu generieren, ohne ihren Phänotyp und ihre funktionelle Kapazität zu verändern, stellt daher eine zentrale Hürde in der Anwendung der Treg Zelltherapie dar.

Diese technische Herausforderung wird dadurch adressiert, Tregs mit Antigen-spezifität durch die Expression eines transgenen TCRs oder CARs auszustatten. Das Konzept, dass spezifisch aktivierte Tregs potenter in ihrer Immunsuppression sind als polyklonale - nicht aktivierte Tregs – wurde in experimentellen Modellen bestätigt.⁶¹ MHCII spezifische transgene TCR Tregs induzieren verlängerte Toleranz eines Spenderorgans, in einem Modell für Herztransplantation in Mäusen.^{62,63}

In einer Alloantigen spezifischen Situation existieren eine Vielzahl von potenziellen Zielen für TCRs, was die Anwendung in der Transplantatabstoßung komplex macht. In Autoimmunerkrankungen hingegen, in der die Anzahl der durch TCR erkannten Ziele auf wenige reduziert ist, können mit dieser Strategie eine Vielzahl an Patienten behandelt werden.⁶⁴ Technisch einfacher ist die Situation mit CARs, die MHC unabhängig Antigene erkennen und nach Bindung eine T Zellaktivierung induzieren. CARs sind synthetische Rezeptormoleküle mit einer extrazellulären Bindedomäne und zwei intrazellulären Signaldomänen. Nach Bindung des Zielantigens übermitteln CARs ein Aktivierungssignal in die T Zelle (Abbildung 2).^{65,66} Tregs mit CARs zu modifizieren verfolgt das Ziel, diese mit einer definierten Antigen-spezifität auszustatten, welche die inhärenten suppressiven Mechanismen nach Antigen-erkennung aktiviert.

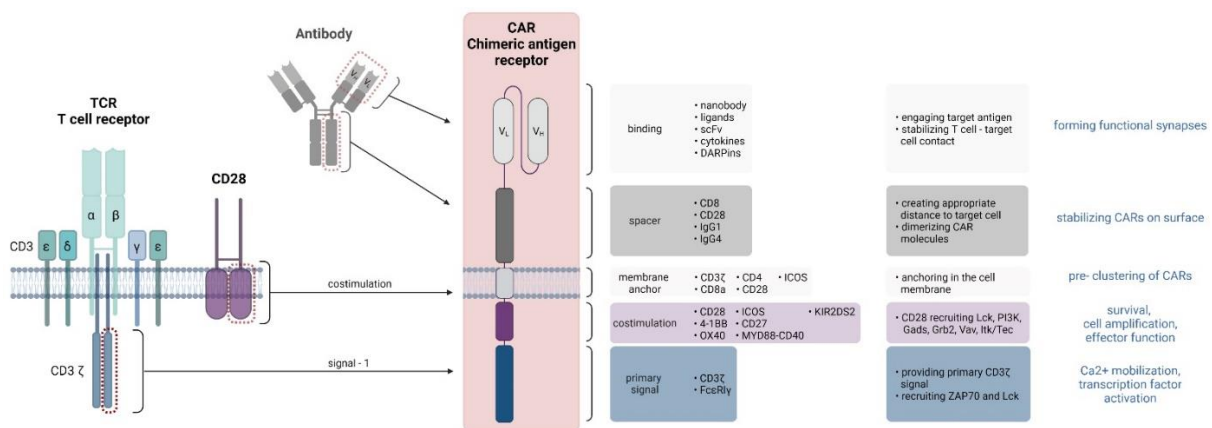


Abbildung 2: Schemazeichnung und modularer Aufbau von Chimären Antigen Rezeptoren und ihrer Funktionen.

Die Antigen Bindedomäne leitet sich von Antikörpern und deren variablen Regionen (V_L und V_H) ab. In C- terminaler Leserichtung schließt sich die Hinge Region, die dem Molekül Stabilität, Flexibilität und effektive Antigenbindung gewährleistet. Für CARs zweiter Generation besteht der intrazelluläre Teil aus dem primären Aktivierungssignal CD3zeta und einer ko-

stimulatorischen Domäne. Hier gibt es mannigfaltige Modulationsmöglichkeiten (Abbildung 2).

CARs für Tregs folgen prinzipiell dem selben Bauplan wie für Tkonv.⁶⁷ Jedoch lassen sich nicht alle Regeln übertragen, wodurch systematisches Testen unabdingbar ist. Die Funktion, Potenz und die Persistenz von CAR T Zellen wird größtenteils durch die Wahl der ko- stimulatorischen Domäne definiert.⁶⁸ Die Anforderungen an die ko- stimulatorische Domäne ist für Tregs unterschiedlich zu Tkonv, wobei Treg eine Stimulation durch CD28 zusätzlich zu dem primären CD3ζ Signal benötigen, welches durch kein anderes Mitglied der TNFR- oder CD28 Superfamilie substituiert werden kann.⁶⁹⁻⁷¹ Zusätzlich ist die Versorgung mit IL-2 für die Aufrechterhaltung der Viabilität, Proliferation und die Stabilität des Phänotyps unabdingbar.⁷² Denn um langfristige Toleranz induzieren zu können müssen modifizierte Treg einen stabilen Phänotyp aufweisen.

In Studien wurde gezeigt, dass im Speziellen für CAR Tregs, CD28 in Bezug auf Proliferation und suppressivem Potential als ko- stimulatorische Domäne, eindeutig zu bevorzugen ist. CARs mit CD28 Domäne erzielte die Besten Ergebnisse in einem GvHD Xenograft Modell. Die ko- stimulatorischen Domänen 4-1BB und TNFR2 dagegen destabilisieren Tregs.^{73,74}

Das tonische Aktivierungssignal ist für Tregs mit fatalen Folgen verbunden. Es führt zu Dysfunktionalität in vivo, zu Methylo- Umstrukturierungen und Veränderungen im Metabolom. Außerdem zeigen Tregs die einen CAR mit tonischer Aktivität exprimieren einen Phänotyp der mit einem Erschöpfungszustand, der sogenannte Exhaustion in Verbindung gebracht wird.⁷⁵ Treg Zellen, welche mit tonisch aktiven 4-1BB CARs ausgestattet wurden, können jedoch mit transienter mTOR Blockade vor einem dysfunktionalen Zustand bewahrt werden.⁷⁶

Präklinische Studien demonstrieren therapeutische Effektivität der CAR Treg Therapie. Der adoptive Transfer von anti CEA CAR Treg, im Modell der DSS und Transfer vermittelten Kolitis, verbesserte den Krankheitsverlauf signifikant. Die mit chronischer Kolitis assoziierte Tumorbildung im Kolon wurde verhindert.^{77,78} CAR iTregs mit Spezifität für das Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG) milderten den Verlauf der murinen Experimentellen Autoimmun- Enzephalomyelitis (EAE).⁷⁹ Tregs die mit einem anti HLA-A2 CAR modifiziert wurden, konnten ein letale GvHD in einem xenogenen Modell für GvHD mildern. Hierbei konnten diese HLA-A2 positive Effektor T Zellen in NSG- Mäusen effizient supprimieren. CAR Treg Zellen mit nicht relevanter Spezifität konnten die letale GvHD nicht verhindern.⁸⁰ In einem klinischen Modell für Herztransplantation wurde zeigen, dass HLA-A2 CAR Tregs die Abstoßung von vaskularisierten Spenderorganen in einer immunkompetenten Maus verzögerten, jedoch nicht verhinderten.⁸¹

1.4 CAR Tregs in der Immuntherapie

Für die Translation in die klinische Anwendung stellen bisher die geringen Zellzahlen der regulatorischen T Zellen im peripheren Blut, die Isolation dieser ohne Kontamination der sehr viel größeren Population der konventionellen T Zellen, die effektive Transduktion des CARs, und die Generierung von therapeutisch relevanten Zellzahlen durch ex- vivo Expansion des Zellprodukts große Herausforderungen dar. Während der letzten Jahre entwickelten einige

Arbeitsgruppen Protokolle, die es erlauben, Tregs unter GMP Bedingungen erfolgreich zu isolieren, amplifizieren und genetisch zu modifizieren (Abbildung 3).⁸²

Sortierte naive Treg gelten als sicher für die ACT und eignen sich sehr gut als Startmaterial, da während der Isolierung Effektor T Zellen effizient aussortiert werden.⁸³ Außerdem lassen sich naive Treg ex- vivo sehr gut expandieren.^{84,85} Naive Treg sind durch die Marker CD4⁺CD25⁺CD127^{low}CD45RA⁺ definiert, zeigen eine potente therapeutische Wirkung im Vergleich zu konventionellen Treg und eine stabile FoxP3 Expression im Vergleich zu CD45RA⁻ Memory Treg. Letzteres liegt im stabilen epigenetischen Phänotyp begründet.^{86,87} Obwohl ein Risiko einer Kontamination mit Effektor T Zellen verbleibt, werden Treg in klinischen Studien zur Behandlung von akuter GvHD erforscht. (EudraCT 2012-00268512).^{88,89}

Isolierte naive Treg werden durch CD3, CD28 und IL-2 Stimulation aktiviert, und anschließend mit oder ohne Rapamycin und TGF-β⁹⁰, mittels γ-Retrovirus oder Lentivirus transduziert.^{91,92} Die modifizierten Zellen werden im Anschluss durch die Stimulation von TCR/CD3, CD28 und IL-2 auf therapeutisch wirksame Zellzahlen expandiert. Artificielle Antigen präsentierende Zellen (aAPCs), wie zum Beispiel die KT64/86 Zellen, die mit anti- CD3/CD28 Antikörpern beladen werden, induzieren ähnliche Expansionsraten bei gleichzeitig höherer TGF-β Sekretion und Suppressor Funktion es Zellprodukts.^{93,94}

CAR und TCR modifizierte Treg sind in fortgeschrittener klinischer Testung. „Steadfast“ ist eine multizentrische Studie (NCT04817774, EudraCT 2019-001730-34, Sangamo Therapeutics), worin naive Tregs von HLA-A02 negativen Nierentransplant Rezipientinnen mit einem HLA-A02 spezifischen CAR modifiziert werden. Den Rezipientinnen wird eine HLA-A02 positive Niere implantiert, die durch den CAR erkannt wird.⁹⁵ Die CAR Tregs sollen spezifisch in der transplantierten Niere akkumulieren und eine nachhaltige Immuntoleranz induzieren. Das primäre Ziel der Studie ist die Sicherheit und die therapeutische Wirkung der Zelltherapie auf die gespendete Niere und deren Rezipientinnen zu evaluieren. Sekundäre Ziele umfassen die Bewertung des Effektes der CAR Tregs auf die langfristige Sicherheit und Immuntoleranz der Empfängerinnen gegenüber der Spenderniere, der Möglichkeit der Reduktion der immunsupprimierenden Medikamente und der Akkumulation von CAR Treg Zellen in der transplantierten Niere.⁹⁶

In der „LIBERATE“ Studie (Quell Therapeutics) werden HLA-A02⁻ Patientinnen nach HLA-A02⁺ Leber Transplantation mit autologen CAR Tregs behandelt, die HLA-A02 erkennen. Ziel ist die graduelle Reduktion der systemischen Immunsuppression und die nachhaltige Induktion der Immuntoleranz durch das Verhindern der host-versus-graft Immunantwort, die Gefahr der Transplantabstoßung birgt.⁹⁷ Ziel ist es von aus diesen Studien Auskunft über die Lokalisation der CAR Treg Zellen, deren Phänotyp, die Persistenz und die funktionale Kapazität im Zielorgan und in der Peripherie von transplantierten Patientinnen zu erhalten.

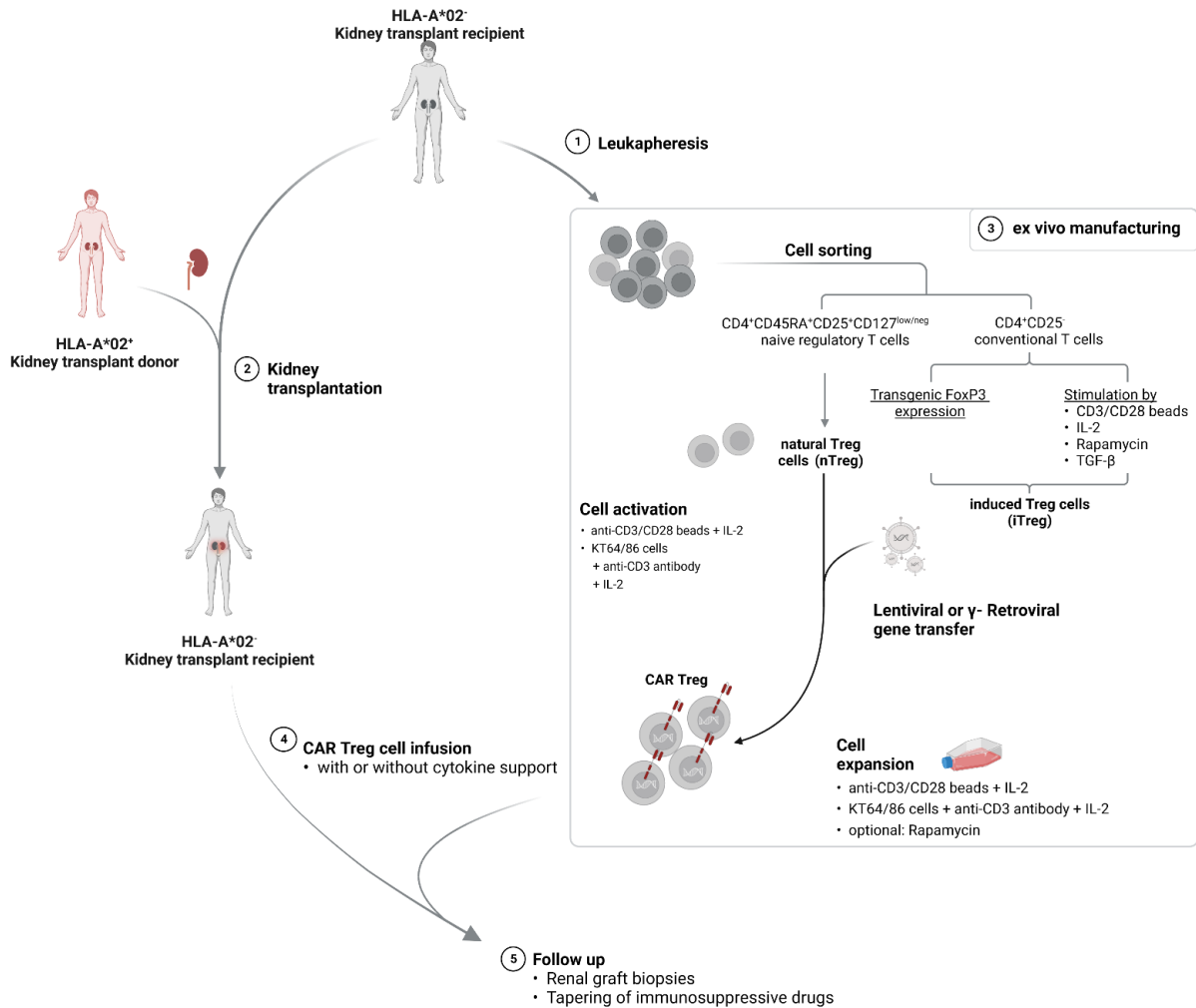


Abbildung 3: Schematische Übersicht der ex vivo CAR Treg Herstellung und Therapie am Beispiel der Nierentransplantation.

1.5 Daclizumab – ein anti CD25 Antikörper in der Behandlung schubförmiger Multipler Sklerose

Daclizumab (DAC) ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper der CD25 bindet, die α -Untereinheit von des IL-2 Rezeptors. DAC wurde ursprünglich als intravenöse Therapie zur Behandlung der Transplantabstoßung, T Zell Leukämie und der schweren Verlaufsform von Uveitis entwickelt.⁹⁸⁻¹⁰¹ Die subkutane Applikation von DAC konnte die klinischen und MRT Messwerte für inflammatorische Aktivität bei Patienten und Patientinnen mit remittierender Form der Multiplen Sklerose (RMS) reduzieren. Daraufhin wurde das Medikament 2016 für die Behandlung von RMS zugelassen.¹⁰²⁻¹⁰⁵ Unglücklicherweise kam es bei den mit DAC Behandelten zu schwerwiegenden Nebenwirkungen, sodass DAC 2018 vom Markt genommen wurde.

Die Blockade des IL-2 Signalwegs führt wie gewollt zu verringerter Proliferation und Apoptose aktivierter T und B Lymphozyten. Im weiteren Verlauf werden jedoch auch regulatorische T Zellen in die Apoptose geführt, da diese Zellen eine hohe Expression an CD25 aufweisen.

Jedoch erwies sich die verstärkte Proliferation von CD56^{high} NK Zellen unter Behandlung mit DAC als Ursache für die Nebenwirkungen. Durch die Blockade von CD25 und der damit verbundenen reduzierten Aufnahme von IL-2 akkumuliert das Zytokin und resultiert in einer erhöhten Serumkonzentration. NK Zellen exprimieren kein CD25 jedoch den IL-2 Rezeptor intermediärer Affinität, welcher sich aus der IL-2 Rezeptor beta (CD122) und der gamma Kette (CD132) zusammensetzt. Somit konnten NK Zellen immer noch ihren IL-2 Signalweg nutzen und das überschießende IL-2 binden (Abbildung 4). Diese zunehmende Proliferation von NK Zellen kann im weiteren Verlauf der Behandlung zu seltenen schwerwiegenden Nebenwirkungen führen, wie Entzündung der Haut, autoimmun Hepatitis und dem DRESS Syndrom (Drug Rash with Eosinophilia and Systemic Symptoms)¹⁰⁶.

Durch die Aufarbeitung des Falles Daclizumab wurden tiefgreifende Erkenntnisse über die wechselseitige Beeinflussung von angeborener und erworbener Immunität und die Rolle des Zytokins IL-2 innerhalb dieses Netzwerkes gewonnen.¹⁰⁶

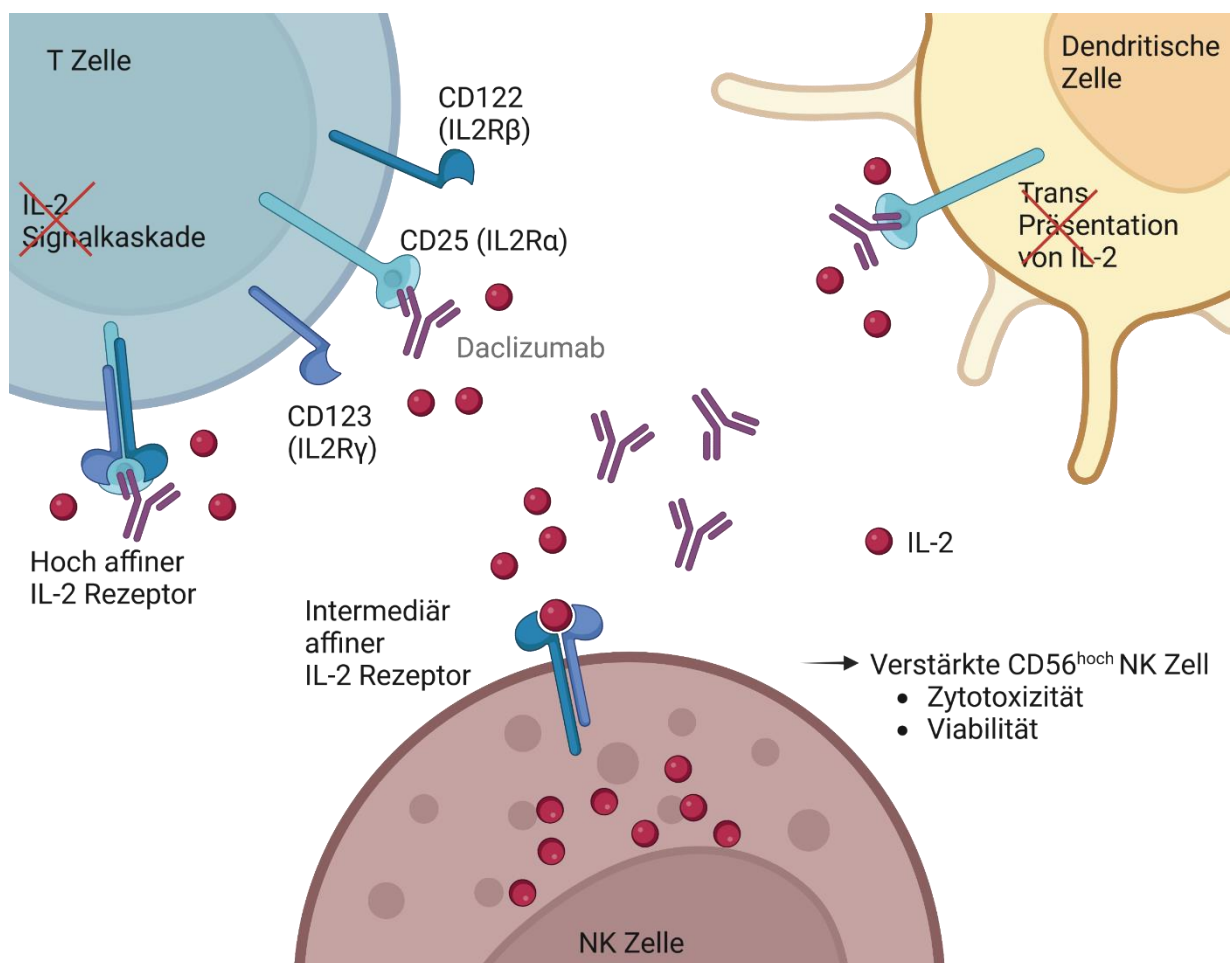


Abbildung 4: Daclizumabs Wirkmechanismus und Grund der schwerwiegenden Nebenwirkungen als Schemazeichnung. DAC bindet CD25 und verhindert die Assoziation mit CD132 und CD122. Des Weiteren unterbindet die CD25 Blockade die Präsentation von IL-2 in trans, durch DCs. Dies mündet in eine erhöhte IL-2 Serumkonzentration wodurch NK Zellen durch deren intermediär affinen IL-2 Rezeptor (CD132 und CD122) aktiviert werden. Dadurch verschiebt sich das Gleichgewicht innerhalb der NK Zellen zu CD56^{hoch} NK Zellen, und dadurch auch zu verstärkter Zytotoxizität und Viabilität.¹⁰⁶

1.6 Die Rolle von IL2 in der Funktion regulatorischer T Zellen

IL2 ist der wichtigste Faktor für die Proliferationsfähigkeit, Funktion, die Stabilität von Tregs und die Aufrechterhaltung der Immunhomöostase in der Peripherie. Im Gegensatz zu Tkonv sind Treg nicht in der Lage IL-2 zu produzieren und deshalb auf eine parakrine Aufnahme angewiesen. Mäuse, die kein STAT5 und Jak3 exprimieren können –welche zentrale Faktoren der IL-2 Signalkaskade darstellen– weisen eine substantiell reduzierte Treg Population auf.¹⁰⁷ Chen *et al.* demonstrieren, dass ein IL-2/anti-IL-2 Komplex TSDR Methylierung in iTregs induziert und dadurch die Expression von FoxP3 stabilisiert. Dieser Komplex erhöht die Aktivität und Bioverfügbarkeit von IL- 2. Im Gegenzug führt die IL-2 Blockade zum Verlust von FoxP3 Expression und Funktion.¹⁰⁸ In Übereinstimmung damit steht, dass durch IL-2 Gabe der Verlust von FoxP3 Expression transferierter Tregs in lymphopenischen Mäusen verhindert werden konnte.¹⁰⁹ Auch im Menschen konnte gezeigt werden, dass eine IL-2 Therapie TSDR Demethylierung und die Frequenz zirkulierender Treg Zellen erhöhen kann.¹¹⁰

STAT5 steht am Ende der IL-2 Signalkaskade und ist ein Transkriptionsfaktor, der den Lokus für FoxP3 direkt bindet.¹¹¹ Die STAT5 Bindung an CNS2 und damit das IL-2 Signal schirmen die FoxP3 Transkription vor Signalen proinflammatorischer Zytokine ab und stabilisieren damit den Phänotyp der pTreg sowie der tTreg Zellen.¹¹² Die Transkriptionsfaktoren Nr4a1 (Nur77), Nr4a2 und Nr4a3, deren Induktion proportional zur Stärke des TCR Signals ist, binden den proximalen Promotor von FoxP3 zur Induktion der Transaktivierung (Abbildung 5).¹¹³ Das unterstreicht die Bedeutung von IL-2 und des TCR/CD3 Signals für die Funktion und Stabilität der Treg.

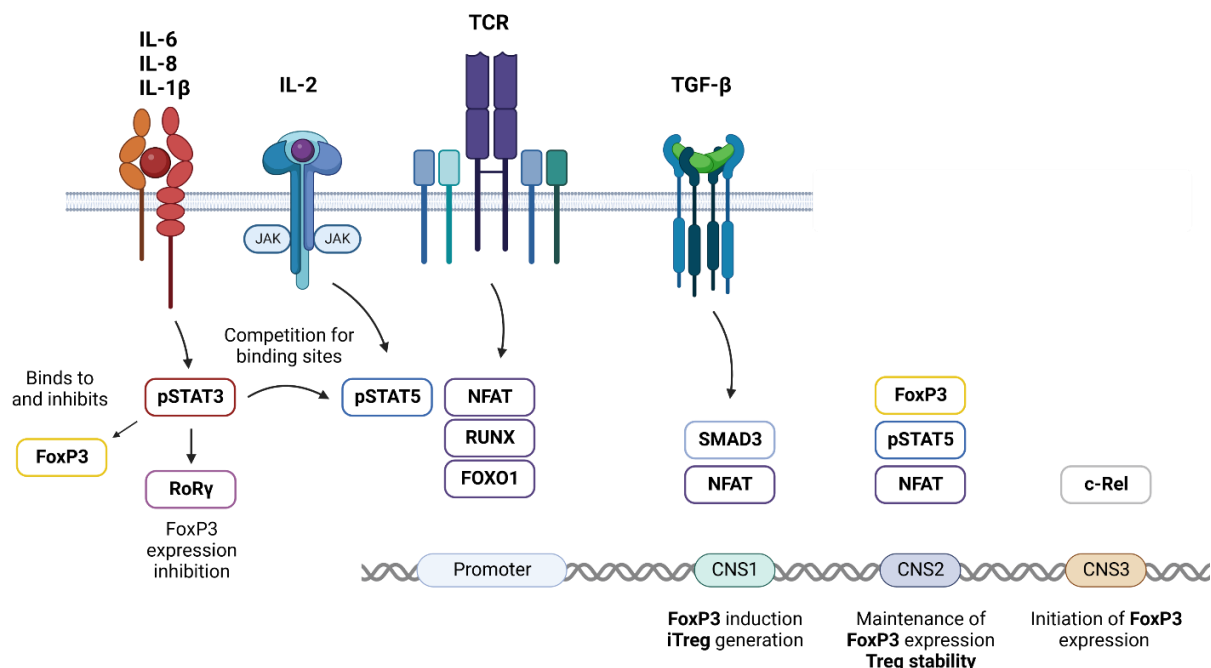


Abbildung 5: Schema Diagramm der Transkript Regulation des FoxP3 Lokus. Gezeigt sind die regulatorischen Regionen CNS1, CNS2, CNS3, deren Funktion und Transkriptionsfaktoren, die diese Regionen binden.

Eine Defizienz an IL-2, wie sie zum Beispiel bei der Behandlung mit Calcineurin Inhibitoren (CNI) vorkommen kann, führt zum Verlust peripherer Tregs^{114,115}. Nach adoptivem Treg Zelltransfer in Patienten und Patientinnen mit Typ 1 Diabetes (T1D) sank die Anzahl der Tregs um 75% in

den ersten 90 Tagen^{116,117}. Diese IL-2 Knappheit ist eine Hürde für die adoptive Treg Therapie, da erstens ein Ungleichgewicht zwischen IL-2 produzierenden Zellen und Tregs entsteht, welche die Treg Zellen versorgen könnten. Zweitens senkt sich der IL-2 Serum Pegel durch die Tregs nach Transfer drastisch, was das Versorgungsproblem weiter verstärkt¹¹⁷.

Durch Antigenaktivierung und Entzündung innerhalb des Gewebes wird die Stabilität von FOXP3 beeinträchtigt. Dies ist auch bei Tregs der Fall, welche initial eine hohe FoxP3 Expression zeigen. Als Schlüsselfaktoren für die Instabilität werden ein Mangel an IL-2 und pro-inflammatorische Zytokine diskutiert, wie zum Beispiel IL-6 und aktive STAT3 und NFκB-Signalwege^{118,119}.

Durch die Expression von Membran gebundenem IL-2 (mIL-2) kann die Funktionalität und die Stabilität von transferierten CAR Tregs verbessert werden. Exprimiertes mIL-2 führt zu höherer Überlebensrate, Stabilität des Phänotyps und verstärkter Funktion von CAR Tregs, im Vergleich zu CAR Tregs ohne mIL-2. In einem humanisierten Maus Modell wurde verbesserte Viabilität in der Treg Nische und Resistenz gegen die Calcineurin Inhibitor (CNI) Therapie der mIL-2 CAR Tregs gezeigt.¹²⁰

Eine spezifische Stimulation von Treg Zellen über den IL-2 Signalweg führt zu einem besseren therapeutischen Ergebnis in der Maus GvHD. Durch die Expression einer modifizierten ortho IL-2 Rezeptor beta Kette (oIL2Rb) werden Treg Zellen durch die Injektion eines modifizierten IL-2 (oIL2) in vivo selektiv expandiert, ohne andere IL-2 Rezeptor positiven Lymphozyten zu stimulieren. Mäuse, die mit oIL-2 behandelt wurden, zeigten im Vergleich zu Kontrollen verbesserte Überlebensraten in der GvHD, selektive Expansion von Tregs in vivo und eine verstärkte Suppression der Effektor T-Zell Expansion in sekundären lymphatischen Organen und im Darmgewebe. Dabei wurde gleichzeitig die Graft-versus-Tumor (GVT) Antwort in zwei Tumor Modellen aufrecht erhalten.¹²¹

1.7 Ziele

Ziel der Arbeit ist es, Treg Zellen mit Hilfe eines CD25 CARs spezifisch gegen Zellen einer Entzündungsreaktion zu richten und die Treg Zellen durch die Signalkette in ihrer Amplifikation zu stärken. Zusätzlich dazu soll durch die Implementierung der IL-2 Signalketten in einen synthetischen Rezeptor, die Funktion und Persistenz der regulatorischen T Zelle verbessert werden.

CD25 wird im Kontext von Autoimmunerkrankungen unter anderem von aktivierten T und B Zellen exprimiert.^{122,123} Die Rationale wird dadurch unterstützt, dass CD25 als Zielstruktur in der Antikörper-Therapie mit Daclizumab in der immunsuppressiven Behandlung akuter Abstoßungsreaktionen nach Nierentransplantation eingesetzt wurde. Durch eine Therapie mit CD25 spezifischen CAR Treg Zellen erhofft man sich im Vergleich zur Therapie mit CD25 spezifischen Antikörpern entscheidende Vorteile. Wir erhoffen uns dadurch, dass die Treg Zelle durch den CAR spezifisch am Ort der Inflammation, nicht aber in gesundem Gewebe aktiviert wird und im Gegensatz zu einem CD25 Antikörper nicht die Signalweiterleitung auf Tregs in trans blockiert. Zweitens wirken Tregs durch die hohe Expression von CD25 als natürliche IL-2 Senke. Dies stellt einen zentraler suppressiver Mechanismus von Tregs dar.^{124,125} Somit steht die CAR Treg Therapie der Antikörper Therapie diametral gegenüber, da die CAR Treg Zelle in der Lage ist IL-2 zu internalisieren und kein überschießendes IL-2 Serumlevel wie bei einer DAC Therapie erwartet wird. Zuletzt ist die CAR Treg ein lebendes Medikament, welches dynamisch auf die vorherrschenden Krankheitsbedingungen eingehen kann, indem Aktivitätsstatus und Proliferation veränderbar sind. Somit kann der Pool an CAR Tregs je nach Antigenmenge expandieren und kontrahieren. Um unseren Therapieansatz zu testen wählten wir das Maus Modell der Experimentellen Akuten Enzephalomyelitis. In Fransson et al. akkumulieren MOG spezifische CAR iTregs nach intranasaler (i.n.) Injektion im zentralen Nervensystem (ZNS) und reduzieren die Krankheitssymptome in einer Enzephalomyelitis.⁷⁹

Des Weiteren wurde der Frage nachgegangen, wie die Persistenz der Treg Zelle verstärkt werden kann. Durch die Implementierung eines IL2 Rezeptor Signals in humane Tregs via membran gebundenem IL-2 oder eines synthetischen Rezeptors, wird das Ziel verfolgt, Viabilität und Proliferationsfähigkeit zu erhöhen und FoxP3 Expression zu stabilisieren.

2 Ergebnisse

2.1 Expression des CD25-spezifischen CARs reduziert das intrazelluläre IL-2 Rezeptor- Signal und führt zur eingeschränkten T Zell Funktion

2.1.1 Struktureller Aufbau des murinen CD25 CARs

Wir verfolgen das Ziel, regulatorische T Zellen mit einem CD25-spezifischen CAR gegen CD25+ aktivierte T und B Lymphozyten zu richten und im murinen Modell der experimentellen akuten Enzephalomyelitis zu testen. Der charakterisierte CAR gegen humanes CD25 zeigte keine Kreuzreaktivität mit murinem CD25, so dass ein murines Äquivalent für die in-vivo Testung in Mausmodellen konstruiert werden musste.

Als Vektor wurde das retrovirale Expressionsplasmid pMSCV gewählt; die Viren wurden mit Hilfe der Zelllinie Phoenix ECO produziert. Der anti-CD25 Antikörper Klon PC61.5 (Huss et al. 2016) wurde als Ausgangsprodukt für die Konstruktion des anti- murinen CD25 scFv genutzt. Dazu wurde die V_H und die V_L- Domäne des PC61.5 Antikörpers mit einem 16 Aminosäure Glycin-Serin Linker in der Anordnung V_H-V_L verbunden. Die Signalpeptideinheit des Immunglobulins in der kappa Isoform (I-κ), (Abbildung 6A) wurde N- terminal mit dem scFv verbunden; C- terminal an den scFv folgt die murine IgG1 Fc CH2-CH3 Domäne, eine CD4 Transmembrandomäne, die intrazelluläre Domäne aus CD28 und CD3ζ (Abbildung 6B). Die P2A Signalsequenz schließt unmittelbar an die DNA Sequenz von CD3ζ an und mündet in die Koexpression von ΔLNGFR, der als ko- exprimierter Oberflächenmarker ohne Signalfunktion genutzt wurde (Abbildung 6C).

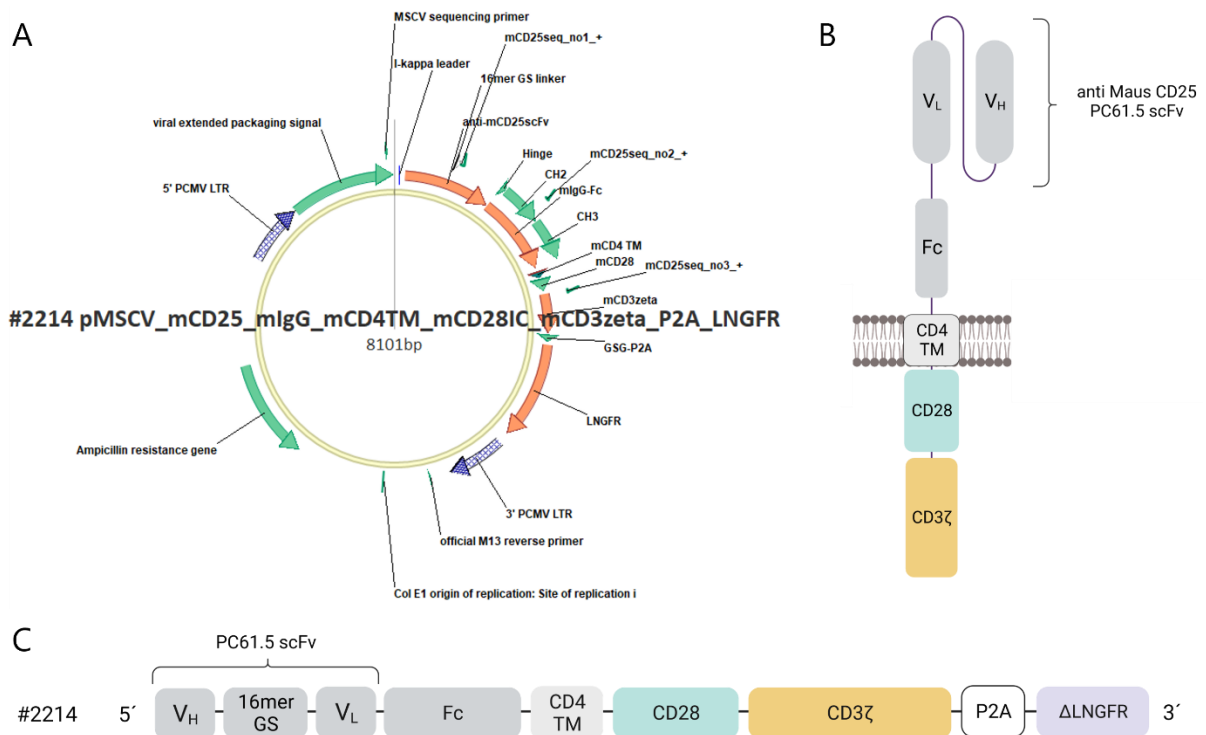


Abbildung 6: Darstellung des retroviralen pMSCV Vektors #2214, der für den murinen anti-CD25 CAR und den Marker Δ LNGFR als ko-exprimiertes Molekül kodiert. In **A**) ist das Plasmid pMSCV als Vektorkarte visualisiert. **B**) zeigt schematisch den CAR auf der Zelloberfläche mit seinen funktionalen Domänen. In **C**) ist die Orientierung von CAR und LNGFR auf dem Gen in der Leserichtung 5' nach 3' beschrieben.

2.1.2 Der murine und der humane CD25 CAR werden auf der Oberfläche humaner T Zellen exprimiert

Ziel ist die stabile Expression des CARs auf der Oberfläche humaner und muriner T-Zellen. Hierfür verwendeten wir den retroviralem Gentransfer; die Retroviren wurden nach Transfektion der HEK293T Zellen, die das SV40 large T Antigen exprimieren, mit den Helferplasmiden #392 (gag-pol), #393 (env) und dem CAR kodierenden Vektor transfiziert, sodass die entsprechenden Virus Partikel in den Überstand sezerniert werden. Dieser Virus-haltige Überstand wurde verwendet, um T Zellen zu transduzieren. Zum Nachweis des CAR wurden drei Tage nach Transduktion die Zellen mit anti- Maus IgG Antikörper gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Der murine CD25 CAR wurde auf humanen T Zellen exprimiert, zusammen mit dem ko-exprimierten Marker LNGFR; nicht transduzierte T Zellen zeigten kein Signal für den CAR oder LNGFR. Zum Vergleich wurde der humane CD25 CAR exprimiert (Abbildung 7).

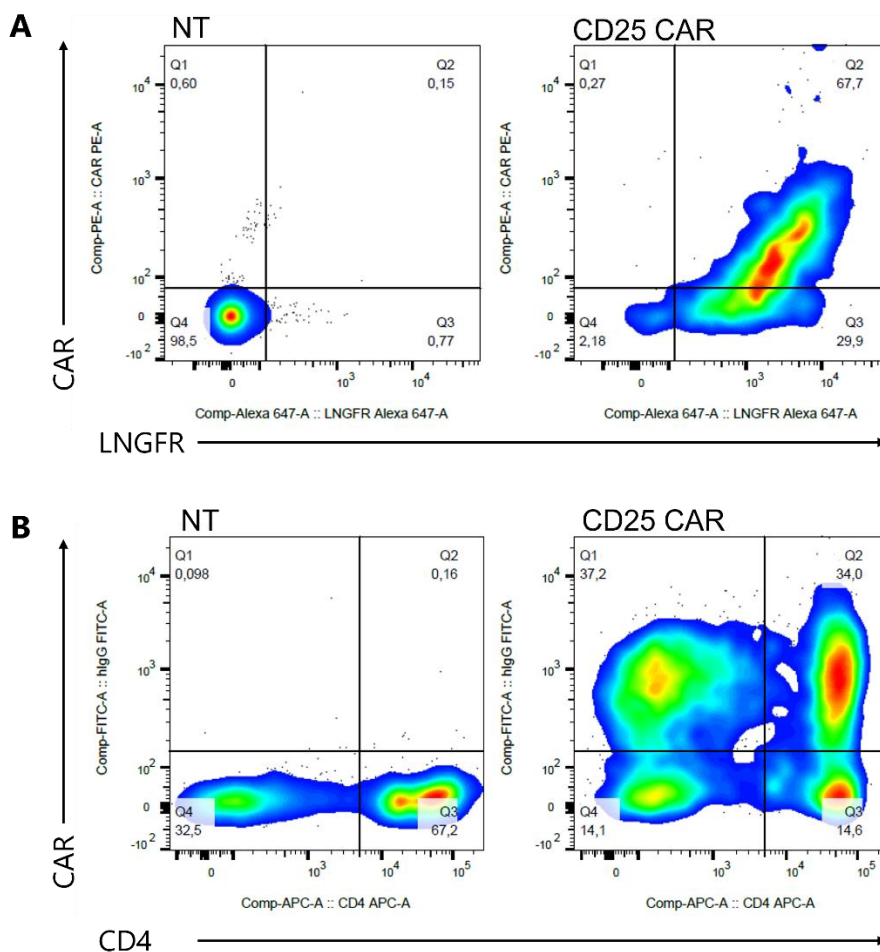


Abbildung 7: Der murine wie der humane CD25 CAR ist auf humanen T Zellen exprimiert. Die Abbildung zeigt transduzierte T Zellen mit CD25 CAR im Vergleich zu nicht transduzierten T Zellen (NT). **A**) Die Proben wurden in

der Auswertung auf Zellintegrität, Singletten, viable CD4+ Zellen diskriminiert und CAR gegen LNGFR aufgetragen. Der Nachweis des murinen CARs erfolgte mit anti- Maus IgG Antikörper. **B)** Die Proben wurden in der Auswertung auf Zellintegrität, Singletten, viable Zellen diskriminiert und CAR gegen CD4 aufgetragen. Der Nachweis des humanen CAR Moleküls erfolgt durch einen anti- human IgG Antikörper.

2.1.3 Der humane und murine CAR induziert IFN- γ Sekretion in humanen T Zellen nach Antigen Bindung

Das Ziel ist es nachzuweisen, ob der anti-CD25 CAR nach Bindung des Antigens die T-Zellen aktiviert. Hierfür wurden die CD25 CAR T Zellen und T Zellen ohne CAR jeweils mit HEK293 Zellen ko-inkubiert, welche murines CD25 oder humanes CD25 auf der Zelloberfläche exprimieren. Zum Nachweis der T-Zell Aktivierung wurde die IFN- γ Konzentration im Überstands via ELISA ermittelt. T Zellen mit humanem CD25 CAR wurden zur IFN- γ Sekretion nach Ko-Kultur mit human CD25 exprimierenden HEK293 Zellen induziert, aber nicht nach Ko-Kultur mit 293 Zellen mit murinem CD25. T Zellen mit murinem CD25 CAR zeigen IFN- γ Sekretion nach Ko-Kultur mit murinem CD25 exprimierenden HEK293, aber nicht mit humanem CD25. T Zellen ohne CAR wurden nach Ko-Kultur mit keiner der beiden Zelllinien aktiviert (Abbildung 8).

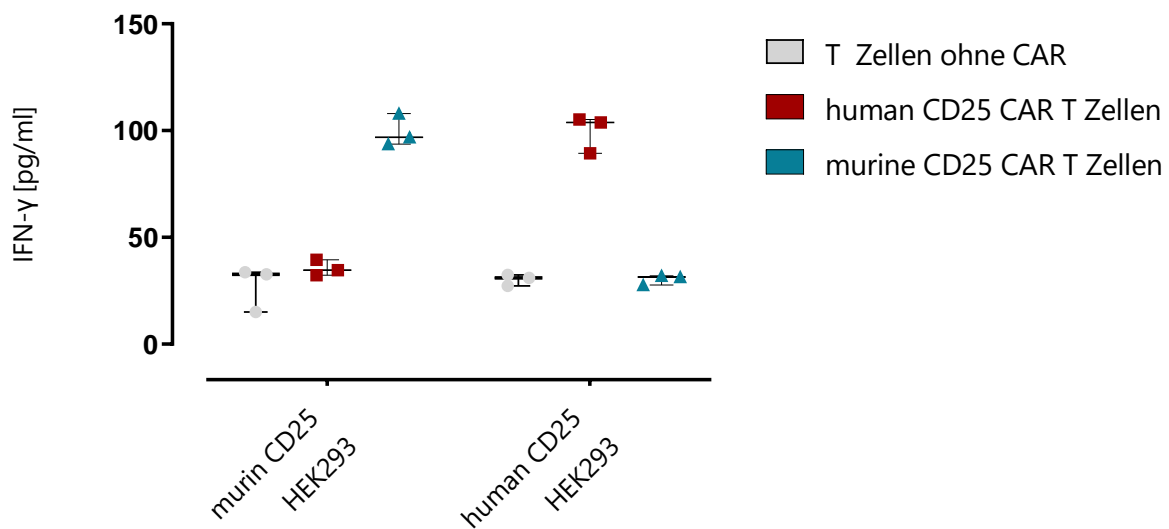


Abbildung 8: Humane T Zellen mit murinem und humanem CD25 CAR sezernieren IFN- γ nach Antigen Bindung. Es wurden 50×10^3 murine and humane CD25 CAR T Zellen 24 h mit HEK293 Zellen inkubiert, die das humane oder das murine CD25 Protein tragen. Als Kontrolle dienten T Zellen ohne CAR. Die IFN- γ Sekretion wurde im Kulturüberstand mittels ELISA bestimmt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte und das Minimum und Maximum der Messwerte.

2.1.4 CD25 CARs werden auf murinen regulatorischen T Zellen exprimiert

Ziel ist es naive murine Treg Zellen mit CD25 spezifischem CAR zu modifizieren. Hierfür wurden zunächst Phoenix ECO Zellen mit dem CAR kodierenden retroviralen Vektor pMSCV_CD25CAR (#2214) und dem Helferplasmid pCL-ECO (#2222) transfiziert. Nach 36 h wurde die Expression des CARs und Δ LNGFR auf Phoenix ECO Zellen im Durchflusszytometer untersucht. Es wurde regelmäßig eine CAR+LNGFR+ Zell Fraktion von mehr als >40% erreicht (Abbildung 9A).

Um eine Aussage über die Infektiösität der produzierten Virus Partikel zu erhalten, wurden NIH/3T3 Zellen mit Phoenix ECO Überstand in der Verdünnung 1:1, Virusvolumen zu frischem DMEM Medium inkubiert. Dabei wurde eine Fraktion von CAR+LNGFR+ NIH/3T3 Zellen von über 97% erhalten (Abbildung 9B).

sortierte naive Treg Zellen wurden mit dem virushaltigen Überstand transduziert und 3 Tage später mittels Durchflusszytometrie hinsichtlich CAR und Δ LNGFR Expression untersucht. Die Treg Zellen sind zu 98,7 % positiv für Δ LNGFR und 40% positiv für den CD25 CAR (Abbildung 9C). Wir nehmen an, dass eine große Anzahl LNGFR+ T-Zellen den CAR nicht oder in so geringer Dichte exprimieren, dass die Zellen im gate CAR negativer T-Zellen liegen. In den folgenden Experimenten haben wir die Transduktionseffizienz auf der Grundlage CAR+ kalkuliert.

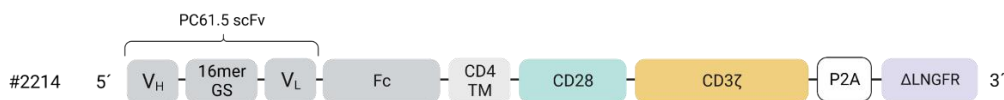
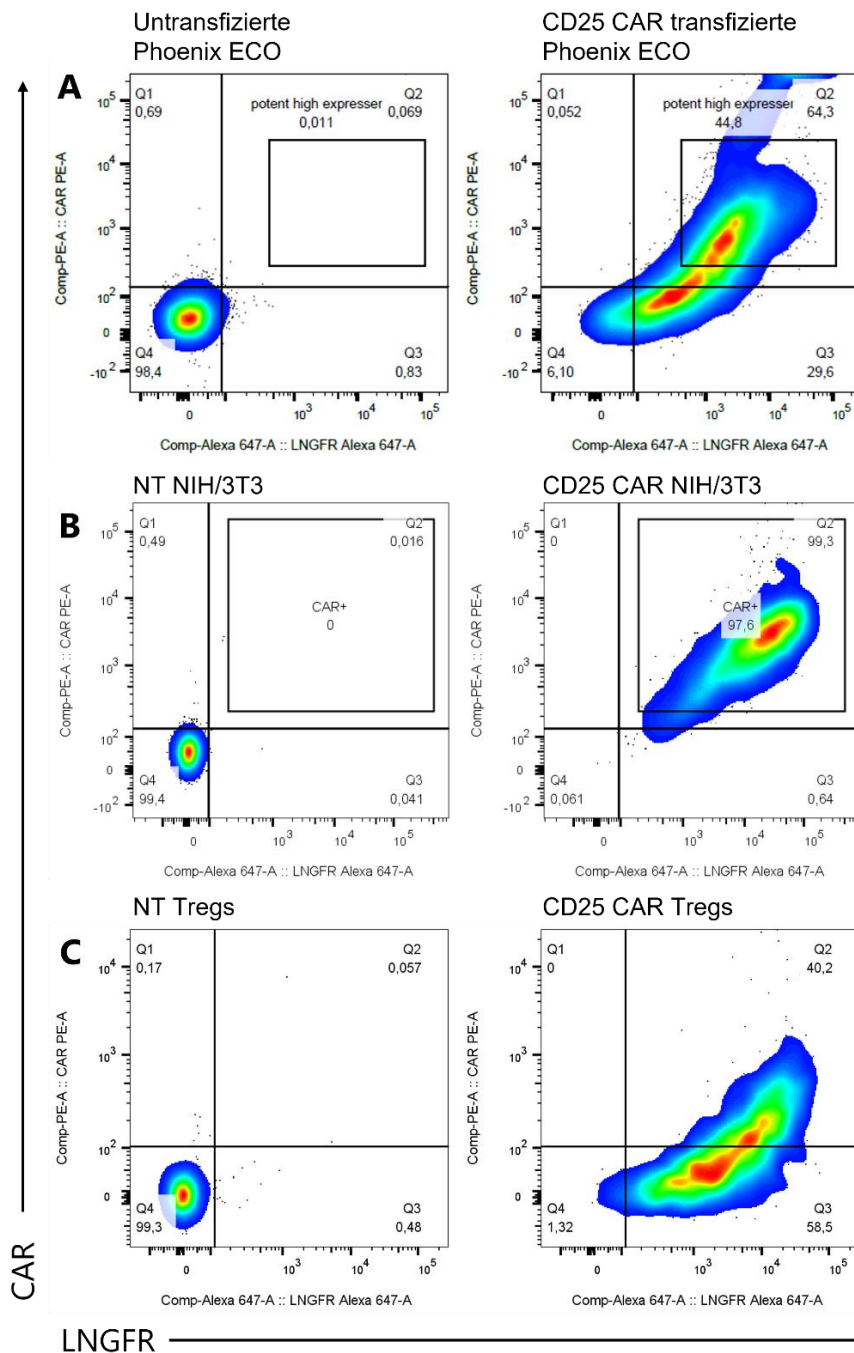


Abbildung 9: Der CD25 CAR wird nach Transduktion auf murinen regulatorischen T Zellen exprimiert. Die Proben wurden mit denselben Antikörpern gegen LNGFR, anti- Maus IgG und lebend- tot Farbstoff gefärbt. T Zellen wurden zusätzlich auf CD4⁺ und CD25⁺ gefärbt. Die Gruppen wurden auf Zellintegrität, Singletten, lebende Zellen und Tregs zusätzlich auf CD4⁺ Zellen diskriminiert. Anschließend wurde CAR gegen LNGFR aufgetragen. **A)** CD25 CAR transfizierte Phoenix ECO Zellen exprimieren den CAR und LNGFR auf der Oberfläche, während im Vergleich dazu nicht transfizierte Zellen keinen CAR oder ΔLNGFR exprimieren. **B)** NIH/3T3 Zellen wurden mit 1:1 verdünntem Virusüberstand zu DMEM transduziert und zeigten eine CAR Expression von >95 %. Untransduzierte NIH/3T3 Zellen exprimieren keinen CAR. **C)** Sortierte naive regulatorische T Zellen wurden mit 1:1 verdünntem Virusüberstand zu frischem DMEM transduziert. Im Folgenden lassen sich diese 3 Tage nach Transduktion in der Durchflusszytometrie

positiv auf Δ LNFR und auf den CAR nachweisen. Die Proben für die CAR und NT Fraktionen wurden jeweils mit derselben Antikörperkombination gefärbt. In der Abbildung unten ist das Konstrukt als Schema visualisiert.

2.1.5 Murine konventionelle und regulatorische T Zellen zeigen dosisabhängige Expression des Aktivierungsmarkers LAG-3 nach CAR Aktivierung

Mit folgendem Experiment wurde die Funktionalität der CAR Signaldomänen überprüft. Nach Quervernetzung der CAR Moleküle auf der T Zelloberfläche durch anti Maus IgG Antikörper löst man bei CARs mit funktionalen Signaldomänen eine Signalkaskade aus, die sich in der Expression von Aktivierungsmarkern zeigt. Somit dient der anti Maus IgG Antikörper als Antigen Surrogat. Mit diesem Antikörper wurden 96 F well Platten beschichtet und darauf folgend CAR Tkonv, CAR Treg Zellen und die entsprechenden Kontrollgruppen Tkonv und Treg ohne CAR darauf für 72 h inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Versuchsgruppen geerntet, gewaschen und gefärbt. Anschließend wurden die T Zellen im Durchflusszytometer auf die Expression von LAG-3 untersucht. Die Abbildung 10 zeigt den jeweiligen prozentualen Anteil von LAG-3 der morphologisch integren, viablen und CD4 positiven Zellpopulation. Die CD25 CAR+ Zellen zeigen eine dosisabhängige Expression des Aktivierungsmarkers LAG-3 nach Inkubation mit anti Maus IgG Antikörpern. Die Kontrollgruppen Tkonv und Treg ohne CAR zeigten ausschließlich bei polyklonaler Stimulation LAG-3 Expression.

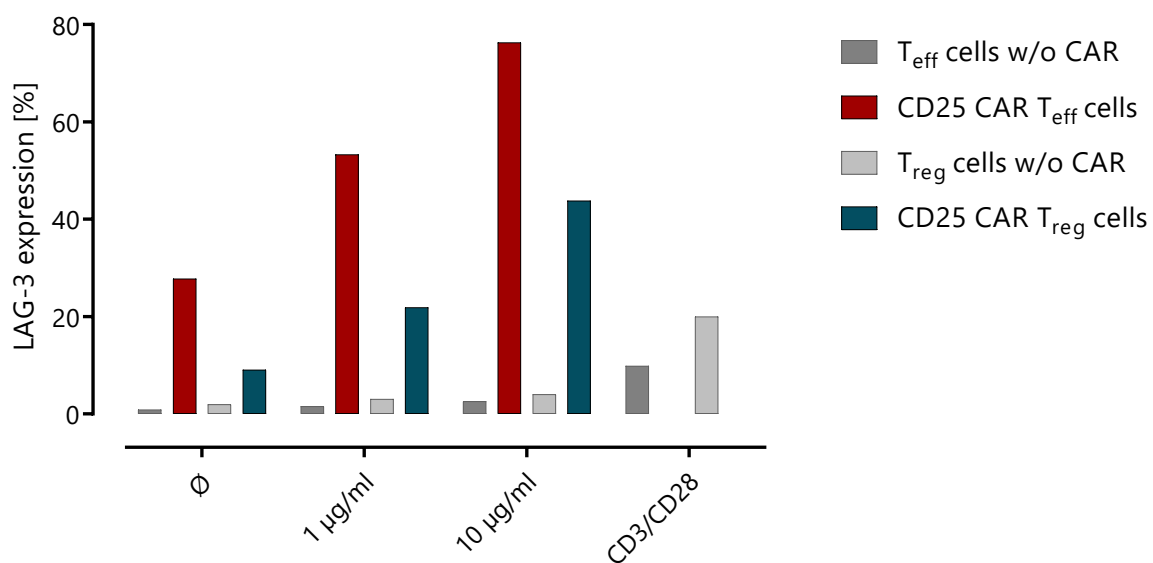


Abbildung 10: Maus CD25 CAR Tkonv und Treg zeigen exprimieren LAG-3 nach CAR Vernetzung via anti Maus IgG Antikörper. 0.1×10^6 CAR Zellen wurden in 96 well polysorb Platten für 72 h inkubiert. Die Polysorb Platten wurden über Nacht bei 4° C mit aufsteigender Konzentration an anti Maus IgG Antikörper beschichtet. Im Durchflusszytometer wurden integere, viable und CD4+ Singletten auf ihre LAG-3 Expression untersucht. Zur Kontrolle wurden Tkonv und Treg ohne CAR herangezogen, die ebenso in aufsteigender Antikörper Konzentration stimuliert wurden. Zusätzlich wurden Tkonv und Treg ohne CAR in einer weiteren Versuchsgruppe mit CD3/CD28 Antikörpern stimuliert und alle Versuchsgruppen wurden auf LAG-3 Expression unter bei Abwesenheit von Stimuli untersucht.

2.1.6 CD25 CARs beeinträchtigen die Proliferation und die Viabilität von T Zellen

Das Ziel war CD25 CAR T Zellen auf ihr Potential zur Expansion und Viabilität zu testen. Nach Transduktion wurden die T Zellen erneut ausgezählt und auf eine definierte Konzentration eingestellt. Danach wurde durch manuelles Zählen die Zellzahl und die Expansionsrate bestimmt. Als Kontrolle wurden die Expansionsraten der CD25 CAR T Zellen mit den Raten von Mock oder CAR T Zellen nicht relevanter Spezifität verglichen.

In humanen wie in murinen CD25 CAR Tkonv Zellen konnte nach Transduktion keine Proliferation mehr festgestellt werden. Im Vergleich dazu proliferieren CAR T Zellen nicht relevanter Spezifität und Mock T Zellen. (Abbildung 11A und B). Regulatorische CD25 CAR T Zellen hingegen proliferieren, jedoch ab Tag 7 ist die Proliferation im Vergleich zu Mock Tregs reduziert (Abbildung 11 C). An Tag 7 ergeben sich bei regulatorischen T Zellen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Proliferation zwischen CD25 CAR Tregs, Mock Tregs und NT Tregs (Abbildung 11D). Die Viabilität ist in CD25 CAR Tregs signifikant reduziert im Vergleich zu NT Tregs, jedoch nicht im Vergleich zu Mock Tregs (Abbildung 11E).

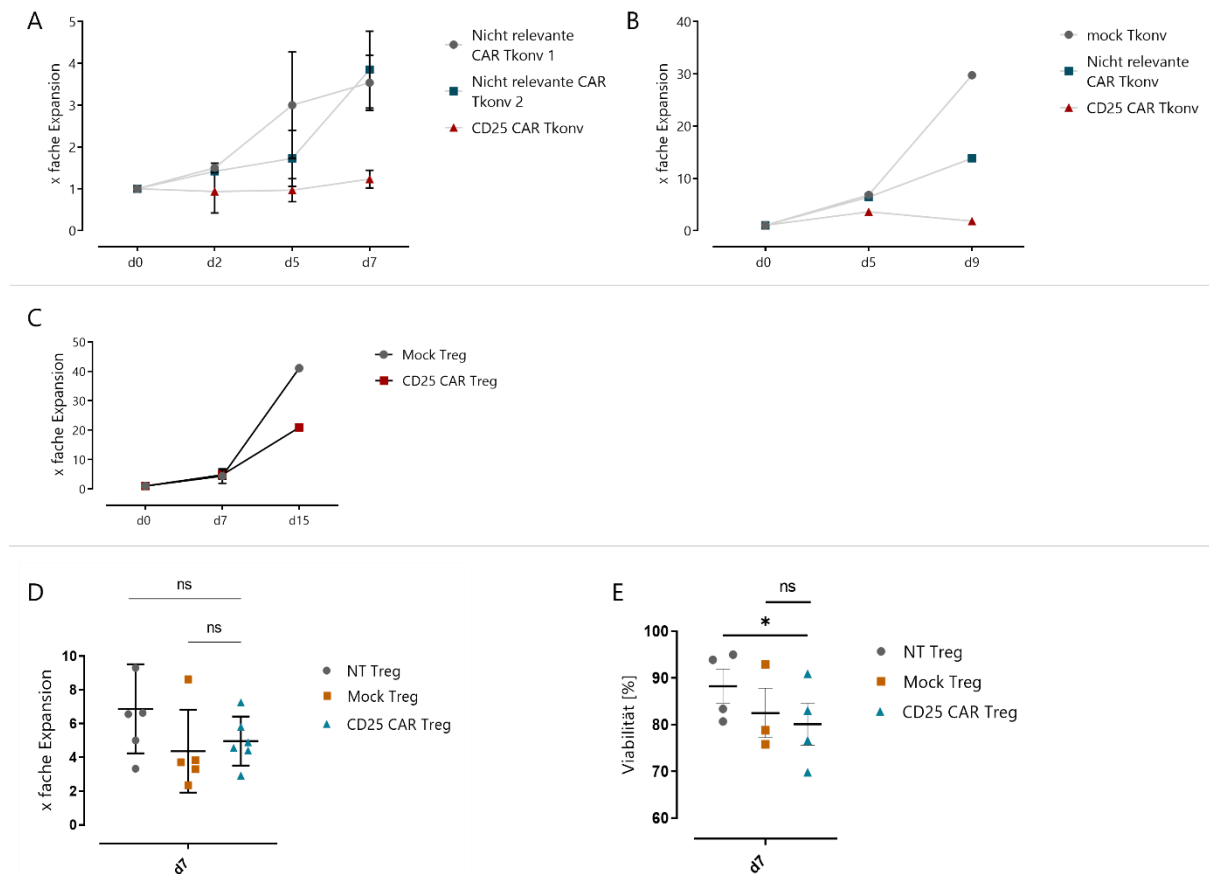


Abbildung 11: CD25 CARs beeinträchtigen die Proliferation und die Viabilität von CD25 CAR humanen wie murinen Tkonv und Treg Zellen. **A)** Humane CD25 CAR Tkonv zeigen wie die **(B)** murinen CD25 CAR Tkonv keine Proliferation ab Tag 0 nach Transduktion im Vergleich zu Mock und CAR T Zellen nicht relevanter Spezifität. Die Gruppen wurden nach Transduktion auf die Transduktionseffizienz getestet, auf die gleiche CAR+ Anzahl angepasst und auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Zellzahl durch manuelles Zählen und im Folgenden die Expansionsrate ermittelt. **C)** Murine CD25 Treg Zellen zeigen reduzierte Proliferation an Tag 15 im Vergleich zu Mock transduzierten. Murine Tregs wurden in 96 well Platten kultiviert und zu 10^4 Zellen/well ausgesät. **D)** Analysen zur Expansion (links) und Viabilität (rechts) muriner regulatorischer T Zellen an Tag 7 – welches den Zeitpunkt der Injektion in den in- vivo Experimenten darstellt – zeigt keine signifikant reduzierte Expansion der CD25 CAR Tregs im Vergleich zu NT und Mock Tregs. Die Viabilität der CD25 CAR Tregs im Vergleich

zu NT Tregs war signifikant reduziert Für die statistische Analyse wurde der T- Test für gepaarte Gruppen verwendet. In den Plots werden die Mittelwerte mit Standardabweichung gezeigt.

2.1.7 In CD25 CAR Tkonv ist CD25 nicht mehr nachweisbar und in CD25 CAR Tregs ist die Reduktion an CD25 Expression stärker in trans als in cis

Aufgrund der verringerten Proliferation der CD25 CAR T Zellen wurde im weiteren Verlauf die CD25 Expression analysiert. CD25 ist eine zentrale Komponente des suppressiven Mechanismenspektrums von Treg Zellen. Daher ist eine hohe Expression von CD25 indikativ für eine erfolgreiche Suppression. Tkonv Zellen wurden unmittelbar vor der Färbung mit Flow Antikörpern für 30' mit 1000 U/ml IL-2, 200 ng/ml OKT3 und 50 ng/ml 15E8 stimuliert. Treg Zellen wurden nicht gesondert stimuliert Die Zellen wurden am Tag 5 nach Transduktion gewaschen und Proben mit den entsprechenden Kontrollen mit demselben Antikörpermix gefärbt. Im Durchflusszytometer wurden die Proben auf Zellintegrität, Viabilität und CD4 diskriminiert und auf CD25 und CAR Expression getestet. Alle Zellen der Kultur der CD25 CAR Tkonv Zellen zeigen eine Depletion an CD25+ Zellen. Diese Depletion zeigt sich in cis wie in trans, also auf CAR und nicht CAR T Zellen derselben Kultur. Im Vergleich dazu zeigt die Kultur der CAR T Zellen irrelevanter Spezifität und NT Tkonv Zellen CD25 Expression (Abbildung 12A). CD25 CAR Tregs zeigen ebenso keine CD25 Expression mehr, jedoch ist dieser Effekt auf die CAR+ Zellen beschränkt. Die CARmid und CAR- Zellen derselben Kultur weisen CD25 Expression auf, wenn auch in reduziertem Umfang (Abbildung 12B). Die Kontrollen NT, mock Tregs und NT Tkonv zeigen die erwartete CD25 Expression.

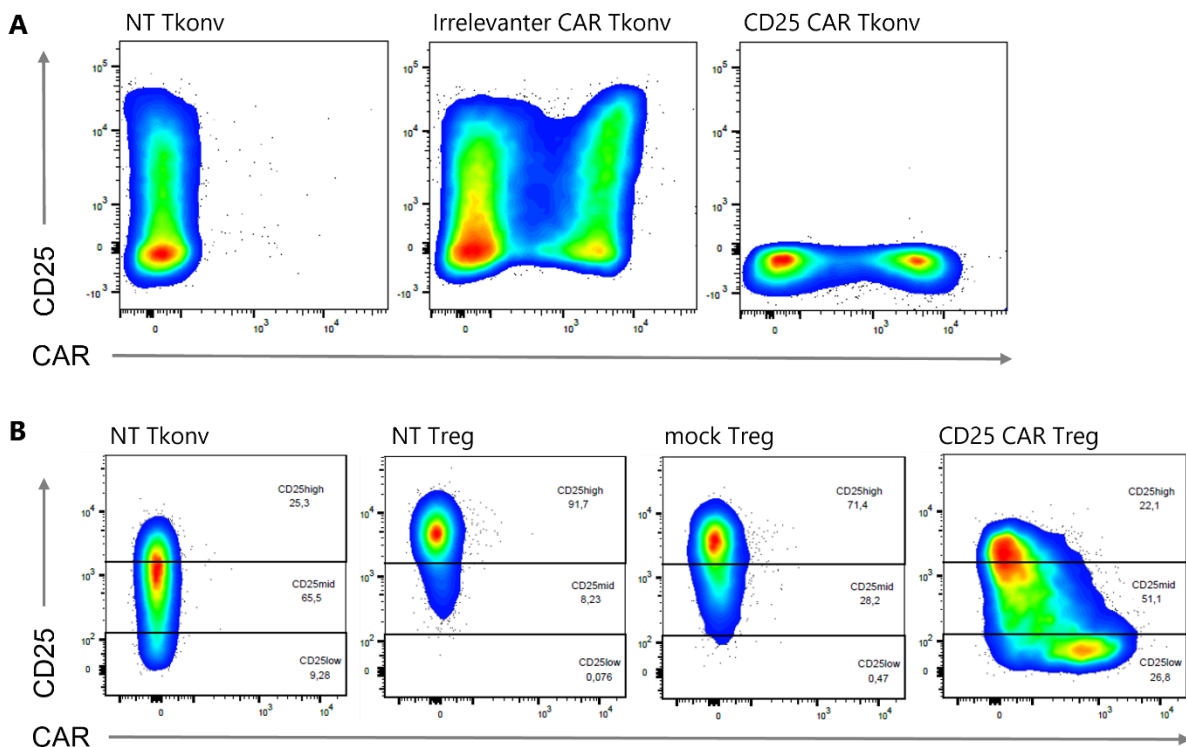


Abbildung 12: CD25 CAR Tkonv depletieren CD25+ Zellen. CD25 CAR Tregs weisen ebenso keine CD25 Expression auf, jedoch beschränkt sich dieser Effekt auf cis. In trans ist die CD25 Expression reduziert. A) Die Proben wurden 5 Tage nach Transduktion, vor der Analyse im Durchflusszytometer mit 1000 U/ml IL-2, 200 ng/ml OKT3 und 50 ng/ml 15E8 stimuliert. Die Proben wurden in der Auswertung auf Zellintegrität, Singletten und viable Zellen diskriminiert und dann CD25 gegen CAR aufgetragen. **B)** CD25 CAR Treg Zellen wurden nicht gesondert

stimuliert. Die Proben wurden in der Auswertung auf Zellintegrität, Singletten und viable Zellen diskriminiert und CD25 gegen CAR aufgetragen.

2.1.8 In CD25 CAR Tregs ist CD25 signifikant reduziert, FoxP3 Expression hingegen ist stabilisiert und signifikant höher als in Mock Treg Zellen

Im Folgenden wurde der Phänotyp der Treg Zellen analysiert. Als charakteristische Merkmale wurden dafür CD25 und FoxP3 hinsichtlich der mean fluorescent intensity (MFI) ausgewertet. Die Integrität des Phänotyps, im speziellen der FoxP3 Expression, wurde nach Modifikation der Treg Zellen überprüft. Dieser Marker ist indikativ für die suppressive Kapazität und die Stabilität dieses T Zell Subtyps und daher ist dessen Expression unerlässlich für den Einsatz einer CAR Treg Zelle als Therapeutikum. Die Zellen wurden an Tag 5 nach Transduktion aus der Kultur genommen, in FACS Puffer aufgenommen und Proben mit Kontrollen jeweils mit demselben Antikörpermix gefärbt. Anschließend wurden die Zellen im Durchflusszytometer analysiert und mit FlowJo™ und GrapPad Prism™ ausgewertet.

CD25 CAR Treg Zellen wurden hinsichtlich der MFI der CD25 Expression mit NT Tkonv, NT Treg und Mock Treg Zellen verglichen und zeigen eine signifikant reduzierte Expression im Vergleich zu NT und Mock Tregs (Abbildung 13A). In Abbildung 13B wurde die MFI der FoxP3 Expression von CD25 CAR Treg mit NT Tkonv, NT Treg und Mock Treg verglichen. Hierbei ergibt sich eine signifikant höhere Expression von FoxP3 in CD25 CAR Treg Zellen gegenüber Mock Treg Zellen. Der Vergleich der CD25 CAR Tregs mit NT Tregs hingegen ergibt keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 13B).

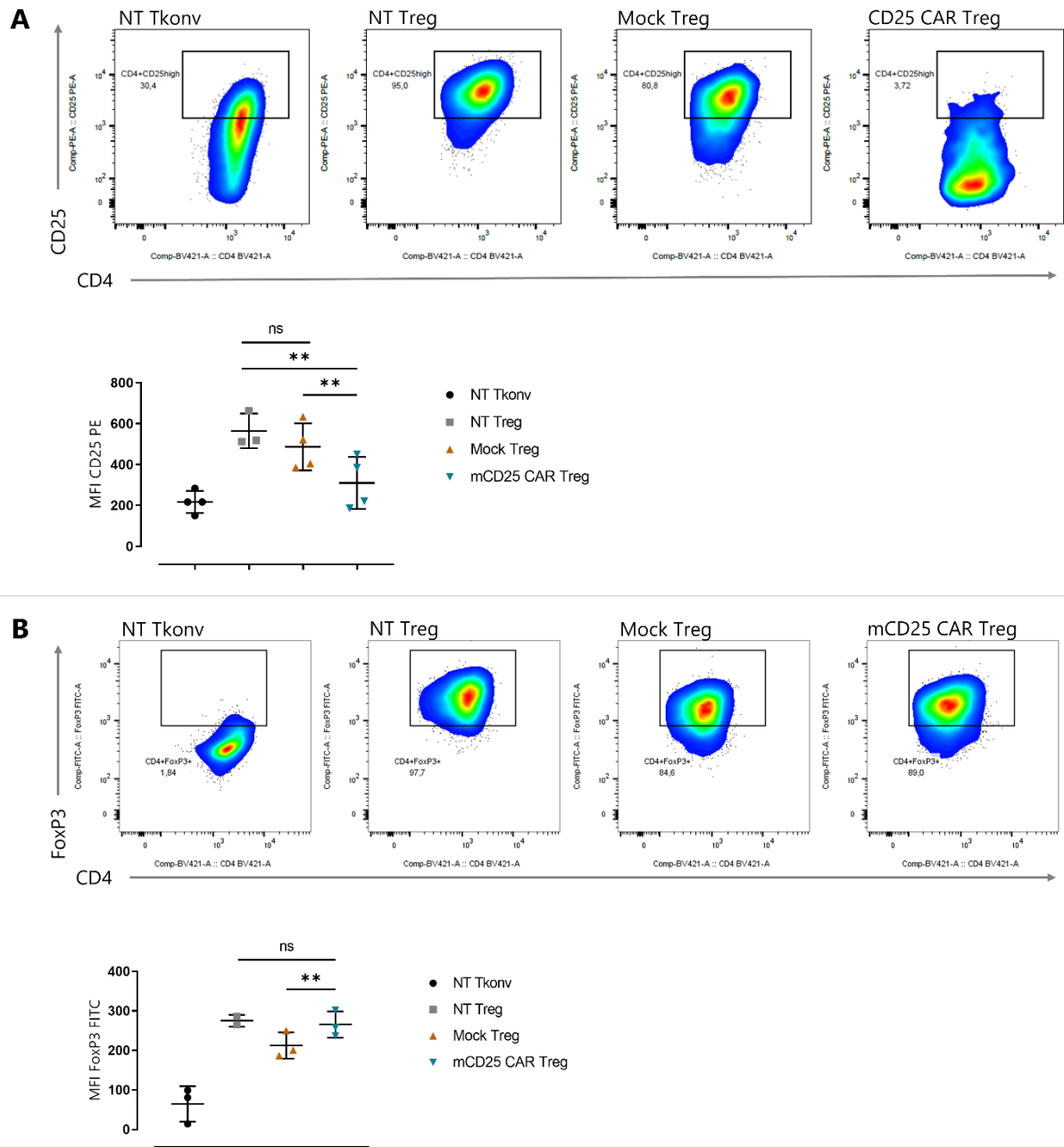


Abbildung 13: CD25 CAR Tregs zeigen eine signifikant reduzierte CD25 Expression bei gleichzeitig stabiler FoxP3 Expression. A) CD25 CAR Treg Zellen zeigen signifikant reduzierte CD25 Expression im Vergleich zu NT und Mock Tregs. Die Proben wurden an Tag 5 nach Transduktion im Durchflusszytometer analysiert. In der Auswertung wurde auf Zellintegrität, Singletten, viable CD4+ Zellen diskriminiert und CD25 gegen CD4 aufgetragen. Für die statistische Analyse wurde der T-Test für gepaarte Gruppen verwendet. In den Plots werden die Mittelwerte mit Standardabweichung gezeigt. **B)** D25 CAR Treg Zellen zeigen signifikant höhere CD25 Expression im Vergleich zu Mock Tregs, jedoch keinen signifikanten Unterschied zu NT Tregs. Die Proben wurden auf Zellintegrität, Singletten, viable CD4+ Zellen diskriminiert und FoxP3 gegen CD4 aufgetragen. Für die statistische Analyse wurde der T-Test für gepaarte Gruppen verwendet. In den Plots werden die Mittelwerte mit Standardabweichung gezeigt. Die Auswertung erfolgte mit FlowJo™ und GraphPad Prism™.

2.1.9 Die Depletion der CD25+ Zellen durch CD25 CAR Tkonv erfordert Zell-Zell Kontakt

Ziel war es zu untersuchen, ob die Depletion von CD25+ Zellen durch CD25 CAR T Zellen auf Zell- Zell Kontakt beruht, oder ob sezernierte scFvs für eine Blockade des CD25 Epitops verantwortlich sind. Diese können durch Abscheren von CAR- Molekülen in den Überstand gelangen. Diese Erkenntnis ist unerlässlich auf dem Weg den Mechanismus der CD25 Depletion aufzuklären. Der Nachweis von CD25 erfolgte mit zwei Antikörperklonen – BC96 und M-A151 –, welche unterschiedliche Epitope von CD25 binden. Diese zwei Szenarien – Zell- Zell Kontakt und lösliche scFv Komponenten im Überstand – können im Experiment mit Transwell Vorrichtungen untersucht werden. Hierbei werden 2 Kulturkammern (Oben und Unten) durch eine semipermeable Membran getrennt, sodass lösliche Komponenten über das Medium zwischen den Kammern frei diffundieren. Zellen können die Membran nicht passieren.

Hierbei zeigte sich, dass CD25 CAR Tkonv Zellen CD25+ Zellen im Top- Well komplett depletieren, in cis wie in trans. Jedoch die aktivierten Tkonv Zellen im Bottom- Well zeigten immer noch eine zu erwartende CD25 Expression (Abbildung 14). Als Kontrolle wurden aktivierte CD25 exprimierende Tkonv Zellen in Top- und Bottom- Well kultiviert. Hier zeigt sich auf beiden Seiten der Membran CD25 Expression.

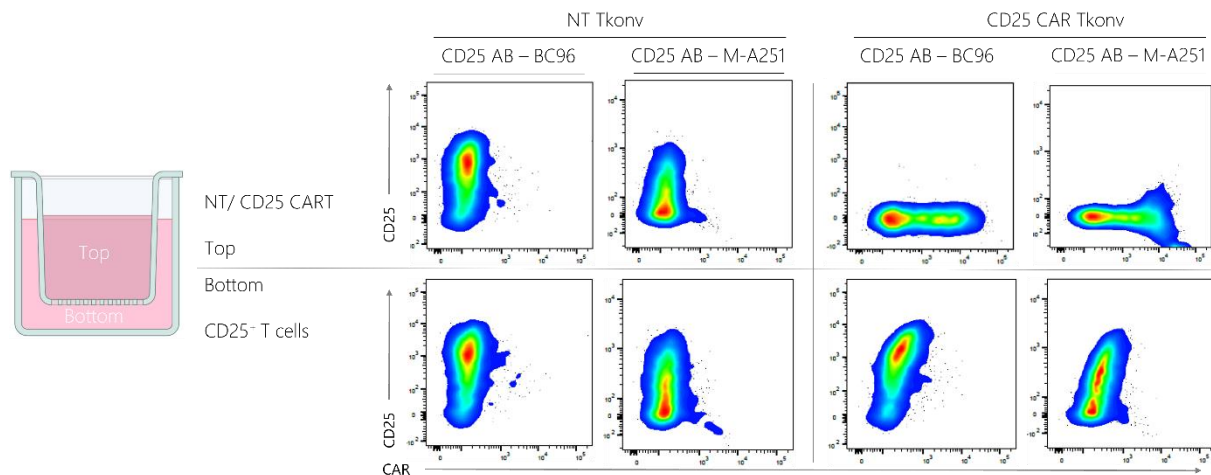


Abbildung 14: Die Depletion von CD25+ Zellen erfolgt durch Zell-Zell Kontakt. CD25 CAR Tkonv Zellen wurden für 4 Tage nach Transduktion expandiert, erneut ausgezählt und anschließend zu jeweils 2 ml in 6 well Transwell Platten ausgesät. Die Konzentration betrug 1×10^6 /ml. CD25 CAR Tkonv wurden in das Top- Well gegeben und die CD25+ Zielzellen in das Bottom- Well. Als Zielzellen wurden aktivierte CD25+ Tkonv Zellen verwendet. Als Kontrolle dienen ebenfalls aktivierte Tkonv Zellen im Top- well. Die Gruppen wurden für 5 Tage bei 200 U/ ml IL-2 kultiviert, anschließend in FACS- Puffer aufgenommen, gefärbt und im Durchflusszytometer auf CD25 Expression analysiert. Der Nachweis von CD25 erfolgte mit zwei Antikörperklonen – BC96 und M-A151 –, welche unterschiedliche Epitope von CD25 binden. Die Proben wurden mit demselben Antikörpermix gefärbt.

2.1.10 CD25 CARs reduzieren die phosphoryliertes STAT5 in konventionellen und regulatorischen T Zellen

Hier wurde untersucht, worin die reduzierte Proliferation der CD25 CAR T Zellen begründet liegt und welche Auswirkungen die beobachtete Reduktion in CD25 CAR Treg Zellen beziehungsweise die Depletion von CD25 hat. Die Induktion der Signalkaskade, welche mit der Bindung von IL-2 and CD25 beginnt und mit der Aktivität des Transkriptionsfaktors endet, ist indikativ für die Reaktionsbereitschaft zur Proliferation. Außerdem ist die stete Aufrechterhaltung dieses Signals ein Überlebensfaktor für regulatorische T Zellen.

Tkonv Zellen wurden, vor der Analyse des STAT5- Phosphorylierungsstatus, 30 Minuten mit 1000 U/ml IL-2 stimuliert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen fixiert, gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. CD25 CAR Tkonv Zellen zeigen eine verminderte Phosphorylierung von STAT5, im Vergleich zum CAR irrelevanter Spezifität und den Tkonv Zellen ohne CAR (Abbildung 15A). Regulatorische T Zellenproben wurden an Tag 5 nach Transduktion aus der Kultur genommen, fixiert und im Durchflusszytometer analysiert. Treg Proben wurden, abgesehen von den Stimuli aus den Standard- Kulturbedingungen, nicht gesondert stimuliert. CD25 CAR Tregs zeigen reduzierte Phosphorylierung von STAT5 im Vergleich zu Tregs mit CARs irrelevanter Spezifität oder Treg Zellen ohne CAR.

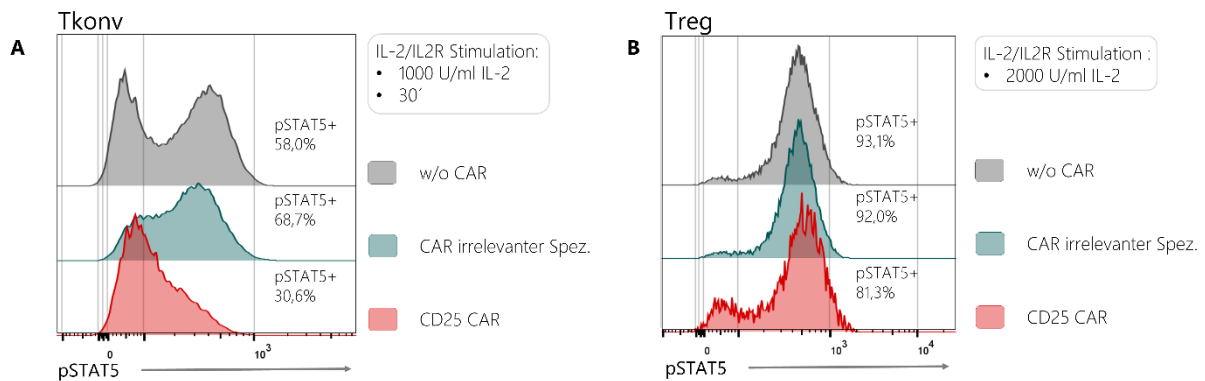


Abbildung 15: CD25 CAR Tkonv und Treg zeigen reduzierte Phosphorylierung von STAT5. A) Tkonv wurden vor der Analyse im Durchflusszytometer für 30 Minuten mit 1000 U/ ml IL-2 stimuliert. Anschließend wurden die Proben fixiert und auf den Phosphorylierungsstatus von STAT5 überprüft. **B)** Regulatorische T Zellen wurden nach Transduktion für 5 Tage unter Standardbedingungen (Miltenyi Treg Expansion Beads im Verhältniss von Bead zu Zelle 4:1 und 2000 U/ ml IL-2) kultiviert. Anschließend wurden die Proben fixiert und auf den Phosphorylierungsstatus von STAT5 überprüft. Für die Auswertung der Daten wurde FlowJo™ verwendet.

2.1.11 CD25 CAR Tregs zeigen keine verminderte suppressive Kapazität

Im Folgenden wurde getestet, wie hoch die suppressive Kapazität von CD25 CAR Tregs im Vergleich zu Mock Tregs ist. Die Fähigkeit zur Suppression von aktivierten T Zellen ist ein zentrales Attribut regulatorischer T Zellen und indikativ für den Erfolg oder Vorteil einer CAR Treg Zelltherapie im Vergleich zum konventionellen adoptiven Treg Zelltransfer.

CD4⁺ Tkonv wurden mit dem cell proliferation dye CPD450 gefärbt und als Responder Zellen mit CD3/CD28 Beads stimuliert. Dieser Reaktion werden mit aufsteigender Konzentration CD25 CAR Tregs oder Mock Tregs zugegeben. Die einsetzende Proliferation wird dosisabhängig gehemmt und die beiden Gruppen im Bezug auf das Maß der Suppression verglichen. Die Rohdaten, die mit dem Durchflusszytometer erhoben wurden, wurden anschließend quantifiziert und als Suppression in Prozent angegeben. Histogramme in Abbildung 16 oben, geben die Rohdaten wieder. Anhand dieser Rohdaten kann mit dem FlowJo Plugin „Proliferation Modeling“ der Zellteilungseilungsindex erhoben werden, der wiederum herangezogen wird, um die Suppression in Prozent zu berechnen. Die CD25 CAR Tregs sind den Mock Tregs in Bezug auf die Proliferation nicht unterlegen.

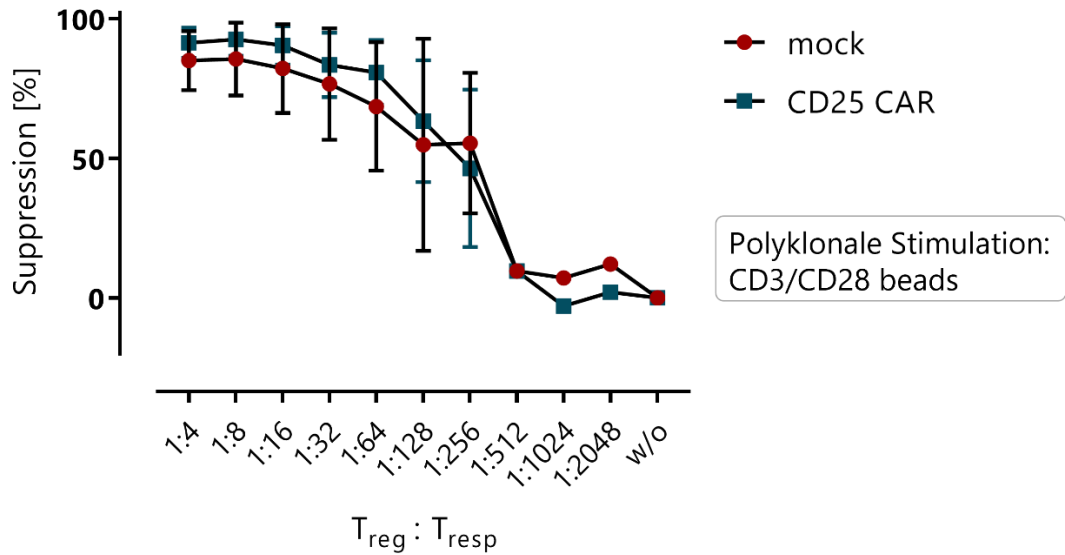
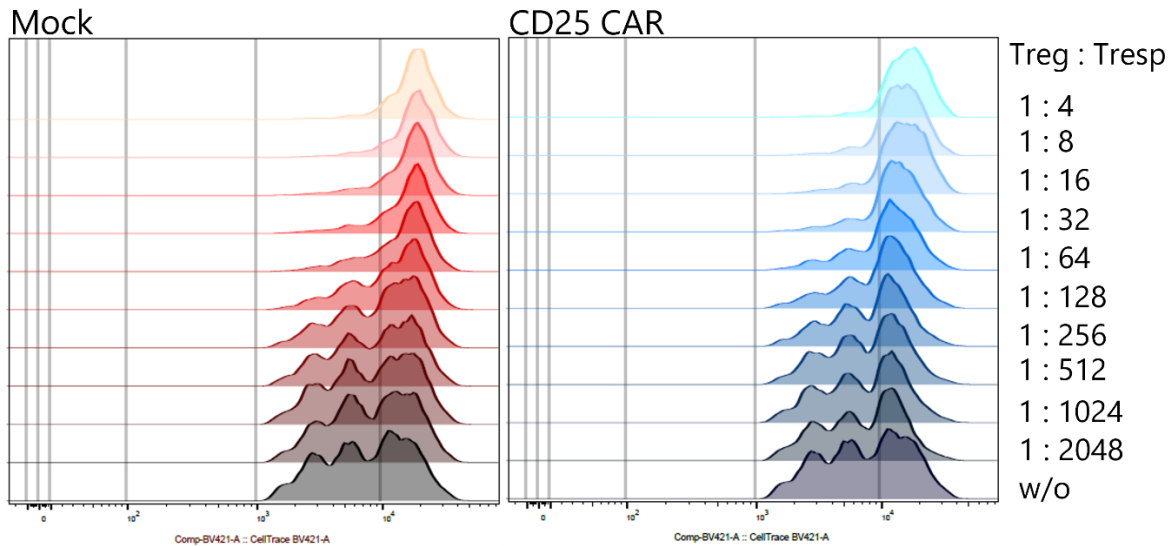


Abbildung 16: CD25 CAR Treg Zellen zeigen keine verminderte suppressive Aktivität im Vergleich zu Mock Tregs. Der Ansatz des Suppression Assay bestand aus CD4+ Tkonv, CD3/CD28 Beads im Verhältnis 2:1 und regulatorischen T Zellen in absteigender Konzentration, beginnend bei einem Treg:Tresp Verhältnis 1:4 bis zu einem Verhältnis 1:2048. Tresp Zellen wurden mit CPD450 von Invitrogen bei einer Konzentration von 1 μ M gefärbt. Hierbei wurden 0,1x 10⁶ Tresp pro Einheit einer 96 Well Platte eingesetzt. Als Nullwert diente ein Ansatz ohne Tregs. Die Daten wurden als Duplikate erhoben. Der Graph zeigt Mittelwerte und die Standardabweichung. Die Rohdaten des Graphs sind als Histogramme abgebildet.

2.1.12 CD25 CAR Tkonv Zellen begehen Fratrizid

Ziel war es den Grund für das Ausbleiben der Proliferation der CD25 CART Population zu ermitteln. Die Fähigkeit zur Proliferation ist für Tkonv, wie für Treg wichtig und Teil der Effektor-Funktionen. Die Kulturansätze von CD25 CAR Tkonv, CEA CAR Tkonv und Mock Tkonv wurden an Tag 7 nach Transduktion gefärbt und im Durchflusszytometer auf die morphologische Integrität, Viabilität und CD25 Expression untersucht. Alle drei Analyten sind in der CD25 CAR Tkonv Population im Vergleich zu CEA CAR und Mock Tkonv reduziert.

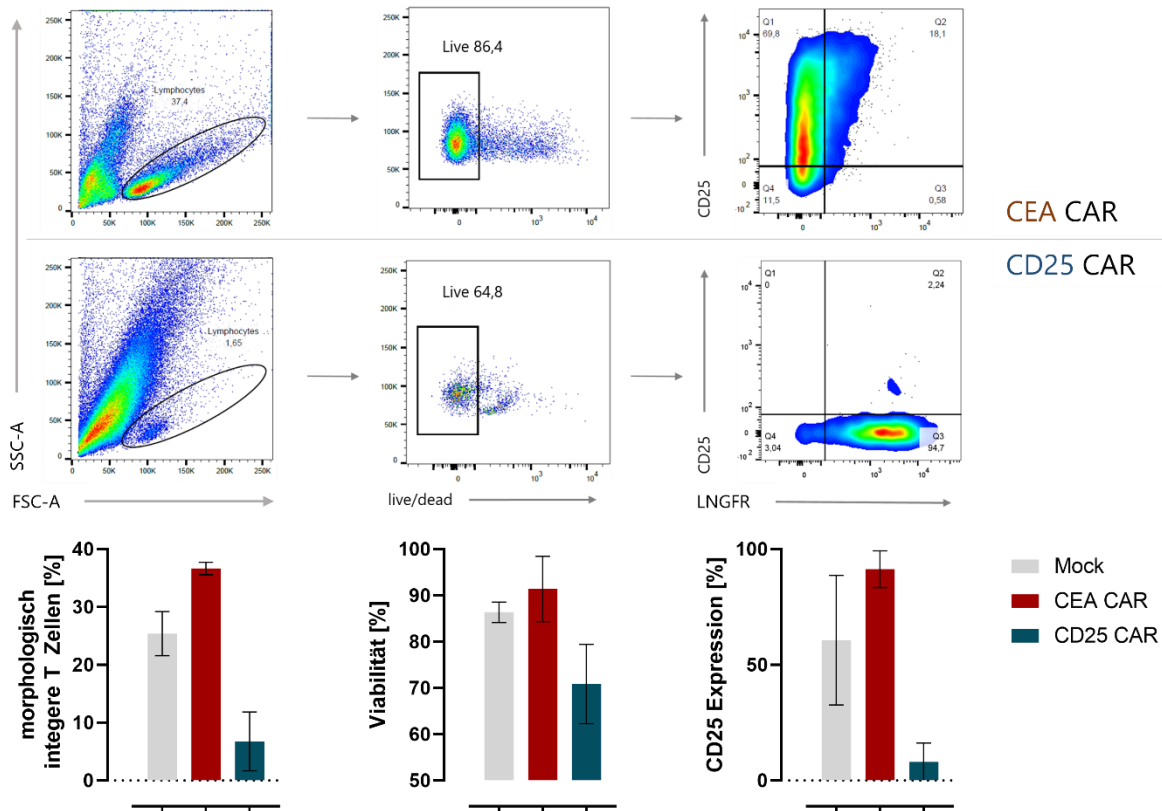


Abbildung 17: CD25 CAR Tkonv Zellen zeigen verringerte Viabilität und einen dezimierten Anteil integrierender Zellen an der Gesamtpopulation, im Vergleich zu CAR Tkonv irrelevanter Spezifität und Mock Tkonv. Tkonv wurden an Tag 7 nach Transduktion aus der Kultur genommen, gefärbt und anschließend im Durchflusszytometer analysiert. Alle Proben wurden mit dem selben Antikörpermix gefärbt. Die FACS Plots stehen exemplarisch über den Daten als Balkendiagramm. Der Anteil der morphologisch integren Zellen wurde über den Forward Scatter Area (FSC-A) und den Sideward Scatter Area (SSC-A) Kanal erhoben, die Viabilität über den Farbstoff eFluor780 und die CD25/LNGFR Expression über Antikörperfärbung nachgewiesen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte und die Standardabweichung des Mittelwerts.

2.1.13 CD25 CAR Tregs reduzieren signifikant die Infiltration von CD4/ CD8 Lymphozyten ins Rückenmark in der experimentellen autoimmun Enzephalomyelitis.

Hier wurde untersucht, ob CD25 CAR T Zellen Krankheitsstart und Krankheitsverlauf im Mausmodell der experimentellen autoimmun Enzephalomyelitis verzögern, beziehungsweise lindern kann.

Die Induktion der EAE erfolgte mit einer subkutanen Injektion MOG und CFA, in den Schwanzansatz an Tag 0 und zwei intraperitonealen Injektionen PTX an Tag 0 und 2. Der

Versuchsaufbau gliedert sich in zwei Äste. Zum einen wurde bei 15 Tieren an Tag 11 die Milz und das Rückenmark entnommen und auf aktivierte Lymphozyten, beziehungsweise auf Lymphozyteninfiltration im Rückenmark getestet. Dafür wurde das Gewebe aufgearbeitet und im Durchflusszytometer auf CD4, CD8, CD25, CD44 und CD62L untersucht. Zum anderen wurde bei 15 weiteren Tieren anhand der EAE- Bewertungsskala der Krankheitsverlauf und der Krankheitsbeginn dokumentiert.

CD25 CAR Tregs reduzieren signifikant die Infiltration von CD4+ und CD8+ T Zellen in das Rückenmark von EAE erkrankten Tieren, im Vergleich zur PBS- Kontrollgruppe. Der Unterschied zur Mock Treg Gruppe ist nicht signifikant (Abbildung 18B). In der CD25 CAR Treg Gruppe ist in der Milz keine CD25 Expression mehr nachweisbar. Dieser Effekt ist hoch signifikant im Vergleich zur PBS und Mock Treg Gruppe. Des Weiteren wurden die Gruppen auf Unterschiede bezüglich CD44 und CD62L Expression untersucht. Anhand dieser Oberflächenmarker lassen sich naive und Effektor T Zellen unterscheiden. Hier ergeben sich keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 18C). Die Bewertung des klinischen Verlaufs der mit CD25 CAR Treg Zellen behandelten Tiere ergibt keinen signifikanten Unterschied zur PBS und Mock Treg Kontrolle (Abbildung 18D). Großem Dank gilt an dieser Stelle Silvia Seubert die das Scoring der Mäuse und EAE induzierte, an Magdalena Lippert für die Auswertung und Bereitstellung der in-vivo Daten und Herrn Prof. Dr. Ralf Linker und Herrn Prof. Hinrich Abken für die freundschaftliche Kooperation zwischen den Gruppen.

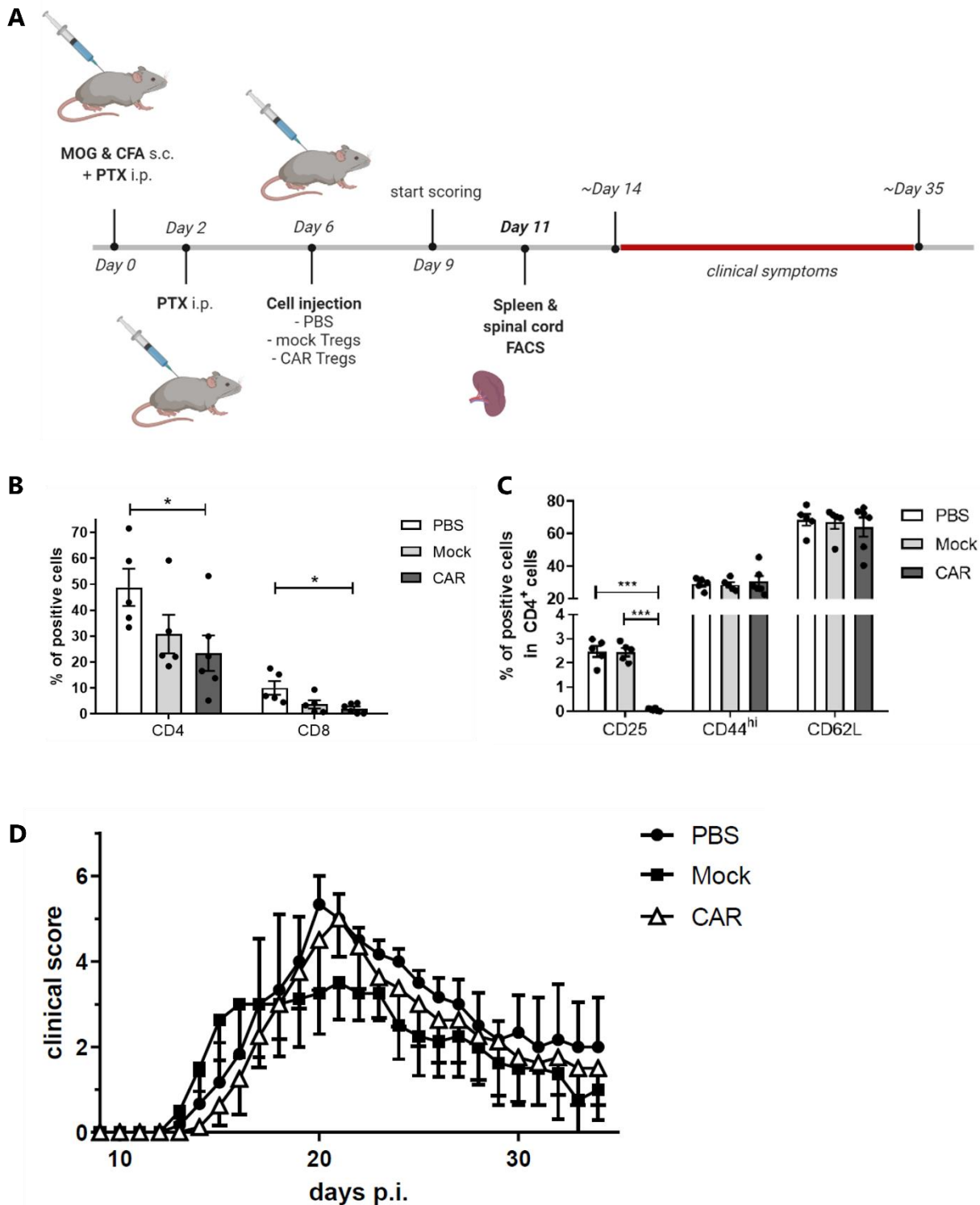


Abbildung 18: CD25 CAR Treg Zellen reduzieren signifikant die Rückenmarksinfiltration von CD4+ und CD8+ Lymphozyten, in der experimentellen autoimmun Enzephalomyelitis. Der Krankheitsverlauf ist im Vergleich zu den Kontrollen nicht signifikant unterschiedlich. A) Verlauf des Experiments der experimentellen autoimmun Enzephalomyelitis. Um den Krankheitsverlauf zu induzieren wurde an Tag 0 das Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) zusammen mit Complete Freud's Adjuvant (CFA) subkutan in den Schwanzansatz gespritzt. Pertussistoxin wurde an Tag 0 und 2 intraperitoneal injiziert. An Tag 6 werden CD25 CAR Tregs cells, Mock Tregs und 1x PBS in die Schwanzvene von jeweils 5 Tieren pro Gruppe injiziert. Das Scoring der Tiere erfolgte ab Tag 9 und endete an Tag 40. Einzweite Gruppe von 5 Tieren wurde ebenso behandelt jedoch am Tag 11 für die Milz und Rückenmark Entnahme getötet, die Gewebe aufgearbeitet und im Durchflusszytometer auf die Oberflächenmarker

CD4, CD8, CD25, CD44 und CD62L untersucht. **B)** Infiltration von CD4+ und CD8+ T Zellen in das Rückenmark an Tag 11. **C)** Prozentualer Anteil der CD25+, CD44+ und hochexprimierenden CD62L Zellen in der Milz am Tag 11. **D)** Klinischer Verlauf in der Punktwertung in der EAE von Tag 9 bis 35.

2.2 Membrangebundenes IL-2 stabilisiert FoxP3 Expression, Viabilität und induziert Proliferation in humanen regulatorischen T Zellen

Hier wurde untersucht, inwiefern Treg Funktionalität und Stabilität des Phänotyps unter IL-2 limitierenden Kulturbedingungen verbessert werden kann. Nach Treg Transfer, wie zum Beispiel zur Behandlung der GvHD oder Transplantatabstoßung, kontrahiert die Treg Population nach kurzer Zeit. Es wird diskutiert ob erhöhte Persistenz und Viabilität von regulatorischen T Zellen zu besserem Therapieerfolg führen kann. Die Stabilität des Phänotyps ist insbesondere bei Treg Transfer von zentraler Bedeutung für die Sicherheit des Zellprodukts.

Membrangebundenes IL-2 wurde in verschiedenen Konfigurationen konstruiert. Zum einen mit verschiedenen Linker Längen und zum anderen wurde der IL-2 CAR- Prototyp mit zusätzlichen Signaldomänen ausgestattet, nach dem Design von CARs zweiter Generation (Abbildung 19A). Die drei Konstrukte werden auf der Oberfläche von humanen Tregs exprimiert. (Abbildung 19B). Membrangebundenes IL-2 führt zur Proliferation von memIL2short, memIL2long und IL2 CAR Prototyp Tregs in Kulturbedingungen ohne IL-2 im Vergleich zu NT Tregs (Abbildung 19C und D). Hierbei wurden die Gruppen für 5 Tage ohne IL-2 kultiviert, nachdem sie mit Zellproliferationsfarbstoff CPD450 gefärbt wurden. (Abbildung 19C). In Abbildung 19D wurden die Gruppen über einen Zeitraum von 11 Tagen manuell am Lichtmikroskop gezählt. In einer Gruppe wurde IL-2 an Tag 4 ausgewaschen.

Alle Treg Gruppen mit membrangebundenem IL-2 zeigen konstitutiv aktive Phosphorylierung von STAT5 unter Kulturbedingungen ohne IL-2, im Vergleich zu NT Tregs. Werden die Zellen mit IL-2 stimuliert besteht kein Unterschied zwischen den Gruppen bezüglich des Phosphorylierungsstatus von STAT5. Hierfür wurden die Proben für 5 Tage mit und ohne IL-2 kultiviert (Abbildung 19E). Alle Tregs mit membrangebundenem IL-2 zeigen in Kulturbedingungen ohne IL-2 eine signifikant höhere Viabilität, im Vergleich zu NT Tregs (Abbildung 19F). Hierbei wurden die Treg Proben im ViCell Zellzählgerät nach 5 Tagen in Kulturbedingungen ohne IL-2 auf Viabilität getestet. Ebenso nach 5 Tagen ohne IL-2 wurden die Proben auf FoxP3 Expression im Durchflusszytometer analysiert. Hierbei ergab sich bei zwei Donoren eine erhöhte FoxP3 Expression in den Treg Proben mit membrangebundenem IL-2 im Vergleich zu NT Tregs (Abbildung 19G).

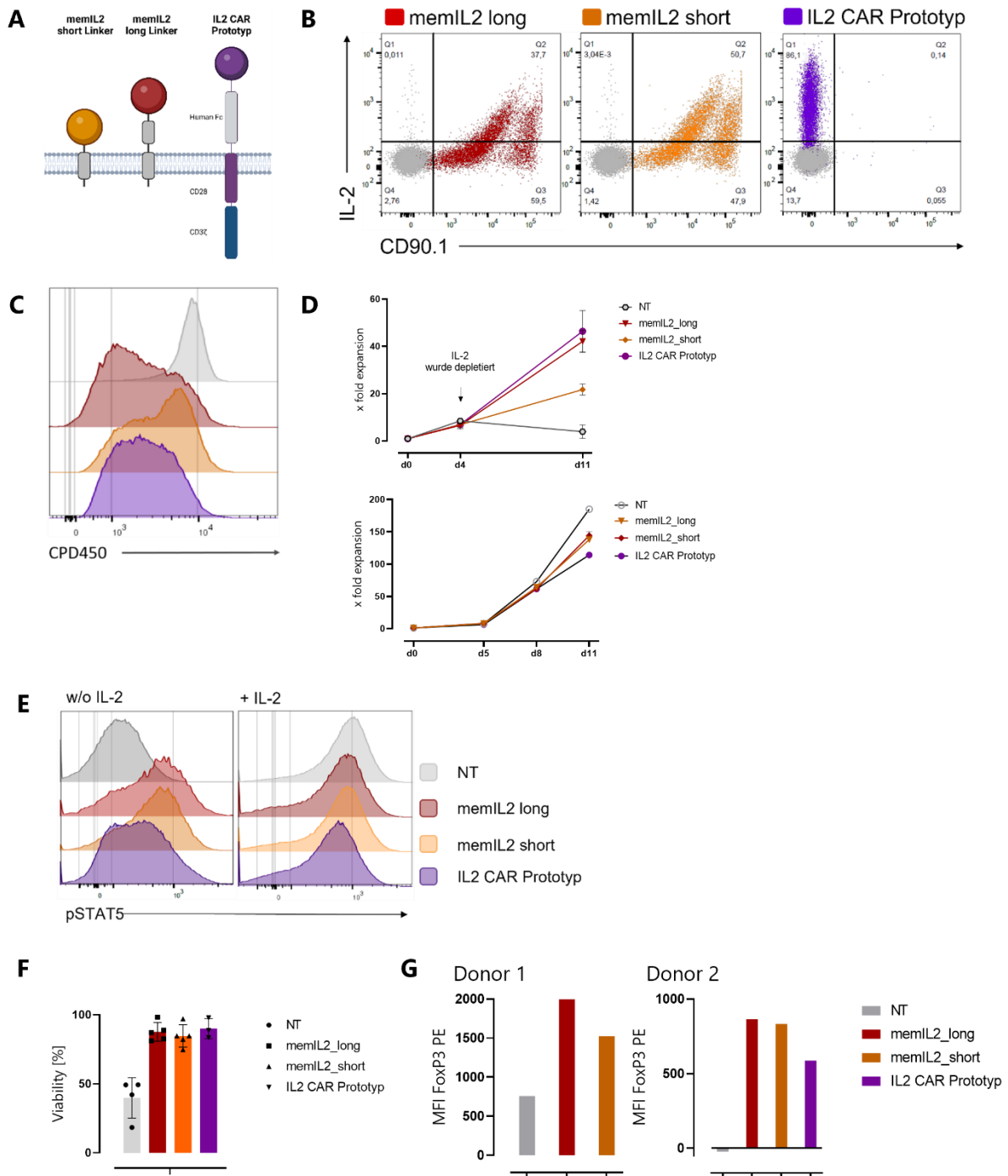


Abbildung 19: Membran verankertes IL-2 führt zu Proliferation, Phosphorylierung von STAT5, stabilisierter Expression von FoxP3 und verhindert Apoptose unter IL-2 depletierten Bedingungen in humanen Tregs. A) Schemagraphik der verwendeten Konstrukte memIL2short, memIL2long und IL2 CAR Prototyp Tregs. **B)** IL-2 und CD90.1 Expression von memIL2short und memIL2long und IL-2 Expression des IL2 CAR Prototyp Tregs (in Farbe) im Vergleich zu NT Tregs (grau). **C)** Die IL-2 Konstrukte zeigten spontane Proliferation unter IL-2 depletierten Kulturbedingungen gemessen mit Zellproliferationsfarbstoff CPD450 (Färbekonzentration: $1\mu\text{M}$). Die Zellen proliferierten über 5 Tage. Daten wurden via Durchflusszytometrie ermittelt. **D)** Proliferation wurde ermittelt durch manuelles Zählen am Lichtmikroskop, über einen Verlauf von 11 Tagen. Verglichen wurden 2 Kulturansätze, ein Ansatz mit der Supplementierung von IL-2 (unten) und einen Ansatz bei dem IL-2 an Tag 4 ausgewaschen wurde. **E)** Histogramme aus der Durchflusszytometrie zeigen den Phosphorylierungszustand von STAT5 der Proben memIL2short, memIL2long und IL2 CAR Prototyp Tregs im Vergleich zu NT Tregs, unter IL-2 depletierten und IL-2 supplementierten Bedingungen. Die Proben wurden 5 Tage in den jeweiligen Bedingungen kultiviert. **F)** Die

Viabilität wurde am ViCell cellcounter 5 Tage nach IL-2 Depletion ermittelt. **G**) Die Expression von FoxP3 wurde 5 Tage nach IL-2 Depletion ermittelt. Für die Darstellung der MFI wurde der Median herangezogen. Gezeigt werden 2 separate Experimente mit 2 Donoren.

2.3 Switch Rezeptor Prototyp induziert IL-2 Signalweg und stabilisiert Phänotyp und Viabilität in regulatorischen T Zellen nach Ligandenbindung

Hier wurde auf die Entwicklung der selektiven Induzierbarkeit der IL-2 Signalkaskade in regulatorischen T Zellen abgezielt. Und damit auch auf die Stabilisierung des Treg Phänotyps – im Speziellen die FoxP3 Expression –, die selektive Aktivierung von Proliferation und die Verbesserung der Viabilität in Abwesenheit von IL-2. Wie in vorangegangenem Kapitel beschrieben, ist eine zentrale Eigenschaft für den Therapieerfolg von Adoptivem Zelltransfer, die Persistenz der transferierten Zellen. Dies soll durch die Aktivierung des IL-2 Signalwegs unterstützt werden. Hier soll der Weg für ein System geebnet werden, welches nicht wie das membrangebundene IL-2 konstitutiv aktiv ist, sondern induzierbar ist.

Der im Gegensatz zum monovalenten SWR, CAR Tregs und Mock Tregs induziert der divalente SWR nach Zugabe des Liganden TGF- β die Phosphorylierung von STAT5 (Abbildungen 20A und B). Für diese Phosphorylierung sind die beiden IL-2 Signaldomänen erforderlich (Abbildung 20B). Die Treg Proben wurden dabei 5 Tage lang unter IL-2 – Bedingungen kultiviert, mit und ohne den Liganden TGF- β . Der divalente SWR induziert selektiv nach Aktivierung mit oberflächengebundenem und frei löslichem Liganden die Proliferation von Tregs, in Experimenten mit manueller Zellzählung (Abbildung 20D) und Experiment mit Zellproliferationsfarbstoff CPD450 (Abbildung 20C). Als Kontrollen dienten hierbei monovalente SWR Tregs und NT Tregs. Diese zeigen keine Proliferation in Kulturbedingungen mit TGF- β . Alle Proben proliferieren in Standardkulturbedingungen mit CD3/ CD28/ IL-2. Tregs mit divalentem SWR zeigen erhöhte MFI FoxP3 Expression, in Kulturbedingungen ohne IL-2, im Vergleich zu Tregs mit monovalentem SWR und NT Tregs (Abbildung 20E). Hierbei wurden die Gruppen 5 Tage in Kultur ohne IL-2 und +/- TGF- β gehalten und anschließend im Durchflusszytometer auf FoxP3 Expression analysiert. Für die Berechnung der MFI wurde der Median des entsprechenden Fluorochroms herangezogen.

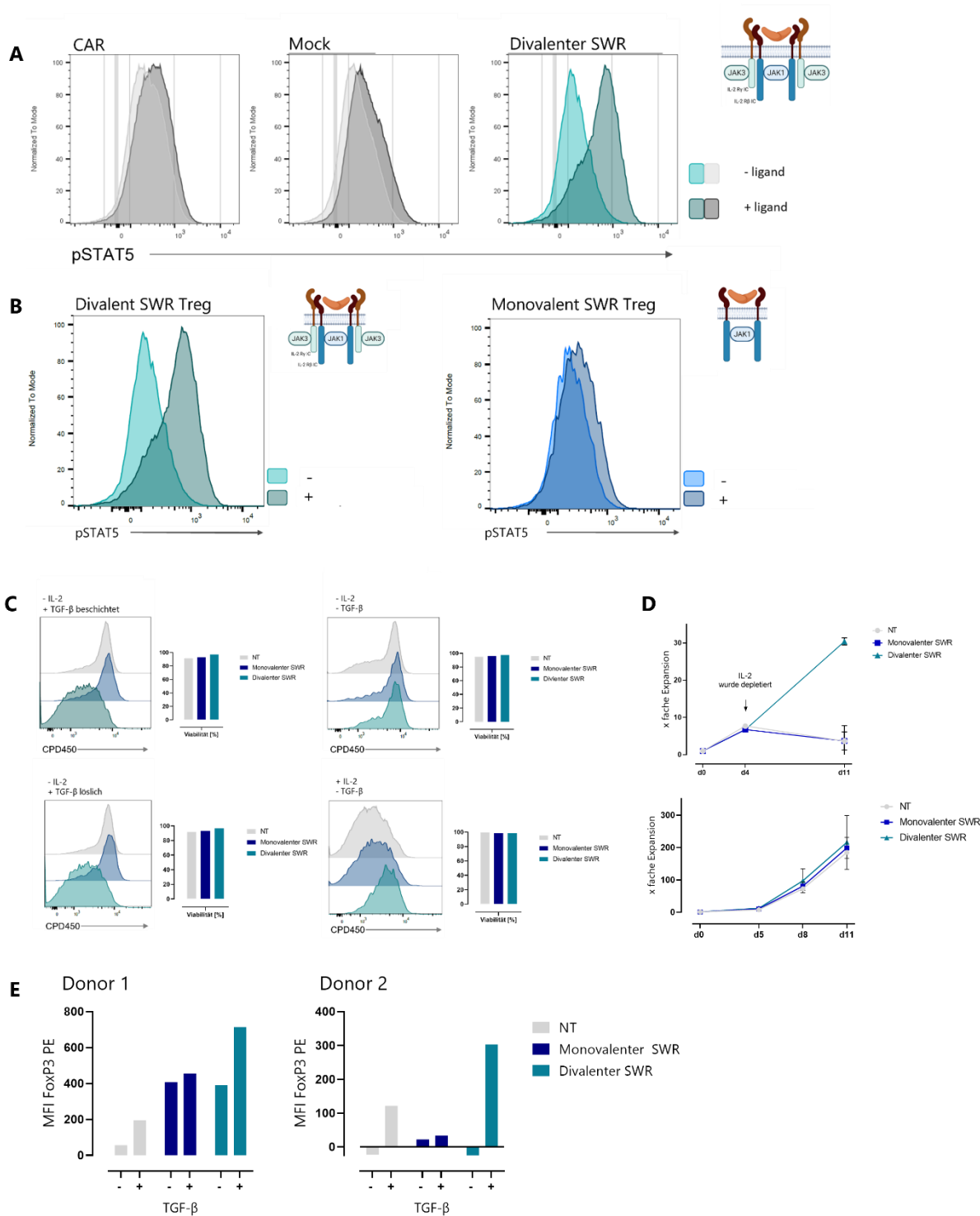


Abbildung 20: Der Switch Rezeptor Prototyp induziert selektiv Proliferation, Phosphorylierung von STAT5, stabilerer Expression von FoxP3 und verhindert Apoptose nach Ligandenbindung unter IL-2 depletierten Bedingungen in humanen Tregs. A) Der Switch Rezeptor induziert selektiv die Phosphorylierung von STAT5 nach Ligandenbindung. **B)** Beide Signalketten des IL-2 Rezeptors - beta und gamma - sind notwendig, um nach Ligandenbindung pSTAT5 zu induzieren. Für die pSTAT5 Messungen wurden die Tregs der Gruppen auf die Konzentration 1×10^6 / ml eingestellt und für 5 Tage mit dem Liganden (c(TGF- β) = 40 ng/ ml) ohne kultiviert. Die schematischen Abbildungen zeigen die Konstrukte des monovalenten und des divalents Switch Rezeptors. Ersterer beinhaltet ausschließlich die IL-2 Rezeptor beta Signalkette. Zweiterer enthält zusätzlich die IL-2 Rezeptor gamma Signalkette. Die Proben wurden im Durchflusszytometer analysiert. **C)** Treg Zellen wurden mit Zellproliferationsfarbstoff CPD450 (1 μ M) gefärbt und anschließend für 5 Tage mit löslichem und

oberflächengebundenem TGF- β inkubiert (löslich: 40 ng/ ml, Polysorb 96 well Platte: 50 μ l. c = 40 ng/ ml). Anschließend wurden die Gruppen im Durchflusszytometer analysiert. **D)** Die Proliferationsdaten wurden durch manuelles Zählen erhoben. Tag 0 bezieht sich auf den letzten Tag der Transduktion. Die Proben wurden in zwei Gruppen aufgeteilt. Bei der ersten Gruppe (oben) wurde nach 4 Tagen IL-2 aus der Kultur ausgewaschen, bei der zweiten Gruppe nicht. Die Gruppen wurden mit TGF- β (40 ng/ ml) kultiviert. **E)** Der divalente SWR wurde im Durchflusszytometer mit dem monovalenten SWR und NT Tregs auf das Maß an FoxP3 Expression unter Kulturbedingungen ohne IL-2 und +- TGF- β (40 ng/ ml) getestet. Die Daten wurden nach einer Kulturdauer von 5 Tagen ermittelt.

3 Diskussion

Der humane anti- CD25 CAR zeigte keine Kreuzreaktivität zu murinem CD25. Deshalb wurde ein muriner anti- CD25 CAR zweiter Generation konstruiert, (Abbildung 6) mit dem Ziel, aktivierte CD25 Lymphozyten mit CD25 CAR Tregs zu supprimieren und diese in einem Maus Modell der Experimentellen Akuten Enzephalitis zu testen. Als kostimulatorische Domäne wurde die intrazelluläre Signalkette von CD28 in Kombination mit dem primären Aktivierungssignal CD3 ζ gewählt. CD28 als ko- stimulatorische Domäne demonstriert im Vergleich zu anderen Vertretern der CD28- und TNFR- Superfamilie in- vitro und in einem GvHD Xenograft Model überlegene Suppression. Die CD28 CAR-Tregs überlebten in vivo signifikant besser, und am siebten Tag hatte diese Gruppe eine höhere absolute Anzahl von CAR+FOXP3+Helios+- Zellen im peripheren Blut als alle anderen Gruppen. Der beobachtete Überlebensvorteil der CD28 CAR Tregs in- vivo wird durch eine Transkriptomanalyse gestützt, die eine Anreicherung einiger Gene die mit Zellzyklus/ Proliferation/ DNA- Replikation zusammenhängenden Stoffwechselwegen, sowie die Fähigkeit zur Proliferation als Reaktion auf HLA-A2 in vitro zeigte. Die Fähigkeit, die Proliferation zu stimulieren, ist jedoch eindeutig nicht ausreichend für die volle Funktion der Treg Zelle, da die starken 4-1BB- und TNFR2- CAR vermittelten proliferativen Signale zum Verlust der TSDR-Methylierung und der Helios-Expression führten. Alle außer einer mutierten Variante von CD28 (CD28mut CAR) hatten niedrigere MFIs bezüglich CAR Expression als der CD28wt CAR und zeigten eine verminderte Expression von wichtigen Treg-Effektorproteinen wie LAP, GARP und CTLA-4.⁷³ Die 4-1BB Ko-stimulation reduziert spezifisch die CAR-vermittelte Treg- Suppressorfunktion.⁷⁴

Der murine CD25 CAR wurde auf sortierten murinen CD4⁺CD8⁻CD25⁺CD62L^{hoch} Treg, wie auf humanen und murinen T Effektor Zellen exprimiert (Abbildung 7 und 9).

Der humane und murine CAR induziert IFN- γ Sekretion in humanen T Effektor Zellen nach Antigen Bindung (Abbildung 8). Murines CD28 und CD3 ζ ist in der humanen T Zelle aktiv. Daher kann der murine CAR in humanen T Zellen exprimiert und grundlegende funktionale Tests wie die Signalweiterleitung nach Antigenbindung durchgeführt werden. Der murine und der humane CD25 CAR induzieren jeweils Antigen induzierte IFN- γ Sekretion. Der humane CAR bindet humanes CD25, nicht murines CD25, während muriner CD25 CAR murines CD25 und nicht humanes CD25 bindet. Damit zeigen beide CARs keine Kreuzreaktivität, binden ihr jeweiliges Antigen und induzieren nach Bindung eine T-Zell Aktivierung.

Der murine CD25 CAR wurde in murinen regulatorischen und konventionellen T Zellen auf dessen Aktivierungspotential getestet. Murine regulatorische T Zellen zeigen Antigen-abhängige Expression des Aktivierungsmarkers LAG-3 nach CAR- Aktivierung (Abbildung 10). Das Expressionslevel der Treg und Tkonv ohne CAR- Expression bei aufsteigendem Antikörper Stimulus und ohne Stimulus erhöhte sich nicht. Treg und Tkonv Zellen mit CD3/CD28 Stimulus zeigten erhöhte LAG-3 Expression. CD25 CAR T Zellen zeigten auch unter nicht stimulierenden Konditionen LAG-3 Expression. Die Expression des Aktivierungsmarkers könnte zum einen auf eine mögliche tonische Signalaktivität der CAR- Moleküle zurückgeführt werden, das heißt, ohne Bindung des Zielantigens CD25, oder zum anderen auf die Aktivierung des CARs durch die Bindung des Zielmoleküls CD25 auf aktivierten Tkonv, wie auf Treg Zellen. Ein CAR nicht relevanter Spezifität aber identischer Signaldomäne könnte ebenso ein tonisches Signal induzieren, während eine Aktivierung durch CD25 Bindung nur durch den CD25 CAR erfolgen würde. Jeder CAR vermittelt ein individuelles tonisches Signal, was unter anderem durch die

Bindedomäne bedingt ist. Dadurch ist ein quantitativer Vergleich des tonischen Signals schwer möglich. In Abbildung 8 wird gezeigt, dass die CD25 CARs selektiv CD25 binden und die T Zellen aktivieren. Das lässt den Schluss zu, dass der gezeigte Aktivierungsstatus in der nicht stimulierten Gruppe der CAR T Zellen, der Aktivierung durch Antigen zugeordnet werden kann. LAG-3 Expression korreliert mit dosisabhängiger Aktivierung von Treg Zellen, ist ein selektiver Marker von induzierten Tregs und ein entscheidender Faktor der nTreg vermittelten suppressiven Aktivität.¹²⁶

CD25 CARs supprimieren die Proliferation und führen zu verringerter Viabilität von T Zellen. Abbildung 11 A und B zeigen, dass auf humanen (A) und murinen (B) Tkonv exprimierte CD25 CARs zu einer Blockade der Proliferationsfähigkeit der CAR positiven wie CAR negativen T Zellen führen. Murine CD25 CAR Treg zeigen reduzierte Proliferation im Vergleich zu mock Treg (Abbildung 11C). An Tag 7 –am Tag der Treg Injektion im Modell der EAE– manifestieren sich keine signifikanten Unterschiede in der Proliferation zwischen mock Treg und CD25 CAR Treg Zellen, jedoch ist die Viabilität der CD25 CAR Treg Population signifikant reduziert, im Vergleich zu NT Treg. Um zu proliferieren, benötigen T Zellen IL-2; CD3/CD28 Stimulus ist für Tkonv hinreichend, da diese nach CD28 Stimulation IL-2 sezernieren können. Dies ist für Tregs nicht der Fall, die kein IL-2 produzieren können und daher abhängig von parakrin sezerniertem IL2 sind, um zur Proliferation stimuliert zu werden.²⁸ Da selektiv CD25 CAR T Zellen in ihrer Proliferation beeinträchtigt sind, wurde der IL-2 Signalweg untersucht.^{127,128}

CD25 CAR Treg und Tkonv Zellen zeigen erhebliche Abweichungen in ihrer CD25 Expression, im Vergleich zu mock Treg/ Tkonv und CAR Tkonv Zellen nicht relevanter Spezifität. Kulturen mit CD25 CAR T Zellen beinhalten 5 Tage nach Transduktion ausschließlich CD25 negative T Zellen (Abbildung 12 A). CD25 CAR Tregs exprimieren ebenso wie Tkonv kein CD25, jedoch ist auf CAR negativen Treg CD25 exprimiert, wenn auch in geringerem Umfang. Das unterscheidet CD25 CAR Tkonv und Treg Kulturen (Abbildung 12 B und A). NT Tkonv und CAR Tkonv Zellen irrelevanter Spezifität sowie NT Treg und mock Treg exprimieren CD25.

Bei einer Maskierung von CD25 geht man davon aus, dass sich das Molekül noch auf der Zelloberfläche befindet und nicht mehr durch Antikörperbindung nachweisbar ist. In diesem Szenario stellt sich die Frage, inwieweit die CD25 CAR Bindung an CD25 den Nachweis von CD25 verhindert und zugleich eine intrazelluläre IL-2 Signalweiterleitung und somit Proliferation der Treg Zelle beeinträchtigt. CD25 CAR Tkonv Zellen zeigen keine Proliferation und gleichzeitig keine CD25 Expression (Abbildung 12 A). Dies wurde durch Antikörperfärbung nachgewiesen, die unterschiedliche, sich nicht überlappende Epitope von CD25 binden (Abbildung 14). Die CD25 CAR Treg Kultur zeigt reduzierte CD25 Expression auf CAR- Zellen jedoch keine CD25 Expression auf CAR+ Zellen im Vergleich zu mock Treg Zellen, die eine CD25 Expression zeigen, die mit unbehandelten Treg gleich ist. Des Weiteren ist die Proliferation von CD25 CAR Treg Zellen im Vergleich zu mock Treg Zellen verringert. Somit könnte das Maß der CD25 Expression der Kultur mit der proliferativen Aktivität korrelieren (Abbildungen 11 und 12). Die beeinträchtigte Phosphorylierung von STAT5 in CD25 CAR T Lymphozyten –in Tkonv wie Treg– deutet auf eine Blockade des IL-2 Signalwegs hin (Abbildung 15).

Ein zweites Szenario, zur Erklärung der Proliferationsdefizienz in CD25 CAR Tkonv, stellt die Selektion CD25 negativer T Zellen ausgelöst durch CD25 CAR T-Zell vermittelten Fratrizid dar. Neben zytotoxischen CAR T Lymphozyten sind auch CAR Tregs in der Lage, Granzym B vermittelte Zell Lyse in T Zellen selber HLA Signatur zu induzieren.^{74,129,130} Obwohl beide T Zell

Subtypen in der Lage sind Zellen zu lysieren, zeigen sich in Bezug auf die Expression von CD25 in Kulturen von CD25 CAR Tkonv und Treg Zellen Unterschiede, in Bezug auf die Expression von CD25 in trans. Untransduzierte Treg in Kultur mit CD25 CAR Treg zeigen –wenn auch im Vergleich zu mock transduzierten Treg geringere– CD25 Expression (Abbildung 12 B), während untransduzierte Tkonv in Kultur mit CD25 Tkonv kein CD25 exprimieren. Bei CD25 CAR T Zellen sind keine CD25+ Zellen mehr in Kultur vorhanden und es findet keine Proliferation der CD25 CAR T Zellen mehr statt (Abbildung 11 A). Dies deutet auf Fratrizid der CD25 positiven Zellen hin. Diese Beobachtung deckt sich mit den Daten von Cooper et al. zum Fratrizid der CD7 CAR T Zellen. Diese sind ebenso in den folgenden Tagen nach Transduktion nicht mehr in Lage zu expandieren. Wird jedoch das *cd7* Gen zuvor durch CRISPR Knockout eliminiert, proliferieren die T Zellen.¹³⁰ Bei CD25 CAR Tregs konnte kein solches Verhalten beobachtet werden. Die Expression des CD25 CAR auf Treg Zellen führt jedoch zu verringerter Expansion und reduzierter Viabilität in Tregs (Abbildung 11 B und C).

In Ruella et al. wurde demonstriert, wie die ungewollte Transduktion einer CD19+ leukämischen Zelle mit dem CD19 CAR Lentivirus des Produktes CTL019 (Kymriah™) zur Therapieresistenz und zu einem CD19- Rezidiv durch die Maskierung des CD19 Epitops führte. Der vorgeschlagene Mechanismus der Maskierung beschreibt die Kolo-kalisation von CD19 CAR und CD19 Oberflächenmolekül auf derselben B Zelle. Somit wird das Epitop durch die CD19 CAR T Zellen nicht mehr erkannt und führte fortfolgend zum Rezidiv des Patienten. Die Autoren und Autorinnen bestätigten in weiterführenden Experimenten den vorgeschlagenen Mechanismus für CD22 CARs.¹³¹ Auf gleiche Weise kann der CD25 CAR auf der Treg Zelle kolo-kalisieren und durch die blockierende Eigenschaft des PC61 Klons die IL-2 Bindung und damit einher gehend, den IL-2 Signalweg blockieren.

Diese Annahme wird in einer Studie von Locke et al. unterstützt, in der Patienten und Patientinnen mit akuter GvHD mit Daclizumab behandelt wurden. Hier führte die Blockade von CD25 zu einer nachhaltigen Reduktion von zirkulierenden Tregs während des Ausbruchs der akuten GvHD. Die der Studie zugrunde liegende Annahme, dass eine Verringerung der Aktivierung von Tkonv durch eine Blockade des IL-2 Rezeptors erreicht wird, konnte nicht bestätigt werden. Stattdessen wurde anerkannt, dass der Anteil der FoxP3+ Tregs an der CD25+ Population zur Reduktion der Symptomatik der akuten GvHD im Menschen und in Mausmodellen beiträgt.¹³² Eine niedrig dosierte IL-2 Therapie erhöht die Zirkulation, Proliferation und die Resistenz gegen Apoptose in Tregs, jedoch nicht in CD4 Tkonv.¹³³ Locke et al. schlussfolgern dass, sobald das IL-2 Signal blockiert ist, ein reziproker Mechanismus in Kraft tritt, der zirkulierende Treg eher eliminiert oder deren Proliferation einschränkt, als dass es zu einer Reduktion der CD25 Expression kommt.¹³²

Dieser Datensatz steht jedoch in Widerspruch zu Ergebnissen die zeigen, dass eine CD25 vermittelte Blockade des IL-2 Signalwegs mit DAC CD25 Expression auf Tregs runter reguliert, ohne sie zu depletieren, deren Zirkulation in der Peripherie zu reduzieren oder die Expression von FoxP3 zu beeinflussen.¹³⁴ Unsere Arbeit kann Teile dieser beider Studien bestätigen. Zum einen wurde gezeigt, dass die CD25 Blockade durch die Expression des CD25 CARs auf Treg zu reduzierter Proliferationsfähigkeit führt und zu einer Depletion der CD25+ Zellen. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die FoxP3 Expression von CD25 CAR Tregs im Vergleich zu nicht-modifizierten Treg Zellen gleich hoch ist, während die CD25 Expression niedriger ist (Abbildung 13 A). Für eine stabile FoxP3 Expression wird neben IL-2 ebenso das TCR Signal benötigt.¹³⁵ Grund für die signifikant höhere FoxP3 Expression der CD25 CAR Tregs könnte die

Autostimulation durch CD25 Expression auf CAR – Zellen sein die sich in der Kultur befinden (Abbildung 12 B).

Zusätzlich zur stabilen FoxP3 Expression waren CD25 CAR Tregs gleichermaßen suppressiv gegenüber amplifizierenden Effektor-T-Zellen wie nicht-modifizierte Treg Zellen. (Abbildung 16). Ex- vivo Tregs von MS Patienten und Patientinnen, die vor und nach DAC- Therapie behandelt wurden, zeigten nach DAC Therapie reduzierte suppressive Funktion. Dafür wurden PBMCs auf die Marker CD4+CD25+CD127(negativ/niedrig) sortiert. Diese Treg, welche ebenso reduzierte CD25 Expression im Vergleich zu unbehandelten Treg zeigten, waren den Treg welche vor Therapiebeginn mit DAC getestet wurden in ihrer suppressiven Funktion unterlegen.¹³⁶ Die durchflusszytometrische Untersuchung der sortierten ex vivo Tregs auf FoxP3 Expression ergab eine verringerte MFI im Vergleich zu Tregs vor Therapiebeginn mit DAC. Diese Datenpunkte deuten auf eine funktionale Beeinträchtigung der ex vivo Tregs während der anti CD25 Antikörper Therapie hin. Im Vergleich dazu sind die CD25 CAR Tregs nicht in ihrer Funktionalität eingeschränkt und zeigen die gleiche FoxP3 Expressionsniveau, im Vergleich zu NT Tregs.

Bei der kritischen Betrachtungsweise des Mechanismus der CD25 Blockade muss neben der möglichen Ko- Lokalisation von CD25 CAR und CD25 das „shedding“ oder die Abpaltung von CARs in ihre extrazelluläre lösliche Form diskutiert werden. In diesem Szenario kommt es zu proteolytischer Spaltung des CARs von der Zelloberfläche.^{137,138} Dieser lösliche Anteil wäre dann in der Lage, in trans CD25 zu binden. In Abbildung 14 wird demonstriert, dass die CD25 Verringerung nur durch Zell- Zell Kontakt zustande kommt, da die semipermeable Membran für mögliche lösliche Anteile des Überstandes durchlässig ist. Des Weiteren kann geschlossen werden, dass es sich hierbei nicht um eine bloße Maskierung von CD25 handelt, sondern um eine Depletion der CD25 positiven Lymphozyten. Durch die Färbung mit Anti CD25 Antikörpern unterschiedlicher Epitop Bindung lässt sich ein Antigen auch dann nachweisen, wenn ein Epitop durch einen anderen Antikörper blockiert ist, sodass CD25 trotzdem gefärbt werden kann. Dies ist hier nicht der Fall.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden sortierte naive CD4+CD8-CD25^{hoch}CD62L^{hoch} Treg Zellen als Ausgangsprodukt gewählt. Diese nTreg Zellen sind in ihrer Stabilität, Reinheit, ihrer suppressiven und proliferativen Kapazität den iTregs und peripheren Tregs überlegen.^{42,139} Dadurch eignet sich diese Zellpopulation zur Herstellung einer stabilen Treg basierten Therapie der Autoimmunerkrankungen.

CD25 CAR T Zellen reduzieren signifikant die Rückenmarksinfiltration von CD4+ und CD8+ Lymphozyten im Maus Modell der EAE. Außerdem wurde an Tag 11 in der Milz eine signifikante Reduktion der CD25 positiven Zellen im Vergleich zu mock Treg therapierten und nicht therapierten Mäusen festgestellt. Der Krankheitsausbruch ist dabei jedoch nicht verzögert und der Krankheitsverlauf insgesamt ist nicht unterschiedlich zu den Kontrollen. Die suppressive Funktion der CD25 CAR Tregs ist im Vergleich zu mock Tregs nicht eingeschränkt, jedoch ist die proliferative Fähigkeit ab Tag 7 reduziert. Die Zahl der CAR Tregs nimmt in vitro weniger stark zu als in der mock Treg Population oder kontrahiert schneller relativ zu dem nicht transduzierten Treg Anteil. Somit wäre eine Zunahme des klinischen Scores im zeitlichen Verlauf zu erwarten, was jedoch nicht der Fall ist. Der Krankheitsverlauf der EAE induzierten Mäuse war sehr heterogen sodass feine Unterschiede schwer auszumachen sind.

Der Erfolg CAR regulatorischer T Zellen wurden in der Therapie der EAE bisher in zwei Publikationen gezeigt. MOG und MBP spezifische CAR Tregs reduzierten die Immunpathologie einer MOG induzierte EAE. Hierbei wurde ein „Bystander Effekt“ aufgedeckt. MBP spezifische Tregs in der Monotherapie konnten die MOG induzierte EAE supprimieren. Was hier nicht gezeigt werden konnte, war die Infiltration der CAR Tregs in das ZNS.¹⁴⁰ In der Arbeit von Fransson et al. wurde die ZNS Infiltration durch MOG spezifische CAR iTregs erreicht. Hier wurden durch transgene *foxp3* induzierte Tregs intranasal (i.n.) appliziert. Dadurch konnte eine laufende EAE behandelt werden, sodass die MOG induzierten Mäuse symptomfrei wurden. Des Weiteren wurde eine reduzierte Abundanz an INF- γ und IL-12 mRNA im Gehirngewebe nachgewiesen. In der Therapie mit iTregs besteht die Gefahr der Konversion induzierter Tregs zu CD4⁺ Tkonv, da virale Promotoren zunehmend methyliert werden. Dies birgt die Gefahr eines pro inflammatorischen oder zytotoxischen Effekt, ausgehend von spezifischen CAR Lymphozyten, was die Pathologie negativ beeinflussen kann.^{139,141}

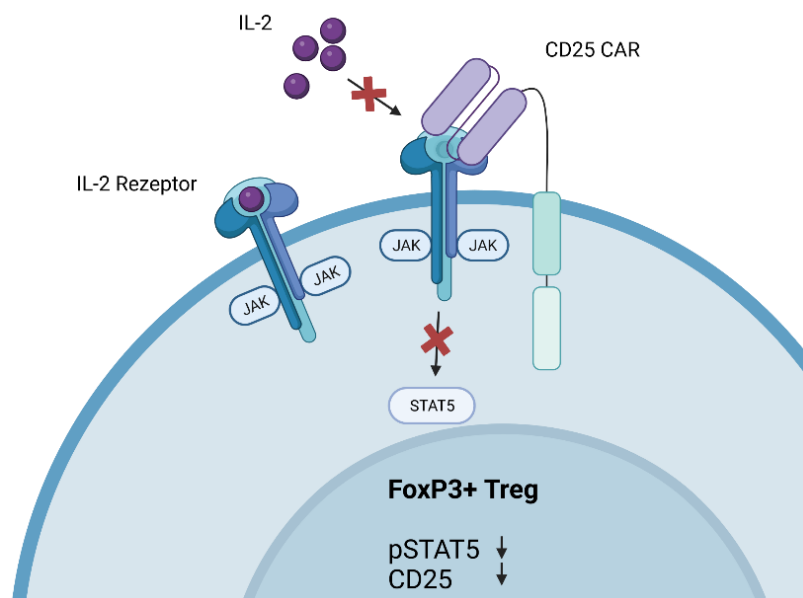


Abbildung 21: Graphische Modelldarstellung des Blockademechanismus des IL-2 Signalwegs durch CD25 CAR Moleküle.

Die Gen- Konstrukte des membranverankerten IL-2 und des IL-2 CAR- Prototyps werden auf der Zelloberfläche von humanen regulatorischen T Zellen exprimiert. Membran verankertes IL-2 und der IL-2 CAR- Prototyp führt zu Proliferation der Treg Zellen, Phosphorylierung von STAT5, verhindert Verlust von FoxP3 und Apoptose unter IL-2 limitierenden Bedingungen. (Abbildung 19). Verglichen wurden membranverankerte IL-2 Konstrukte mit unterschiedlichen Linker Längen und einem IL-2 CAR mit CD28-CD3 ζ Signalkette. MemIL-2 Tregs mit dem langen Linker zeigen eine höhere Proliferationsfähigkeit und FoxP3 Expression als memIL-2 Tregs mit kurzem Linker. Es ergeben sich möglicherweise durch die unterschiedlichen Abstände zur Membran und eine zunehmende Flexibilität des längeren Linkers eine verbesserte Bindung an die CD25 Kette des IL2 Rezeptors. Die zusätzlichen stimulatorischen Domänen CD3 ζ und CD28 des IL-2 CAR vermitteln keinen Vorteil in Bezug auf die Proliferation, Viabilität und die Expression von FoxP3 im Vergleich zu Membran-gebundenen IL2 (Abbildung 19).

In Weinstein-Marom et al. wurden membranverankerte Zytokine beschrieben. In der Publikation wird ein Zugewinn an Viabilität von ex- vivo Tumor infiltrierenden Lymphozyten (TILs) durch die transiente Expression membran gebundener Zytokine beschrieben. Die Zytokinbindung der membrangebundenen Zytokine erfolgt dabei fast ausschließlich in cis.^{142,143} In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass dieses Konzept auch für regulatorische T Zellen anwendbar ist und diese von membran gebundenem IL-2 profitieren.

Die memIL-2 Tregs proliferieren spontan und zeigen eine erhöhte Phosphorylierung von STAT5 in IL-2 limitierenden Kulturbedingungen. pSTAT5 hat bei gleichzeitiger Aktivierung mit dem Transkriptionsfaktor NFAT - Einfluss auf die Transkription im Bereich der regulatorischen Regionen CNS2. Diese beiden Faktoren NFAT und pSTAT5 nehmen eine zentrale Rolle für die FoxP3 Expression ein und sind für die suppressive Funktion und die Stabilität des Treg Phänotyps verantwortlich.^{112,113}

Während dem Anfertigen dieser Arbeit wurden humane CAR Tregs beschrieben, die nach Expression von membrangebundenem IL-2 höheres Überleben, verstärkte Stabilität des Phänotyps und der Funktion, im Vergleich zu polyklonal expandierten Tregs zeigen. Die memIL-2 Tregs waren stabil unter pro- inflammatorischen Bedingungen und zeigten Resistenz gegen CNI Therapie in einem präklinischen humanisierten Maus Modell.¹²⁰ Calcineurin Inhibitoren reduzieren die Aktivität von Phosphatasen, welche für die Aktivierung von NFAT und somit von Immunzellen verantwortlich sind. Die verbesserte Viabilität, Proliferationsfähigkeit und die FoxP3 Expression wurden somit hier bestätigt werden. In Weinstein-Marom et al. und in der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass memIL-2 T Effektor kein CD25 exprimieren. Sollte dies auch auf memIL-2 Tregs zutreffen, ist davon auszugehen, dass die Funktion als IL-2 Senke um proinflammatorische Prozesse zu regulieren, beeinflusst ist, da ein Anteil an CD25 Bindestellen durch mbIL-2 Moleküle belegt ist.

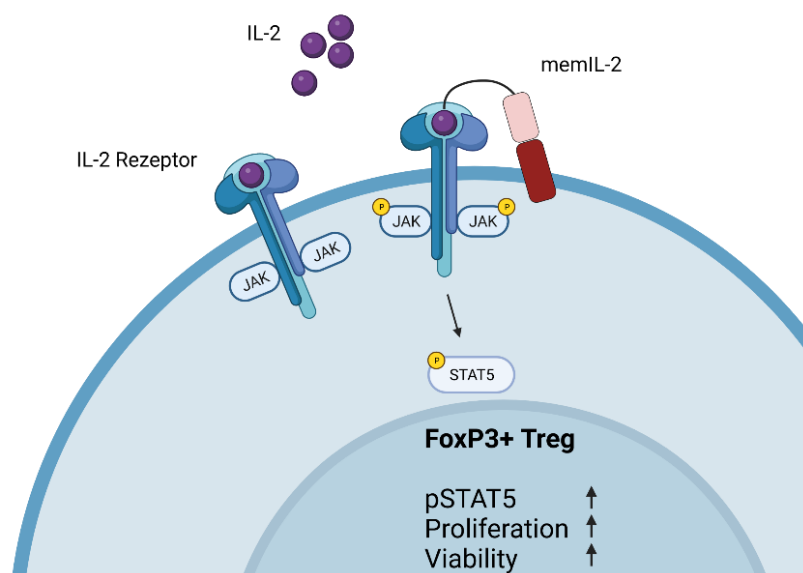


Abbildung 22: Graphische Modelldarstellung der mbIL-2 Molekül Bindung and den IL-2 Rezeptor in cis, mit Signaltransduktion.

Membran gebundenes IL-2 vermittelt wichtige Signale für regulatorische T Zellen in Bezug auf Proliferation, Überleben, Phosphorylierung von STAT5 und die Expression von FoxP3. Jedoch führt die Expression dieser Moleküle auf der Zelloberfläche zu konstitutiv aktivem IL-2 Signal. Dadurch ist die Aktivität der Treg Zellen nicht steuerbar. Deshalb wurde ein synthetischer Rezeptor entwickelt der selektiv durch einen Liganden induzierbar ist. Der Switch Rezeptor Prototyp induziert spezifisch Proliferation, Phosphorylierung von STAT5, Expression von FoxP3 und verhindert Apoptose nach TGF- β Ligandenbindung in humanen Tregs, unter IL-2 limitierenden Bedingungen (Abbildung 20). Hierbei wurde der divalente SWR mit dem monovalenten SWR und mit Tregs die keinen SWR exprimieren verglichen. Der divalente SWR besteht intrazellulär aus beiden signaltragenden Ketten des IL-2 Rezeptors, CD122 und CD132. Der monovalente SWR trägt ausschließlich die CD122 Signalkette. Der divalente Rezeptor ist im Gegensatz zum monovalenten Gegenstück in der Lage, STAT5 Phosphorylierung nach Ligandenbindung zu induzieren (Abbildung 20 B). Divalente SWR Tregs proliferieren spezifisch nach Inkubation mit löslichem und immobilisiertem TGF- β Liganden. Monovalente SWR und NT Tregs proliferieren nicht unter diesen Bedingungen. In Abbildung 20 E wird demonstriert, dass divalente SWR Tregs nach Ligandenbindung mehr FoxP3 exprimieren als monovalente SWR und NT Treg Zellen. Regulatorische T Zellen benötigen in einem synthetischen Rezeptor beide Signalketten des IL-2 Rezeptors, um STAT5 zu phosphorylieren, zu proliferieren und eine verstärkte FoxP3 Expression zu zeigen. Das CD122 Signal reicht dafür nicht aus. Des Weiteren konnte demonstriert werden, dass die genannten Effekte spezifisch durch einen Liganden induziert werden können, wodurch Vorteile in Bezug auf Sicherheit und der Spezifität der Tregs im Gegensatz zu den konstitutiv aktiven memIL-2 Tregs erzielt werden. Ein weiterer Vorteil von SWR Tregs ist, dass die Bindestellen für IL-2 auf der Zelloberfläche von SWR Treg Zellen unangetastet bleibt und anders als bei memIL-2 Tregs, alle CD25 Moleküle auf der Zelloberfläche für die Aufnahme von IL-2 zur Verfügung stehen. Somit kann die SWR Treg vollumfänglich auf diesen suppressiven Mechanismus -der Aufnahme von IL-2 proinflammatorischer, aktivierter T Lymphozyten- zurückgreifen.

Die Vorteil einer spezifisch induzierten Signalkaskade wird durch den Einsatz eines chimären orthoIL-2/IL-9 Rezeptor veranschaulicht. In Kalbasi et al. werden synthetische gamma Zytokinrezeptoren die eine extrazelluläre Domäne (ECD) mit Spezifität für ortho IL-2 tragen, verglichen. Hierbei handelte es sich um Chimären der IL-2, IL-4, IL-9 und IL-21 Rezeptoren die selektiv durch ortho IL-2 aktiviert werden können. Die Autoren und Autorinnen konnten zeigen, dass durch den gezielten Einsatz eines Zytokinsignals herausragende Erfolge in Bezug auf anti-Tumor Effekte erzielt werden können. Die synthetischen Rezeptoren wurden in syngeneten Mausmodellen des Melanoms und des Pankreas Tumors unter lymphodepletierten und nicht lymphodepletierten Bedingungen getestet.¹⁴⁴

Wir sehen ein großes Potential der synthetischen „Switch Rezeptoren“ für die Treg vermittelte Therapie von Autoimmunerkrankungen, Transplantabstoßung, chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (CED) und GvHD. Es ließe sich die ECD eines Rezeptors proinflammatorischer Zytokine mit intrazellulären Signaldomänen des IL-2 Rezeptors kombinieren, mit dem Ziel proinflammatorische Signale für die Treg Zelle zu reduzieren und gleichzeitig am Ort von Entzündungsreaktionen ein Proliferations- und Überlebenssignal zu vermitteln. Das proinflammatorische Mikromilieu hat das Potenzial, Treg Zellen in ihrer Funktion zu beeinträchtigen und eine Konversion der Treg Zellen zu Th17 oder Th1 Zellen zu induzieren. Mit einem SWR für proinflammatorische Zytokine kann möglicherweise ein stimulatorisches Signal umgewandelt werden, sodass die SWR Tregs selektiv IL2 Rezeptor

Stimuli in einer proinflammatorischen Umgebung erhält. Da das IL-2 Signal überlebenswichtig für Treg Zellen ist, besteht großes Potential, Signalketten des IL-2 Rezeptors in CAR Moleküle für regulatorische T Zellen zu implementieren, welche das primäre CD3 ζ und das ko-stimulatorische CD28 Signal komplementieren.

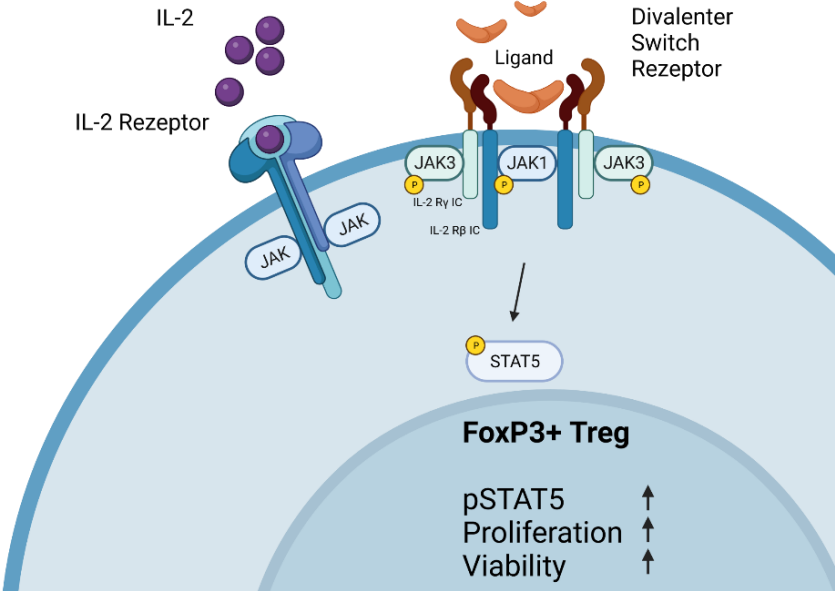


Abbildung 23: Graphisches Modell der Funktionsweise des induzierbaren, divalenten Switch Rezeptors.

4 Material

4.1 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller
ABTS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany
ABTS Buffer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany
Ampicillin	Merck/CalBiochem, Darmstadt, Germany
Bacto Agar	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany
BSA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany
Cell Proliferation Dye (eFluor™ 450)	Invitrogen/ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
DMSO	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany
eBioscience™ Fixable Viability Dye™ 780	eBioscience/ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
Ethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany
Gelatine Lösung 0,1%	PAN-Biotech GmbH, Aidenback, Germany
Glycerin	Merck/CalBiochem, Darmstadt, Germany
HEPES	GIBCO/ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany
Pancoll	PAN-Biotech GmbH, Aidenback, Germany
PBS 1x	GIBCO/ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
PBS 10x	GIBCO/ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
PEIpro® Transfection Reagent	Polyplus transfection, Illkirch, France
PenStrep	PAN-Biotech GmbH, Aidenback, Germany

Streptavidine-Peroxidase conjugate	Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland
TransACT	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany
TransIT-293	Mirus Bio LLC, Madison, WI 53719 USA
TransIT-LT1	Mirus Bio LLC, Madison, WI 53719 USA
Trypan Blue	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany
Trypsin/EDTA	PAN-Biotech GmbH, Aidenback, Germany
Tween® 20	Merck, Darmstadt, Germany

Tabelle 1: Liste der verwendeten Chemikalien und Reagenzien.

4.2 Kits

Kits	Hersteller
Anti-Mouse/Rat Foxp3 Staining Set FITC, eBioscience™	Invitrogen/ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
Fixation/Permeabilization Kit	BD Bioscience, San Jose, CA, USA
NucleBond® Xtra Midi Kit	Macherey Nagel GmbH, Düren, Germany
PureLink™ Quick Plasmid MiniPrep-Kit	Invitrogen/ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
Transcription Factor Phospho Buffer Set	BD Bioscience, San Jose, CA, USA

Tabelle 2: Liste der verwendeten Kits und deren Hersteller

4.3 Zellkulturmedium

Medium	Hersteller
D-MEM, High Glucose, GlutaMAX™	GIBCO/ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
FCS, Hitzeinaktiviert (HI) (56°C, 30 Minuten)	PAN-Biotech GmbH, Aidenback, Germany

FCS, Hitzeinaktiviert (HI) (56°C, 30 Minuten)	Merck KGaA/ Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany
RPMI1640 GlutaMAX™	GIBCO/ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
TexMACS™ Medium	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany

Tabelle 3: Liste der verwendeten Zellkulturmedien und FCS.

4.4 Puffer und Nährmedien für Bakterien

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

Tabelle 4: Liste der verwendeten Puffer und Nährmedien für die Kultivierung von Bakterien

4.5 Antikörper

4.5.1 Unkonjugierte Antikörper

Reaktivität/ Klon	Spezies	Hersteller/ Quelle
Anti- human CD3, OKT3	Maus IgG2a	Hybridom Zelllinie; CRL-8001, ATCC
Anti- Maus CD16/32, 93	Ratten IgG2a	BioLegend®, CA, USA
Anti- human CD28,15E8	Maus IgG1	Hybridom Zelllinie; (Van Lier et., 1988)

Anti Maus IgG (H+L)	Ziege IgG	SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA
Anti- human BW431/26scFv, BW2064/36	Maus IgG1	Hybridom Zelllinie; (Bosslet et al., 1985)

Tabelle 5: Liste der verwendeten nicht konjugierten Antikörper

4.5.2 Konjugierte anti- human Antikörper

Reaktivität/ Klon	Spezies	Konjugat	Hersteller/ Quelle
Human CD3, OKT3	Maus IgG2ak	APC	BioLegend®, CA, USA
Human CD3, UCHT1	Maus IgG1k	BV421	BioLegend®, CA, USA
Human CD4, M-T466	Maus IgG1k	APC	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany
Human CD4, L3T4	Maus IgG1k	PerCP	BD Bioscience, San Jose, CA, USA
Human CD8, BW135/80	Maus IgG2a κ	FITC	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany
Human CD25	Maus IgG2a κ	PE	BD Bioscience, San Jose, CA, USA
Human CD25, M-A2512	Maus IgG2a κ	AF700	BD Bioscience, San Jose, CA, USA
Human CD25, BC96	Maus IgG2a κ	PE-Cy7	BioLegend®, CA, USA
Human CD45RA, HI100	Maus IgG2b κ	FITC	BD Bioscience, San Jose, CA, USA
Human CD127, MB15-18C9	Maus IgG2a κ	APC	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany
Human CD271 (LNGFR)	Maus IgG1 κ	AF647	BD Bioscience, San Jose, CA, USA

Human FoxP3, REA1253	Human IgG1	APC	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany
Human hlgG F(ab')	Ziege F(ab') ₂ IgG	PE	Southern Biotechnology, AL, USA
Human STAT5, 47/stat5(pY694)	Maus IgG1k	BV421	BD Bioscience, San Jose, CA, USA
Human TGF- β Receptor II	Ratten IgG2b, κ	APC	BioLegend®, CA, USA
Human IL-2, B33.2	Maus IgG1	Biotin	BD Pharmingen™, Hamburg, Germany
Human IFN- γ , 42.B3	Maus IgG1	Biotin	BD Pharmingen™, Hamburg, Germany

Tabelle 6: Liste der konjugierten anti- Human Antikörper

4.5.3 Konjugierte anti- Maus und Ratten Antikörper

Reaktivität/ Klon	Spezies	Konjugat	Hersteller/ Quelle
Maus CD4, GK1.5	Ratten IgG2b	BV421	BioLegend®, CA, USA
Maus CD4, GK1.5	Ratten IgG2b	PacificBlue	BD Bioscience, San Jose, CA, USA
Maus CD4, GK1.5	Ratten IgG2b	PerCP-Cy5.5	BioLegend®, CA, USA
Maus CD8a,53-6.7	Ratten IgG2b	PerCP-Cy5.5	BD Bioscience, San Jose, CA, USA
Maus CD25, PC61	Ratten IgG1	PE	BD Bioscience, San Jose, CA, USA
Maus CD62L, MEL-14	Ratten IgG1	APC	BD Bioscience, San Jose, CA, USA
Maus CD223 (LAG-3), C9B7W	Ratten IgG1	PE-Cy7	BioLegend®, CA, USA

Maus hlgG F(ab')	Ziege F(ab') ₂ IgG	PE	Southern Biotechnology, AL, USA
Maus/ Ratten FoxP3, FJK-16s	Ratten IgG2a	FITC	Invitrogen/ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA

Tabelle 7: Lister der verwendeten konjugierten anti- Maus Antikörper

4.6 Zytokine

Zytokin	Hersteller
Imukin® (IFN-γ standard)	Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Germany
Proleukin® (IL-2 standard)	Novartis Pharma GmbH, Basel, Switzerland
Rekombinantes Human TGF-β1	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany

Tabelle 8: Liste der verwendeten Zytokine

4.7 Plasmid Vektoren

ID	Plasmid	Eigenschaft/ Referenz
#392	pCOLT-GALV	Retroviraler Vektor der die Expressionskassette des gibbon ape leukemia virus Hüllproteins (GALV env) trägt (Weijtens et al., 1998)
#393	pHIT 60	Retroviraler Vektor der die Expressionskassette der Moloney murine leukemia virus (M-MuLV) Proteine gag und pol trägt (Weijtens et al., 1998)
#422	pBullet_Leervektor	Retroviraler Vector mit multiple cloning site (MCS) für die Insertion von Genen
#607	pBullet-BW431/26scFv-Fc-CD28(tm+iz)-CD3ζ	Retroviraler Vektor der die Expressionskassette für den CEA-specific scFv CAR BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3ζ trägt (Hombach et al., 2001)
#1022	pBullet-hCD25	Retroviraler Vektor der die Expressionskassette für humanes CD25 trägt
#2134	pBullet_anti-mCD25scFv-mFc-mCD4TM-mCD28-mCD3z	Retroviraler Vektor der die Expressionskassette des Maus CD25 spezifischen CAR mCD25scFv-mFc-mCD4TM-mCD28-mCD3z enthält.
#2136	pScalps_puro_mIL2Ra	Lentiviraler Vektor der die Expressionskassette für murines CD25 enthält.
#2214	pMSCV_mCD25_mFc_mCD4TM_mCD28_mCD3zeta_P2A_LNGFR	Retroviraler Vektor speziell für die Virusproduktion in Phoenix ECO Zellen, der die Expressionskassette des Maus CD25 spezifischen CAR mCD25_mFc_mCD4TM_

		mCD28_mCD3zeta und LNGFR enthält.
#2222	pCL-Eco retroviral packaging vector_ env_gag_pol	Helferplasmid für die Produktion retroviraler Partikel mit ecotroper Pseudodypisierung
#2223	pCL-Ampho retroviral packaging vector_ env_gag_pol	Helferplasmid für die Produktion retroviraler Partikel mit amphotroper Pseudodypisierung
#2239	pMSCV_SP6_mIgG_mCD4TM_mCD28IC_mCD3zeta_P2A_LNGFR	Retroviraler Vektor der die Expressionskassette des TNP spezifischen CARs SP6_mIgG_mCD4TM_mCD28IC_mCD3zeta und LNGFR enthält.
#2196	pMSCV_mCD90.1	Retroviraler Vektor der die Expressionskassette für murines CD90.1 enthält.
#2299	pcDNA.3HIV1.GP.4xCTE	Lentiviraler Vektor, der die Expressionskassette für das HIV-1 GAG/POL-Protein enthält. Vorläufer-Strukturprotein des lentiviralen Partikels mit Matrix-, Capsid- und Nukleokapsid-Komponenten. Vorläuferprotein, das Komponenten der Reversen Transkriptase und der Integrase enthält.
#2300	P.MD2.G (VSVg)	Lentiviraler Vektor, der die Expressionskassette für das VSV-G-Protein enthält. (Vesikuläres Stomatitis-Virus G-Glykoprotein)
#2301	P.RSV.REV	Lentiviraler Vektor, der die Expressionskassette für das REV-Protein enthält. Bindet an das Rev Response Element (RRE) in ungespleißten und

		teilweise gespleißten Transkripten, um den Kernexport zu vermitteln.
2431	pBullet_TGFBR2-PDGFRb-IL2RB_P2A_mCD90.1	Retroviraler Vektor der die Expressionskassette für den monovalenten SWR und CD90.1 enthält.
2432	pBullet_memhIL-2long_P2A_mCD90.1	Retroviraler Vektor der die Expressionskassette für Membran gebundenes IL-2 mit langem linker und CD90.1 enthält.
2433	pBullet_memhIL-2short_P2A_mCD90.1	Retroviraler Vektor der die Expressionskassette für Membran gebundenes IL-2 mit kurzem linker und CD90.1 enthält.
2434	pBullet_cSWR_TGFbR2-PDGFRbTM-IL2Rb_TGFbR1-PDGFRbTM-IL2Rg_T2A_mCD90.1	Retroviraler Vektor der die Expressionskassette für den divalenten SWR und CD90.1 enthält.

Tabelle 9: Liste der verwendeten Plasmide mit laborinterner ID, Bezeichnungen und Eigenschaften

4.8 Bakterienstamm

Bakterienstamm	Eigenschaften
E.Coli DH5 α	F-, end A1, hsd R17 (r κ -, m κ -) sup E44, thi-1, lambda-, recA1, gyrA96, Φ 80 d lacZ δ M15

Tabelle 10: Beschreibung des verwendeten Bakterienstamms

4.9 Zelllinien

Zelllinie	Eigenschaften	Referenz
HEK 293T	epithelähnliche Zelle, die aus der Niere eines Patienten isoliert wurde (ATCC CRL-3216™) mit stabiler Expression des SV40 T Antigen; neomycin resistent.	(DuBridg e et al., 1987) ¹⁴⁵
HEK293 #1022	Stabil mit #1022 transduzierte HEK293 Zelllinie, die das humane CD25 auf der Zelloberfläche exprimiert.	-
HEK293 #2136	Stabil mit #2136 transduzierte HEK293 Zelllinie, die das murine CD25 auf der Zelloberfläche exprimiert	-
NIH/3T3	NIH/3T3 (ATCC CRL-1658™) ist eine Fibroblasten-Zelllinie, die aus einem Maus-NIH/Swiss-Embryo isoliert wurde.	(J L Jainchill, S A Aaronson, G J Todaro, 1969) ¹⁴⁶
Phoenix-ECO	Phoenix-ECO ist eine epitheliale Zelllinie, die 1996 aus der Niere eines Embryos isoliert wurde. Phoenix basiert auf HEK293T Zellen und ist eine Retrovirus-Produktionszelllinie der zweiten Generation für die Erzeugung von helferfreien ekotropen Retroviren.	(W S Pear et al. 1993) ¹⁴⁷
Platinum-A	Die Platinum- A Zelllinie für die retrovirus Produktion basiert auf der Zelllinie 293T. Plat-A Zellen enthalten die gag-, pol- und env (amphotrop) Gene.	CELL BIOLABS, INC.; (Zenke S et al. 2022) ¹⁴⁸

Tabelle 11: Liste der verwendeten Zelllinien

4.10 Primärzellen

Humane mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) wurden aus frischem Blut aus der Thrombozyten- und Leukozytenfraktion einer Blutspende von gesunden Spendern isoliert. Die Proben wurden vom Universitätsklinikum Regensburg bereitgestellt und genehmigt (Ethikantrag Nr. 21-2224-101).

Primäre Maus Tkonv und Treg Zellen wurden nach Aufarbeitung frisch entnommener Milzen von C57BL/6 oder BALB/c Mäusen durch FACS isoliert.

4.11 Software

Software	Anbieter
BioRender	BioRender
Benchling	Benchling
FACS Diva	BD Bioscience
FlowJo	FlowJo LLC
GraphPad Prism	GraphPad Software, Inc
Microsoft Excel	Microsoft
Miscrosoft Powerpoint	Microsoft
Microsoft Word	Microsoft
SnapGene Viewer	SnapGene

Tabelle 12: Liste der verwendeten Software und deren Anbieter

5 Methoden

5.1 Arbeiten mit Bakterien

5.1.1 Transformation von *E.coli* DH5 α Bakterien (SOP 2-4 Version001)

Zur Vorbereitung wurden chemokompetente Bakterien auf Eis für 20 Minuten aufgetaut. Parallel dazu wird eine Ligation/ DNA aufgetaut (im Falle einer Retransformation) oder DNA lösen (falls als Trockenpellet bestellt). Die Ligation oder 10-100 ng DNA wird den Bakterien hinzugefügt ohne zu vortexen, bevor der Ansatz 30 Minuten auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock der Probe wird für 90 Sekunden bei 42°C durchgeführt. Anschließend für 2 Minuten auf Eis inkubieren, bevor 600 μ L LB-Medium ohne Antibiotikum durch vorsichtiges Pipettieren zugegeben wird. Die Zellen wurden 1 Stunde bei 37°C und 200 U/min im Schüttelbakterienbrutkasten inkubiert. Danach wird die LB-Bakterienlösung 1 Minute lang bei 5000g zentrifugiert, 600 μ L des Überstandes verworfen, nach Resuspension im restlichen Überstand auf einer antibiotischen LB-Agar-Platte ausgestrichen und für 16 Stunden bei 37°C im nicht schüttelnden Inkubator inkubiert.

5.1.2 Long term storage of transformed bacteria in glycerol stocks (SOP 2-6 Version001)

Damit ein Bakterienklon wiederverwendet werden kann, wird er nach der Vermehrung in einer Übernachtskultur bei -80 °C kryokonserviert und für künftige Übernachtskulturen verwendet. Aus dem Rest der Flüssigkultur wird die Plasmid-DNA durch Miniprep isoliert und ihr Gehalt gemessen. Dafür wurden 300 μ L 87%igem Glycerin pro Konstrukt vorgelegt, 700 μ L der Bakteriensuspension in das Mikroröhrchen geben und resuspendiert. Den neuen Glycerinansatz bei -80°C lagern.

5.1.3 MiniPrep (SOP 2-5 Version001) PureLink™ Quick Plasmid MiniPrep-Kit

Bakterien wurden bei 4500g für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Pellets wurden in 250 μ L Puffer A1 resuspendiert. Für die Induktion der Lyse wurden 250 μ L Puffer A2 zugegeben. Das Röhrchen wird 6- 8-mal invertiert, 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und 300 μ L Puffer A3 zugegeben. Erneut 6- bis 8- mal invertieren. 5 Minuten lang bei 11.000 g bei Raumtemperatur in der Tischzentrifuge zentrifugieren. Geklärten Überstand auf die Säule dekantieren und 1 Minute lang bei 11.000 g zentrifugieren. Der Durchfluss wird verworfen und die Silikamembran mit 500 μ L Puffer AW gewaschen. Danach wird 1 Minute lang bei 11.000 g zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und mit 600 μ L Puffer A4 erneut gewaschen und 1 Minute lang bei 11.000 g zentrifugiert. Zum Trocknen der Silikatmembran wird das Röhrchen 2 Minuten bei 11.000 g zentrifugiert. Die Säule wird in ein 1,5 mL Eppi gegeben und mit geöffnetem Deckel für 1 Minute in einen Heizblock bei 50°C inkubiert, sodass der restliche Ethanol evaporiert. Um die DNA zu eluieren wird ddH₂O auf 50°C vorgewärmt und im Anschluss 50 μ L ddH₂O auf die Säule gegeben, 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und für 1 Minute bei 11.000 g zentrifugiert. Die DNA-Konzentration wird mit dem Nanodrop1000 gemessen.

5.1.4 MidiPrep (SOP 2-7 Version002)

Eine 100 mL LB- Bakterienkultur wird durch Pelletieren bei 4500g für 10 Minuten im schwingenden Rotor oder bei 8000g für 5 Minuten im feststehenden Rotor geerntet. Der Überstand wird verworfen je Pellet oder Konstrukt 8 mL RES-Puffer zugeben und vollständig resuspendiert. Die Lyse wird durch die Zugabe 8 mL LYS-Puffer und 5- maligem invertieren eingeleitet. Dann wird 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 8 ml Puffer NEU gestoppt. Das Lysat wird auf mit 5 ml EQU- Puffer equilibrierte Säulen geladen. Der Filter wird mit 5 ml EQU- Puffer nachgespült und nach Entfernen des Filters wird die Säule mit 8 ml Puffer WASH gespült. Die Elution erfolgt mit 5 ml Puffer ELU in ein 50 ml Falcon Röhrchen. Die DNA wird anschließend mit 3 ml Isopropanol gefällt und für 45 Minuten bei 4 °C und 4500 g pelletiert. Im Anschluss wird das Pellet mit 2 ml 70% Ethanol erneut gewaschen und in der Speedvac bei 40 °C und Vakuum für 5 min getrocknet.

5.2 Molekularbiologische Arbeiten

5.2.1 Klonieren (SOP 1-7 Ver001)

Beginn wurden Zielvektor und der Insert tragende Vektor mit Restriktionsenzymen BamHI und NcoI verdaut, um zum einen den Zielvektor zu öffnen und zum anderen das Insert des Insert tragenden Vektors freizugeben.

Jeweils ein Ansatz mit 1x Tango Puffer:

- 16,7 µL nukleasefreies Wasser
- 2 µL Tango-Puffer
- 1,5 µL DNA (1µg/µL)
- 0,1 µL NcoI / 0,2 µL BamHI

Die Ansätze wurden durch Anschneiden des Tubes gemischt und bei 37°C für 16 Stunden inkubiert. Der Zielvektor wird durch Behandlung mit antarktischer Phosphatase an den 5'-Enden dephosphoryliert. Dafür wurden 2 µL Antarktische Phosphatase-Reaktionspuffer (10 x) zu 5 Einheiten Antarktische Phosphatase gegeben und mit ddH₂O bis zu einem Gesamtvolumen von 20 µL aufgefüllt. Der Ansatz wird bei 37°C für 30 Minuten inkubiert, sofort darauf folgt das Abstoppen der Reaktion durch Hitzeinaktivierung bei 80°C für 2 Minuten. Die ganze Probe + 3,5 µL Ladefarbstoff wird durch Agarose Gel Elektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden Banden ausgeschnitten und mittels Gel- Extraction Kit wieder aufgereinigt. Darauf folgt eine Konzentrationsmessung am NanoDrop1000 um das geeignete Verhältnis von Vektor und Insert für die Ligation einstellen zu können. Das molare Verhältnis von Insert zu Vektor 3:1 wird mit folgendem Web basierten Tool berechnet:

(<https://nebiocalculator.neb.com/#!/Ligation> berechnen)

Der Ansatz mit 1x Ligase Puffer ist wie folgt zusammengesetzt:

- 100 ng Vektor-DNA und entsprechende Menge an Insert-DNA
- 2 Einheiten T4-Ligase
- 2 µL 10x Ligasepuffer

- ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 20 µL zugeben

Die Inkubation bei 14°C erfolgt über Nacht im PCR-Cycler. Danach folgt die Transformation von 1-10 µL der Ligation (SOP2-4 -Transformation). Zur Kontrolle der Integrität folgen MiniPreps (SOP2-5 -Miniprep) für Testverdau und MidiPreps (SOP2-7 -Midiprep) für positive Klone. Die zweite Integritätsprüfung erfolgt durch Sequenzierung mit passenden Primern.

5.2.2 Agarose Gel Elektrophorese

Die verdauten DNA-Fragmente wurden durch Elektrophorese in 1%igen (w/v) Agarosegelen getrennt. Mit GelRed (100 ng/ml) angereicherte Gele wurden bei 8-12 V/cm in 1x TAE-Puffer betrieben. 6x DNA Loading Dye wurde den DNA-Proben vor dem Auftragen auf das Gel zugesetzt, und die GeneRuler™ 1 kb DNA-Leiter wurde als DNA-Größenstandard verwendet. Für die DNA-Visualisierung wurde die Biometra BioDocAnalyze Live (BDALive) Workstation mit UVstar UV-Transilluminator mit Bandpassfilter (254 nm) verwendet.

5.2.3 Quantifizierung von DNA

Vor der Lagerung der DNA bei -20°C wurde die DNA-Konzentration spektrophotometrisch mit dem NanoDrop™ 1000 Spektrophotometer (ThermoFisher Scientific) gemessen. Dazu wird 1 µL DNA-Probe auf den NanoDrop™-Sockel aufgetragen, die DNA-Konzentration wird bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen, während die Proteinkonzentration bei 280 nm gemessen wird. Die Reinheit des Präparats von Proteinverunreinigungen wird durch das Verhältnis O.D. 260 nm / abs 280 nm definiert. Ein Verhältnis von größer- gleich 1,8 deutet auf eine hohe Reinheit der DNA hin, ein Wert <1,8 auf Verunreinigungen mit Proteinen und aromatischen Substanzen. Messwerte >1,8 deuten auf eine RNA-Kontamination hin.

5.2.4 Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde durchgeführt, um die Integrität entweder von neu geklonten Plasmiden oder von neuen Plasmiden, die von GenScript bezogen wurden, zu überprüfen. Für die Sequenzierung von Plasmiden jeglicher Art wurde die DNA an Microsynth SeqLab geschickt. Die Plasmid-DNA wurde in einer Konzentration von 100 ng/µL in einem Gesamtvolumen von 12 µL bereitgestellt. Die Primer wurden in einem separaten Röhrchen in einer Konzentration von 10 ng/µL und einem Gesamtvolumen von 20 µL vorgelegt. Für jede zusätzliche Reaktion mit demselben Primer müssen 3 zusätzliche µL zur Verfügung gestellt werden. In allen Fällen wurde der Prepaid- Label Sequenzier- Service genutzt.

5.3 Arbeiten mit eukaryotischen Zellkulturen

5.3.1 Zellkultur Bedingungen

Alle Zellkulturen wurden in einem Labor der Biosicherheitsstufe S2 unter einer Laminar-Flow-Haube (Klasse II) (HERASAFE 2030i, ThermoFisher Scientific) bearbeitet. Die Kulturen wurden in einer Atmosphäre mit gesättigter Luftfeuchte (95-100%) mit 5% oder 10% (v/v) CO₂ und 37°C gehalten. Die verwendeten Kulturmedien waren DMEM und RPMI1640 mit GlutaMAX™ oder complete DMEM für Maus- Zellkulturen, ergänzt mit 10% (v/v) FCS, 1 M HEPES, 10 mg/ml

Streptomycin und 10.000 U/ml Penicillin. Vor der Verwendung wurden die Medien und Zusätze auf 37°C vorgewärmt.

5.3.2 Passagieren adhärenter Zellen

Das Medium der adhärenen Zelllinie wurde abgenommen, 5 ml vorgewärmtes 1x PBS wurde zum Waschen der Zellen hinzugefügt. Trypsin/EDTA (3-5 ml) wurde zugegeben, um die gesamte Oberfläche des Kolbens zu bedecken und die Zellen wurden 2 Minuten lang bei 37 °C inkubiert. 5-10 ml frisches Kulturmedium wurden zugegeben, um die Reaktion von Trypsin/EDTA zu stoppen. Danach wurden die Zellen in ein 15/50 ml Falcon Röhrchen überführt und 5 Minuten lang bei 500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen wurden in frischem Kulturmedium resuspendiert und je nach Wachstumscharakteristik der Zelllinie, falls nicht an anderer Stelle spezifiziert, im Verhältnis 1:10 oder 1:20 zurück in den Kolben transferiert.

5.3.3 Kryokonservierung und Auftauen von Zelllinien und primären Zellen

Für die Langzeitlagerung der Zellen wurden die Zellen ($1-150 \times 10^6$) 5 Minuten lang bei 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 500 µl Kryomedium A (60 % FCS + 40 % RPMI 1640) und 500 µl Kryomedium B (80 % FCS + 20 % DMSO) resuspendiert und in ein Kryogefäß pipettiert. Die Kryofläschchen wurden in einen "Mr Frosty™ Freezing Container" (ThermoFisher Scientific) gegeben und in einen Gefrierschrank bei -80°C gelagert. Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoflaschen aus dem -80°C Gefrierschrank genommen und in 10 ml vorgewärmtem Kulturmedium resuspendiert. Die Zellen wurden 5 Minuten lang bei 300 x g zentrifugiert, um das DMSO zu entfernen. Schließlich wurden die Zellen in frischem Kulturmedium resuspendiert und in einem Zellkulturinkubator mit 5% oder 10% (v/v) CO₂ bei 37°C kultiviert.

5.3.4 Zellzählung

Die Zellzahl und Viabilität wurden mit dem Vi-CELL BLU cellcounter Analysegerät (Beckman Coulter) bestimmt. Für die Messung wurden 200 µl der Probe in ein Vi-CELL Blu Probengefäß gegeben und in die Kammer des Geräts eingeführt. Alternativ dazu wurden die Zellen manuell gezählt. Dafür wurden die Zellen mit Trypanblau verdünnt (1:10), um tote Zellen diskriminieren zu können und 10 µl der Mischung wurden in eine „Neubauer“-Zählkammer (Celeromics) gegeben. Die Gesamtzahl der Zellen wurde in jedem der 4 Quadrate gezählt. Die Gleichung zur Bestimmung der Zellzahl lautet wie folgt: Gesamtzellen / 0,4 (x (Verdünnungsfaktor) x 1000) = Gesamtzahl der Zellen /ml.

5.3.5 Arbeiten mit primären humanen Zellen

5.3.5.1 Isolation Humaner T Zellen

Die Isolation basiert auf der Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll. Menschliche PBMCs wurden aus Thrombozytenkegeln -ein Produkt das bei der Thrombozytenspende als Abfall anfällt- gesunder Spender isoliert, das von der Abteilung der Transfusionsmedizin des

Universitätsklinikums Regensburg zur Verfügung gestellt wurde. Das Trennverfahren basiert auf einer Polysaccharidlösung mit einer Dichte von 1,077 g/ml. Mononukleäre Zellen haben eine geringere Dichte als Erythrozyten und Granulozyten, daher sedimentieren sie nicht während des Zentrifugationsprozesses.

Zunächst wird die Blutprobe mit 1x PBS auf ein Volumen von 50 ml aufgefüllt. Anschließend wurden 25 ml des verdünnten Blutes vorsichtig auf 15 ml Human Pancoll Solution (PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland) in einem 50 ml Falcon Tube geschichtet. Die Mischung wird bei 2000 U/min mit einer Bremsgeschwindigkeit von 3 bei 20°C 20 Minuten lang zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Lymphozyten mit einer Pasteurpipette entnommen, in ein 50 ml Falcon Röhrchen überführt und dreimal mit 30 ml 1x PBS gewaschen (1400 U/min, 20°C, 10 Minuten).

Die Lymphozyten wurden zentrifugiert (400g/ 10'/ 4°C) und in 100µL FACS-Puffer pro 25x10⁶ Zellen aufgenommen. Es folgt die Zugabe von anti-CD25-PE Antikörpern (5 µL AK/ 100µL Zellsusp. à 25 x 10⁶ Zellen) und eine Inkubation der Zellen für 20 Minuten im Kühlschrank. Die Zellen wurden mit FACS-Puffer aufgefüllt und zentrifugiert (400g/ 10'/ 4°C). Das Zellpellet wird in 100µL FACS-Puffer pro 25x10⁶ aufgenommen, 25 µl anti-PE-Beads UltraPure pro 100µL FACS-Puffer pro 25 x 10⁶ Zellen zugegeben und für 15' im Kühlschrank inkubiert. Zellen wurden mit FACS-Puffer aufgefüllt und zentrifugiert (400g/ 10'/ 4°C). Im nächsten Schritt wird eine LS(MIDI)-MACS-Säule(n) mit pre- separation Filter (30 µm) versehen und anschließend mit 3ml MACS-Puffer äquilibriert.

Das Zellpellet wird möglichst luftblasenfrei in max. 100 x 10⁶ Zellen/ 500 µl MACS-Puffer aufgenommen und über den Filter auf die Säule gegeben; Tube mit 1000µl MACS-Puffer nachspülen und ebenfalls auf die Säule geben. Der Filter wird mit 3x 3ml MACS-Puffer nachgespült. Der Durchfluss wird nach Bedarf mit CD3/CD28 und IL-2 stimuliert und ist somit Ausgangsprodukt für die Tkonv Transduktion.

Die Säule wird auf ein 15ml Röhrchen überführt, mit 5ml MACS-Puffer aufgefüllt und durch zügiges Durchdrücken des Stempels eluiert. Diese CD25 positive Fraktion wird anschließend für die FACS- Sortierung vorbereitet und im ersten Schritt gefärbt. Dafür wird das Zellpellet in 100 µl FACS-Puffer pro 4 x 10⁶ Zellen aufgenommen.

Antikörper	Fluorochrom	Menge pro 100 µl Master Mix
CD4	PerCP	10 µl
CD45RA	FITC	10 µl
CD127	APC	1,5 µl

Tabelle 13: Zusammensetzung des Antikörper Färbeansatzes, für die Sortierung von naiven humanen Treg und Tkonv

Daraufhin wurden die Zellen bei 4 °C inkubiert, danach mit FACS-Puffer aufgefüllt und zentrifugiert (400g/ 10'/ 4°C). Im letzten Schritt wurden die Zellen über 30µM Filter in ein FACS-

Tube geben (ca. $10\text{-}20 \times 10^6/\text{mL}$) und sind bereit von einem(r) Operator(in) auf $\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{hoch}}$ $\text{CD127}^{\text{niedrig}}\text{CD45RA}^+$ am BD FACSFusion sortiert zu werden.

5.3.5.2 Kulturansatz humaner T Zellen

Die CD25^- oder sortierte naive Treg wurden am am Tag des Sorts/ MACS (Tag 0) zu je 1×10^6 Zellen/ml /Vertiefung in 24 well Platten gegeben und mit TransAct 1:100 und IL-2 versetzt. CD25^- Tkonv wurden mit 50 U/ ml und Tregs mit 600 U/ ml IL-2 kultiviert. Die Zellen wurden am Tag 2- 3 transduziert und am Tag 4 mit einem zusätzlichen Milliliter TexMACS Medium und der für Tkonv oder Treg entsprechenden Menge IL-2 versorgt. Am Tag 7 wurden die Zellen geerntet, neu ausgezählt, auf Transduktionsrate im Durchflusszytometer analysiert, auf $0,5 \times 10^6/\text{ml}$ eingestellt und erneut in Vertiefungen einer 24 well Platte ausgesäht. Dabei wurden sie mit TransACT 1:100 und der entsprechenden Menge IL-2 versehen. Die Zellen wurden wie beschrieben oder nach Bedarf am Tag10 oder 11 und Tag 14 versorgt.

5.3.5.3 Maus T Zellisolation und Kultur

Im Tierstall wird die benötigte Anzahl an Milzen entnommen, in ein Falcon mit RPMI-Medium überführt und dann im Labor unter der Sterilbank aufgearbeitet. Es wurden nur sterile Puffer - während Aufarbeitung auf Eis- und Zusätze verwendet. Eine bis maximal drei Milzen wurden in eine sterile Petrischale mit etwas RPMI/5 überführt, von eventuell anhängendem Fett befreit und mit gebogener Pinzette ausgestrichen. Die Zellen in der Petrischale mit einer 5 ml Pipette gut suspendieren und über ein $70 \mu\text{M}$ Zellsieb in ein 50 ml Falcon-Tube filtrieren und mit einem 1 ml Tuberkulin-Stöpsel vorsichtig durchdrücken. Die Petrischale wird zweimal mit RPMI/5 nachgespült und in dasselbe 50 ml Falcon-Tube überführt und auf ein Gesamtvolumen von mindestens 30 ml mit RPMI/10 aufgefüllt. Die Zellen wurden bei $500 \text{ xg}/5'/4^\circ\text{C}$ zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Erythrozyten Lyse erfolgt durch Zugabe von 3 ml 1x RBC-Puffer pro Milz. Die Inkubation wird für 5 min bei Raumtemperatur durchgeführt, mit 30-50 ml RPMI/10 wird die Reaktion gestoppt und anschließend bei $500 \text{ xg}/5'/4^\circ\text{C}$ zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellets wird in 1 ml RPMI/10 resuspendiert. Zur Entfernung eventuell durch die RBC-Lyse entstandener Zellaggregate wird eine erneute Filtration über $70 \mu\text{M}$ Zellsieb in ein neues 50 ml Falcon-Tube durchgeführt. Es folgt eine Zentrifugation bei $500 \text{ xg}/5'/4^\circ\text{C}$. Nun folgt die Aufnahme des Zellpellets in 80 μl sterilem FACS-Puffer pro 1×10^7 Zellen. Hier rechnet man mit 80 Mio. Zellen für eine gesunde C57BL/6 Milz und mit 100 Mio. Zellen für eine BALB/c Milz. Zunächst wird $1 \mu\text{l}$ Maus Fc-Block ($\alpha\text{-CD16/CD32}$) pro 1×10^7 Zellen zugegeben und für 5min auf Eis inkubiert. Danach wird der anti- CD25-PE Antikörper zu $1 \mu\text{l}/80 \mu\text{l}$ FACS- Puffer pro 1×10^7 Zellen zugegeben, suspendiert und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit sterilem FACS-Puffer aufgefüllt bei $500 \text{ xg}/5'/4^\circ\text{C}$ zentrifugiert, das Zellpellet in $40 \mu\text{l}$ sterilem FACS-Puffer pro 1×10^7 Zellen aufgenommen und $10 \mu\text{l}$ anti- $\text{PE-MicroBeads UltraPure}$ pro 1×10^7 Zellen hinzugegeben. Wiederum wird suspendiert und für auf Eis inkubiert. Danach wird mit sterilem FACS-Puffer aufgefüllt und über $70 \mu\text{M}$ Zell Sieb in ein neues 50 ml Falcon überführt. Darauf folgt eine Zentrifugation bei $500 \text{ xg}/5'/4^\circ\text{C}$. Das Zellpellet wird möglichst Luftblasenfrei in sterilem MACS-Puffer zu maximal 100×10^6 Zellen/500 μl aufgenommen und auf die

LS-MIDI Säule gegeben. Im nächsten Schritt wird mit 3 x 3ml MACS-Puffer nachgespült. Die CD25 negativ Fraktion stellt das Ausgangsmaterial für die Aktivierung, Kultivierung oder Transduktion von Tkonv dar. Die Säule wird auf ein 15 ml Röhrchen überführt, 5 ml MACS-Puffer wird zugegeben und der Stempel für die Elution durchgedrückt. Das Eluat stellt die CD25+ angereicherte Fraktion dar und ist Ausgangsprodukt für die sich anschließende Sortierung reiner naiver CD4+ Tkonv oder naiver Tregs.

Die Färbung der CD25+ Fraktion für die Zellsortierung mittels FACS erfolgt mit 4×10^6 Zellen/100 μ l. Die Zellen

Antikörper	Fluorochrom	Menge pro 100 μ l Master Mix
CD4	PB	1 μ l
CD62L	APC	2,3 μ l
CD8a	PerCP-Cy5.5	2 μ l

Tabelle 14: Zusammensetzung des Antikörper Färbeansatzes, für die Sortierung von naiven murinen Treg und Tkonv

Die Färbung erfolgt bei 15 Minuten Inkubation auf Eis. Danach wird mit sterilem FACS-Puffer aufgefüllt und bei 500 xg/5'/4°C zentrifugiert.

Das Zellpellet wird in sterilem FACS-Puffer bei einer maximalen Zellkonzentration von 20×10^6 Zellen/ 500 μ l resuspendiert bei gleichzeitigem Mindestsortvolumen von 500 μ l. Unmittelbar vor dem Sort wird durch ein 30 μ m Zellsieb in eine sterile FACS- Tube filtriert und mit Propidiumiodid (PI) versetzt. Um naive Tkonv zu erhalten wird die CD25- Fraktion auf CD4+CD8-CD25-CD62L^{hoch}, und für naive Treg auf CD4+CD8-CD25+CD62L^{hoch} sortiert.

Die erhaltenen Zellen wurden auf auf 100.000/ml mit cDMEM eingestellt, mit Miltenyi Treg activation Beads und IL-2 versetzt. Für Tkonv wird ein Bead zu Zell Verhältnis 2:1 und 100 U/ml und für Treg ein Bead zu Zell Verhältnis 4:1 und 2000 U/ml IL-2 eingesetzt. Abschließend wurden die Zellen zu je 100 μ l in 96 Well Platten Vertiefungen pipettiert und bei 37 °C im Zellkultur Inkubator kultiviert. Tkonv wurden an Tag 1, Treg an Tag 2 transduziert und an Tag 5 der entsprechenden IL-2 Konzentration mit 100 μ l cDMEM versorgt. An Tag 7 wurden die Zellen geerntet, von den Beads per Magnet separiert, im Durchflusszytometer auf ihre Transduktionsrate analysiert, mit frischen Beads und IL-2 versorgt und erneut zu 10^4 Zellen pro 96 Well Platten Vertiefung ausgesät.

5.3.6 Transfektion von HEK293T Zellen für die Lentivirale Transduktion

Die Transfektion von HEK 293T-Zellen erfolgte mit dem Transfektionsreagenz PEIpro® (Polyplus transfection) gemäß den Anweisungen des Herstellers. Am Tag vor der Transfektion wurden HEK 293T-Zellen in eine 10 cm große Petrischale ausgesät und in DMEM mit 10 % FCS

(v/v), 1 M HEPES, 10 mg/ml Streptomycin und 10.000 U/ml Penicillin kultiviert. Am Tag der Transfektion sollte die gewünschte Konfluenz der Zellen etwa 70-80 % betragen. Die Konstrukt-DNA wurde mit der Helper-Plasmid-DNA in DMEM-Medium ohne Zusätze gemischt. Die DNA/Helperlösung wurde mit der Transfektionsreagenz-Lösung gemischt, geschüttelt und 15 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit wurde der Überstand der HEK 293T-Zellen gegen RPMI1640+ GlutaMax™ ausgetauscht, welches mit 1 M HEPES, 10 mg/ml Streptomycin und 10.000 U/ml Penicillin supplementiert ist. Nach der Inkubation wurde das DNA/Transfektionsreagenz-Gemisch tropfenweise zu den HEK 293T-Zellen gegeben. Die Zellen wurden dann über Nacht bei 37°C in einem 5%igen (v/v) CO₂-Inkubator inkubiert. Der folgende Transfektionsprozess wurde durchgeführt.

Kulturgefäß	Anzahl der HEK 293T Zellen	Gesamtvolumen	Gesamtmenge der DNA	Volumen des DNA Ansatzes	Volumen PEIpro® Reagenz	Volumen des PEIpro® Ansatzes	Gesamtvolumen des Ansatzes
10 cm Petri Schale	3 x 10 ⁶	10 ml	25 µg (Lenti)	250 µl	20 µl	250 µl	545 µl (Lenti)

Tabelle 15: Übersicht des Transfektionsschemas für die Transfektion von HEK293T

DNA	Name	Volumen
Helfer Plasmid	pcDNA.3HIV1.GP.4xCTE	5 µg (5 µl)
Helfer Plasmid	P.MD2.G (VSVg)	5 µg (5 µl)
Helfer Plasmid	P.RSV.REV	5 µg (5 µl)
Kodierendes Plasmid	#2136 pScalps_IL2Ra_puro	10 µg (10 µl)

Tabelle 16: Plasmide welche für die Produktion von Lentiviren verwendet wurden

5.3.7 Lentivirale Transduktion von HEK293 Zellen

Der Virusüberstand wurde durch Transfektion von HEK293T Zellen hergestellt. Nach der Ernte des Virusüberstandes wurden 10 ml frisches Medium (DMEM GlutaMax™, 10% FCS (v/v), mit 1 M HEPES, 10 mg/ml Streptomycin und 10.000 U/ml Penicillin) zu den transfizierten HEK 293T-Zellen gegeben, um am nächsten Tag eine zweite Ernte durchzuführen. HEK293 Zellen (2 x 10⁶) wurden in 10 ml Virusüberstand resuspendiert und in eine T25 Kulturflasche überführt, die 24 Stunden zuvor mit Poly-D-Lysin (PDL, 10 µg/ml in 2 ml sterilem destilliertem H₂O) beschichtet worden war. Die Zellen und der Virusüberstand wurden bei 1600 g für 1 Stunde bei 32°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen 24 Stunden lang bei 37°C in einem 5%

(v/v) CO₂ Inkubator kultiviert. Am nächsten Tag wurde dieser Vorgang mit dem frisch hergestellten Virusüberstand wiederholt.

5.3.8 Retrovirale Transduktion

5.3.8.1 Humane T Zellen

An Tag -4 vor MACS der Tkonv und der Sortierung der Treg Zellen wurden Platinum A Zellen aufgetaut, zu $1,5 \times 10^6$ / T75 Kulturflaschen ausgesät und bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. An Tag -1 wurden Plat-A Zellen passagiert und zu $1,8 \times 10^6$ Zellen pro T75-Zellkulturflasche in einem Gesamtvolumen von 10 ml ausgesät und bei 37°C, 5% CO₂ kultiviert. An Tag 0 wurden humane FACS sortierte Tregs oder MACS sortierte Tkonv aktiviert und in Kultur gebracht wie unter 5.3.5.1 beschrieben. Ebenfalls an Tag 0 wurden die aus gesäten Plat-A Zellen transfiziert. Hierfür wird zunächst der Phänotyp überprüft. Die Konfluenz der Kultur war nicht >70 %.

Kultur-gefäß	Anzahl der HEK 293T Zellen	Gesamt-volumen	Gesamt-Menge der DNA	Volumen OptiMEM	Volumen TransIT® Reagenz	Gesamt-Volumen des Ansatzes
T75 Kultur-flasche	$1,8 \times 10^6$	10 ml	18 µg	1900µl	60 µl	1960 µl

Tabelle 17: Übersicht des Transfektionsschemas für die Transfektion von Platinum-A Zellen

DNA	Name	Volumen
Helfer Plasmid	pCL_Ampho	6 µg (6 µl)
Kodierendes Plasmid	...	12 µg (12 µl)

Tabelle 18: Volumen und Zusammensetzung der DNA in Transfektionsansätzen der retroviralen Transduktion von humanen T Zellen

Die Plasmid DNA wurde nach dem Auftauen gevortext und für 5 Minuten bei 20 000 xg zentrifugiert. Nach der Präparation des Transfektionsansatzes wird dieser für 20 Minuten in Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der Ansatz langsam tropfenweise und unter Schwenken der Kulturflasche zu den Plat-A pipettiert und bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert.

An Tag 1 wurden 24 well Platten für zwei Transduktionen an Tag 2 und 3 mit PDL beschichtet. Dafür wird eine Lösung aus 10 µg/ml PDL in ddH₂O (Stock Lösung: 1 mg/mL) hergestellt und zu 500 µl pro Vertiefung pipettiert. Die Inkubation erfolgte bei 4°C über Nacht.

An Tag 2 wurde die erste Transduktion durchgeführt. Während dem Vorwärmen der Zentrifuge wurden die Virusüberstände geerntet und bei 2000 g für 5 Minuten abzentrifugiert, um

mögliche Zellkontamination zu entfernen. Die Plat-A wurden mit frischen DMEM versorgt. Danach wurde die PDL- Lösung aus den 24 Well Platten entfernt und durch 2 ml virushaltigen Überstand ersetzt. Anschließend wurden die Platten für 1h bei 3000 g, 30°C, decel 2 zentrifugiert. Währenddessen wurden die aktivierten Tregs oder Tkonv geerntet und entsprechend der Anzahl an Transduktionen plus eine Gruppe NTs aufgeteilt, jedoch zu mindestens 0.1×10^6 Zellen pro Gruppe. Danach wurden die Treg mit 1 ml entsprechendem virushaltigen Überstand versetzt und mit 600 U/ ml IL-2 versorgt. Daraufhin wird der virushaltige Überstand der 24 well Platten abgenommen, verworfen und durch den entsprechenden Treg – Virus Ansatz ersetzt. Die Platten wurden im letzten Schritt für 10 min bei 250 g und decel 2 zentrifugiert und danach bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert.

An Tag 3 erfolgte die zweite Transduktion nach denselben Vorgaben. Nach 6 Stunden Inkubationszeit wurden die Treg geerntet, abzentrifugiert, der Überstand verworfen und mit frischem TexMACS Medium, TransACT in der Konzentration 1:100 und 600 U/ ml IL-2 versorgt. An Tag 6 wurde die Ermittlung der Transduktionseffizienz am Durchflusszytometer durchgeführt.

5.3.8.2 Murine T Zellen & NIH/3T3 Zellen

An Tag 0 wurden Phoenix ECO Zellen zu $1,6 \times 10^6$ Zellen pro 6 Well Platten Vertiefung ausgesät und für 6 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert Diese Platten wurden zuvor mit 1 ml pro Vertiefung 0,1% Gelatine für 1h bei 37 °C im Zellkulturinkubator beschichtet. Für die Supplementierung des DMEM- Mediums für Phoenix-ECO Zellen wie das cDMEM für die Maus Kulturen wurde das FCS von SigmaAldrich verwendet. Nach der Inkubationszeit erfolgte die Präparation der Transfektionsansätze. Dafür wurde Plasmid DNA aufgetaut, gevortext und für 5 Minuten bei 20 000 g zentrifugiert.

Kultur-gefäß	Anzahl der HEK 293T Zellen	Gesamt-volumen	Gesamt-Menge der DNA	Volumen OptiMEM	Volumen TransIT® Reagenz	Gesamt-Volumen des Ansatzes
Vertiefung einer 6-Well Platte	$1,6 \times 10^6$	2 ml	4 µg	250 µl	12 µl	262 µl

Tabelle 19: Übersicht des Transfektionsschemas für die Transfektion von Phoenix ECO Zellen

DNA	Name	Volumen
Helfer Plasmid	pCL_Eco	1 µg (6 µl)
Kodierendes Plasmid	...	3 µg (12 µl)

Tabelle 20: Volumen und Zusammensetzung der DNA in Transfektionsansätzen der retroviralen Transduktion von murinen T Zellen

Für die Herstellung des Transfektionsansatzes wurde das OptiMEM vorgelegt, die DNA hinzu pipettiert und zuletzt das TransIT Reagenz tropfenweise unter Anschneiden des Tubes hinzugegeben. Daraufhin wurden die Ansätze bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss für 30 Minuten inkubiert. Danach wurden die Ansätze tropfenweise und unter Schwenken der Kulturschale den Phoenix ECO hinzu pipettiert. An diesem Tag wurden simultan Treg wie in Kapitel 5.3.5.2 beschrieben sortiert und aktiviert.

An Tag 1, 16 Stunden nach Inkubation des Transfektionsansatzes, wurde das Kulturmedium der Phoenix ECO vollständig aufgenommen, verworfen und mit 1,2 ml frischem DMEM ersetzt. Danach wurden NIH/3T3 Zellen zu 15 000 Zellen pro Vertiefung einer 96 flat Well Platte in DMEM ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

An Tag 2, 24 Stunden nach Austausch des Mediums, wurden die Tregs und NIH/3T3 Zellen transduziert. Hierfür wurden die virushaltigen Überstände geerntet und für fünf Minuten bei 2000 g zentrifugiert. Danach wurden die Überstände mit Polybren versetzt und jeweils zu 100 µl mit den Treg, Tkonv oder NIH/3T3 Kulturen in den 96 well Platten vorsichtig gemischt. Die finale Konzentration von 200 µl Kultur mit Virus, setzt sich aus 100 µl Kulturmedium plus Zellen und 100µl virushaltigen Überstand plus Polybren zusammen. Die finale Konzentration in der Kultur enthielt für Treg 3 µg/ ml Polybren, für Tkonv und für NIH/3T3 Zellen 16 µg/ ml Polybren.

Nach 6,5- stündiger Inkubationszeit wurden 160 µl Medium von den Zellen abgenommen und mit 200µl frischem cDMEM supplementiert mit IL-2 ersetzt. Treg erhielten 2000 U/ ml IL-2, Tkonv 100 U/ ml und NIH/3T3 Zellen kein IL-2. An Tag 7 kann die Transduktionseffizienz im Durchflusszytometer ermittelt werden.

5.3.9 FACS- Analyse; Basisprotokoll zum Färben mit konjugierten Antikörpern

Für die Analyse im Durchflusszytometer wurden 0,2- 1 x 10⁶ Zellen in ein FACS- Röhrchen überführt und mit 2 ml FACS- Puffer zentrifugiert (500 g, 4 min, RT). Der Überstand wurde verworfen. Als Waschschrift wurde dem Röhrchen 2 ml FACS- Puffer zugegeben, resuspendiert und anschließend zentrifugiert (500 g, 4 min, RT). Der Überstand wurde rückstandsfrei abgenommen, den Zellen 100 µl Antikörper Mix zugegeben und anschließend resuspendiert. Die Zellen wurden im Kühlschrank bei 4 °C für 20 Minuten inkubiert. Darauf folgten zwei Waschschriffe bei dem jeweils 2 ml FACS- Puffer pro Röhrchen zugeben wurden, resuspendiert und zentrifugiert wurde (500 g, 4 min, RT). Die Zellen wurden vor der Analyse in 300 µl FACS- Puffer aufgenommen und bis zur Analyse im Durchflusszytometer lichtgeschützt auf Eis gelagert.

Intrazelluläre Färbungen mit anti- human oder murinem FoxP3 und pSTAT5 wurden nach Herstellerprotokollen der Färbekits durchgeführt

5.3.10 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

MaxiSorp™ Mikrotiterplatten wurden mit Capture- Antikörpern beschichtet (50 µl/ Vertiefung) und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten zur Verhinderung

unspezifischer Bindungen mit 1% (w/v) BSA in 1x PBS (200 µl/ Vertiefung) für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Plattenschüttler bei 300 U/min blockiert. Die Platten wurden dreimal mit PBS-T (200 µl/ Vertiefung) gewaschen, bevor der Kulturüberstand (50 µl/ Vertiefung) und die Standardproben (100 µl/ Vertiefung) zugegeben wurden. Die Platten wurden 2 Stunden lang bei Raumtemperatur auf dem Plattenschüttler mit 300 U/min geschüttelt. Nach der Inkubation wurden die Platten viermal mit PBS-T (200 µl/ Vertiefung) gewaschen und biotinylierte Antikörper in 1 % (w/v) BSA in PBS-T (50 µl/ Vertiefung) zugegeben; die Platten wurden eine Stunde lang bei Raumtemperatur auf einem Plattenschüttler bei 300 rpm inkubiert. Die Platten wurden viermal mit PBS-T (200 µl/Vertiefung) gewaschen und Streptavidin-POD (1:10.000 in 1% (w/v) BSA in PBS-T, 50 µl/Vertiefung) zugegeben; die Platten wurden 30 Minuten lang bei Raumtemperatur auf einem Plattenschüttler bei 300 U/min inkubiert. Schließlich wurden die Platten fünfmal mit PBS-T (200 µl/Vertiefung) gewaschen, bevor ABTS (10 mg/ml in 1 ml ABTS-10x-Puffer und 9 ml ddH₂O, 50 µl/Vertiefung) zugegeben wurde. Die Analyse erfolgte mit einem Tecan Spark 20M Microplate Reader (Absorption 405 nm, 1-ref 405 - 490 nm). Die Konzentration der gebundenen Proteine wurde anhand der Absorptionskurve einer Standardsequenz mit bekannter Konzentration berechnet. Die Tests wurden in dreifacher Ausfertigung durchgeführt. Für den ELISA wurde folgendes verwendet:

IFN-γ ELISA	
Beschichtungs Antikörper	1 µg/ml Maus anti-human IFN- γ
Antikörper zur Detektion	0.5 µg/ml biotin Maus anti-human IFN- γ
Standard	1:10,000 der Stock Lösung Imukin® 20 ng/ml IFN- γ in 1% (w/v) BSA in PBS-T

Tabelle 21: Übersicht der Komponenten die für die Detektion von IFN- γ verwendet wurden

5.3.11 Aktivierungs- Assay via CAR crosslinking

Eine Polysorb 96 flat Well Platte wurde mit 50 µl einer Lösung von unkonjugiertem anti- Maus IgG Antikörper (H+L), gelöst in PBS, in den Konzentrationen 1 µg/ ml und 10 µg/ ml beschichtet. Als Kontrollen wurden Vertiefungen mit 1x PBS überschichtet. Die Platte wurde bei 4 °C über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Lösung rückstandsfrei abgenommen und 10⁵ CAR T Zellen pro 96 Lochvertiefung und die entsprechenden Kontrollen ausgesät, für 72 Stunden inkubiert und im Anschluss im Durchflusszytometer auf ihre LAG-3 Expression untersucht. Zuvor wurden die Gruppen in FlowJo auf morphologisch integre, Singletten und Viable Zellen diskriminiert. Es wurden technische Triplikate angefertigt

5.3.12 Proliferations Assay

Die zu untersuchenden Zellen wurden nach Invitrogen™eBioscience™ Cell Proliferation Dye eFluor™ 450 Herstellerprotokoll gefärbt. Zunächst wurde dafür eine Einzelzellsuspension der zu kennzeichnenden Zellen vorbereitet und zwei Mal mit PBS gewaschen, um jegliches Serum zu entfernen. Die Zellen wurden in einer Konzentration von 10×10^6 / ml aufgenommen und das minimale Endvolumen von 0,5 ml 1x PBS nicht unterschritten. Simultan wurde eine 2 μ M Lösung Zellproliferationsfarbstoffs eFluor™ 450 in PBS (auf Raumtemperatur vorgewärmt) vorbereitet, welche im nächsten Schritt im Verhältnis 1:1 mit der Zellsuspension sehr gut gemischt wurde. Danach wurden die Ansätze gevortext, bevor diese für 10 Minuten bei 37 °C im Dunkeln inkubierten. Die Färbereaktion wurde durch die Zugabe von Kulturmedium in fünffachen Volumenverhältnis gestoppt. Danach wurden die Zellen drei Mal mit Medium gewaschen. mbIL-2, SWR Tregs und die entsprechenden Kontrollen wurden in 24 Well Platten Lochvertiefungen in einer Konzentration von $0,5 \times 10^6$ / ml und 500 μ l pro Vertiefung ausgesät und 5 Tage bei 37 °C und 5% CO₂ im Zellkulturinkubator kultiviert. An Tag 5 wurden die Zellen ausgezählt und im Durchflusszytometer auf ihre Proliferation untersucht. Die Zellen wurden in FlowJo auf morphologisch integre, Singletten, viable und die Oberflächenmarker CD4 und CD25 diskriminiert, bevor das Maß der Proliferation analysiert wurde.

Für „starvation assays“ humaner mbIL-2 und SWR Tregs wurde IL-2 durch 3 maliges Waschen der Treg Kultur entfernt.

5.3.13 Suppressions Assay

CD4+ T Responder Zellen wurden nach Invitrogen™eBioscience™ Cell Proliferation Dye eFluor™ 450 Herstellerprotokoll gefärbt (Kapitel 5.3.12) und zu 50 000 Zellen pro 96 Well Platten Lochvertiefung ausgesät. Mock und CD25 CAR Treg Zellen wurden in absteigender Konzentration eingesetzt, sodass sich Treg zu Tresp Verhältnisse von 1:4 bis 1:2048 ergaben. Der Ansatz wurde mit CD3/ CD28 Treg expansion Beads im Tresp zu Bead Verhältnis 1:2 versetzt und ohne IL-2 für 96 Stunden kultiviert. Die Proliferation wurde am Durchflusszytometer ermittelt. Die analysierten Zellen wurden auf morphologisch integre, Singletten, viable und CD4 Oberflächenmarker diskriminiert, bevor das Maß der Proliferation ermittelt wurde. Die Analyse wurde mit Hilfe von Flow Jo durchgeführt. Die Suppression in Prozent wird durch die folgende Formel berechnet:

$$100 - \left(\frac{\text{divisionindex Treg Probe}}{\text{divisionindex Positivkontrolle}} \right) * 100 = \text{Suppression} [\%]$$

Diese Berechnungsmethode wurde publiziert von McMurchy und Levings (2012)¹⁴⁹ Der divisionindex wurde mit dem FlowJo Plug in Proliferation analysis ermittelt.

6 Literaturverzeichnis

1. Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T. & Ono, M. Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell* **133**, 775–787 (2008).
2. Liu, W. *et al.* CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J. Exp. Med.* **203**, 1701–1711 (2006).
3. Barzaghi, F. *et al.* Long-term follow-up of IPEX syndrome patients after different therapeutic strategies: An international multicenter retrospective study. *J. Allergy Clin. Immunol.* **141**, 1036-1049.e5 (2018).
4. Bennett, C. L. *et al.* The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat. Genet.* **27**, 20–21 (2001).
5. Okeke, E. B. & Uzonna, J. E. The Pivotal Role of Regulatory T Cells in the Regulation of Innate Immune Cells. *Front. Immunol.* **10**, (2019).
6. Onishi, Y., Fehervari, Z., Yamaguchi, T. & Sakaguchi, S. Foxp3+ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 10113–10118 (2008).
7. Akkaya, B. *et al.* T regulatory cells mediate specific suppression by depleting peptide-MHC class II from dendritic cells. *Nat. Immunol.* **20**, 218–231 (2019).
8. Akkaya, B. *et al.* Tregs orchestrate antigen specific suppression via stripping cognate peptide-MHCII from the DC surface. *J. Immunol.* **200**, 47.20-47.20 (2018).
9. Akkaya, B. *et al.* Unique interaction dynamics and peptide-MHC class II (pMHC II) transendocytosis lead to antigen-specific T regulatory cell (Treg)-mediated suppression. *J. Immunol.* **198**, 80.8-80.8 (2017).
10. Fallarino, F. *et al.* Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **4**, 1206–1212 (2003).
11. Much Ado about Adenosine: Adenosine Synthesis and Function in Regulatory T Cell Biology | The Journal of Immunology | American Association of Immunologists. <https://journals.aai.org/jimmunol/article/185/4/1993/103189/Much-Ado-about-Adenosine-Adenosine-Synthesis-and>.
12. Zhu, Z. *et al.* IL-35 promoted STAT3 phosphorylation and IL-10 production in B cells, but its production was reduced in patients with coronary artery diseases. *Hum. Immunol.* **79**, 869–875 (2018).
13. Tsuchida, Y. *et al.* TGF- β 3 Inhibits Antibody Production by Human B Cells. *PLOS ONE* **12**, e0169646 (2017).
14. Dooley, A., Quintana, M., Cheung, M., Sun, L. L. & Gupta, N. The B cell IL-10 receptor suppresses antibody production. *J. Immunol.* **200**, 164.9-164.9 (2018).
15. Boks, M. A. *et al.* IL-10-generated tolerogenic dendritic cells are optimal for functional regulatory T cell induction — A comparative study of human clinical-applicable DC. *Clin. Immunol.* **142**, 332–342 (2012).

16. Strobl, H. & Knapp, W. TGF- β 1 regulation of dendritic cells. *Microbes Infect.* **1**, 1283–1290 (1999).
17. Wallet, M. A., Sen, P. & Tisch, R. Immunoregulation of Dendritic Cells. *Clin. Med. Res.* **3**, 166–175 (2005).
18. Speck, S. *et al.* TGF- β Signaling Initiated in Dendritic Cells Instructs Suppressive Effects on Th17 Differentiation at the Site of Neuroinflammation. *PLOS ONE* **9**, e102390 (2014).
19. Thepmalee, C., Panya, A., Junking, M., Chieochansin, T. & Yenchitsomanus, P. Inhibition of IL-10 and TGF- β receptors on dendritic cells enhances activation of effector T-cells to kill cholangiocarcinoma cells. *Hum. Vaccines Immunother.* **14**, 1423–1431 (2018).
20. Safinia, N., Scotta, C., Vaikunthanathan, T., Lechler, R. I. & Lombardi, G. Regulatory T Cells: Serious Contenders in the Promise for Immunological Tolerance in Transplantation. *Front. Immunol.* **6**, (2015).
21. Schwarz, A. *et al.* Fine-Tuning of Regulatory T Cell Function: The Role of Calcium Signals and Naive Regulatory T Cells for Regulatory T Cell Deficiency in Multiple Sclerosis. *J. Immunol.* **190**, 4965–4970 (2013).
22. Schmidt, A., Oberle, N. & Krammer, P. Molecular Mechanisms of Treg-Mediated T Cell Suppression. *Front. Immunol.* **3**, (2012).
23. Human T Regulatory Cells Can Use the Perforin Pathway to Cause Autologous Target Cell Death - ScienceDirect. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074761304002729?via%3Dihub>.
24. Bodmer, J.-L. *et al.* TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. *Nat. Cell Biol.* **2**, 241–243 (2000).
25. Involvement of cellular death in TRAIL/DR5-dependent suppression induced by CD4+CD25+ regulatory T cells | Cell Death & Differentiation. <https://www.nature.com/articles/4402220>.
26. Francisco, L. M. *et al.* PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J. Exp. Med.* **206**, 3015–3029 (2009).
27. Giancchetti, E. & Fierabracci, A. Inhibitory Receptors and Pathways of Lymphocytes: The Role of PD-1 in Treg Development and Their Involvement in Autoimmunity Onset and Cancer Progression. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
28. Chinen, T. *et al.* An essential role for the IL-2 receptor in Treg cell function. *Nat. Immunol.* **17**, 1322–1333 (2016).
29. Delacher, M. *et al.* Single-cell chromatin accessibility landscape identifies tissue repair program in human regulatory T cells. *Immunity* **54**, 702–720.e17 (2021).
30. Burzyn, D. *et al.* A Special Population of Regulatory T Cells Potentiates Muscle Repair. *Cell* **155**, 1282–1295 (2013).
31. Marek-Trzonkowska, N. *et al.* Administration of CD4+CD25highCD127– Regulatory T Cells Preserves β -Cell Function in Type 1 Diabetes in Children. *Diabetes Care* **35**, 1817–1820 (2012).

32. Bluestone, J. A. *et al.* Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells. *Sci. Transl. Med.* **7**, 315ra189-315ra189 (2015).
33. Desreumaux, P. *et al.* Safety and Efficacy of Antigen-Specific Regulatory T-Cell Therapy for Patients With Refractory Crohn's Disease. *Gastroenterology* **143**, 1207-1217.e2 (2012).
34. Todo, S. *et al.* A pilot study of operational tolerance with a regulatory T-cell-based cell therapy in living donor liver transplantation. *Hepatology* **64**, 632–643 (2016).
35. Chandran, S. *et al.* Polyclonal Regulatory T Cell Therapy for Control of Inflammation in Kidney Transplants. *Am. J. Transplant.* **17**, 2945–2954 (2017).
36. Skuljec, J. *et al.* Chimeric Antigen Receptor-Redirected Regulatory T Cells Suppress Experimental Allergic Airway Inflammation, a Model of Asthma. *Front. Immunol.* **8**, 1125 (2017).
37. Trzonkowski, P. *et al.* First-in-man clinical results of the treatment of patients with graft versus host disease with human ex vivo expanded CD4+CD25+CD127– T regulatory cells. *Clin. Immunol.* **133**, 22–26 (2009).
38. Theil, A. *et al.* Adoptive transfer of allogeneic regulatory T cells into patients with chronic graft-versus-host disease. *Cytotherapy* **17**, 473–486 (2015).
39. Zeng, H., Zhang, R., Jin, B. & Chen, L. Type 1 regulatory T cells: a new mechanism of peripheral immune tolerance. *Cell. Mol. Immunol.* **12**, 566–571 (2015).
40. Yadav, M., Bluestone, J. & Stephan, S. Peripherally Induced Tregs – Role in Immune Homeostasis and Autoimmunity. *Front. Immunol.* **4**, (2013).
41. Gandhi, R. *et al.* Cutting Edge: Human Latency-Associated Peptide+ T Cells: A Novel Regulatory T Cell Subset. *J. Immunol.* **184**, 4620–4624 (2010).
42. Riegel, C. *et al.* Efficient treatment of murine acute GvHD by in vitro expanded donor regulatory T cells. *Leukemia* **34**, 895–908 (2020).
43. In vitro-expanded donor alloantigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cells promote experimental transplantation tolerance - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17003369/>.
44. Mottet, C., Uhlig, H. H. & Powrie, F. Cutting Edge: Cure of Colitis by CD4+CD25+ Regulatory T Cells1. *J. Immunol.* **170**, 3939–3943 (2003).
45. Suppression of Disease in New Zealand Black/New Zealand White Lupus-Prone Mice by Adoptive Transfer of Ex Vivo Expanded Regulatory T Cells1 | The Journal of Immunology | American Association of Immunologists. <https://journals.aai.org/jimmunol/article/177/3/1451/209/Suppression-of-Disease-in-New-Zealand-Black-New>.
46. Marek-Trzonkowska, N., Myśliwec, M., Siebert, J. & Trzonkowski, P. Clinical application of regulatory T cells in type 1 diabetes. *Pediatr. Diabetes* **14**, 322–332 (2013).
47. Brunstein, C. G. *et al.* Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics. *Blood* **117**, 1061–1070 (2011).

48. Di Ianni, M. *et al.* Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood* **117**, 3921–3928 (2011).
49. Brunstein, C. G. *et al.* Umbilical cord blood–derived T regulatory cells to prevent GVHD: kinetics, toxicity profile, and clinical effect. *Blood* **127**, 1044–1051 (2016).
50. Martelli, M. F. *et al.* HLA-haploidentical transplantation with regulatory and conventional T-cell adoptive immunotherapy prevents acute leukemia relapse. *Blood* **124**, 638–644 (2014).
51. Yeh, W.-I. *et al.* Avidity and Bystander Suppressive Capacity of Human Regulatory T Cells Expressing De Novo Autoreactive T-Cell Receptors in Type 1 Diabetes. *Front. Immunol.* **8**, 1313 (2017).
52. Riley, J. L., June, C. H. & Blazar, B. R. Human T Regulatory Cell Therapy: Take a Billion or So and Call Me in the Morning. *Immunity* **30**, 656–665 (2009).
53. Giang, S. & La Cava, A. Regulatory T Cells in SLE: Biology and Use in Treatment. *Curr. Rheumatol. Rep.* **18**, 67 (2016).
54. Sackstein, R., Schatton, T. & Barthel, S. R. T-lymphocyte homing: an underappreciated yet critical hurdle for successful cancer immunotherapy. *Lab. Invest.* **97**, 669–697 (2017).
55. Wright, G. P. *et al.* Adoptive therapy with redirected primary regulatory T cells results in antigen-specific suppression of arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 19078–19083 (2009).
56. Brusko, T. M. *et al.* Human Antigen-Specific Regulatory T Cells Generated by T Cell Receptor Gene Transfer. *PLOS ONE* **5**, e11726 (2010).
57. Sagoo, P. *et al.* Human Regulatory T Cells with Alloantigen Specificity Are More Potent Inhibitors of Alloimmune Skin Graft Damage than Polyclonal Regulatory T Cells. *Sci. Transl. Med.* **3**, 83ra42–83ra42 (2011).
58. Joffre, O. *et al.* Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T lymphocytes. *Nat. Med.* **14**, 88–92 (2008).
59. Putnam, A. L. *et al.* Clinical Grade Manufacturing of Human Alloantigen-Reactive Regulatory T Cells for Use in Transplantation. *Am. J. Transplant.* **13**, 3010–3020 (2013).
60. Tang, Q. & Lee, K. Regulatory T-cell therapy for transplantation: how many cells do we need? *Curr. Opin. Organ Transplant.* **17**, 349–354 (2012).
61. Verginis, P., McLaughlin, K. A., Wucherpfennig, K. W., von Boehmer, H. & Apostolou, I. Induction of antigen-specific regulatory T cells in wild-type mice: Visualization and targets of suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 3479–3484 (2008).
62. Tsang, J. Y.-S. *et al.* Conferring indirect allospecificity on CD4⁺CD25⁺ Tregs by TCR gene transfer favors transplantation tolerance in mice. *J. Clin. Invest.* **118**, 3619–3628 (2008).
63. Sicard, A., Levings, M. K. & Scott, D. W. Engineering therapeutic T cells to suppress alloimmune responses using TCR s, CAR s, or BAR s. *Am. J. Transplant.* **18**, 1305–1311 (2018).
64. Dawson, N. A. J., Vent-Schmidt, J. & Levings, M. K. Engineered Tolerance: Tailoring Development, Function, and Antigen-Specificity of Regulatory T Cells. *Front. Immunol.* **8**, 1460 (2017).

65. June, C. H. & Sadelain, M. Chimeric Antigen Receptor Therapy. *N. Engl. J. Med.* **379**, 64–73 (2018).
66. Abken, H. Building on Synthetic Immunology and T Cell Engineering: A Brief Journey Through the History of Chimeric Antigen Receptors. *Hum. Gene Ther.* **32**, 1011–1028 (2021).
67. *Introduction to antibody engineering.* (Springer, 2021). doi:10.1007/978-3-030-54630-4.
68. van der Stegen, S. J. C., Hamieh, M. & Sadelain, M. The pharmacology of second-generation chimeric antigen receptors. *Nat. Rev. Drug Discov.* **14**, 499–509 (2015).
69. Chmielewski, M., Hombach, A., Heuser, C., Adams, G. P. & Abken, H. T Cell Activation by Antibody-Like Immunoreceptors: Increase in Affinity of the Single-Chain Fragment Domain above Threshold Does Not Increase T Cell Activation against Antigen-Positive Target Cells but Decreases Selectivity. *J. Immunol.* **173**, 7647–7653 (2004).
70. Hombach, A. A., Kofler, D., Rapp, G. & Abken, H. Redirecting human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells from the peripheral blood with pre-defined target specificity. *Gene Ther.* **16**, 1088–1096 (2009).
71. Golovina, T. N. *et al.* CD28 Costimulation Is Essential for Human T Regulatory Expansion and Function. *J. Immunol.* **181**, 2855–2868 (2008).
72. Tahvildari, M. & Dana, R. Low-Dose IL-2 Therapy in Transplantation, Autoimmunity, and Inflammatory Diseases. *J. Immunol.* **203**, 2749–2755 (2019).
73. Dawson, N. A. J. *et al.* Functional effects of chimeric antigen receptor co-receptor signaling domains in human regulatory T cells. *Sci. Transl. Med.* **12**, eaaz3866 (2020).
74. Boroughs, A. C. *et al.* Chimeric antigen receptor costimulation domains modulate human regulatory T cell function. *JCI Insight* **5**, 126194 (2019).
75. Lamarche, C. *et al.* Tonic-signaling chimeric antigen receptors drive human regulatory T cell exhaustion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **120**, e2219086120 (2023).
76. Lamarthée, B. *et al.* Transient mTOR inhibition rescues 4-1BB CAR-Tregs from tonic signal-induced dysfunction. *Nat. Commun.* **12**, 6446 (2021).
77. Elinav, E., Adam, N., Waks, T. & Eshhar, Z. Amelioration of colitis by genetically engineered murine regulatory T cells redirected by antigen-specific chimeric receptor. *Gastroenterology* **136**, 1721–1731 (2009).
78. Blat, D., Zigmond, E., Alteber, Z., Waks, T. & Eshhar, Z. Suppression of Murine Colitis and its Associated Cancer by Carcinoembryonic Antigen-Specific Regulatory T Cells. *Mol. Ther.* **22**, 1018–1028 (2014).
79. Fransson, M. *et al.* CAR/FoxP3-engineered T regulatory cells target the CNS and suppress EAE upon intranasal delivery. *J. Neuroinflammation* **9**, 112 (2012).
80. MacDonald, K. G. *et al.* Alloantigen-specific regulatory T cells generated with a chimeric antigen receptor. *J. Clin. Invest.* **126**, 1413–1424 (2016).
81. Wagner, J. C., Ronin, E., Ho, P., Peng, Y. & Tang, Q. Anti-HLA-A2-CAR Tregs prolong vascularized mouse heterotopic heart allograft survival. *Am. J. Transplant.* **22**, 2237–2245 (2022).

82. MacDonald, K. N., Piret, J. M. & Levings, M. K. Methods to manufacture regulatory T cells for cell therapy. *Clin. Exp. Immunol.* **197**, 52–63 (2019).
83. Dawson, N. A. *et al.* Systematic testing and specificity mapping of alloantigen-specific chimeric antigen receptors in regulatory T cells. *JCI Insight* **4**, e123672, 123672 (2019).
84. Miyara, M. *et al.* Functional Delineation and Differentiation Dynamics of Human CD4+ T Cells Expressing the FoxP3 Transcription Factor. *Immunity* **30**, 899–911 (2009).
85. Hoffmann, P. *et al.* Loss of FOXP3 expression in natural human CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells upon repetitive *in vitro* stimulation. *Eur. J. Immunol.* **39**, 1088–1097 (2009).
86. Hoffmann, P. *et al.* Only the CD45RA⁺ subpopulation of CD4⁺CD25^{high} T cells gives rise to homogeneous regulatory T-cell lines upon *in vitro* expansion. *Blood* **108**, 4260–4267 (2006).
87. Arroyo Hornero, R. *et al.* CD45RA Distinguishes CD4⁺CD25⁺CD127⁻/low TSDR Demethylated Regulatory T Cell Subpopulations With Differential Stability and Susceptibility to Tacrolimus-Mediated Inhibition of Suppression. *Transplantation* **101**, 302–309 (2017).
88. Edinger, M. Driving allotolerance: CAR-expressing Tregs for tolerance induction in organ and stem cell transplantation. *J. Clin. Invest.* **126**, 1248–1250 (2016).
89. Balcerak, J. *et al.* Polyclonal Regulatory T Cell Manufacturing Under cGMP: A Decade of Experience. *Front. Immunol.* **12**, (2021).
90. Rosado-Sánchez, I. & Levings, M. K. Building a CAR-Treg: Going from the basic to the luxury model. *Cell. Immunol.* **358**, 104220 (2020).
91. Fung, V. C. W., Rosado-Sánchez, I. & Levings, M. K. Transduction of Human T Cell Subsets with Lentivirus. in *T-Helper Cells* (eds. Annunziato, F., Maggi, L. & Mazzoni, A.) vol. 2285 227–254 (Springer US, 2021).
92. Wu, D. *et al.* A method for expansion and retroviral transduction of mouse regulatory T cells. *J. Immunol. Methods* **488**, 112931 (2021).
93. Thomas, A. K., Maus, M. V., Shalaby, W. S., June, C. H. & Riley, J. L. A cell-based artificial antigen-presenting cell coated with anti-CD3 and CD28 antibodies enables rapid expansion and long-term growth of CD4 T lymphocytes. *Clin. Immunol. Orlando Fla* **105**, 259–272 (2002).
94. Hippen, K. L. *et al.* Generation and Large-Scale Expansion of Human Inducible Regulatory T Cells That Suppress Graft-Versus-Host Disease. *Am. J. Transplant.* **11**, 1148–1157 (2011).
95. Schreeb, K. *et al.* Study Design: Human Leukocyte Antigen Class I Molecule A*02-Chimeric Antigen Receptor Regulatory T Cells in Renal Transplantation. *Kidney Int. Rep.* **7**, 1258–1267 (2022).
96. Sangamo Therapeutics Announces Dosing of First Patient in Phase 1/2 Clinical Study of Investigational CAR-Treg Cell Therapy TX200 in Kidney Transplantation | Sangamo Therapeutics, Inc. <https://investor.sangamo.com/news-releases/news-release-details/sangamo-therapeutics-announces-dosing-first-patient-phase-12>.

97. Quell Therapeutics Granted CTA Approval to Begin First Clinical Trial with a Multi-modular Engineered Treg Cell Therapy – QuellTX. <https://quell-tx.com/quell-therapeutics-granted-cta-approval-to-begin-first-clinical-trial-with-a-multi-modular-engineered-treg-cell-therapy/>.
98. Nussenblatt, R. B. *et al.* Treatment of noninfectious intermediate and posterior uveitis with the humanized anti-Tac mAb: A phase I/II clinical trial. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 7462–7466 (1999).
99. Waldmann, T. A. *et al.* Therapy of Patients With Human T-Cell Lymphotropic Virus I-Induced Adult T-Cell Leukemia With Anti-Tac, a Monoclonal Antibody to the Receptor for Interleukin-2. *Blood* **72**, 1805–1816 (1988).
100. Vincenti, F. *et al.* Interleukin-2–Receptor Blockade with Daclizumab to Prevent Acute Rejection in Renal Transplantation. *N. Engl. J. Med.* **338**, 161–165 (1998).
101. Bumgardner, G. L. *et al.* RESULTS OF 3-YEAR PHASE III CLINICAL TRIALS WITH DACLIZUMAB PROPHYLAXIS FOR PREVENTION OF ACUTE REJECTION AFTER RENAL TRANSPLANTATION1. *Transplantation* **72**, 839 (2001).
102. Wynn, D. *et al.* Daclizumab in active relapsing multiple sclerosis (CHOICE study): a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled, add-on trial with interferon beta. *Lancet Neurol.* **9**, 381–390 (2010).
103. Kappos, L. *et al.* Daclizumab HYP versus Interferon Beta-1a in Relapsing Multiple Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **373**, 1418–1428 (2015).
104. Gold, R. *et al.* Daclizumab high-yield process in relapsing-remitting multiple sclerosis (SELECT): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet* **381**, 2167–2175 (2013).
105. Giovannoni, G. *et al.* Daclizumab high-yield process in relapsing-remitting multiple sclerosis (SELECTION): a multicentre, randomised, double-blind extension trial. *Lancet Neurol.* **13**, 472–481 (2014).
106. Cohan, S. L., Lucassen, E. B., Romba, M. C. & Linch, S. N. Daclizumab: Mechanisms of Action, Therapeutic Efficacy, Adverse Events and Its Uncovering the Potential Role of Innate Immune System Recruitment as a Treatment Strategy for Relapsing Multiple Sclerosis. *Biomedicines* **7**, 18 (2019).
107. Huehn, J., Polansky, J. K. & Hamann, A. Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage? *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 83–89 (2009).
108. Chen, Q., Kim, Y. C., Laurence, A., Punkosdy, G. A. & Shevach, E. M. IL-2 controls the stability of Foxp3 expression in TGF-beta-induced Foxp3+ T cells in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **186**, 6329–6337 (2011).
109. Duarte, J. H., Zelenay, S., Bergman, M.-L., Martins, A. C. & Demengeot, J. Natural Treg cells spontaneously differentiate into pathogenic helper cells in lymphopenic conditions. *Eur. J. Immunol.* **39**, 948–955 (2009).
110. Wieczorek, G. *et al.* Quantitative DNA Methylation Analysis of FOXP3 as a New Method for Counting Regulatory T Cells in Peripheral Blood and Solid Tissue. *Cancer Res.* **69**, 599–608 (2009).

111. Yao, Z. *et al.* Nonredundant roles for Stat5a/b in directly regulating Foxp3. *Blood* **109**, 4368–4375 (2007).
112. Feng, Y. *et al.* Control of the Inheritance of Regulatory T Cell Identity by a cis Element in the Foxp3 Locus. *Cell* **158**, 749–763 (2014).
113. Sekiya, T. *et al.* Nr4a receptors are essential for thymic regulatory T cell development and immune homeostasis. *Nat. Immunol.* **14**, 230–237 (2013).
114. Tatapudi, V. S., Lonze, B. E., Wu, M. & Montgomery, R. A. Early Conversion from Tacrolimus to Belatacept in a Highly Sensitized Renal Allograft Recipient with Calcineurin Inhibitor-Induced de novo Post-Transplant Hemolytic Uremic Syndrome. *Case Rep. Nephrol. Dial.* **8**, 10–19 (2018).
115. de Fijter, J. W. *et al.* Early Conversion From Calcineurin Inhibitor- to Everolimus-Based Therapy Following Kidney Transplantation: Results of the Randomized ELEVATE Trial. *Am. J. Transplant.* **17**, 1853–1867 (2017).
116. Dong, S. *et al.* The effect of low-dose IL-2 and Treg adoptive cell therapy in patients with type 1 diabetes. *JCI Insight* **6**, e147474 (2021).
117. Marek-Trzonkowska, N. *et al.* Factors affecting long-term efficacy of T regulatory cell-based therapy in type 1 diabetes. *J. Transl. Med.* **14**, 332 (2016).
118. Bailey-Bucktrout, S. L. *et al.* Self-antigen-Driven Activation Induces Instability of Regulatory T Cells during an Inflammatory Autoimmune Response. *Immunity* **39**, 949–962 (2013).
119. Polesso, F., Sarker, M., Anderson, A., Parker, D. C. & Murray, S. E. Constitutive expression of NF- κ B inducing kinase in regulatory T cells impairs suppressive function and promotes instability and pro-inflammatory cytokine production. *Sci. Rep.* **7**, 14779 (2017).
120. Kremer, J. *et al.* Membrane-bound IL-2 improves the expansion, survival, and phenotype of CAR Tregs and confers resistance to calcineurin inhibitors. *Front. Immunol.* **13**, (2022).
121. Ramos, T. L. *et al.* Prevention of acute GVHD using an orthogonal IL-2/IL-2R β system to selectively expand regulatory T cells in vivo. *Blood* **141**, 1337–1352 (2023).
122. Comi, G. *et al.* Role of B Cells in Multiple Sclerosis and Related Disorders. *Ann. Neurol.* **89**, 13–23 (2021).
123. Petersone, L. *et al.* T Cell/B Cell Collaboration and Autoimmunity: An Intimate Relationship. *Front. Immunol.* **9**, 1941 (2018).
124. Barthlott, T. *et al.* CD25⁺ CD4⁺ T cells compete with naive CD4⁺ T cells for IL-2 and exploit it for the induction of IL-10 production. *Int. Immunol.* **17**, 279–288 (2005).
125. de la Rosa, M., Rutz, S., Dorninger, H. & Scheffold, A. Interleukin-2 is essential for CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell function. *Eur. J. Immunol.* **34**, 2480–2488 (2004).
126. Huang, C.-T. *et al.* Role of LAG-3 in Regulatory T Cells. *Immunity* **21**, 503–513 (2004).
127. Sharon, M., Klausner, R. D., Cullen, B. R., Chizzonite, R. & Leonard, W. J. Novel Interleukin-2 Receptor Subunit Detected by Cross-Linking Under High-Affinity Conditions. *Science* **234**, 859–863 (1986).

128. Sugamura, K. *et al.* The IL-2/IL-2 Receptor System: Involvement of a Novel Receptor Subunit, γ Chain, in Growth Signal Transduction. *Tohoku J. Exp. Med.* **168**, 231–237 (1992).
129. Breman, E. *et al.* Overcoming Target Driven Fratricide for T Cell Therapy. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
130. Cooper, M. L. *et al.* An “off-the-shelf” fratricide-resistant CAR-T for the treatment of T cell hematologic malignancies. *Leukemia* **32**, 1970–1983 (2018).
131. Ruella, M. *et al.* Induction of resistance to chimeric antigen receptor T cell therapy by transduction of a single leukemic B cell. *Nat. Med.* **24**, 1499–1503 (2018).
132. Locke, F. L. *et al.* CD25 Blockade Delays Regulatory T Cell Reconstitution and Does Not Prevent Graft-versus-Host Disease After Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* **23**, 405–411 (2017).
133. Matsuoka, K. *et al.* Low-Dose Interleukin-2 Therapy Restores Regulatory T Cell Homeostasis in Patients with Chronic Graft-Versus-Host Disease. *Sci. Transl. Med.* **5**, 179ra43–179ra43 (2013).
134. Kohm, A. P. *et al.* Cutting Edge: Anti-CD25 Monoclonal Antibody Injection Results in the Functional Inactivation, Not Depletion, of CD4+CD25+ T Regulatory Cells¹. *J. Immunol.* **176**, 3301–3305 (2006).
135. Barbi, J., Pardoll, D. M. & Pan, F. Treg functional stability and its responsiveness to the microenvironment. *Immunol. Rev.* **259**, 115–139 (2014).
136. Oh, U. *et al.* Regulatory T Cells are Reduced During Anti-CD25 Antibody Treatment of Multiple Sclerosis. *Arch. Neurol.* **66**, 471–479 (2009).
137. Karlsson, H. & Nässberger, L. Influence of compounds affecting synthesis, modification and transport of proteins on the expression and release of interleukin-2 receptor. *Immunol. Cell Biol.* **73**, 81–88 (1995).
138. Müllberg, J. *et al.* Further evidence for a common mechanism for shedding of cell surface proteins. *FEBS Lett.* **401**, 235–238 (1997).
139. Ohkura, N. & Sakaguchi, S. Transcriptional and epigenetic basis of Treg cell development and function: its genetic anomalies or variations in autoimmune diseases. *Cell Res.* **30**, 465–474 (2020).
140. De Paula Pohl, A. *et al.* Engineered regulatory T cells expressing myelin-specific chimeric antigen receptors suppress EAE progression. *Cell. Immunol.* **358**, 104222 (2020).
141. Hua, J. *et al.* Pathological conversion of regulatory T cells is associated with loss of allotolerance. *Sci. Rep.* **8**, 7059 (2018).
142. Weinstein-Marom, H. *et al.* Membrane-attached Cytokines Expressed by mRNA Electroporation Act as Potent T-Cell Adjuvants. *J. Immunother. Hagerstown Md 1997* **39**, 60–70 (2016).
143. Weinstein-Marom, H. *et al.* Combined Expression of Genetic Adjuvants Via mRNA Electroporation Exerts Multiple Immunostimulatory Effects on Antitumor T Cells. *J. Immunother.* **42**, 43 (2019).

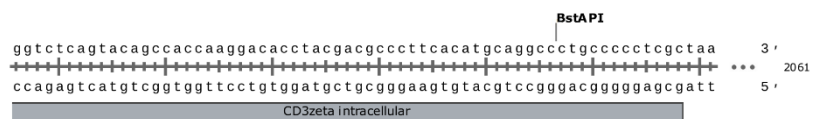
144. Kalbasi, A. *et al.* Potentiating adoptive cell therapy using synthetic IL-9 receptors. *Nature* **607**, 360–365 (2022).
145. DuBridge, R. B. *et al.* Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 379–387 (1987).
146. Jainchill, J. L., Aaronson, S. A. & Todaro, G. J. Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. *J. Virol.* **4**, 549–553 (1969).
147. Pear, W. S., Nolan, G. P., Scott, M. L. & Baltimore, D. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 8392–8396 (1993).
148. Zenke, S. *et al.* Differential trafficking of ligands trogocytosed via CD28 versus CTLA4 promotes collective cellular control of co-stimulation. *Nat. Commun.* **13**, 6459 (2022).
149. McMurchy, A. N. & Levings, M. K. Suppression assays with human T regulatory cells: A technical guide: Highlights. *Eur. J. Immunol.* **42**, 27–34 (2012).

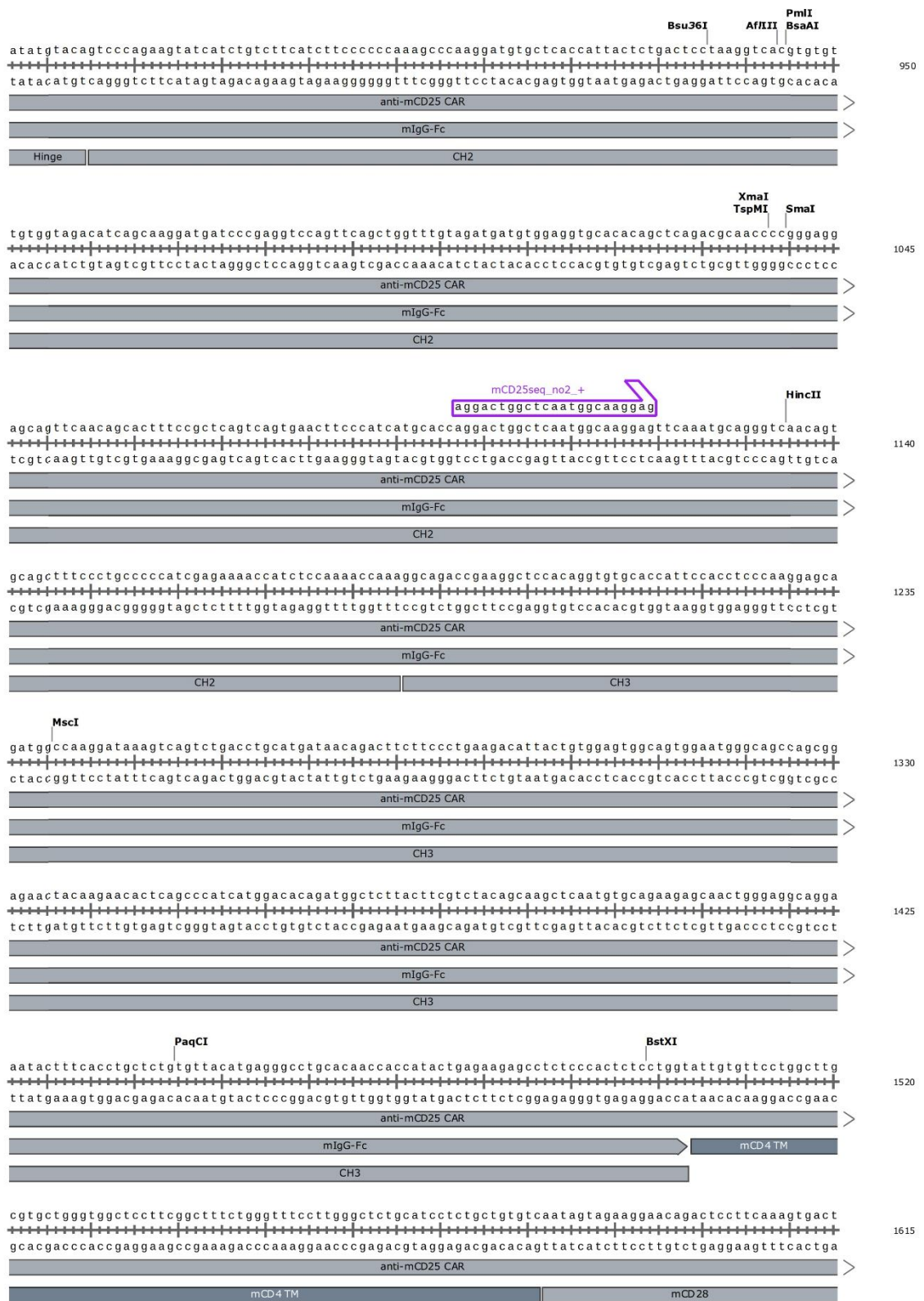
7 Anhang

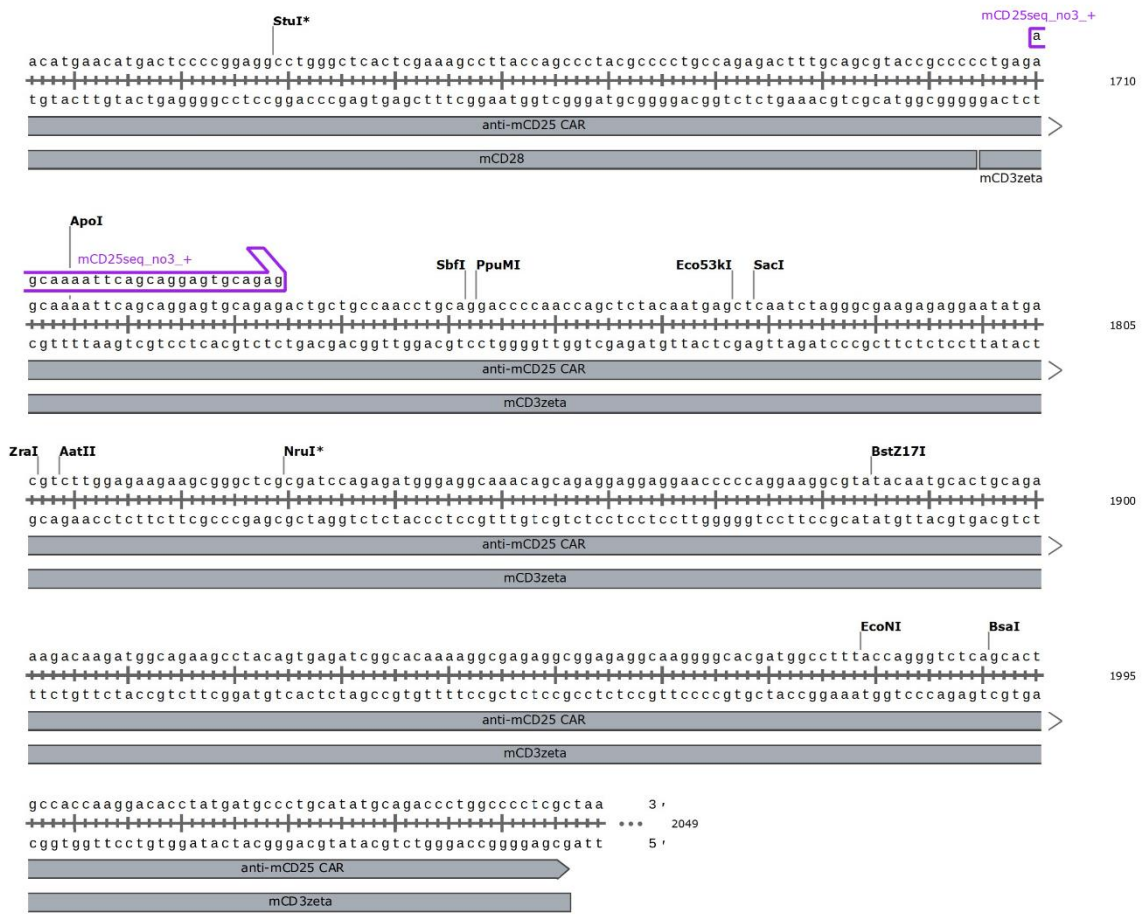
7.1 Gensequenzen von Plasmid Vektor Inserts

7.1.1 #607 pBullet-BW43126scFv-Fc-CD28(tm+iz)-ζ

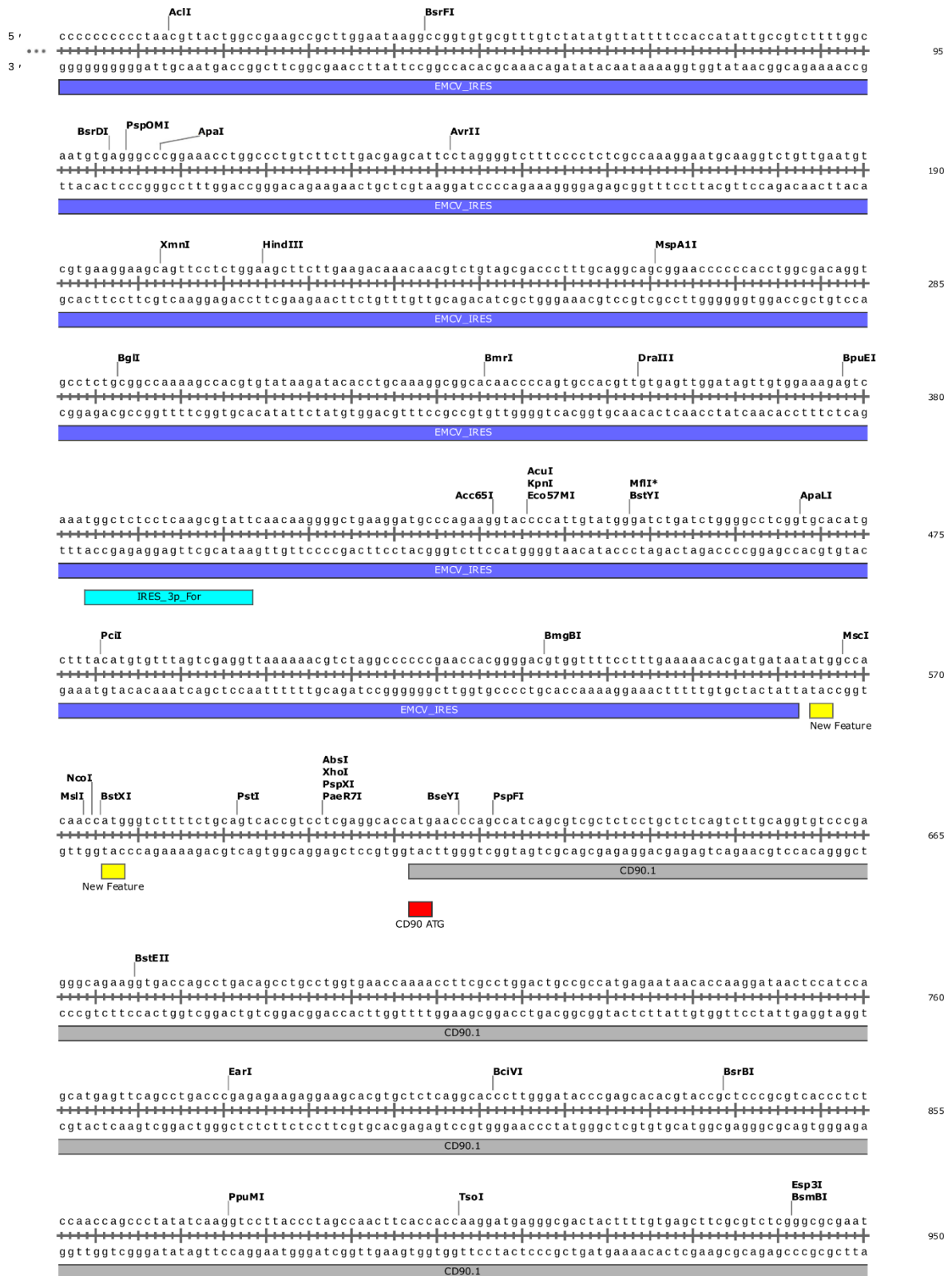


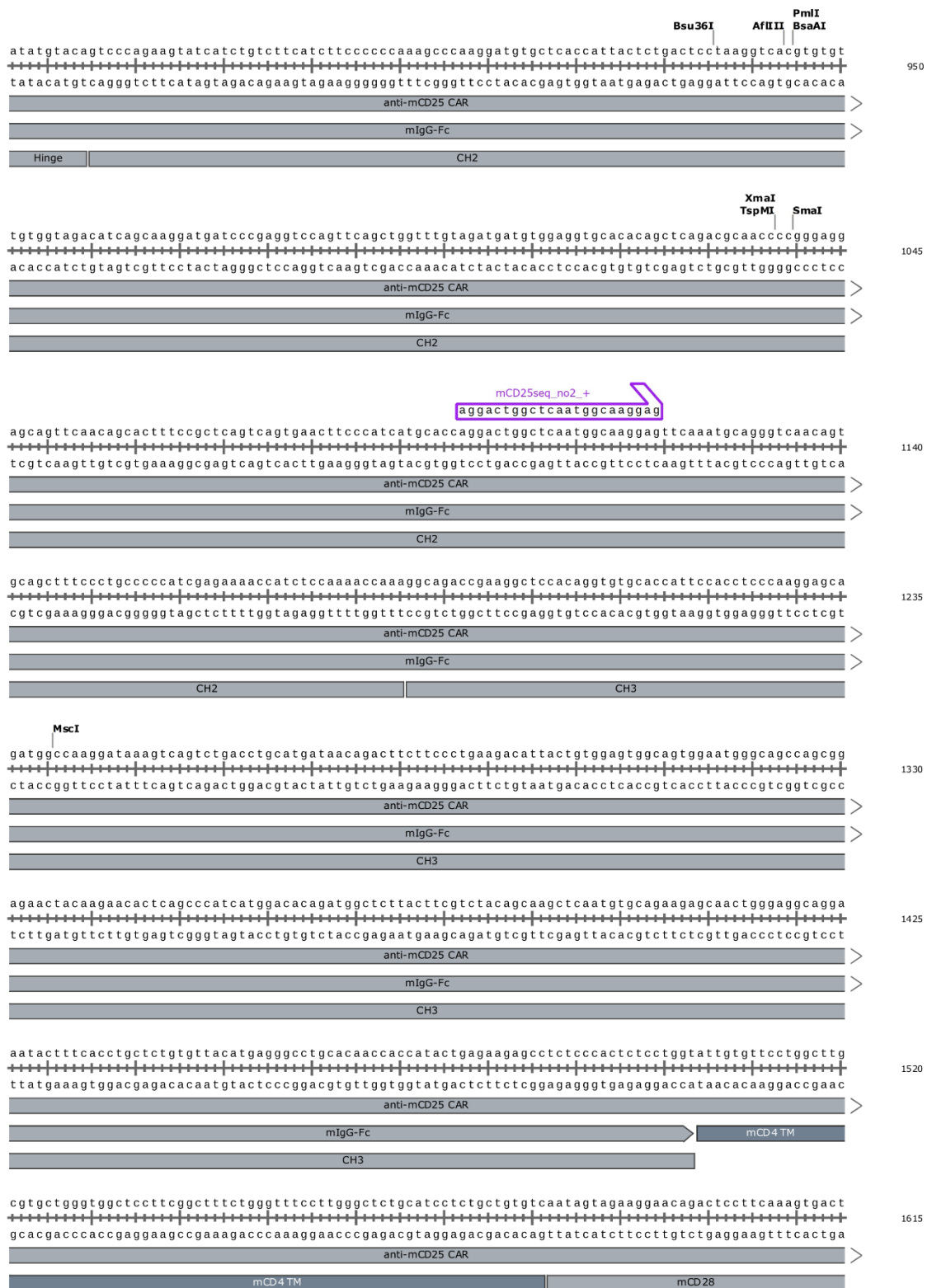






7.1.3 #2196 pMSCV_leer vector_IRES_mCD90.1







BbvCI

gagtgccccgacggcacctacagcgacgaggccaaccatgtggaccctgcttgcctgcaccgtgtgagggacaccgagaggcagctgagggga
 ctcacggggctgccgtggatgtcgtctcgggttggtacacctggggacggacgggacgtggcacacgctcctgtggctctccgtcgcactccct

2660

LNGFR

CsiI
SexAI*

gtgcaccagggtgggcccgcgacggcagtgcgaggagatccccggcaggtggatcaccaggagcacccccccgagggcagcgacagcaccgccccca
 cacgtggtccaccccggctcgggctcacgctcctctaggggcccgtccacctagtggtcctcgtggggggggctcccgtcgtctcgtggcgggggt

2755

LNGFR

gcaccaggagcccaggccccccccgagcaggacctgatcgccagcaccgtggcggcggtggtgaccaccgtgatgggcagcagccagcccgtg
 cgtgggtcctcgggctccgggggggctcgtcctggactagcggctgtggcaccggccgcaccactggtggcactaccctcgtcgtcggcgggac

2850

LNGFR

BtgZI

gtgaccaggggcaccaccgacaacctgatccccgtgtactgcagcatcctggccgcccgtggtgggtgggcctggggcctacatcgcctcagcgg
 cactggtccccgtggtggctgttggactaggggcacatgacgtcgtaggaccggcggcaccaccaccggaccaccggatgtagcggaaagtcc

2945

LNGFR

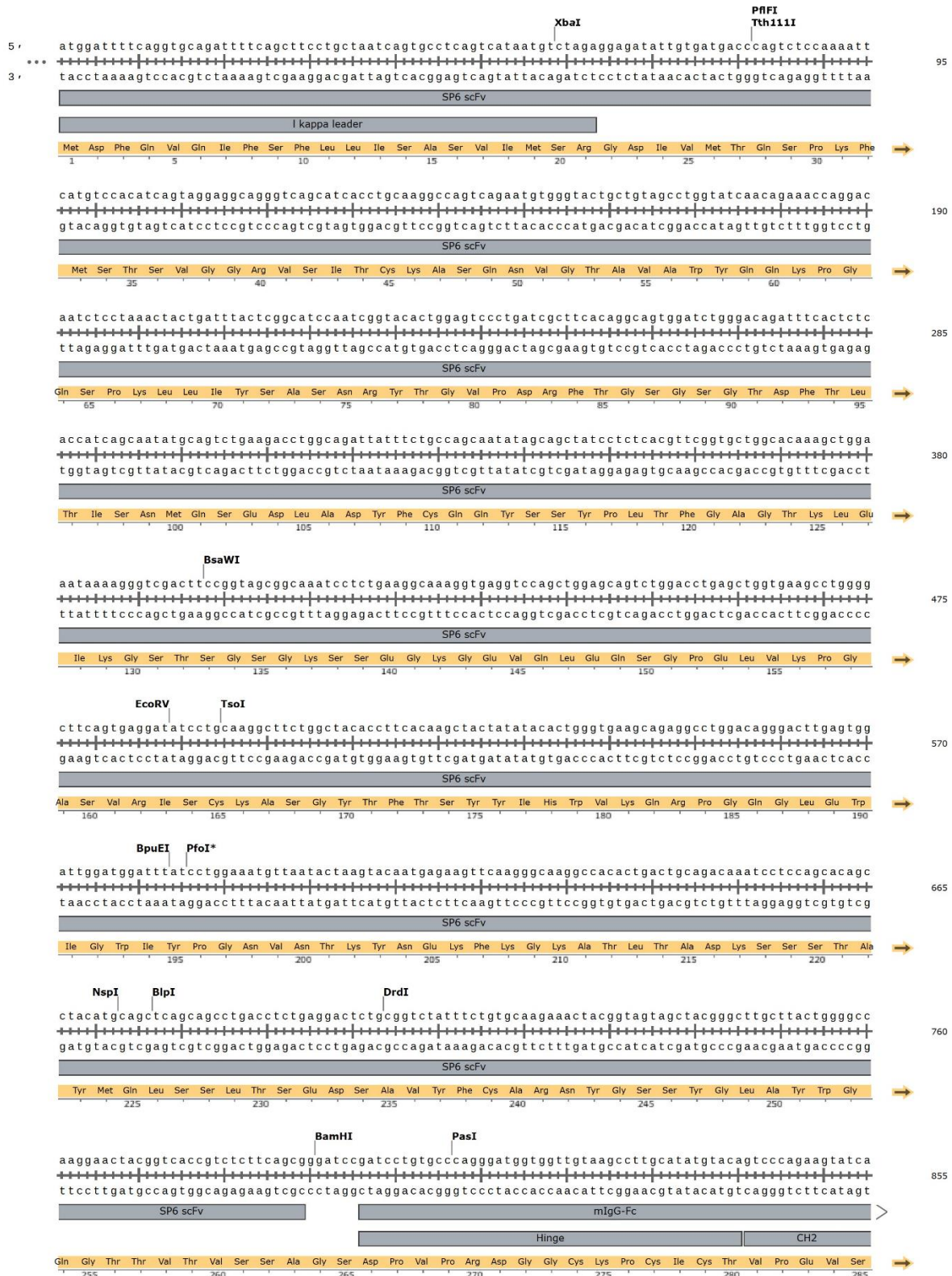
SmlI
XhoI
PspXI
PaeR7I

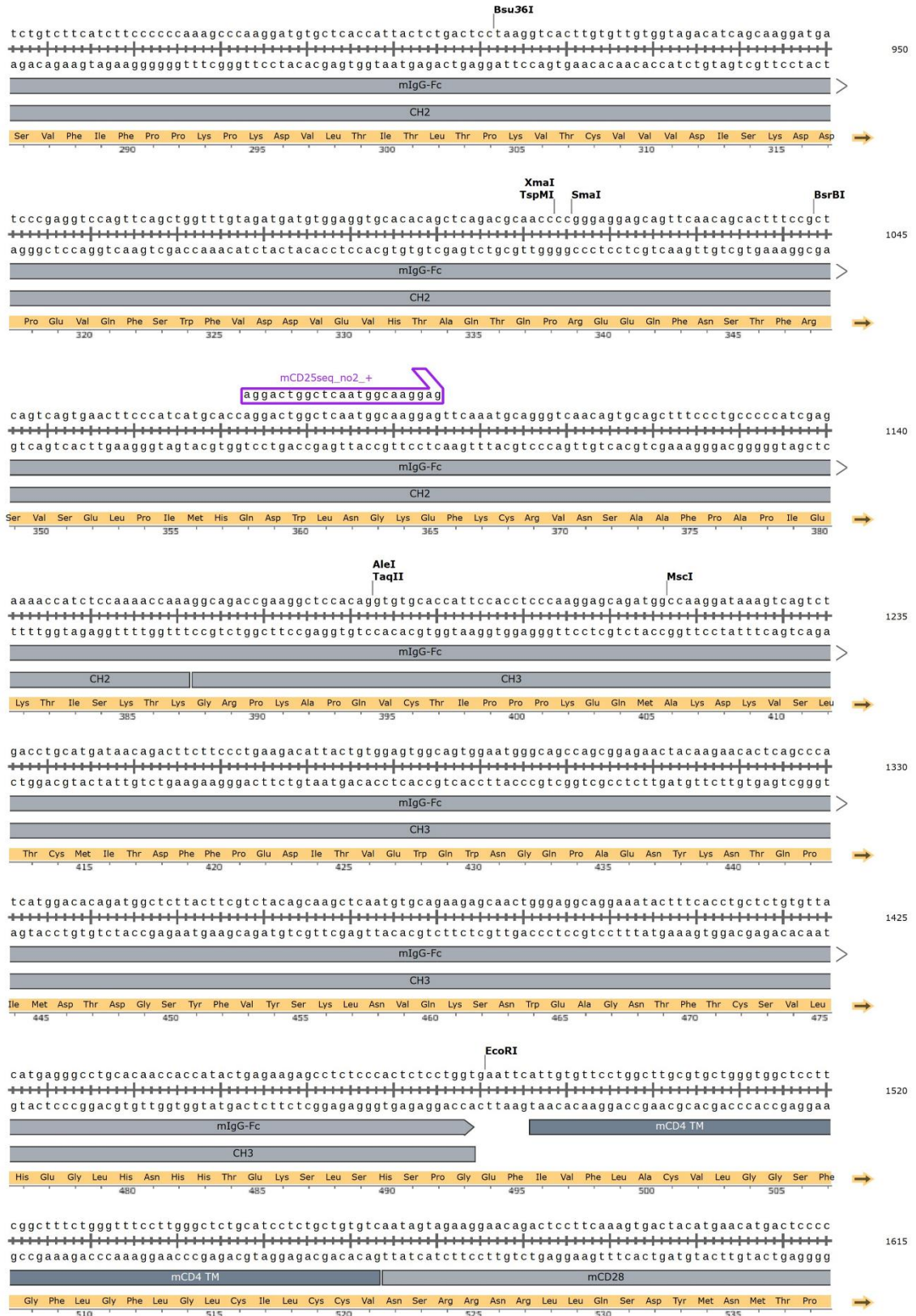
cggcagcggcctcgagtcgcgataa 3'
 ... 2970
 gccgtcggcggagctcagcgtatt 5'

LNGFR

Terminator

7.1.5 #2239 pMSCV_Ik_SP6_mIgG_mCD4TM_mCD28IC_mCD3zeta_P2A_LNGFR





SbfI

gcaggtgcgaggcctgcaggggtgagcggccggcagcggcctgggtgttcagctgccaggacaagcagaacaccgtgtgagggagtgccccgac
 cgctccacgctccggacgtccacacgctccggcctcggcggaccacaagtcgacggctcctgttctgtggcacacgctccctcaggggctg

LNGFR

Gly Arg Cys Glu Ala Cys Arg Val Cys Glu Ala Gly Ser Gly Leu Val Phe Ser Cys Gln Asp Lys Gln Asn Thr Val Cys Glu Glu Cys Pro Asp

825 830 835 840 845 850 855

BbvCI **CsiI** **SexAI***

ggcacctacagcgacgagggccaacctggtggaccctgcttccctgcaccgtgtgagggacaccgagaggcagctgagggagtgaccaggtg
 ccgtggatgtcgctgctccggttggtacacctgggacgggacgtggcacacgctcctgttggctcctcctcgactccctcagctggtccac

LNGFR

Gly Thr Tyr Ser Asp Glu Ala Asn His Val Asp Pro Cys Leu Pro Cys Thr Val Cys Glu Asp Thr Glu Arg Gln Leu Arg Glu Cys Thr Arg Trp

860 865 870 875 880 885

ggccgacgcccagtgagggagatccccggcaggtggatcaccaggagcacccccccgagggcagcgacagcaccgccccagcaccaggagc
 ccggctgcccgtcacgctcctctagggccgctccacctagtggtcctcgtggggggggctcccgtcgtgctggcgggggtcgtgggtcctcg

LNGFR

Ala Asp Ala Glu Cys Glu Glu Ile Pro Gly Arg Trp Ile Thr Arg Ser Thr Pro Pro Glu Gly Ser Asp Ser Thr Ala Pro Ser Thr Gln Glu

890 895 900 905 910 915

Pf1MI

ccgagggccccccgagcaggacctgatcccgaccctggccggcgtggtgaccaccgtgatgggcagcagccagcccgtggtgaccaggggc
 ggctccgggggggctcgtcctggactagcgttctggcaccggcgcaccactggtggcactaccgctcgtcggtcgggaccactggtcccg

LNGFR

Pro Glu Ala Pro Pro Glu Gln Asp Leu Ile Ala Ser Thr Val Ala Gly Val Val Thr Thr Val Met Gly Ser Ser Gln Pro Val Val Thr Arg Gly

920 925 930 935 940 945 950

BtgZI **XhoI** **PspXI** **PaeR7I**

accaccgacaacctgatccccgtgtactgcagcatcctggcccgctgggtggctggccttacatcgccttcagggcggcagcggcct
 tgggtgctgttgactagggcacatgacgtcgttaggaccggcggcaccaccaccggaccaccggatgtagcggaaagtccgccctcgcggga

LNGFR

Thr Thr Asp Asn Leu Ile Pro Val Tyr Cys Ser Ile Leu Ala Ala Val Val Val Gly Leu Val Ala Tyr Ile Ala Phe Ser Gly Gly Ser Gly Leu

955 960 965 970 975 980

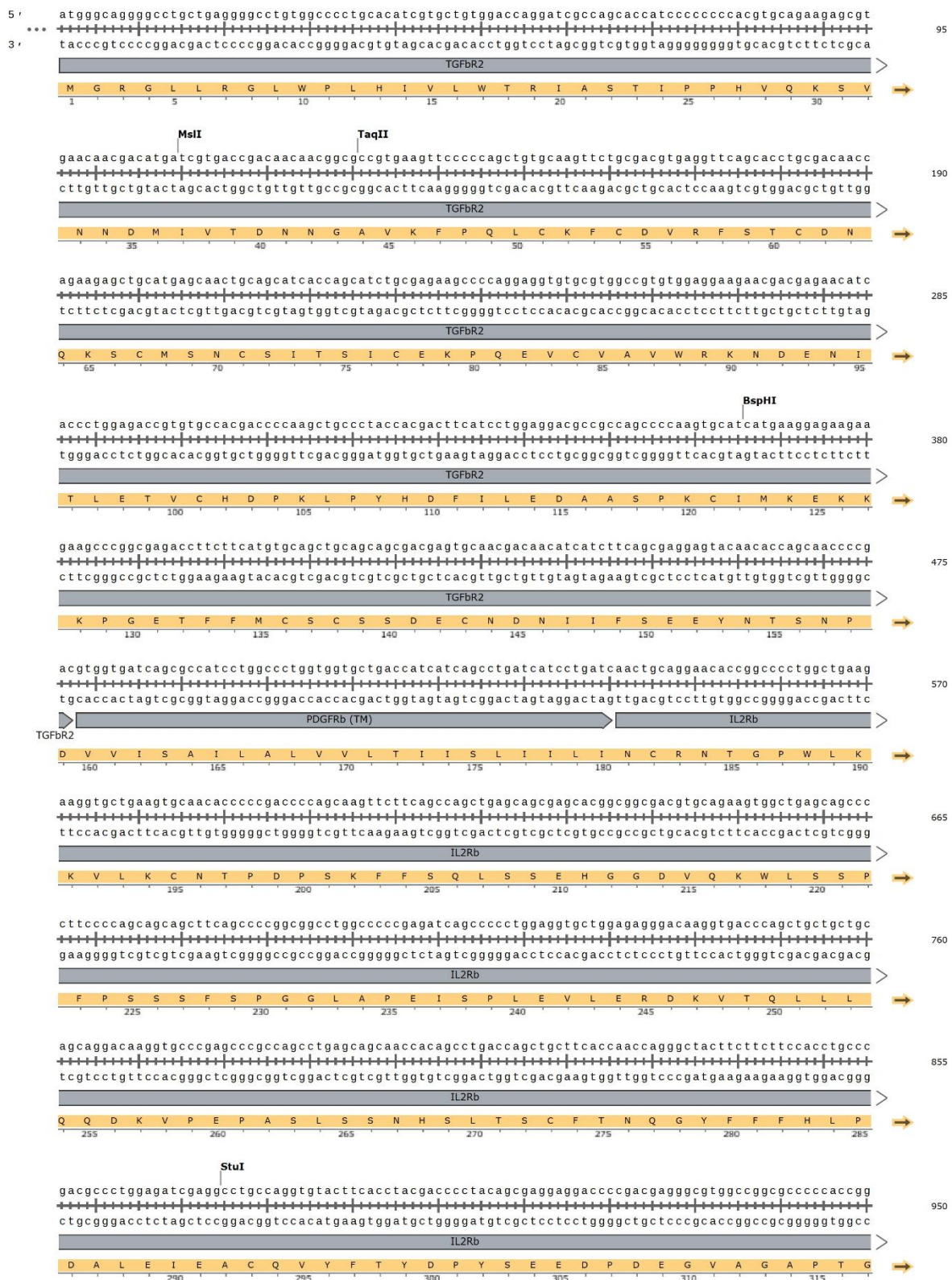
NruI

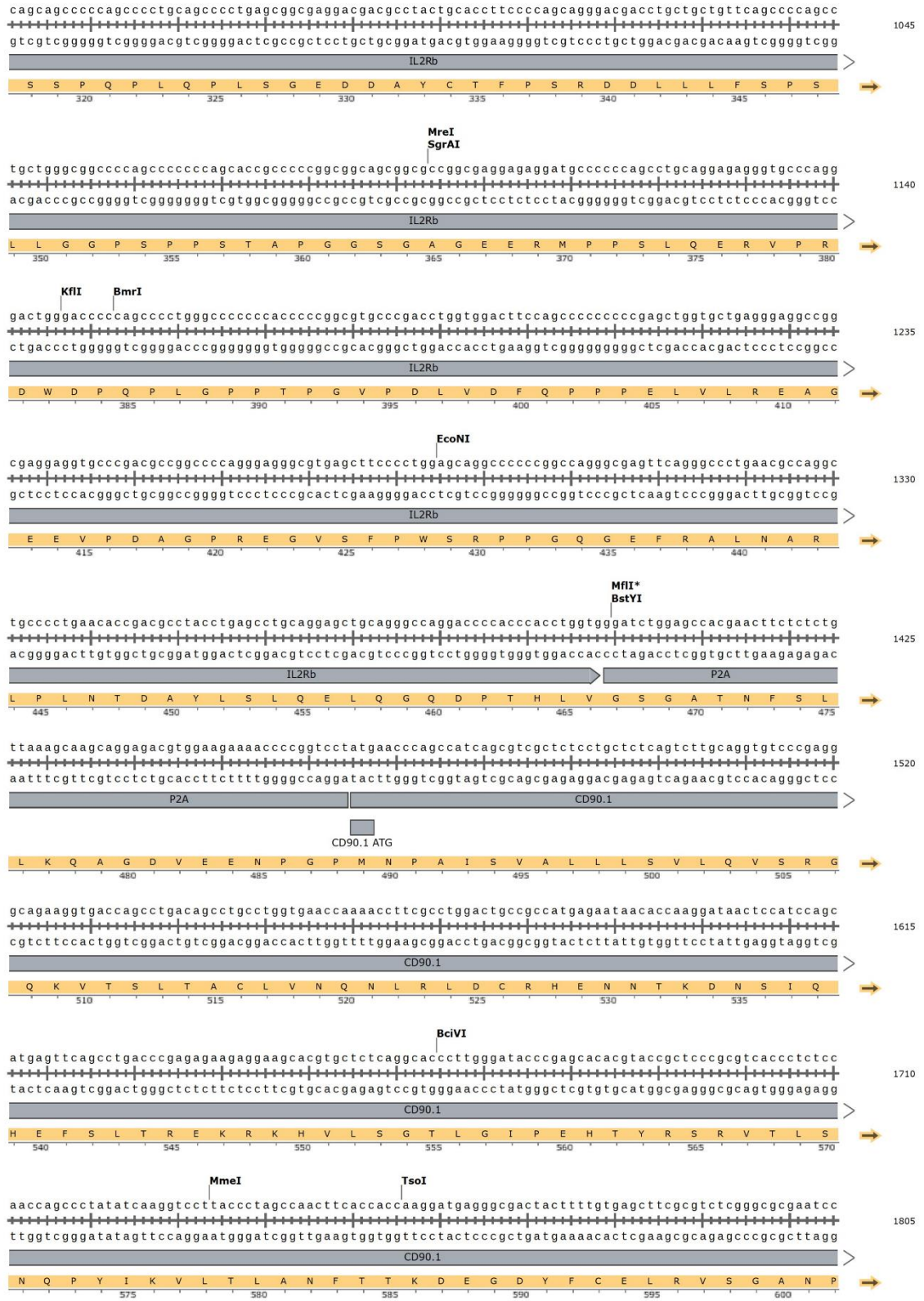
cgagtcgcgataa 3'
 2958
 gctcagcgctatt 5'

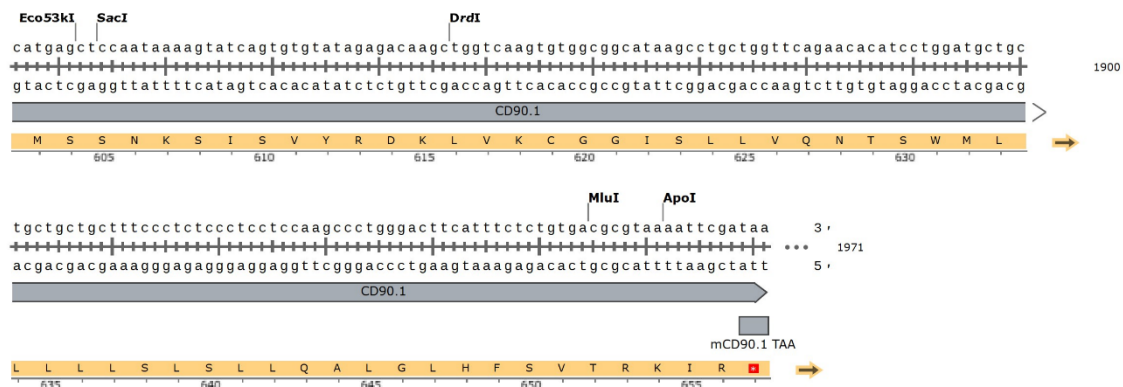
Glu Ser Arg

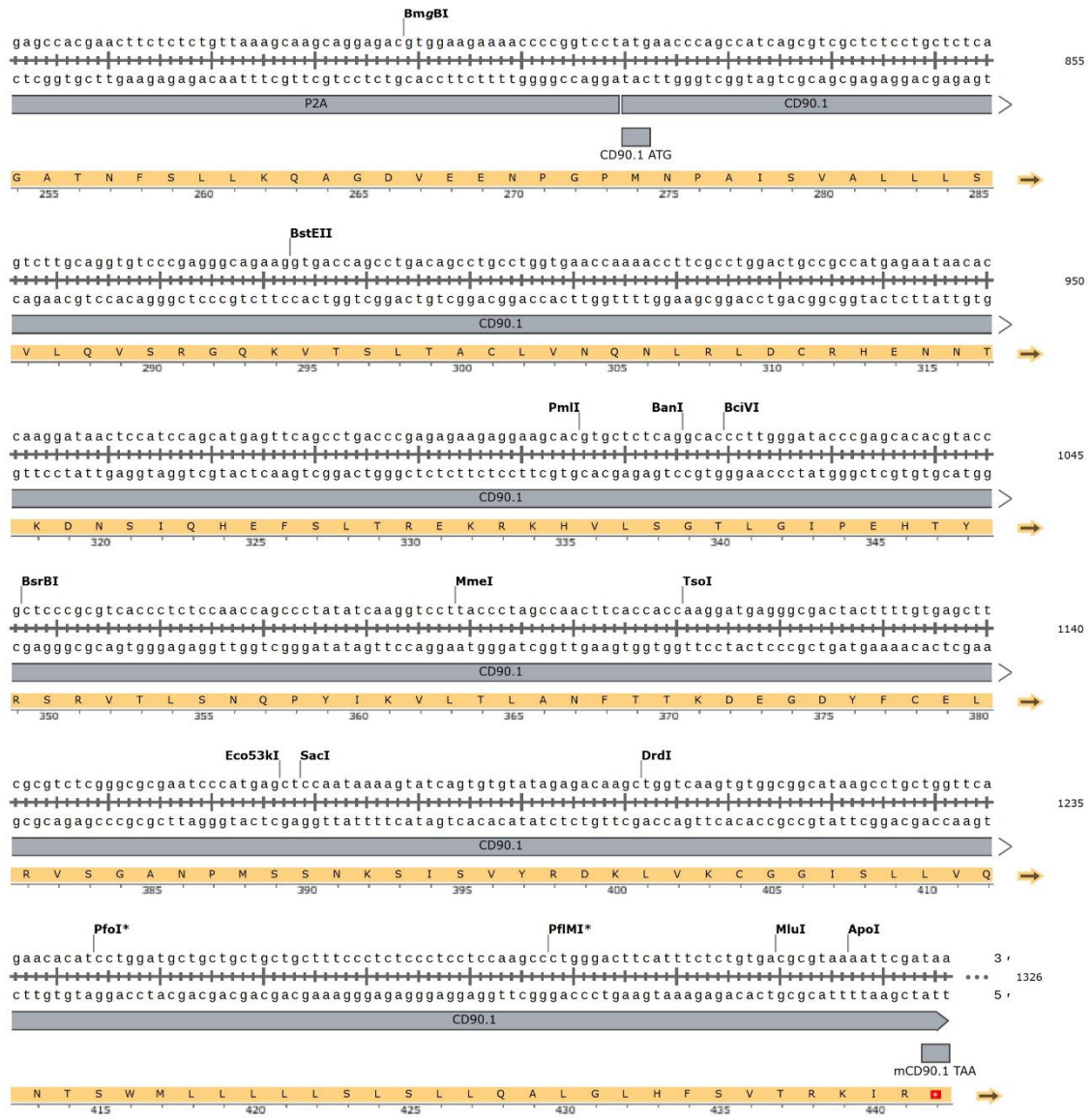
985

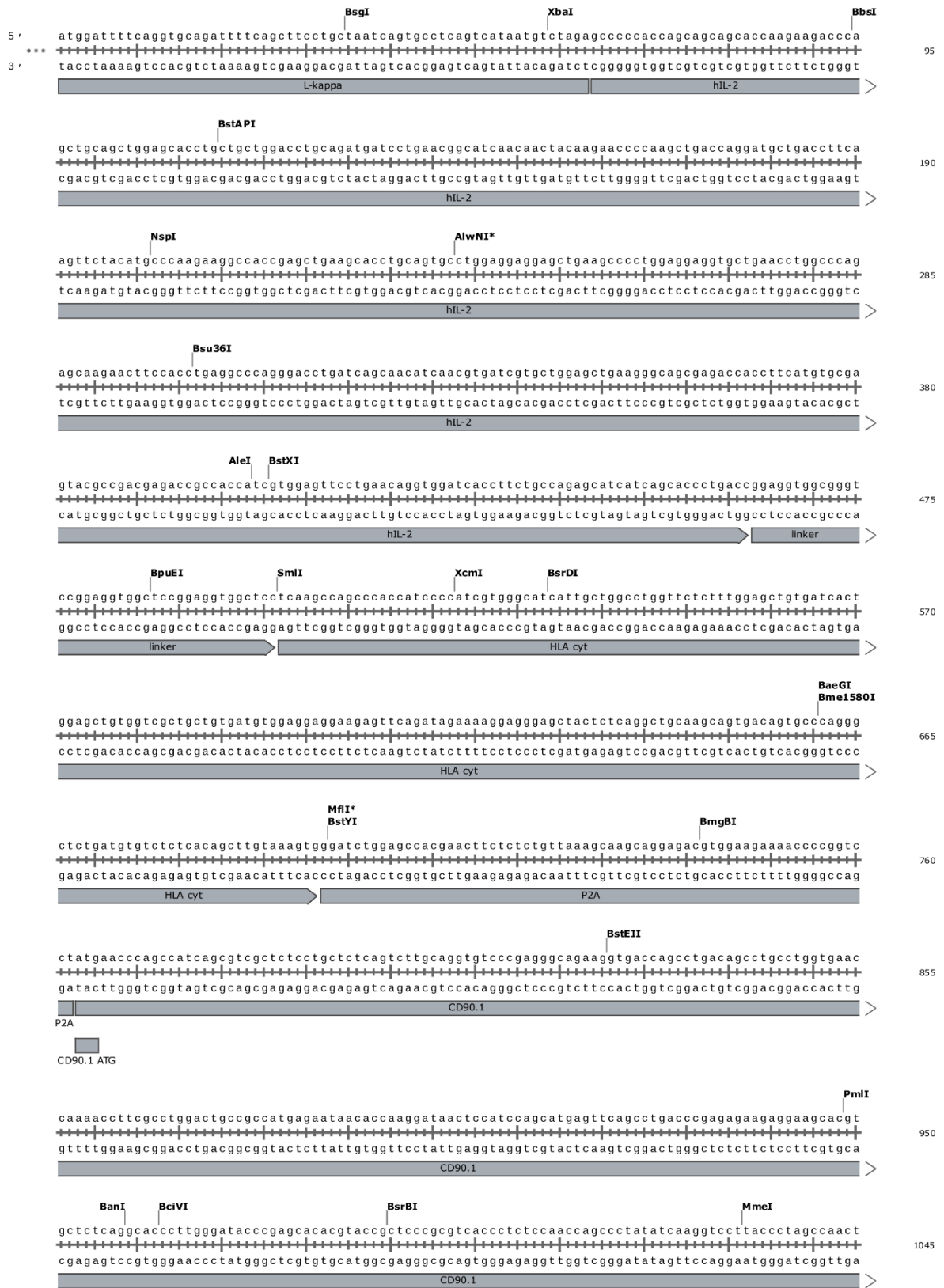
7.1.6 #2431 pBullet_TGFbR_PDGFRb(TM)_IL2Rb(IC)_P2A_mCD90.1

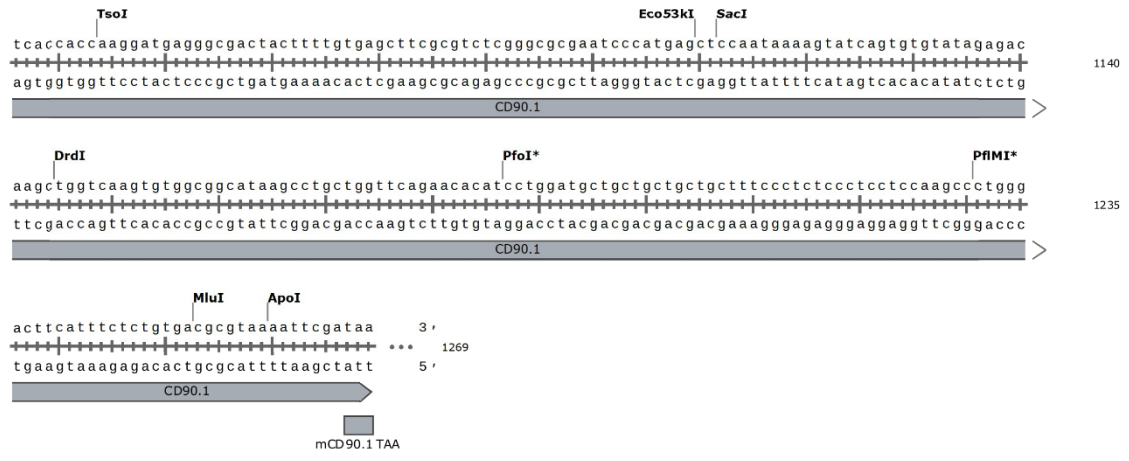






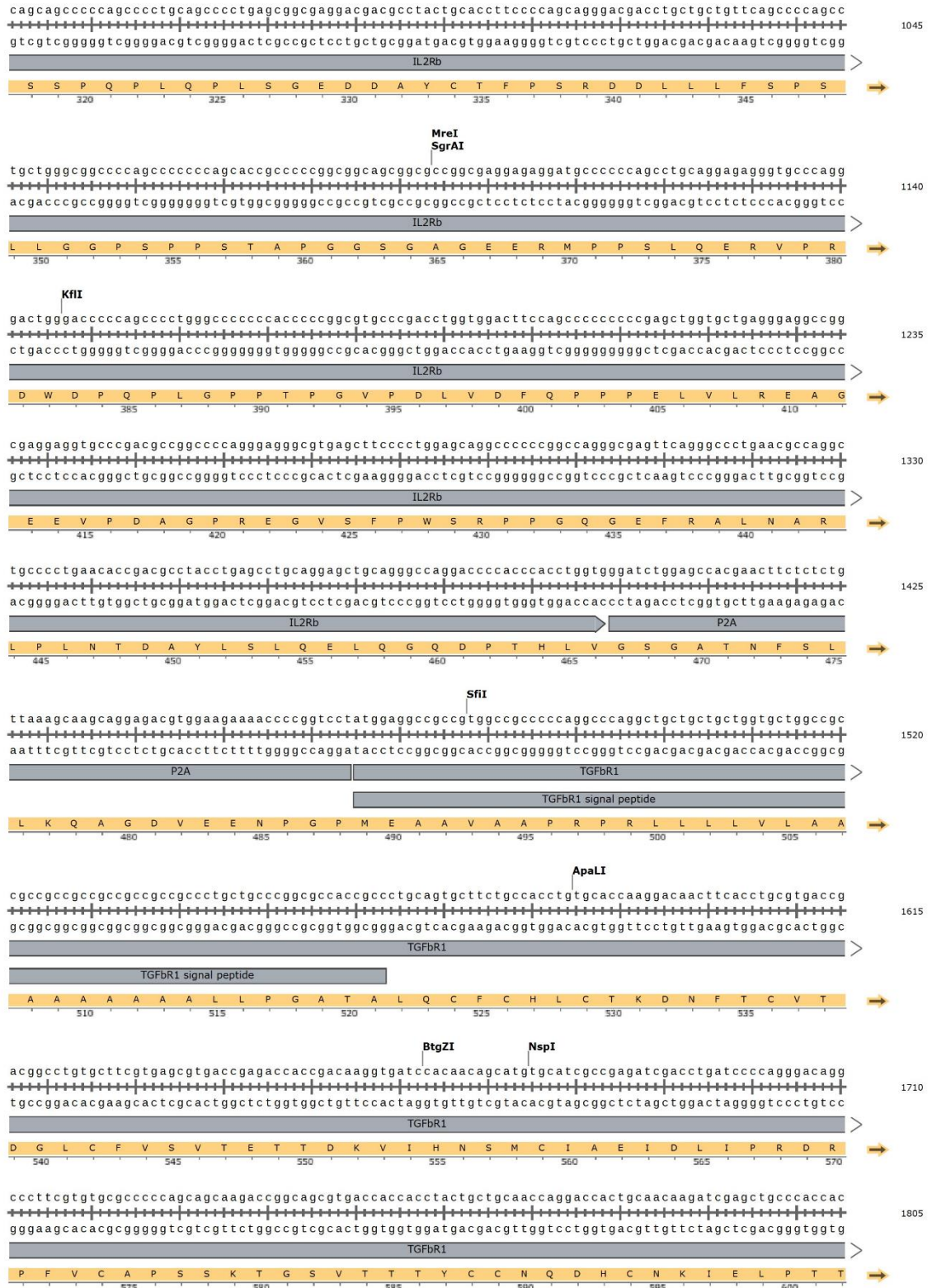


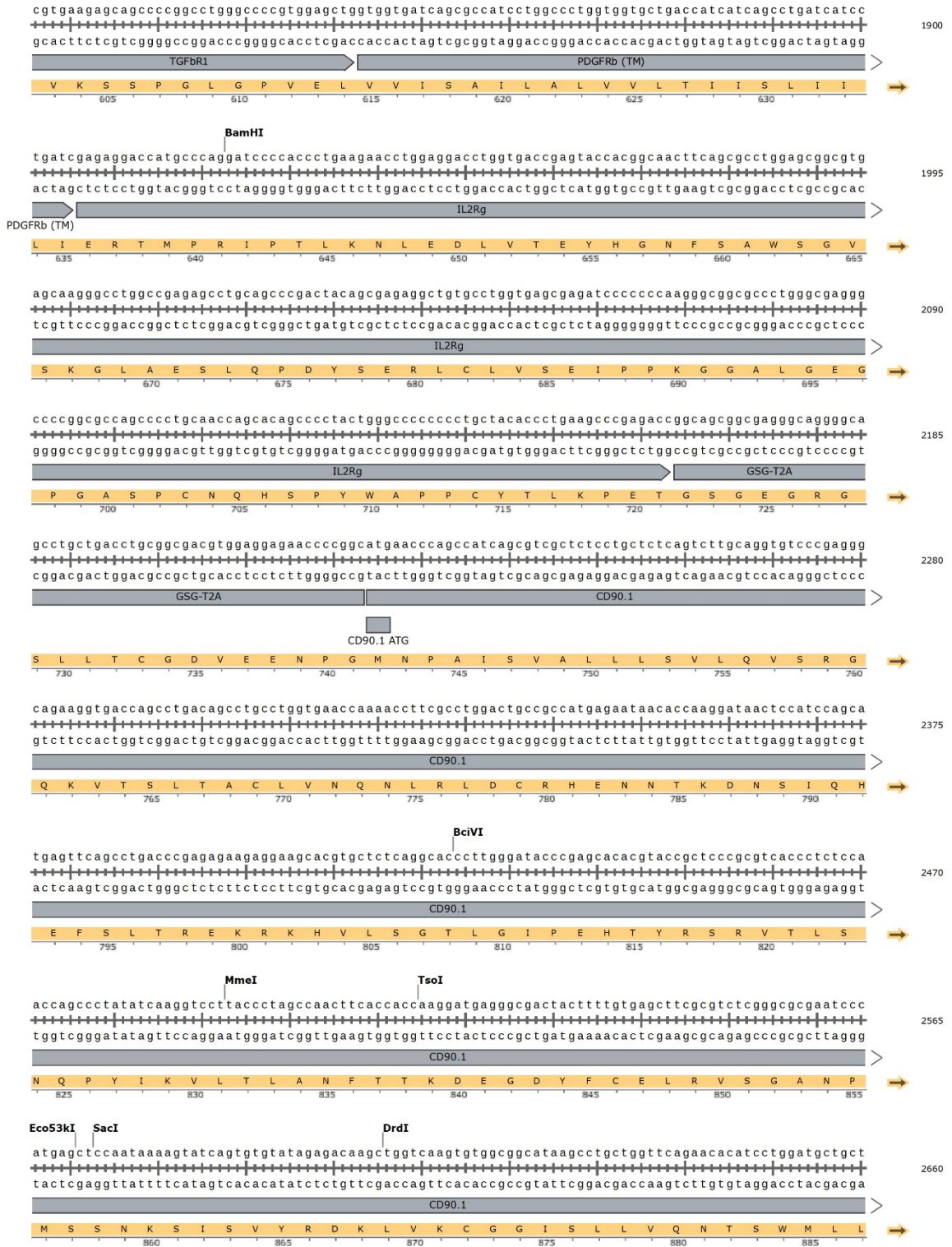


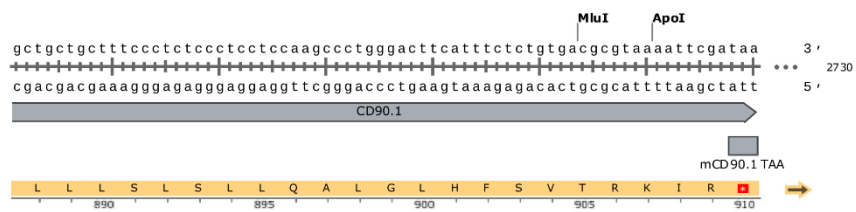


7.1.9 #2434 pBullet_cSWR_TGFbR2-PDGFRbTM-IL2Rb_TGFbR1-PDGFRbTM-IL2Rg_T2A_mCD90.1









Confirmation of Publication and Licensing Rights

June 6th, 2023
 Science Suite Inc.

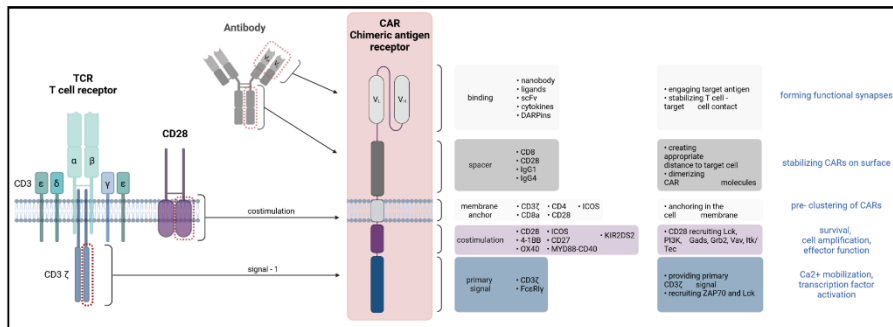
Subscription: Institution
Agreement number: GE25GF71HY
Journal name: Dissertation Marcell Kaljanac

To whom this may concern,

This document is to confirm that Hinrich Abken has been granted a license to use the BioRender content, including icons, templates and other original artwork, appearing in the attached completed graphic pursuant to BioRender's [Academic License Terms](#). This license permits BioRender content to be sublicensed for use in journal publications.

All rights and ownership of BioRender content are reserved by BioRender. All completed graphics must be accompanied by the following citation: "Created with BioRender.com".

BioRender content included in the completed graphic is not licensed for any commercial uses beyond publication in a journal. For any commercial use of this figure, users may, if allowed, recreate it in BioRender under an Industry BioRender Plan.



For any questions regarding this document, or other questions about publishing with BioRender refer to our [BioRender Publication Guide](#), or contact BioRender Support at support@biorender.com.

Confirmation of Publication and Licensing Rights

June 6th, 2023
 Science Suite Inc.

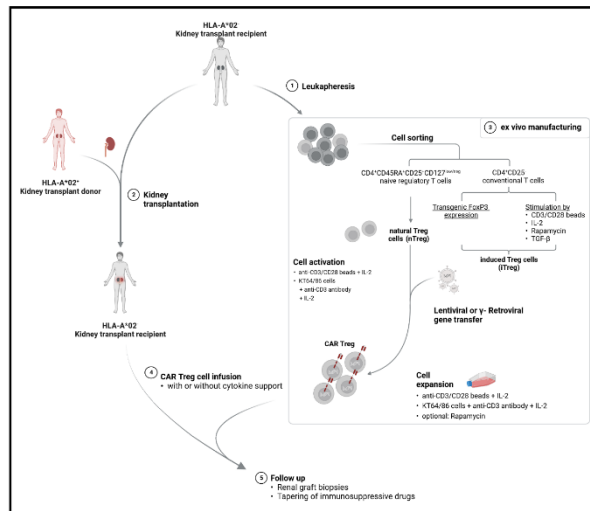
Subscription: Institution
Agreement number: NK25GF7B22
Journal name: Dissertation Marcell Kaljanac

To whom this may concern,

This document is to confirm that Hinrich Abken has been granted a license to use the BioRender content, including icons, templates and other original artwork, appearing in the attached completed graphic pursuant to BioRender's [Academic License Terms](#). This license permits BioRender content to be sublicensed for use in journal publications.

All rights and ownership of BioRender content are reserved by BioRender. All completed graphics must be accompanied by the following citation: "Created with BioRender.com".

BioRender content included in the completed graphic is not licensed for any commercial uses beyond publication in a journal. For any commercial use of this figure, users may, if allowed, recreate it in BioRender under an Industry BioRender Plan.



For any questions regarding this document, or other questions about publishing with BioRender refer to our [BioRender Publication Guide](#), or contact BioRender Support at support@biorender.com.

Confirmation of Publication and Licensing Rights

June 6th, 2023
Science Suite Inc.

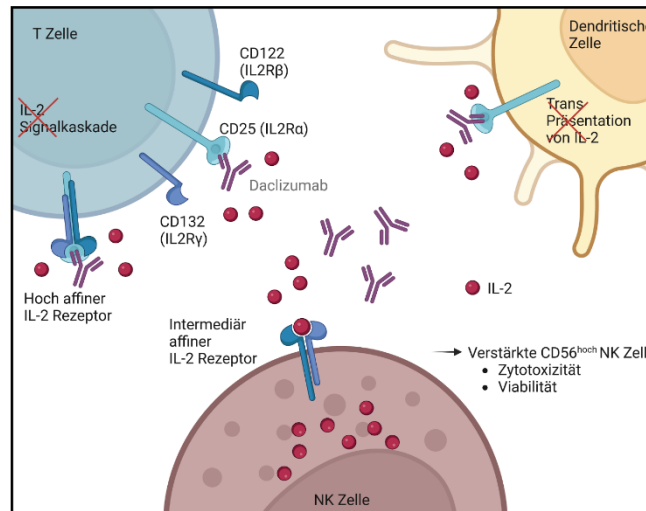
Subscription: Institution
Agreement number: PI25GF7UO5
Journal name: Dissertation Marcell Kaljanac

To whom this may concern,

This document is to confirm that Hinrich Abken has been granted a license to use the BioRender content, including icons, templates and other original artwork, appearing in the attached completed graphic pursuant to BioRender's [Academic License Terms](#). This license permits BioRender content to be sublicensed for use in journal publications.

All rights and ownership of BioRender content are reserved by BioRender. All completed graphics must be accompanied by the following citation: "Created with BioRender.com".

BioRender content included in the completed graphic is not licensed for any commercial uses beyond publication in a journal. For any commercial use of this figure, users may, if allowed, recreate it in BioRender under an Industry BioRender Plan.



For any questions regarding this document, or other questions about publishing with BioRender refer to our [BioRender Publication Guide](#), or contact BioRender Support at support@biorender.com.

Confirmation of Publication and Licensing Rights

June 6th, 2023
 Science Suite Inc.

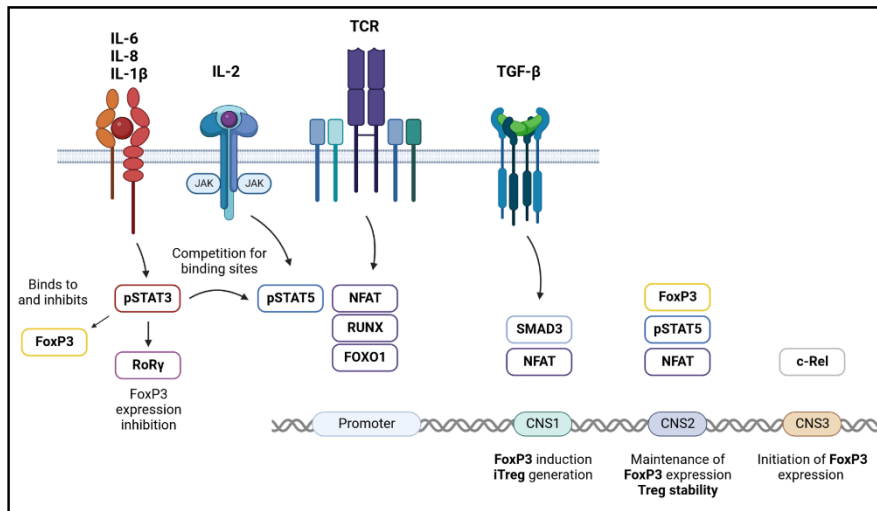
Subscription: Institution
Agreement number: YP25GF8C0D
Journal name: Dissertation Marcell Kaljanac

To whom this may concern,

This document is to confirm that Hinrich Abken has been granted a license to use the BioRender content, including icons, templates and other original artwork, appearing in the attached completed graphic pursuant to BioRender's [Academic License Terms](#). This license permits BioRender content to be sublicensed for use in journal publications.

All rights and ownership of BioRender content are reserved by BioRender. All completed graphics must be accompanied by the following citation: "Created with BioRender.com".

BioRender content included in the completed graphic is not licensed for any commercial uses beyond publication in a journal. For any commercial use of this figure, users may, if allowed, recreate it in BioRender under an Industry BioRender Plan.



For any questions regarding this document, or other questions about publishing with BioRender refer to our [BioRender Publication Guide](#), or contact BioRender Support at support@biorender.com.

Confirmation of Publication and Licensing Rights

June 1st, 2023
Science Suite Inc.

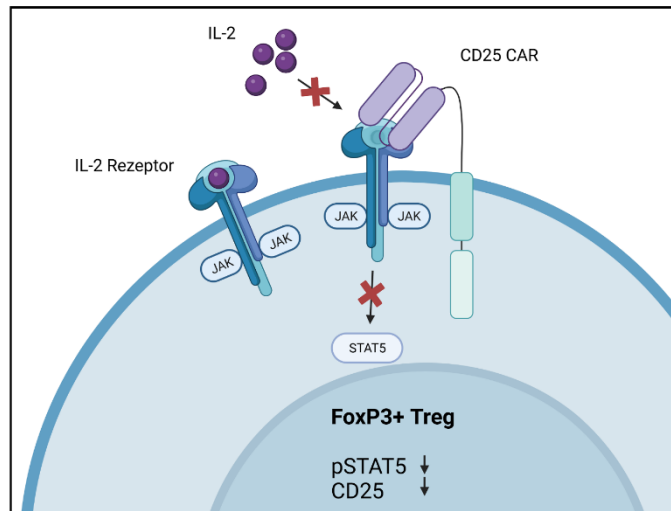
Subscription: Institution
Agreement number: SV25FOOMOX
Journal name: Dissertation Marcell Kaljanac

To whom this may concern,

This document is to confirm that Hinrich Abken has been granted a license to use the BioRender content, including icons, templates and other original artwork, appearing in the attached completed graphic pursuant to BioRender's [Academic License Terms](#). This license permits BioRender content to be sublicensed for use in journal publications.

All rights and ownership of BioRender content are reserved by BioRender. All completed graphics must be accompanied by the following citation: "Created with BioRender.com".

BioRender content included in the completed graphic is not licensed for any commercial uses beyond publication in a journal. For any commercial use of this figure, users may, if allowed, recreate it in BioRender under an Industry BioRender Plan.



For any questions regarding this document, or other questions about publishing with BioRender refer to our [BioRender Publication Guide](#), or contact BioRender Support at support@biorender.com.

Confirmation of Publication and Licensing Rights

June 1st, 2023
Science Suite Inc.

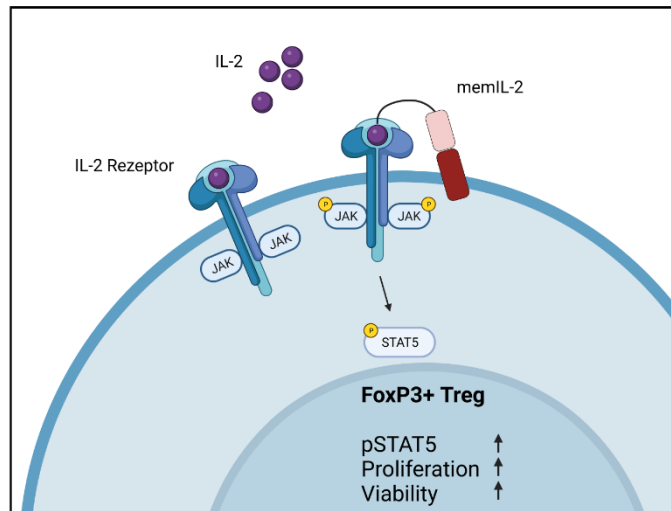
Subscription: Institution
Agreement number: XD25FOV272
Journal name: Dissertation Marcell Kaljanac

To whom this may concern,

This document is to confirm that Hinrich Abken has been granted a license to use the BioRender content, including icons, templates and other original artwork, appearing in the attached completed graphic pursuant to BioRender's [Academic License Terms](#). This license permits BioRender content to be sublicensed for use in journal publications.

All rights and ownership of BioRender content are reserved by BioRender. All completed graphics must be accompanied by the following citation: "Created with BioRender.com".

BioRender content included in the completed graphic is not licensed for any commercial uses beyond publication in a journal. For any commercial use of this figure, users may, if allowed, recreate it in BioRender under an Industry BioRender Plan.



For any questions regarding this document, or other questions about publishing with BioRender refer to our [BioRender Publication Guide](#), or contact BioRender Support at support@biorender.com.

Confirmation of Publication and Licensing Rights

June 1st, 2023
Science Suite Inc.

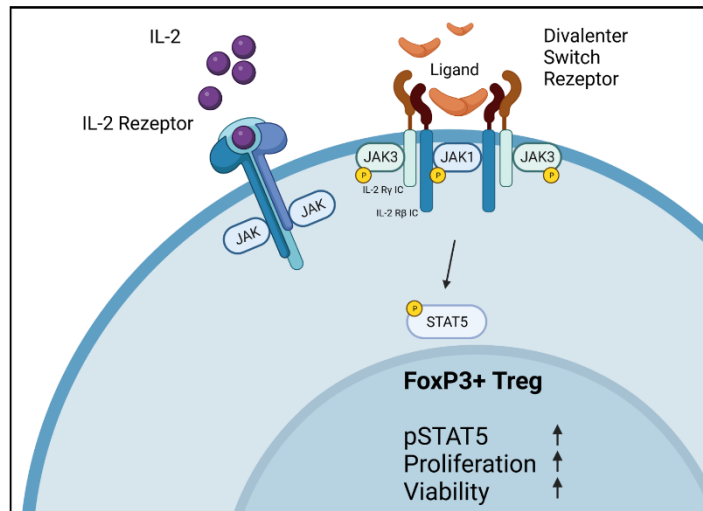
Subscription: Institution
Agreement number: YY25FPNGOZ
Journal name: Dissertation Marcell Kaljanac

To whom this may concern,

This document is to confirm that Hinrich Abken has been granted a license to use the BioRender content, including icons, templates and other original artwork, appearing in the attached completed graphic pursuant to BioRender's [Academic License Terms](#). This license permits BioRender content to be sublicensed for use in journal publications.

All rights and ownership of BioRender content are reserved by BioRender. All completed graphics must be accompanied by the following citation: "Created with BioRender.com".

BioRender content included in the completed graphic is not licensed for any commercial uses beyond publication in a journal. For any commercial use of this figure, users may, if allowed, recreate it in BioRender under an Industry BioRender Plan.



For any questions regarding this document, or other questions about publishing with BioRender refer to our [BioRender Publication Guide](#), or contact BioRender Support at support@biorender.com.