

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie
Abteilung der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. S. Endres

**PD-1-CD28-Fusionsrezeptor-transduzierte CD4+ T-Zellen für die adoptive
T-Zell-Therapie von murinen Pankreaskarzinom- und
Non-Hodgkin-Lymphommodellen**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Fabian Bernhard Thaddäus Kraus
aus Neumarkt in der Oberpfalz
2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
Der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Stefan Endres

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Stefan Böck
Prof. Dr. Julia Mayerle
PD Dr. Tobias Birnbaum

Mitbetreuung
durch den promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. Sebastian Kobold

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 15.04.2021

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	1
1.1	Grundlagen, Formen und Anwendungsbeispiele des adoptiven T-Zell-Transfers	2
1.1.1	Ausbildung einer anti-tumoralen Effektorfunktion durch T-Zell- <i>Priming</i>	2
1.1.2	Zytotoxizitätsmechanismen von CD8+ Effektor-T-Zellen	2
1.1.3	Der adoptive Transfer tumorinfiltrierender Lymphozyten als immunonkologische Behandlungsstrategie	3
1.1.4	Vereinfachung der Protokolle zum adoptiven T-Zell-Transfer mittels T-Zell-Transduktion	4
1.2	Das ungeklärte Potenzial CD4+ T-Zell-gestützter Tumortherapien	5
1.2.1	Wirksamkeitssteigerung des adoptiven Zelltransfers durch CD4+ T-Zellen	5
1.2.2	Die Beteiligung von CD4+ T-Zellen an der Schaffung pro- sowie anti-tumoraler Mikromilieus	6
1.3	Die Relevanz der Immuncheckpoints und deren Überwindung für den adoptiven T-Zell-Transfer	7
1.3.1	Suppression der anti-tumoralen T-Zell-Antwort durch <i>cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4</i> (CTLA-4) und <i>programmed cell death protein 1</i> (PD-1)	8
1.3.2	Umkehrung der T-Zell- <i>Exhaustion</i> durch Aufhebung des PD-1-Signals	9
1.3.3	Erhöhung der Therapiewirksamkeit durch Kombination von adoptiven T-Zell-Transfers und Immuncheckpoint-Inhibitoren	9
1.3.3.1	Aufhebung des PD-1-Signals zur Verstärkung des adoptiven Transfers von CD8+ T-Zellen	10
1.3.3.2	Reaktivierung adoptiv transferierter CD8+ T-Zellen durch Konversion PD-1-vermittelter T-Zell-Inhibition in T-Zell-Stimulation	10
1.3.3.3	Relevanz der PD-1-Signalkonversion für die anti-tumorale Wirkung von CD4+ T-Zellen	11
1.4	Ziele der vorliegenden Promotionsarbeit	12
2	Material	13
2.1	Technische Ausstattung	13
2.2	Verbrauchsmittel	14
2.3	Chemikalien und Reagenzien	14
2.4	Assays	15
2.5	Zellstimulanten und Zytokine	15
2.6	Antikörper	16
2.7	Zelllinien, Zellkulturmedien und Medienzusätze	17

2.7.1	Zelllinien	17
2.7.2	Zusätze für Zellkulturmedien	18
2.7.3	Zellkulturmedien	18
2.8	Pufferlösungen	19
2.9	Software	19
3	Methoden	20
3.1	Zellbiologische Methoden	20
3.1.1	Allgemeine Zellkulturbedingungen	20
3.1.2	Transduktion primärer muriner T-Zellen	20
3.1.2.1	Produktion replikationsdefizienter ekotroper Retroviren	20
3.1.2.2	Isolation muriner Splenozyten und Anreicherung der CD4+ und CD8+ T-Zell-Populationen	21
3.1.2.3	Transduktion von CD4+ und CD8+ T-Zellen	21
3.1.2.4	<i>In-vitro</i> -Expansion der transduzierten T-Zellen	22
3.1.3	Transduktion muriner Tumorzelllinien	22
3.1.4	Tumorzellstimulation mit rekombinantem murinen Interferon- γ	22
3.1.5	Stimulationsassays mit murinen Antikörpern	23
3.1.6	T-Zell-Tumorzell-Co-Kultur-Assays	23
3.1.6.1	Stimulationsassays mit Tumorzellen	23
3.1.6.2	Zytotoxizitätsassays	23
3.1.6.3	Phänotypisierungs- und Proliferationsassays	24
3.1.6.4	Interleukin-2-Neutralisationsassays	24
3.2	Immunologische Methoden	24
3.2.1	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>	24
3.2.2	Laktatdehydrogenase-basierte Zytotoxizitätsassays	24
3.2.3	Durchflusszytometrie	25
3.3	Tierversuche	26
3.3.1	Labortierhaltung	26
3.3.2	<i>In-vivo</i> -Therapieversuche	26
3.4	Statistische Analysen	27
4	Ergebnisse	28
4.1	Funktionalitätsnachweis des PTM-Fusionsrezeptors in CD4+ T-Zellen	28
4.2	Synergistische Verstärkung von T-Zell-Stimulierbarkeit und -Effektoraktivität durch PTM-transduzierte CD4+ T-Zellen in Co-Kultur mit Tumorzellen	30
4.3	Charakterisierung des Phänotyps PTM-transduzierter CD4+ und CD8+ T-Zellen in T-Zell-Tumorzell-Co-Kulturen	33

4.4	<i>In-vivo</i> -Verlangsamung des Tumorwachstums durch Kombination von PTM-transduzierten CD4+ und PTM-transduzierten CD8+ T-Zellen	35
4.5	Positive Korrelation des Mengenverhältnisses CD4+ zu CD8+ T-Zellen mit der synergistischen Aktivität der T-Zellen	36
4.6	Aufhebung des Einflusses PTM-transduzierter CD4+ T-Zellen auf Interferon- γ -Sekretion und Zytotoxizität mittels Interleukin-2-Neutralisation	39
5.	Diskussion	41
5.1	Einordnung und Interpretation der erzielten Ergebnisse	41
5.1.1	Funktionalitätsnachweis PTM-transduzierter CD4+ T-Zellen	41
5.1.2	Der anti-tumorale Wirksynergismus PTM-transduzierter CD4+ und CD8+ Lymphozyten	43
5.1.3	Das Überwiegen weniger ausdifferenzierter PTM-transduzierter T-Zellen in T-Zell-Tumorzell-Co-Kulturen	46
5.1.4	<i>In-vivo</i> -Tumorkontrolle durch den adoptiven Transfer von PTM-transduzierten CD4+ und CD8+ T-Zellen	47
5.1.5	Positive Korrelation des CD4+ : CD8+ T-Zell-Verhältnisses mit dem synergistischen Wirkpotenzial der T-Zellen	48
5.1.6	Interleukin-2 als Mediator des PTM-abhängig gesteigerten anti-tumoralen Synergismus	49
5.2	Limitationen der Arbeit	52
5.2.1	Die offene Frage nach der <i>in-vitro</i> -Antigenerkennung durch CD4+ T-Zellen	52
5.2.2	Die Übertragbarkeit der Ergebnisse vom murinen OT-1-OT-2-Modellsystem in den humanen Organismus	53
5.3	Ausblick: Das therapeutische Potenzial PTM-transduzierter CD4+ T-Zellen	54
6	Zusammenfassung	56
7	Summary	57
8	Literaturverzeichnis	58
9	Anhang	72
9.1	Abkürzungsverzeichnis	72
9.2	Veröffentlichungen	74
9.2.1	Originalarbeiten	74
9.2.2	<i>Abstracts</i> und Poster	74
10	Danksagung	76
11	Eidesstattliche Versicherung	77

1 Einführung

Die Evolution entarteter Körper- zu Krebszellen vollzieht sich in einem Wechselspiel aus genetischer Dysregulation und immunologischen Abwehrmechanismen. Dem Begriff des *immunoeditings* zufolge kann dieser dynamische Prozess in drei Phasen eingeteilt werden (Dunn et al., 2002): In einem ersten Stadium (*elimination*) unterliegen mutierte Körperzellen noch weitestgehend der Regulation des Immunsystems. Das zweite Stadium (*equilibrium*) stellt ein dynamisches Gleichgewicht aus der partiellen Kontrolle mutierter Zellen einerseits sowie der vereinzelten Entstehung von Krebszellen andererseits dar, die sich unter dem aufgebauten Selektionsdruck schrittweise einer suffizienten Immunkontrolle entziehen. In einer dritten Phase, der Immunevasion, zeigen sich derart selektierte Zellen nahezu vollständig resistent gegenüber den immunologischen Kontrollmechanismen und wachsen invasiv und disseminiert im immunkompetenten *host* (*escape*).

Dieses Modell führt anschaulich an die grundsätzlich ambivalente Rolle angeborener und adaptiver Abwehrmechanismen bei der Entstehung, Ausbreitung und Bekämpfung von Krebs heran: Während *Cluster of differentiation 8-positive* (CD8+) Lymphozyten und CD4+ Typ-1-T-Helferzellen (Th1-Zellen) zu den wichtigsten Effektorzellen mit anti-tumoraler Wirkung zählen (Surman et al., 2000), sind Tumor-assoziierte Makrophagen oder myeloide Suppressorzellen (MDSZ) an der Schaffung chronischer Entzündungsreaktionen mit großem pro-tumoralen Potenzial beteiligt (Gonzalez et al., 2018). Eine dritte Zellgruppe, zu der u.a. Typ-17-T-Helferzellen (Th17-Zellen) sowie regulatorische T-Zellen (T_{reg}) gehören, können beide Funktionen ausüben – je nach den lokalen Gegebenheiten des individuellen Tumormikromilieus und seiner Vielfalt an zellulären, membrangebundenen und humoralen Wirkkomponenten (Zamarron et al., 2011). Die maßgebliche Bedeutung des Immunsystems für die Entstehung wie auch für die Abwehr von Tumoren rückt innovative Immuntherapiekonzepte in den Mittelpunkt der Suche nach spezifischen, langwirksamen und anpassungsfähigen Tumortherapien.

1.1 Grundlagen, Formen und Anwendungsbeispiele des adoptiven T-Zell-Transfers

1.1.1 Ausbildung einer anti-tumoralen Effektorfunktion durch T-Zell-Priming

Unter den Immunzellen mit anti-tumoraler Wirkung verdienen CD8+ T-Zellen auf Grund ihrer Fähigkeit, Tumorzellen sicher zu identifizieren und zu eradizieren, besondere Beachtung. Um ihre zytotoxische Effektorfunktion entfalten zu können, müssen naive, Antigen-spezifische Lymphozyten in einem ersten Schritt, dem T-Zell-*Priming*, von Antigenpräsentierenden Zellen (APZ) aktiviert werden (Prlic et al., 2007). In der Regel sind hierzu mindestens zwei verschiedene Stimuli notwendig. Signal 1 resultiert aus der spezifischen Interaktion von T-Zell-Rezeptor (TZR) und CD4- oder CD8-Co-Rezeptor auf Seiten der T-Zellen mit dem Peptid : *major histocompatibility complex* (MHC) auf Seiten der APZ (Goral et al., 2011). Signal 2 ist nicht Antigen-spezifisch und leitet sich aus der Wechselwirkung co-stimulatorischer Moleküle, wie den APZ-gebundenen B7-1- oder B7-2-Proteinen, mit ihrem Rezeptor CD28 auf der T-Zell-Oberfläche ab (Sharpe et al., 2006). Erst die Kombination beider Signale gewährleistet nachhaltig die Aktivierung, Proliferation und Persistenz einer T-Zelle, während Zytokine, wie z. B. Interleukin-2 (IL-2), die Differenzierung der T-Zelle in die jeweilige Effektor-Subpopulation steuern (Hughes et al., 2005). Sowohl ein Fehlen des co-stimulatorischen Signal 2 als auch ein Mangel an IL-2 führen üblicherweise zu Immuntoleranz, Anergie oder zum Untergang der T-Zelle (Murphy et al., 2014). Zur Induktion eines immunologischen Gedächtnisses und um eine wiederkehrende Stimulation von CD8+ T-Zellen zu ermöglichen, ist nicht nur eine Interaktion zwischen APZ und zytotoxischen CD8+ T-Zellen erforderlich, sondern auch zwischen APZ und CD4+ T-Helferzellen (Pardoll et al., 1998; Huang et al., 2007).

1.1.2 Zytotoxizitätsmechanismen von CD8+ Effektor-T-Zellen

So entstandene CD8+ Effektor-T-Zellen haben die Aufgabe, krankhaft veränderte Körperzellen spezifisch zu erkennen und zu beseitigen (Murphy et al., 2014). Zur Apoptoseinduktion stehen ihnen grundsätzlich zwei verschiedene Mechanismen zur Verfügung. Der Erste basiert auf der Freisetzung der humoralen Zytotoxizitäts-Faktoren Perforin, Granzym und Granulysin. Der zweite Mechanismus beruht auf der Interaktion membrangebundener Proteine, namentlich des T-Zell-gebundenen Fas-Liganden mit dem Fas-Rezeptor auf der Oberfläche der Zielzellen, und dient vor allem der Lymphozytenhomöostase und -elimination (Shresta

et al., 1998). Beiden Mechanismen zur Apoptoseinduktion geht die TZR-abhängige Erkennung zytosolischer Fremdantigene voraus, welche von MHC-I-Molekülen auf der Oberfläche krankhafter Körperzellen präsentiert werden (Murphy et al., 2014). Neben pathogenassoziierten Peptiden (Blum et al., 2013) fungieren auch Tumorproteine als Fremdantigene (Tumorantigene), wobei Ihre Präsentation auf den MHC-I-Molekülen der Tumorzellen durch die Interferon- γ (IFN- γ) -Ausschüttung der T-Zellen moduliert werden kann (Zhou et al., 2009).

Gegenwärtig versucht eine Vielzahl personalisierter Immuntherapiekonzepte die Fähigkeit der T-Zellen, eine spezifische und anhaltende anti-tumorale Antwort hervorzubringen, gezielt einzusetzen. Aus der breiten Palette immuntherapeutischer Strategien wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit einem Beispiel besondere Beachtung zuteil, welches in den vergangenen Jahren zunehmend Einzug in die Klinik fand: der adoptive T-Zell-Transfer (AZT).

1.1.3 Der adoptive Transfer tumorinfiltrierender Lymphozyten als immunonkologische Behandlungsstrategie

Der AZT beschreibt die therapeutische Anwendung von T-Zellen. Dabei werden Tumore eines Patienten* exzidiert, fragmentiert und mit IL-2 ex vivo kultiviert, was zur Stimulation und Proliferation der enthaltenen T-Zellen führt. Es schließen sich eine optionale Selektions- sowie eine Expansionsphase an, an deren Ende bis zu 10^{11} tumorspezifische T-Zellen gewonnen und dem Patienten reinfundiert werden können (Rosenberg et al., 2015). Die Verabreichung eines lymphodepletierenden Chemotherapieregimes vor dem T-Zell-Transfer trägt ebenso zur Erhöhung der Therapieeffizienz des AZT bei, wie die Gabe von hochdosiertem IL-2 im Anschluss an den T-Zell-Transfer (Dudley et al., 2002).

Grundlegende Hinweise auf das therapeutische Potenzial des AZT-Konzeptes gaben erste klinische Studien an Patienten mit metastasiertem Melanom. Dort erzielte der adoptive Transfer tumorinfiltrierender Lymphozyten (TIL) Ansprechraten von über 50 % sowie dauerhafte Komplettremissionen in 20 % der Fälle bei bereits aggressiv vorbehandelten Patienten (Rosenberg et al., 2011). Trotz dieses beachtlichen Therapieerfolges stellen gegenwärtig vor allem die schonende Isolation sowie die

*Allein aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird auf die gleichzeitige Verwendung männlicher und weiblicher Sprachformen verzichtet. Sämtliche Personenbezeichnungen gelten gleichberechtigt für alle Geschlechter.

ex-vivo-Kultivierung der Patiententumore eine große Herausforderung dar (Dudley et al., 2003). Hinzu kommt eine noch unzureichende Effizienz bei der *in-vitro*-Expansion tumorspezifischer Lymphozyten aus nicht-melanozytären Tumoren (Yannelli et al., 1996). Einerseits entstehen durch die Produktion zu lange Wartezeiten in Anbetracht des häufig fortgeschrittenen Tumorstadions (Li et al., 2017). Andererseits sind die T-Zell-Produkte häufig zu weit ausdifferenziert und besitzen ein eingeschränktes Proliferations- und anti-tumorales Potenzial (Huang et al., 2005; Powell et al., 2005). Herausforderungen wie diese stehen bislang einer Erprobung TIL-basierter AZT-Konzepte in großen klinischen Studien im Wege (Geukes Foppen et al., 2015).

1.1.4 Vereinfachung der Protokolle zum adoptiven T-Zell-Transfer mittels T-Zell-Transduktion

Eine Alternative zur TIL-Isolation ist die Gewinnung von T-Zellen mittels Leukapharese aus Patientenblut (Paroder et al., 2019). Um die anti-tumorale Reaktivität dieser Zellen zu erhöhen und ein breiteres Tumorspektrum AZT-basierter Therapien zugänglich zu machen, können die aus Patientenblut extrahierten Lymphozyten durch genetische Modifikation zur Tumorspezifität gebracht werden. Gegenwärtig stehen hierzu vor allem zwei Strategien zur Verfügung: Erstens, die gentechnische Expression der α - und der β -Kette eines definierten TZR, welcher spezifisch ein MHC-I-gebundenes tumorassoziiertes Antigen erkennen und so die T-Zelle aktivieren kann (Rosenberg et al., 2015) oder zweitens, die Expression eines chimären Antigen-Rezeptors (CAR) (Kobold, Duewell et al., 2015). CAR sind artifizielle Rezeptoren, die eine T-Zelle durch spezifische Bindung an ein tumorassoziiertes Antigen ohne MHC-Restriktion aktivieren (Rosenberg et al., 2015). Sie bestehen aus den variablen Domänen einer leichten und einer schweren Immunglobulinkette (*single chain variable fragment [scFv]*) als extrazelluläre Antigenerkennungsdomäne, einer Spacer-Region, einer Transmembrandomäne sowie einer intrazellulären Signaldomäne (Stoiber et al., 2019). Je nach Generation des CAR setzt sich letztere wiederum aus einem CD3 ζ -Abschnitt sowie einer oder mehreren co-stimulatorischen Proteindomänen zusammen (Golubovskaya et al., 2016).

Erste Erfolge in vorklinischen und klinischen Studien zur Behandlung hämatologischer Neoplasien belegen das große Potenzial des AZT für die personalisierte Immuntherapie gegen Krebs (Rosenberg et al., 2015). Auf dieser Grundlage erteilte die US-amerikanische *Food and Drug Administration* (FDA) im Jahr 2017 erstmalig die Zulassung für ein aus T-Zellen bestehendes Krebsmedikament: Tisagenlecleucel, eine

CAR-T-Zell-Therapie gegen die refraktäre oder rezidivierende akute lymphatische B-Zell-Leukämie (Maude et al., 2018) sowie gegen das diffus großzellige B-Zell-Lymphom (DLBCL) (Schuster et al., 2019). Ebenfalls seit dem Jahr 2017 ist mit Axicabtagen Ciloleucel eine weitere CAR-T-Zell-Therapie gegen DLBCL sowie gegen das primär mediastinale B-Zell-Lymphom zugelassen (Neelapu et al., 2017). Auf Grund der bislang einzigartigen Remissionsraten sowie des signifikanten Überlebensvorteils für Patienten mit einer andernfalls sehr schlechten Prognose haben sich diese beiden anti-CD19 CAR-T-Zell-Therapien bereits jetzt als fester Bestandteil der jeweiligen Standardtherapien etabliert (Liu et al., 2017). Darüber hinaus befindet sich derzeit eine große Zahl weiterer AZT-basierter Therapiestrategien sowohl gegen hämatologische als auch gegen nicht-hämatologische Neoplasien in der klinischen Erprobung (El-Daly et al., 2019).

1.2 Das ungeklärte Potenzial CD4+ T-Zell-gestützter Tumortherapien

Es werden im Rahmen der meisten AZT-Therapieprotokolle nicht nur CD8+ T-Zellen, sondern mit ihnen auch CD4+ T-Zellen isoliert, *ex vivo* transduziert und dem Patienten reinfundiert (Rosenberg et al., 2015). Zwar ist es technisch möglich, verschiedene T-Zell-Subpopulationen kalkuliert und präzise zu einem wirksamen Zellcocktail zu kombinieren (Riddell et al., 2014), doch sehen zahlreiche AZT-Protokolle noch immer davon ab, ein exaktes Mischverhältnis aus CD4+ und CD8+ T-Zellen als therapeutischen Standard zu implementieren (Gardner et al., 2017). Vielmehr wird lediglich auf CD3+ T-Zellen selektiert. Das konkrete Verhältnis CD4+ zu CD8+ T-Zellen variiert im Einzelfall stark und hängt meist von zufälligen Faktoren, wie dem Mengenverhältnis der einzelnen Zellpopulationen im Patientenblut oder deren Expansionsverhalten *in vitro* ab. Die Auswirkungen dieser Variabilität hinsichtlich Therapieeffizienz, Nebenwirkungsprofil und Nachhaltigkeit des Therapieerfolges sind weitestgehend unerforscht (Riddell et al., 2014).

1.2.1 Wirksamkeitssteigerung des adoptiven Zelltransfers durch CD4+ T-Zellen

In jedem Fall existieren Hinweise auf eine Überlegenheit von Kombinationstherapien mit CD4+ und CD8+ T-Zellen im Vergleich zu Einzelgaben von ausschließlich CD4+ oder CD8+ T-Zellen (Li et al., 2017). Präklinische Studien legen nahe, das Mengenverhältnis von CD4+ zu CD8+ T-Zellen vor dem Transfer an die *ex-ante*-definierten Zielwerte anzugelichen, um die Therapiewirksamkeit zu optimieren

(Riddell et al., 2014; Turtle et al., 2016; Turtle, Gooley et al., 2016). In Tierexperimenten konnten eine verstärkte Proliferation und eine verbesserte anti-tumorale Reaktivität bei gleichzeitig geringeren Nebenwirkungen durch die kombinierte Verabreichung von CD4+ und CD8+ T-Zellen erreicht werden. Die dabei benötigte Menge an CD4+ und CD8+ T-Zellen lag in der Kombinationsstrategie deutlich unter den bisherigen Mindestdosen für die entsprechenden Monotherapien (Sommermeyer et al., 2016). Auch erste klinische Studien wiesen auf eine synergistisch erhöhte anti-tumorale Wirksamkeit und das verbesserte Toxizitätsprofil hin, wenn CAR-transduzierte CD4+ und CD8+ T-Zellen in einem festen 1 : 1 Verhältnis eingesetzt wurden (Gardner et al., 2017; Turtle et al., 2016; Turtle, Gooley et al., 2016).

Zwar wird gegenwärtig CD8+ T-Zellen eine besondere Rolle für die Effizienz des CD4+-CD8+-Kombinationsregimes zugesprochen, doch ist die Bedeutung adoptiv transferierter CD4+ T-Zellen *bis dato* nur unzureichend geklärt (Perez-Diez et al., 2007). Erste präklinische und klinische Studien deuten darauf hin, dass sie sogar jene der CD8+ Lymphozyten übersteigen könnte (Perez-Diez et al., 2007; Tran et al., 2014). So induzierte der adoptive Transfer von CD4+ TIL in einer *Proof-of-concept*-Studie eine dauerhafte Komplettremission in einem an metastasiertem Melanom erkrankten Patienten (Hunder et al., 2008). Dabei steht fest, dass sich die anti-tumorale Wirksamkeit der CD4+ T-Zellen mehrerer verschiedener Mechanismen bedient (Ding et al., 2010).

1.2.2 Die Beteiligung von CD4+ T-Zellen an der Schaffung pro- sowie anti-tumoraler Mikromilieus

CD4+ T-Zellen unterscheiden sich hinsichtlich Funktion und sekretorischem Phänotyp klar von CD8+ T-Zellen, ohne dabei als redundant zu gelten. Durch ihre Zytokin- und Chemokinproduktion sind CD4+ T-Zellen von entscheidender Bedeutung für die Rekrutierung und Aktivierung tumorreaktiver Immunzellen wie APZ (Pardoll et al., 1998), eosinophiler Granulozyten, natürlicher Killerzellen (NK-Zellen) (Perez-Diez et al., 2007), Makrophagen und B-Zellen (Corhay et al., 2005; Hung et al., 1998). Auf diese Weise leisten sie einen wichtigen indirekten Beitrag zur Eradikation MHC-II-negativer Tumore (Haabeth et al., 2014). Schon seit längerem gilt es jedoch als gesichert, dass CD4+ T-Zellen außerdem über eine direkte zytotoxische Effektorfunktion verfügen und MHC-II-positive Tumorzellen über den Granzym-Perforin-Weg eliminieren (Quezada et al., 2010; Qui et al., 2011).

Allerdings sind nicht alle CD4+ T-Helferzell-Subpopulationen an der Stärkung der Tumorabwehr beteiligt. Im Gegenteil entscheidet das individuelle Zytokinprofil der jeweiligen T-Helferzellfamilie über die Ausprägung eines eher pro- (Rakhra et al., 2010) oder anti-tumoralen Tumormikromilieus (Kayser et al., 2015; Voigt et al., 2017). Während Th1-Zellen überwiegend die zelluläre anti-tumorale Antwort vermitteln und Typ-2-T-Helferzellen (Th2-Zellen) zur Tumordestruktion durch Nekroseinduktion beitragen (Nishimura et al., 1999), inhibieren *Forkhead-box-P3*-positive (FoxP3+) T_{reg} wichtige anti-tumorale Effektorpopulationen wie CD8+ und CD4+ Th1-Zellen, NK-Zellen oder tumorinfiltrierende dendritische Zellen (DZ) (Zou et al., 2006). Zwar konnte die Rolle proinflammatorischer Th17-Zellen bisher nicht eindeutig geklärt werden, jedoch existieren Hinweise auf eine kontextabhängige pro- wie auch anti-tumorale Wirkung (Kryczek et al., 2009; Muranski et al., 2008; Wang et al., 2009).

Obgleich die Helferfunktion von CD4+ Th1-Lymphozyten gegenüber CD8+ Effektor-T-Zellen unstrittig ist, konnte die mechanistische Grundlage dieses Zusammenspiels noch nicht vollständig geklärt werden (Moeller et al., 2005; Kennedy et al., 2006; Wang et al., 2007). Fest steht, dass sich der regulierende Einfluss von CD4+ T-Helferzellen nicht nur auf die Migration, Aktivierung, Proliferation, Differenzierung und Persistenz von tumorinfiltrierenden, zytotoxischen CD8+ T-Zellen erstreckt (Marzo et al., 2000; Hunziker et al., 2002; Haabeth et al., 2014), sondern auch die Ausprägung eines immunologischen Gedächtnisses umfasst (Pardoll et al., 1998).

1.3 Die Relevanz der Immuncheckpoints und deren Überwindung für den adoptiven T-Zell-Transfer

Trotz seiner Erfolge bei der Behandlung bestimmter onkologischer Erkrankungen, unterliegt der AZT mehreren maßgeblichen Limitationen: Erstens, im Falle solider Tumore sind T-Zell-Migration und -Persistenz am Wirkort gegenwärtig zu schwach (Griffith et al., 1989). Zweitens, Tumorzellen entziehen sich der Immunkontrolle durch Verlust ihres Zielantigens via Mutation und Tumorzellevolution (Grupp et al., 2013; Lesch et al., 2019). Drittens, durch physiologische Expression des Zielantigens auf gesunden Körperzellen droht als Nebenwirkung der Untergang gesunden Gewebes (sog. *On-target-off-tumor*-Effekt) (Fisher et al., 2017). Viertens, das Mikromilieu solider Tumore induziert Anergie und *exhaustion* Antigen-spezifischer T-Zellen durch

vaskuläre, metabolische, zelluläre, humorale und membranständige Faktoren (El-Daly et al., 2019; Petrova et al., 2018; Thommen et al., 2018).

1.3.1 Suppression der anti-tumoralen T-Zell-Antwort durch *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4)* und *programmed cell death protein 1 (PD-1)*

Beispiele für membranständige, immunsuppressive Faktoren mit hoher therapeutischer Relevanz sind die co-inhibitorischen Rezeptoren *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4)* und *programmed cell death protein 1 (PD-1)*. Sowohl CTLA-4 wie auch PD-1 zählen zur B7-Rezeptorfamilie, zu der auch CD28 gehört (Buchbinder et al., 2016). Als zentrale Immuncheckpoints spielen sie bei der Vermeidung von Autoimmunreaktionen eine tragende Rolle (Zou et al., 2008). Sie unterscheiden sich jedoch hinsichtlich ihres inhibitorischen Wirkmechanismus (Keir et al., 2008).

CTLA-4 entfaltet sein immunsuppressives Potenzial früh, vor allem während des T-Zell-*Primings* in lymphatischen Geweben (Keir et al., 2008). Dazu konkurriert es mit dem co-stimulatorischen CD28-Rezeptor um Bindung der Liganden CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2) und induziert durch Inhibition des TZR-Signalweges T-Zell-Anergie (Krummel et al., 2011). Im Gegensatz dazu bewirkt PD-1 vor allem in den bereits aktivierten Effektor-T-Zellen des peripheren Gewebes eine langfristige Antigentoleranz (Buchbinder et al., 2016). Diese geht mit einer Reduktion von Viabilität, Proliferation und Zytokinsekretion der T-Zellen einher (Keir et al., 2008), weshalb PD-1 auch als molekularbiologisches Markerprotein für T-Zell-*Exhaustion* gilt (Wherry et al., 2011). Die PD-1-Wirkung wird durch Rekrutierung der *Src homology 2 domain-containing phosphatase 2* vermittelt (Ankri et al., 2013) und ist sowohl vom TZR- (Xia, Zhang et al., 2019) als auch vom CD28-Signalweg (Hui et al., 2017) abhängig. Sie kann im Mausmodell mittels CD28-*Knockout* komplett aufgehoben werden (Kamphorst et al., 2017).

Physiologischerweise werden die beiden PD-1-Liganden, *programmed death-ligand 1* (PD-L1) und *programmed death-ligand 2* (PD-L2), von einer Vielzahl körpereigener Zellen zum Schutz vor überschießenden Immunreaktionen exprimiert (Chen et al., 2004; Rozali et al., 2012), doch auch Tumore machen sich die PD-1-PD-L1-Achse zur Immunevasion zunutze (Gibbons et al., 2017; Dong et al., 2002). So präsentieren zahlreiche Komponenten des Tumormikromilieus, wie z. B. Stromazellen, TIL, bis hin zu den Tumorzellen selbst, PDL-1 auf ihrer Oberfläche (Zou et al., 2008; Wang et al.,

2016) und regulieren dieses IFN- γ -abhängig sogar noch weiter herauf (Chen et al., 2004). Eine besonders reiche PD-L1-Expression konnte für das Melanom, das nicht-Kleinzellige Bronchialkarzinom (NSCLC) sowie das Ovarialkarzinom nachgewiesen werden (Patel et al., 2015). Die vermehrte PD-L1-Positivität dieser Tumorentitäten ist häufig mit einer erhöhten Anzahl an TIL assoziiert, geht gleichzeitig jedoch mit einer schlechteren Überlebensprognose einher (Hino et al., 2010; Zou et al., 2008).

Zwar werden tumorspezifische T-Zellen durch Bindung ihres Tumorantigens aktiviert, doch geschieht dies paradoxe Weise zum Preis einer erhöhten Expression von PD-1 auf den T-Zellen (Abate-Daga et al., 2013) sowie von PD-L1 auf der Tumorzelloberfläche (Houot et al., 2015). Dieserart führt die vermehrte PD-1-PD-L1-Interaktion zur *exhaustion* tumorspezifischer T-Zellen und trägt zum Versagen AZT-basierter Therapien bei (Abate-Daga et al., 2013).

1.3.2 Umkehrung der T-Zell-*Exhaustion* durch Aufhebung des PD-1-Signals

Erste klinische Hinweise auf die Reversibilität der T-Zell-*Exhaustion* durch Antagonisierung der PD-1-PD-L1-Achse ergaben sich aus mehreren Phase III-Studien zur therapeutischen Wirksamkeit von anti-PD-1- oder anti-PD-L1 Antikörpern (Alsaab et al., 2017; Abdin et al., 2018) an Patienten mit malignem Melanom (Daud et al., 2016), NSCLC (Iafolla et al., 2017; Malhotra et al., 2017), Urothelkarzinom (Bellmunt et al., 2017) und Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches (Pai et al., 2019). Auf der Grundlage dieser und weiterer Studien fanden bis dato zwei anti-PD-1 (Pembrolizumab, Nivolumab) sowie drei anti-PD-L1 Antikörper (Atezolizumab, Durvalumab und Avelumab) für eine ganze Reihe unterschiedlicher Tumorentitäten ihre Zulassung durch die FDA (Abdin et al., 2018). Unter den gegenwärtigen Indikationen befinden sich neben dem malignen Melanom und dem NSCLC auch das tripel-negative Mammakarzinom, das Nierenzellkarzinom und der Morbus Hodgkin (Xia, Xu et al., 2019).

1.3.3 Erhöhung der Therapiewirksamkeit durch Kombination von adoptiven T-Zell-Transfers und Immuncheckpoint-Inhibitoren

Vor diesem Hintergrund erscheint es wahrscheinlich, dass auch der AZT von einer Modulation der Immuncheckpoints profitieren könnte (Kasakovski et al., 2018). Ebenso

wie der AZT geht jedoch auch eine systemische Immuncheckpoint-Inhibition mit einer breiten Palette schwerer Nebenwirkungen einher, die von Hauthausschlägen über Juckreiz bis hin zu lebensbedrohlichen gastrointestinalen Beschwerden und Endokrinopathien reicht (Buchbinder et al., 2016). Aus diesem Grund könnte die Entwicklung gezielterer Strategien zur Überwindung von T-Zell-*Exhaustion* und -Anergie von Vorteil sein (Qin et al., 2017).

1.3.3.1 Aufhebung des PD-1-Signals zur Verstärkung des adoptiven Transfers von CD8+ T-Zellen

Mit diesem Ziel vor Augen wurden durch das CRISPR-Cas9-System PD-1-*Knockout*-T-Zellen hergestellt und mit einem anti-CD133 CAR transduziert. Ihre therapeutische Überlegenheit konnte in einem murinen Gliom-Modell nachgewiesen werden (Hu et al., 2019). Eine ähnliche Behandlungsstrategie befindet sich derzeit mit anti-CD19 PD-1-*Knockout*-CAR-T-Zellen gegen die akute lymphoblastische Leukämie oder gegen das Burkitt-Lymphom in einer klinischen Phase-I-Studie (NCT03298828) (Martinez et al., 2019). Eine andere Herangehensweise zur Kombination von AZT und *Checkpoint*-Blockade wurde mit dem Einsatz anti-PD-1 *Blocking-scFv*-sezernierender CAR-T-Zellen gewählt. Mit ihrer Hilfe konnte ein signifikanter Überlebensvorteil in mehreren unterschiedlichen murinen Tumormodellen erzielt werden (Rafiq et al., 2018).

1.3.3.2 Reaktivierung adoptiv transferierter CD8+ T-Zellen durch Konversion PD-1-vermittelter T-Zell-Inhibition in T-Zell-Stimulation

Unsere Arbeitsgruppe hatte in der Vergangenheit ein Verfahren entwickelt, um die AZT-Wirksamkeit zu verbessern und die PD-1-vermittelte T-Zell-Suppression im Tumormikromilieu lokal und selektiv zu überwinden (Kobold et al., 2015). Im Unterschied zu den vorstehend beschriebenen Therapiestrategien wurde jedoch nicht ausschließlich eine Aufhebung des inhibitorischen PD-1-Signals angestrebt, sondern darüber hinaus eine Konversion desselben in einen co-stimulatorischen Wirkimpuls.

Kern dieses Konzeptes ist ein PD-1-CD28-Fusionsprotein (PTM), welches sich aus der extrazellulären und transmembranösen Domäne des PD-1-Rezeptors in Kombination mit der intrazellulären Domäne des CD28-Rezeptors zusammensetzt. PTM-transduzierte (PTM+), Tumorantigen-spezifische CD8+ T-Zellen sollten von

Tumorzellen aktiviert werden und Effektorzytokine wie z. B. IFN- γ sezernieren. Dadurch könnten sie einerseits die Antigenpräsentation der Tumorzellen verstärken und andererseits die PD-L1-Expression innerhalb des Tumormikromilieus steigern. Jedoch würde das membranständige PD-L1 durch die Bindung an den PTM-Fusionsrezeptor nicht nur neutralisiert, sodass es zur Interaktion mit nativen TIL nicht mehr zur Verfügung stände. Vielmehr wären PTM-transduzierte T-Zellen in der Lage, das ursprünglich inhibitorische PD-L1-Signal in ein Co-Stimulatorisches zu übersetzen und würden so in ihrer Effektorfunktion zusätzlich gestärkt. In Übereinstimmung mit diesen konzeptionellen Überlegungen konnte in experimentellen Vorarbeiten der Arbeitsgruppe die therapeutische Überlegenheit PTM-transduzierter CD8+ T-Zellen *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden. *In vitro* proliferierten die PTM-transduzierten CD8+ T-Zellen stärker, setzten größere Zytokinmengen frei und zeichneten sich durch eine erhöhte Zytotoxizität aus. *In vivo* induzierten sie anhaltende Komplettremissionen in einem murinen Pankreaskarzinommodell sowie die Ausprägung eines immunologischen Gedächtnisses (Kobold et al., 2015).

1.3.3.3 Relevanz der PD-1-Signalkonversion für die anti-tumorale Wirkung von CD4+ T-Zellen

Dennoch war es bisher unklar, inwieweit die Integration von CD4+ T-Zellen in das PTM-Therapiekonzept dessen Wirksamkeit weiter verbessern würde. Immerhin galt es als gesichert, dass CD4+ TIL mit zunehmendem Tumorwachstum PD-1 hochregulierten (Zappasodi et al., 2018). Dieser Phänotyp CD4+ T-Zellen ging mit einer erhöhten Apoptoserate sowie einer verringerten anti-tumoralen Wirksamkeit von Effektor-T-Zellen einher (Ding et al., 2010).

Erste präklinische Hinweise auf den Nutzen der PD-1-*Checkpoint*-Inhibition für den T-Helferzell-basierten AZT gaben Versuche in einem murinen B-Zell-Lymphommodell. Durch therapeutischen Transfer Antigen-spezifischer CD4+ PD-1-*Knockout*-T-Zellen konnten dauerhafte Komplettremissionen in 90 % der Fälle erreicht werden (Ding et al., 2012).

Auch Patientenstudien spiegelten die klinische Relevanz von CD4+ FoxP3- PD-1+ T-Zellen wider. Dort korrelierte deren Anzahl positiv mit dem Tumorprogress sowie negativ mit der Effektorfunktion von TIL oder adoptiv transferierter T-Zellen und konnte

als negativ-prognostischer Marker für das Ansprechen eines Patienten auf die therapeutische PD-1-Inhibition identifiziert werden (Zappasodi et al., 2018).

1.4 Ziele der vorliegenden Promotionsarbeit

Ziel der Arbeit war es, den Nutzen des PTM-Fusionsrezeptors in Antigen-spezifischen CD4+ T-Zellen zu untersuchen und ihrer möglichen Synergie mit CD8+ T-Zellen nachzugehen. Auf Basis der genannten Vorarbeiten und aufgrund der o.g. Überlegungen sollte diese Arbeit sich mit den folgenden Fragestellungen beschäftigen:

- i) Kann der PTM-Rezeptor CD4+ T-Zellen einen relevanten Aktivierungsvorteil verschaffen?
 - Können Proliferationstätigkeit, Viabilität und IFN- γ -Sekretion aktivierter CD4+ T-Zellen durch PTM-Transduktion gesteigert werden?
 - Kann diese Steigerung mit einer veränderten Expression des T-Zell-Mitosemarkers Ki67 und des Differenzierungsmarkers Eomesodermin (EOMES) korreliert werden?
- ii) Welche Auswirkung hat die Kombination PTM+ CD4+ mit PTM+ CD8+ T-Zellen in Co-Kulturen mit unterschiedlichen Tumorzelllinien auf
 - die IFN- γ - und IL-2-Sekretion der T-Zellen?
 - die T-Zell-vermittelte Tumorzelllyse und Granzym B-Freisetzung?
 - das Proliferationsverhalten der CD8+ Effektor-T-Zellen?
- iii) Mit welchen phänotypischen Veränderungen geht die zytotoxische Aktivität transduzierter und untransduzierter CD4+ und CD8+ Lymphozyten in T-Zell-Tumorzell-Co-Kulturen einher?
- iv) Kann durch Kombination PTM+ CD4+ und PTM+ CD8+ T-Zellen eine verbesserte Tumorkontrolle *in vivo* erzielt werden?
- v) In welchem Zusammenhang steht das Mengenverhältnis PTM-transduzierter oder untransduzierter CD4+ und CD8+ T-Zellen mit ihrer synergistischen Wirkverstärkung?
- vi) Welche Auswirkung zeigt die Antikörper-vermittelte IL-2-Neutralisation
 - hinsichtlich der synergistisch verstärkten IFN- γ -Sekretion der T-Zellen?
 - hinsichtlich der synergistisch verbesserten Zytotoxizität der T-Zellen?

2 Material

2.1 Technische Ausstattung

-80 °C Laborgefrierschrank	HERAfreeze™	Thermo Fisher, Waltham, USA
Analysenwaage	CPA1003S	Sartorius Laboratory, Göttingen, DE
Autoklav	Varioklav 500E	HP Medizintechnik, München, DE
CO ₂ -Brutschrank	BBD 6220	Heraeus, Hanau, DE
FACS	Canto II	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
	LSRFortessa	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Heizblock	Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, DE
Kühl- und Gefrierschrank	MediLine	Liebherr, Bulle, CHE
MACS Separatoren	QuadroMACS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE
Mikroskop	Axiovert 40C	Zeiss, Jena, DE
	Axiovert HAL 100	Zeiss, Jena, DE
Multimode Mikroplatten Reader	Mithras LB 940	Berthold, Bad Wildbad, DE
Neubauer Zählkammer	Neubauer-Improved	Marienfeld superior, Lauda-Königshofen, DE
pH-Meter	InoLab pH 720	WTW GmbH, Weilheim, DE
Pipetten	Discovery	PZ HTL S.A., Warszawa, PL
	Comfort	
Pipettierhilfen	Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, DE
Sicherheitswerkbank	HeraSAFE KS	Heraeus, Hanau, DE
Spektralphotometer	NanoDrop 2000c	Thermo Fisher, Waltham, USA
Vortexer	RS-VA 10	Phoenix, Garbsen, DE
Wasserbad	Unitherm-HB	UniEquip, München, DE
Zentrifugen	3L-R Multifuge	Heraeus, Hanau, DE
	Centrifuge	Eppendorf, Hamburg, DE
	5318R	
	Rotina 420R	Hettich GmbH, Tuttlingen, DE

2.2 Verbrauchsmittel

Durchflusszytometrie-Röhrchen (5 ml)	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Einmalspritzen Discardit II (2 ml; 5 ml; 10 ml; 20 ml)	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Einwegskalpelle (Nr.10)	FEATHER, Osaka, JP
ELISA Mikrotiterplatten (96-Well)	Costar Corning, New York, USA
Falcon Zentrifugenröhrchen (15 ml; 50 ml)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, AUT
Kryoröhrchen	Greiner Bio One, Kremsmünster, AUT
MACS SmartStrainers (30 µm; 70 µm; 100 µm)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE
Spritzenvorsatzfilter (0,45 µm; 0,20 µm)	VWR International, Radnor, USA
Mikroreaktionsgefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2,0 ml)	Sarstedt, Nürnbrecht, DE
Petrischalen	BD Medical, Franklin Lakes, USA
Serologische Pipetten	Costar Corning, New York, USA
Spritzen (2 ml; 5 ml; 10 ml)	BD Medical, Franklin Lakes, USA
Zellkulturflaschen (T25 bis T175)	Costar Corning, New York, USA
Zellkulturplatten (6- bis 96-Well)	BD Medical, Franklin Lakes, USA

2.3 Chemikalien und Reagenzien

β-Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
BD Pharm Lyse TM Lysing Buffer (10x)	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt, DE
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	PAA, Pasching, AT
Ethanol 96-100 % (puriss.)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
FACSFlow	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Isofluran	CP Pharma, Burgdorf, DE

Isopropanol (70 %, 100 %)	Apotheke Innenstadt, LMU, München, DE
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
LB-Agar (Luria/Miller)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Natriumchlorid (NaCl)	Apotheke Innenstadt, LMU München, DE
RetroNectin	Takara, Kusatsu, JPN
Schwefelsäure (2 N)	Apotheke Innenstadt, LMU, München, DE
Trypanblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin	PAA, Pasching, AUT
Tween-20	Roth, Karlsruhe, DE

2.4 Assays

CD4+ T Cell Isolation Kit, mouse	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE
CountBright™ Absolute Counting Beads	Invitrogen, Carlsbad, USA
CytoTox96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay	Promega, Mannheim, DE
Granzym B DuoSet® ELISA (murin)	R&D Systems, Minneapolis, USA
FoxP3/Transcription Factor Staining Buffer Set	eBioscience, San Diego, USA
Interferon- γ (IFN- γ) ELISA (murin)	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Interleukin-2 (IL-2) ELISA (murin)	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Plasmidpräparationssystem PureYield™	Promega, Madison, USA
Zombie Aqua Fixable Viability Kit	BioLegend, San Diego, USA

2.5 Zellstimulanten und Zytokine

Dynabeads Mouse T-Activator CD3-CD28	Life Technologies, München, DE
Rekombinantes IFN- γ (murin)	PeproTech, Rocky Hill, USA
Rekombinantes IL-2 (human)	PeproTech, Rocky Hill, USA
Rekombinantes Interleukin-15 (IL-15) (human)	PeproTech, Rocky Hill, USA
Rekombinantes PD-L1-Fc chimäres Protein	R&D Systems, Minneapolis, USA

2.6 Antikörper

Tabelle 1: Fluorochrom-konjugierte Antikörper

Antikörper	Reaktivität	Klon	Hersteller
Anti-CCR7-PerCP/Cy5.5	Maus	4B12	BioLegend, USA
Anti-CD4-Pacific Blue TM	Maus	GK1.5	BioLegend, USA
Anti-CD4-PE/Cy7	Maus	RM4-5	BioLegend, USA
Anti-CD8-APC/Cy7	Maus	53-6.7	BioLegend, USA
Anti-CD8-Pacific Blue TM	Maus	53-6.7	BioLegend, USA
Anti-CD28-APC	Maus	37.51	BioLegend, USA
Anti-CD62L-Pacific Blue TM	Maus	MEL-14	BioLegend, USA
Anti-CD274-PE/Cy7	Maus	10F.9G2	BioLegend, USA
Anti-EOMES-PE/Cy7	Maus	DAN11mag	eBioscience, USA
Anti-Ki67-PE	Maus	16A8	BioLegend, USA
Anti-MHCI-PE	Maus	M1/42.3.9.8	Elabscience, USA
Anti-MHCII-APC	Maus	M5/114.15.2	eBioscience, USA
Anti-PD-1-APC	Maus	RMP-30	BioLegend, USA
Anti-PD-1-FITC	Maus	29F.1a12	BioLegend, USA
Rat IgG2a-PE Isotypkontrolle	-	#54447	R&D Systems, USA
Rat IgG2b kappa-APC	-	eB149/10H5	eBioscience, USA
Isotypkontrolle			
Rat IgG2b kappa-PE/Cy7	-	RTK4530	BioLegend, USA
Isotypkontrolle			

Tabelle 2: Unkonjugierte Antikörper

Antikörper	Reaktivität	Klon	Hersteller
Anti-CD3e	Maus	145-2C11	eBioscience, USA
Anti-CD28	Maus	37.51	eBioscience, USA
Anti-mouse MHC class I	Maus	M1/42.3.9.8	Bio X Cell, USA
Anti-mouse MHC class II	Maus	M5/114.15.2	eBioscience, USA

2.7 Zelllinien, Zellkulturmedien und Medienzusätze

2.7.1 Zelllinien

Zelllinien	Ursprungszellen	Gentechnische Modifikation	Medium	Referenz
EL-4	Murine T-Zell-Lymphom-Linie (C57BL)	-	T-Zell-Kulturmedium	Gorer et al., 1950
E.G7-OVA-PD-L1	Murine T-Zell-Lymphom-Linie (C57BL)	pAC-Neo-OVA pMXs-PD-L1 (Swiss-Prot accession number Q9EP73)	T-Zell-Kulturmedium	Rataj, et al., 2018
Panc02-OVA	Murines, duktales Pankreas-Karzinom (Panc02)	pAC-Neo-OVA	DMEM Vollmedium (DMEM+++)	Kobold et al., 2015
Panc02-OVA-PDL-1	Murines, duktales Pankreas-Karzinom (Panc02)	pAC-Neo-OVA pMXs-puro-PD-L1 (Swiss-Prot accession number Q9EP73)	DMEM Vollmedium (DMEM+++)	Kobold et al., 2015
Platinum-E (PlatE)	Humane embryonale Nierenzellen (HEK 293T)	pGag-pol-IRES-bs ^r pEnv-IRES-puro ^r	PlatE-Zellkulturmedium	Morita, et al., 2000

2.7.2 Zusätze für Zellkulturmedien

Blasticidin	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Dulbecco's modified Eagles's medium (DMEM)	PAA Laboratories, Pasching, AT
Fetales Kälberserum (FBS) – hitzeinaktiviert	Gibco, Carlsbad, USA
HEPES (1 M)	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
L-Glutamin (200 mM)	PAA Laboratories, Pasching, AT
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA Laboratories, Pasching, AT
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640	PAA Laboratories, Pasching, AT
Natriumpyruvat (100 mM)	PAA Laboratories, Pasching, AT

2.7.3 Zellkulturmedien

<i>DMEM Vollmedium (DMEM+++)</i>		<i>T-Zell-Medium (TZM)</i>	
DMEM	500 ml	RPMI 1640	500 ml
FBS	10 % (v/v)	FBS	10 % (v/v)
Penicillin/Streptomycin (100 x)	1 % (v/v)	Penicillin/Streptomycin	1 % (v/v)
L-Glutamin (200 mM)	1 % (v/v)	L-Glutamin (200 mM)	1 % (v/v)
		Natriumpyruvat (10 mM)	1 % (v/v)
		HEPES (1 M)	0,1 % (v/v)

Medium für Zytotoxizitätsassays

RPMI 1640 ohne Phenolrot	500 ml	<i>PlatE-Zellkulturmedium</i>	
FBS	1 % (v/v)	DMEM+++	500 ml
Penicillin/Streptomycin (100 x)	1 % (v/v)	Blasticidin	10 µg/ml
L-Glutamin (200 ml)	1 % (v/v)	Puromycin	1 µg/ml
Natriumpyruvat (10 mM)	1 % (v/v)	<i>Medium zur Kryokonservierung</i>	
HEPES (1 mM)	0.1 % (v/v)	FBS-Zell-Suspension	900 µl
		DMSO	100 µl

2.8 Pufferlösungen

<i>Lysepuffer</i>		<i>Transfektionspuffer</i>	
Ammoniumchlorid	8,92 g	Dinatriumhydrogenphosphat	50 mg
EDTA	1 g	HEPES	1 mg
Kalumbicarbonat	29 mg	Kaliumchlorid	74 mg
		Natriumchlorid	1,6 g
Aufzufüllen auf 1000 ml mit ddH ₂ O, pH-Titration auf 7,2 mittels HCl (1 M) oder NaOH (1 M)		Aufzufüllen auf 100 ml mit ddH ₂ O, pH-Titration auf 7,1 mit HCl (1 M) oder NaOH (1 M)	
<i>FACS-Puffer</i>		<i>MACS-Puffer</i>	
PBS	500 ml	EDTA	2 mM
BSA	2 % (v/v)	FCS	10 % in PBS
<i>ELISA-Coating-Puffer</i>		<i>ELISA-Verdünnungs-Puffer</i>	
NaHCO ₃	7,13 g	FCS	10 % in PBS
Na ₂ CO ₃	1,59 g		
ddH ₂ O	1,0 L	<i>ELISA-Waschpuffer</i>	
pH-Titration auf 9,5 mit 1M NaOH		Tween20	0,05 % in PBS

2.9 Software

Adobe Creative Suite CS6	Adobe Systems, San Jose, USA
BD FACSDiva	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
BioRender	Toronto, Kanada
EndNote X9	Thomson Reuters, Carlsbad, USA
FlowJo 8.7	Tree Star, Ashland, USA
GraphPad Prism Version 7.04	GraphPad Software, La Jolla, USA
Microsoft Office 2016	Microsoft, Redmond, USA

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Alle Zellen wurden in Zellkulturflaschen bei 37 °C, 5 % CO₂ Volumenanteil und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Zellkulturarbeiten erfolgten steril unter laminarer Luftströmung. Bei 80 % Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Adhäsente Zellen wurden mittels Trypsin gelöst, für 5 Minuten bei 400 g zentrifugiert und anschließend in frischem Kulturmedium resuspendiert. Zellzahl und -viabilität wurden regelmäßig mittels Trypanblau-Färbung im Neubauer Hämozytometer evaluiert. Zum Zeitpunkt der Experimente waren alle verwendeten Zellen für mindestens eine Woche und maximal 25 Passagen in Kultur. Durch monatliche Testungen wurden Mycoplasma-Kontaminationen ausgeschlossen.

3.1.2 Transduktion primärer muriner T-Zellen

Mittels retroviraler Transduktion ist es möglich, zellfremde DNA stabil in ein Wirtsgenom zu integrieren. Als Vektor wurde in allen Experimenten pmp71 mit der kodierenden Sequenz für das PD-1-CD28-Fusionsprotein verwendet (Kobold et al., 2015). Das detaillierte Vorgehen folgte bereits publizierten Protokollen (Leisegang et al., 2008).

3.1.2.1 Produktion replikationsdefizienter ekotroper Retroviren

Die retrovirale Verpackungszelllinie Platinum-E (PlatE) wurde in 6-Well Zellkulturplatten ausgesät und für 24 Stunden in DMEM+++ kultiviert. Unter Vortexen wurden in jedes Well 150 µl der Plasmidlösung (18 µg Plasmid-DNA, 15 µl CaCl₂ 2.5 M, aufgefüllt mit ddH₂O) zu 150 µl Transfektionspuffer pipettiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Transfektion der PlatE, wobei ausschließlich Wells mit einer Konfluenz von circa 75 % Verwendung fanden. Nach 8 Stunden wurde das Zellkulturmedium gegen frisches DMEM+++ ausgetauscht. Die erste Abnahme des virushaltigen Überstandes erfolgte 48 Stunden später. Anschließend wurden die PlatE für weitere 24 Stunden in frischem T-Zell-Medium kultiviert und erneut Viren geerntet. Durch Filtration durch einen 0,45 µm-Spritzenvorsatzfilter wurde der Virusüberstand von Zellresten befreit.

3.1.2.2 Isolation muriner Splenozyten und Anreicherung der CD4+ und CD8+ T-Zell-Populationen

Die Tötung der OT-1 und OT-2 Mäuse erfolgte durch Genickbruch unter Isofluran-Narkose. Anschließend wurde die Milz entnommen und in einem mit T-Zell-Medium (TZM) gefüllten Mikroreaktionsgefäß auf Eis konserviert. Zur Erstellung einer Einzelzellsuspension wurde die Milz mit einem Spritzenstempel erst durch einen 100 µm-, dann durch einen 30 µm-Filter passiert und anschließend für 5 Minuten bei 400 g zentrifugiert. Zur Elimination der Erythrozyten wurde das Zellpellet für 1 Minute in 2 ml Lysepuffer aufgenommen und die Zytolyse durch Verdünnung mit TZM beendet. Zur Selektion auf CD8+ T-Lymphozyten wurden die Splenozyten nach erneuter Zentrifugation in frischem TZM mit 50 µM β-Mercaptoethanol, 10 IU/ml humanem IL-2, 1 µg/ml anti-Maus CD3 und 0,1 µg/ml anti-Maus CD28 für 24 Stunden stimuliert. Zur Selektion auf CD4+ T-Lymphozyten wurde nach Lyse der Erythrozyten eine magnetische Zellseparation (MACS) durchgeführt. Die Anreicherung der CD4+ Zellen erfolgte nach Maßgaben des Herstellerprotokolls durch Depletion der CD4-negativen Zellpopulationen mittels *CD4+ T cell isolation kit*. Eine 24-stündige Stimulationsphase in frischem TZM mit 50 µM β-Mercaptoethanol, 100 IU/ml humanem IL-2, 1 µg/ml anti-Maus CD3 und 0,1 µg/ml anti-Maus CD28 schloss sich an.

3.1.2.3 Transduktion von CD4+ und CD8+ T-Zellen

Zur Erhöhung der Transduktionseffizienz wurden 24-Well Zellkulturplatten bei 4 °C für 12 Stunden mit 400 µl/Well RetroNectin inkubiert und anschließend für 30 Minuten bei 37 °C mit 2 % BSA geblockt. Nach einem Waschschritt mit 25 mM HEPES in 2 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) konnten 2 ml/well der frisch gewonnenen Virussuspension aufgetragen und für 2 Stunden bei 3000 g und 4 °C zentrifugiert werden. Anschließend wurde der Überstand verworfen und durch 10⁶ murine T-Lymphozyten in 1 ml TZM mit 50 µM β-Mercaptoethanol ersetzt. Zur Stimulation der Zellproliferation wurden außerdem 4 x 10⁵ *Dynabeads* sowie 10 IU/ml humanes IL-2 für CD8+ T-Zellen oder 100 IU/ml IL-2 für CD4+ T-Zellen hinzugefügt. Nach abermaliger Zentrifugation bei 37 °C und 400 g wurden Zellen und Viren für 24 Stunden inkubiert. Am nächsten Tag wurde mit frischem Virusüberstand die Transduktion wiederholt und die Transduktionseffizienz durchflusszytometrisch bestimmt.

3.1.2.4 In-vitro-Expansion der transduzierten T-Zellen

Die Expansion der T-Zellen erfolgte im 48-Stunden-Abstand, indem 10^6 Zellen/ml mit frischem TZM und 50 ng/ml humanem Interleukin 15 (IL-15) sowie 50 μ M β -Mercaptoethanol versetzt wurden. Durch Verdünnung mit untransduzierten T-Zellen wurde die Transduktionseffizienz vor jedem Experiment auf 35-45 % eingestellt. Alle Experimente wurden in einem Zeitraum von 6 Tagen nach dem zweiten Viruskontakt begonnen.

3.1.3 Transduktion muriner Tumorzelllinien

Die Zelllinie E.G7-OVA-PD-L1 ging durch retrovirale Transduktion aus E.G7-OVA-Zellen hervor. Ziel war die Etablierung eines PD-L1 konstitutiv überexprimierenden Non-Hodgkin-Lymphommodells.

Als retroviraler Vektor wurde pMXs mit der kodierenden Sequenz für murines PD-L1 verwendet (Swiss-Prot accession number Q9EP73). Die Produktion des Retrovirus sowie die Herstellung virusbeschichteter 24-Well Zellkulturplatten erfolgte analog zum Vorgehen bei primären murinen T-Zellen (vgl. 3.1.2.1). In der Woche vor dem geplanten Transduktionszeitpunkt wurden die E.G7-OVA durch tägliches Passagieren einem verstärkten Proliferationsdruck ausgesetzt. Am Tag der Transduktion wurden 10^4 Lymphomzellen in 1 ml TZM/Well resuspendiert, auf die virusbeschichteten 24-Well Zellkulturplatten aufgetragen und für 30 Minuten bei 37 °C und 400 g zentrifugiert. Anschließend wurden die E.G7-OVA-Zellen mit dem Virus für 3 Tage bei 37 °C inkubiert. Mittels Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung konnte spezifisch auf PD-L1-überexprimierende E.G7-OVA-Zellen selektiert und eine Suspension aus Einzelzellklonen hergestellt werden. Nach der Expansion wurden die so erzeugten E.G7-OVA-PD-L1-Zellklone nochmals durchflusszytometrisch auf ihre PD-L1-Expression hin kontrolliert und anschließend kryokonserviert.

3.1.4 Tumorzellstimulation mit rekombinantem murinen Interferon- γ

Zur Analyse der MHC-I-, MHC-II- und PD-L1-Expression auf E.G7-OVA-PD-L1- und Panc02-OVA-Zellen wurden 5×10^4 Tumorzellen in einer 96-Well Platte ausgebracht und über 48 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen (2, 20 oder 100 ng/ml) von rekombinantem murinen IFN- γ stimuliert. Die Messung der Proteinexpression erfolgte mittels Durchflusszytometrie.

3.1.5 Stimulationsassays mit murinen Antikörpern

96-Well-Zellkulturplatten wurden mit anti-CD3 Antikörpern (100 ng/ml), anti-CD3 Antikörpern und rekombinantem PD-L1-Fc chimären Protein (5 µg/ml) oder anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern (2 µg/ml) über 12 Stunden bei 4 °C im Dunkeln beschichtet. Anschließend wurden $1,5 \times 10^5$ T-Zellen in 0,1 ml TZM pro Well in einer 96-Well Platte über 36 Stunden bei 37 °C inkubiert. Mitoseaktivität und CD28-Expression wurden durchflusszytometrisch erfasst und der Zytokingehalt des Überstandes mittels *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) quantifiziert.

3.1.6 T-Zell-Tumorzell-Co-Kultur-Assays

Für T-Zell-Tumorzell-Co-Kulturen wurden 5×10^5 CD8+ T-Zellen in einem Verhältnis von 1 : 3, 1 : 1 oder 3 : 1 zu CD4+ T-Zellen mittels anti-CD3 Antikörpern (100 ng/ml) und rekombinantem PD-L1-Fc chimären Protein (5 µg/ml) über 24 Stunden vorstimuliert (vgl. 3.1.5). Anschließend wurden die T-Zellen entweder mit E.G7-OVA-PD-L1-, Panc02-OVA- oder Panc02-OVA-PD-L1-Tumorzellen in einem Verhältnis von 10 : 1 co-kultiviert.

3.1.6.1 Stimulationsassays mit Tumorzellen

Die während der 16-stündigen Co-Kultur freigesetzte Menge an IFN-γ und IL-2 wurde nach Abnahme des Überstandes mittels ELISA gemessen.

3.1.6.2 Zytotoxizitätsassays

Als Maß für die zytotoxische Aktivität der T-Zellen wurde die Laktatdehydrogenase- (LDH-) Menge im Überstand nach 16-stündiger T-Zell-Tumorzell-Co-Kultur gemessen. Hierfür wurde ein *CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay* nach Maßgaben des Herstellerprotokolls verwendet. Negative Zytotoxizitätswerte wiesen auf ein Netto-Wachstum der Tumorzellen hin. Der Granzym-B-Gehalt in den Co-Kultur-Überständen wurde mit Hilfe eines Granzym B-ELISA bestimmt. Sowohl während der Vorstimulation als auch während der T-Zell-Tumorzell-Co-Kultur wurden die Zellen in Zytotoxizitätsmedium kultiviert.

3.1.6.3 Phänotypisierungs- und Proliferationsassays

Um den Phänotyp der T-Zellen im Verlauf von Vorstimulation und Co-Kultur zu charakterisieren, wurden die T-Zellen nach 24-stündiger Vorstimulation sowie nach 36-stündiger Co-Kultur mit Panc02-OVA-PD-L1 durchflusszytometrisch auf die relevanten Oberflächenmarker hin untersucht. Durch Zugabe von *CountBright™ Absolute Counting Beads* zu jeder Probe konnten in den Proliferationsassays absolute Veränderungen der Zellzahl vergleichbar gemacht werden.

3.1.6.4 Interleukin-2-Neutralisationsassays

Für IL-2-Neutralisationsassays wurden $7,5 \times 10^4$ CD8+ T-Zellen/Well und ebenso viele CD4+ T-Zellen mit anti-CD3 Antikörpern und rekombinantem chimären PD-L1 in einer 96-Well Zellkulturplatte vorstimuliert (vgl. 3.1.5). Anschließend wurden die T-Zellen mit Panc02-OVA-Zellen in einem 1 : 10 Verhältnis für 16 Stunden co-kultiviert. Der *LEAF purified anti-Maus-IL-2 Antikörper* (10 µg/ml) wurde sowohl zu Beginn der Vorstimulation wie auch zu Beginn der Co-Kultur hinzugegeben. Anschließend wurden die Überstände mittels ELISA hinsichtlich ihres IFN-γ-Gehalts untersucht. Unterschiede in der Effektoraktivität der T-Zellen wurden durch Laktatdehydrogenase-basierte Zytotoxizitätsassays nachgewiesen (vgl. 3.2.2).

3.2 Immunologische Methoden

3.2.1 Enzyme-linked immunosorbent assay

Die Messung der Zytokinkonzentrationen erfolgte durch murine IFN-γ-, IL-2- und Granzym B-ELISA. Die Zellüberstände wurden entweder frisch verwendet oder bis zur Analyse bei -20 °C aufbewahrt. Die Durchführung der ELISA ebenso wie die Herstellung der benötigten Puffer erfolgten gemäß den Herstellerprotokollen, jedoch wurden grundsätzlich nur die halbierten Werte aller Volumenempfehlungen verwendet. Mit einem *Multimode* Mikroplatten Reader wurde der Absorptionsgrad der Messproben bei 450 nm ermittelt. Die Hintergrundkorrektur lag bei 595 nm. Die Auswertung der Daten erfolgte in *Microsoft Excel 2016* unter Verwendung einer Standardgeraden.

3.2.2 Laktatdehydrogenase-basierte Zytotoxizitätsassays

Vermehrter Zelluntergang geht typischerweise mit einer gesteigerten LDH-Freisetzung einher. Aus diesem Grund kann die LDH-Konzentration im Überstand einer

T-Zell-Tumorzell-Co-Kultur als Maß für die Effektoraktivität zytotoxischer T-Zellen verwendet werden. Die LDH-Konzentration in frischen Co-Kultur-Überständen wurde mittels *CytoTox96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay* ermittelt. Die konkrete Vorgehensweise orientierte sich am Herstellerprotokoll. Mit einem *Multimode-Mikroplatten-Reader* wurde der Absorptionsgrad der Messproben bei 490 nm ermittelt. Für die Quantifizierung der spezifischen Zelllyse galt:

$$\text{Relative Lyseaktivität} = \frac{[\text{LDH}]_{\text{T-Zell-Tumorzell-Co-Kultur}} - [\text{LDH}]_{\text{T-Zellen}}}{[\text{LDH}]_{\text{lysierte Tumorzellen}} - [\text{LDH}]_{\text{intakte Tumorzellen}}} \cdot 100 \%$$

3.2.3 Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrische Verfahren erlauben die Differenzierung von Zellen hinsichtlich ihrer Größe und Granularität sowie die spezifische Quantifizierung membrangebundener oder intrazellulärer Proteine mit Hilfe Fluorochrom-konjugierter Antikörper.

Zum durchflusszytometrischen Nachweis extrazellulärer Proteine wurden die Zellen zuerst mit FACS-Puffer gewaschen und dann für 30 Minuten mit den jeweiligen Antikörpern bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Zur eindeutigen Unterscheidung lebender und toter Zellen wurde außerdem *Zombie Aqua Fixable Viability Dye* hinzugefügt. Ungebundene Antikörper wurden durch nochmaliges Waschen der Zellen in FACS-Puffer entfernt. In einem weiteren Schritt wurden die Zellen zur zusätzlichen Färbung intrazellulärer Proteine mittels *FoxP3/Transcription Factor Staining Buffer Set* fixiert und permeabilisiert und anschließend für weitere 30 Minuten mit den Antikörpern im Dunkeln bei 4 °C inkubiert. Das konkrete Procedere folgte den Empfehlungen des Herstellers. Einem letzten Waschschritt in FACS-Puffer schloss sich die durchflusszytometrische Untersuchung am FACS Canto II oder dem LSRII Fortessa mittels FACSDiva Software an. Zum Vergleich absoluter Zellzahlen wurden den Proben kurz vor Beginn der Messungen *CountBright™ Absolute Counting Beads* hinzugesetzt. Zur Datenanalyse wurde FlowJo 8.7 verwendet. Hierbei galt:

$$\text{Absolute Zellzahl} = \frac{\text{Anzahl der ausgewählten Zellen}}{\text{Anzahl der erfassten beads}} \cdot \text{Anzahl der hinzugefügten beads}$$

3.3 Tierversuche

3.3.1 Labortierhaltung

Transgene Mäuse mit Ovalbumin (OVA) -spezifischen TZR auf CD8+ (OT1) oder CD4+ (OT2) T-Zellen wurden von *Jackson Laboratory* (Bar Harbor, ME) erworben (Stock-Nummer: 003831 für OT1, 004194 für OT2). Beide Mausstämme dienten als T-Zell-Donoren für die primäre murine T-Zell-Transduktion. C57/Bl6 Wildtyp-Mäuse wurden bei *Charles River* (Sulzfeld, DE) gekauft und ab einem Mindestalter von sechs Wochen für *in-vivo*-Therapieversuche verwendet.

Züchtung und Haltung der Tiere erfolgte unter SPF-Konditionen in der Tierhaltung Ziemssenstraße, München sowie in der Tierhaltung des Max-von-Pettenkofer Instituts, München. Alle Tiere waren mindestens eine Woche vor Versuchsbeginn in die jeweilige Tierhaltung transferiert worden. Alle *in-vivo*-Experimente wurden durch die Regierung von Oberbayern unter den Referenznummern 55.2.1.54-2532-36-14 und 108-12 genehmigt.

3.3.2 *In-vivo*-Therapieversuche

Für *in-vivo*-Therapieversuche wurden C57/Bl6 Wildtyp-Mäusen (*Charles River*, Sulzfeld, DE) subkutan $4,0 \times 10^5$ E.G7-OVA-PD-L1-Tumorzellen inokuliert. Sobald die Tumore palpabel waren, wurden die Mäuse randomisiert und der adoptive Transfer von PTM-transduzierten oder untransduzierten T-Zellen begonnen: In einem ersten Schritt wurden CD8+ T-Zellen in die *vena caudalis mediana* injiziert, 48 Stunden später schloss sich der Transfer der CD4+ T-Zellen an. Jeden zweiten Tag wurde die Tumogröße ermittelt und das Tumorvolumen wie folgt abgeschätzt:

$$\text{Tumorvolumen} = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot L_1^2 \cdot L_2$$

mit $L_1 :=$ maximaler Durchmesser und $L_2 :=$ Durchmesser senkrecht zu L_1 .

Alle Versuchstiere wurden im Abstand von zwei Tagen hinsichtlich vordefinierter Abbruchkriterien evaluiert und die Ergebnisse dokumentiert. Bei Überschreitung der Grenzwerte wurden die jeweiligen Tiere getötet.

3.4 Statistische Analysen

Für statistische Analysen wurde GraphPad Prism Version 7.04 verwendet. Unterschiede zwischen den Versuchskonditionen wurden mittels zweiseitigem Student t-Test für ungepaarte Stichproben auf Signifikanz überprüft und P-Werte < 0.05 als statistisch signifikant angesehen. Die Angabe der Messergebnisse erfolgte als arithmetisches Mittel. Ihre Streuung wurde als Standardfehler des Mittelwerts (SEM) ausgewiesen.

4 Ergebnisse

4.1 Funktionalitätsnachweis des PTM-Fusionsrezeptors in CD4+ T-Zellen

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnten Funktionalität und therapeutisches Potenzial des PTM-Fusionsrezeptors in CD8+ T-Zellen *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden (Kobold et al., 2015). Zur funktionellen Charakterisierung in CD4+ T-Zellen wurden diese mit dem PTM-Rezeptor transduziert und anschließend *in vitro* stimuliert. Die Analyse der Überstände ergab, dass PTM-transduzierte CD4+ T-Zellen unter Stimulation mit anti-CD3 Antikörpern und rekombinantern PD-L1 signifikant mehr IFN- γ sezernierten als untransduzierte Zellen (Abbildung 1).

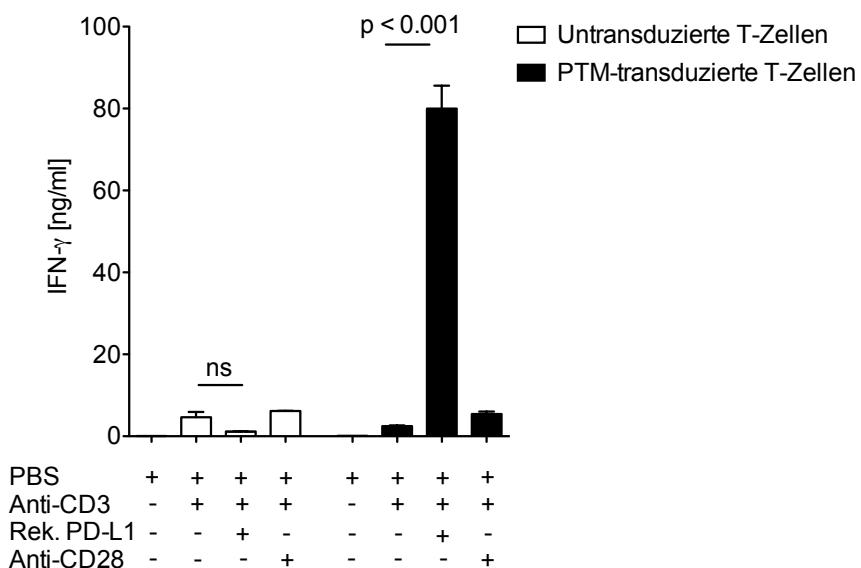


Abbildung 1: IFN- γ -Sekretion unter Antikörper-Stimulation: PTM-transduzierte oder untransduzierte primäre murine CD4+ T-Zellen wurden während 48 Stunden mit anti-CD3 Antikörpern, anti-CD3 Antikörpern und rekombinantern PD-L1 oder anti-CD3 Antikörpern und anti-CD28 Antikörpern stimuliert. Das freigesetzte IFN- γ wurde im Überstand mittels ELISA quantifiziert.
Die Abbildung ist repräsentativ für $n = 3$ voneinander unabhängige Experimente. Jede Versuchskondition lag in Triplikaten vor. Der SEM wurde durch Fehlerbalken markiert und P-Werte mittels zweiseitigem Student t-Test ermittelt.

Außerdem konnte unter Stimulation mit anti-CD3 Antikörpern und rekombinantem PD-L1 eine signifikant verbesserte Viabilität von PTM-transduzierten CD4+ T-Zellen im Vergleich zu den Kontrollgruppen nachgewiesen werden. Auch die absolute Anzahl PTM-transduzierter CD4+ T-Zellen war nach Stimulation mit anti-CD3 Antikörpern und rekombinantem PD-L1 signifikant erhöht und spiegelte den Proliferationsvorteil der Zellen wider (Abbildung 2).

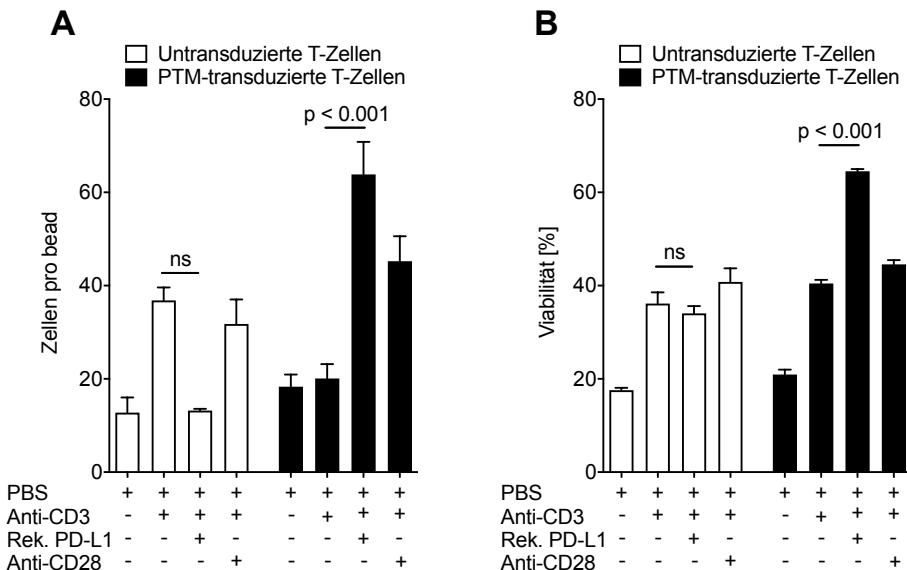


Abbildung 2: Anzahl und Viabilität CD4+ T Zellen nach Antikörper-Stimulation:

PTM-transduzierte oder untransduzierte primäre murine CD4+ T-Zellen wurden während 48 Stunden mit anti-CD3 Antikörpern, anti-CD3 Antikörpern und rekombinantem PD-L1 oder anti-CD3 Antikörpern und anti-CD28 Antikörpern stimuliert. Die Anzahl CD4+ T-Zellen wurde durchflusszytometrisch ermittelt und Zellzahlen unterschiedlicher Konditionen durch *CountBright™ Absolute Counting Beads* vergleichbar gemacht (A). Der Anteil lebender Zellen wurde mittels *Zombie Aqua Fixable Viability Kit* bestimmt (B).

Die Abbildung ist repräsentativ für $n = 3$ voneinander unabhängige Experimente. Jede Versuchskondition lag in Triplikaten vor. Der SEM wurde durch Fehlerbalken markiert und P-Werte mittels zweiseitigem Student t-Test ermittelt.

Untransduzierte CD4+ T-Zellen ließen sich mit anti-CD3 Antikörpern stärker stimulieren als PTM-transduzierte CD4+ T-Zellen. Wurden jedoch zusätzlich anti-CD28 Antikörper hinzugefügt, konnten beide Populationen auf ein vergleichbares Aktivierungsniveau gebracht werden. Analog verhielt es sich mit der Expression des Mitosemarkers Ki67, welche in PTM-transduzierten T-Zellen unter Stimulation mit anti-CD3 Antikörpern höher ausfiel als in untransduzierten T-Zellen (Abbildung 3 A). Bei zusätzlicher Stimulation mit anti-CD28 Antikörpern glichen sich die Expressionsraten jedoch wieder an. Sowohl Ki67 als auch der Zelldifferenzierungsmarker EOMES wurden am stärksten von anti-CD3 Antikörper- und PD-L1-stimulierten PTM-transduzierten T-Zellen exprimiert (Abbildung 3 B).

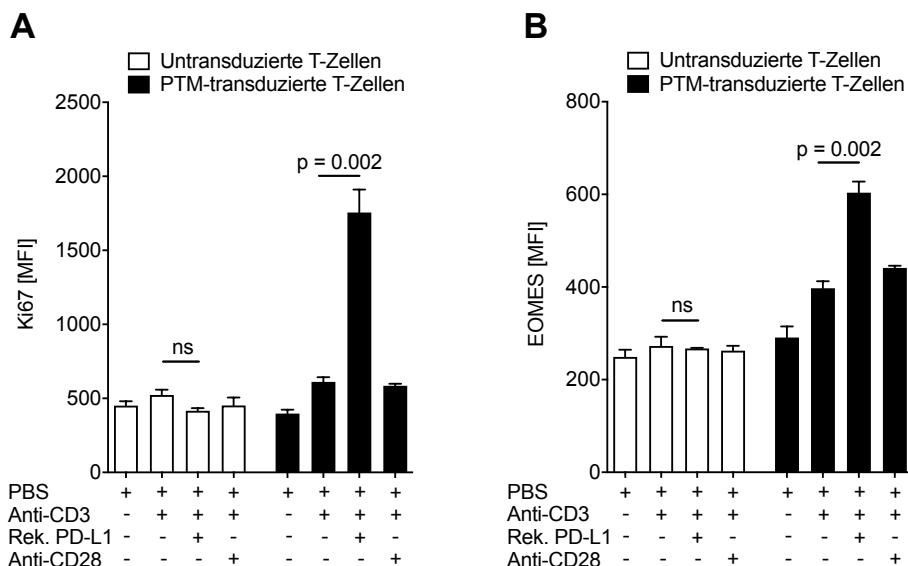


Abbildung 3: Expression von Ki67 und EOMES unter Antikörper-Stimulation:

PTM-transduzierte oder untransduzierte primäre murine CD4+ T-Helferzellen wurden während 48 Stunden mit anti-CD3 Antikörpern, anti-CD3 Antikörpern und rekombinantem PD-L1 oder anti-CD3 Antikörpern und anti-CD28 Antikörpern stimuliert. Die Quantifizierung der Ki67- (**A**) und EOMES-Expression (**B**) erfolgte durchflusszytometrisch nach intrazellulärer Färbung mit spezifischen Antikörpern.

Die Abbildung ist repräsentativ für $n = 3$ voneinander unabhängige Experimente. Jede Versuchskondition lag in Triplikaten vor. Der SEM wurde durch Fehlerbalken markiert und P-Werte mittels zweiseitigem Student t-Test bestimmt.

Mit diesen Versuchsergebnissen konnte gezeigt werden, dass der PTM-Fusionsrezeptor in CD4+ T-Zellen funktionell ist und zur Erhöhung ihres Aktivierungspotenzials beiträgt.

4.2 Synergistische Verstärkung von T-Zell-Stimulierbarkeit und -Effektoraktivität durch PTM-transduzierte CD4+ T-Zellen in Co-Kultur mit Tumorzellen

Dem Funktionalitätsnachweis PTM-transduzierter CD4+ T-Zellen schloss sich die Frage nach deren therapeutischem Potenzial an. Durch Vorstimulation mit anti-CD3 Antikörpern und rekombinantern PD-L1 über 24 Stunden wurde eine erstmalige und andauernde Aktivierung des TZR-Komplexes erzielt und, in Analogie zu den Immunprozessen im Tumormilieu, partielle T-Zell-Anergie induziert. Anschließend wurden die untransduzierten oder die transduzierten CD4+ und CD8+ T-Zellen entweder in Kombination oder alleine mit Panc02-OVA- oder E.G7-OVA-PD-L1-Zellen co-kultiviert.

Sowohl in Co-Kultur mit Panc02-OVA als auch mit E.G7-OVA-PD-L1 produzierten vorstimulierte PTM-transduzierte CD4+ und CD8+ T-Zellen mehr IFN- γ als

untransduzierte T-Zellen. In beiden Co-Kultur-Ansätzen konnte die stärkste IFN- γ -Sekretion erreicht werden, wenn PTM-transduzierte CD4+ und PTM-transduzierte CD8+ T-Zellen kombiniert wurden (Abbildung 4 A). Hinsichtlich der IL-2-Sekretion ergab sich ein identisches Bild mit einer signifikant erhöhten IL-2-Konzentration im Überstand PTM-transduzierter CD4+ und PTM-transduzierter CD8+ T-Zellen (Abbildung 4 B).

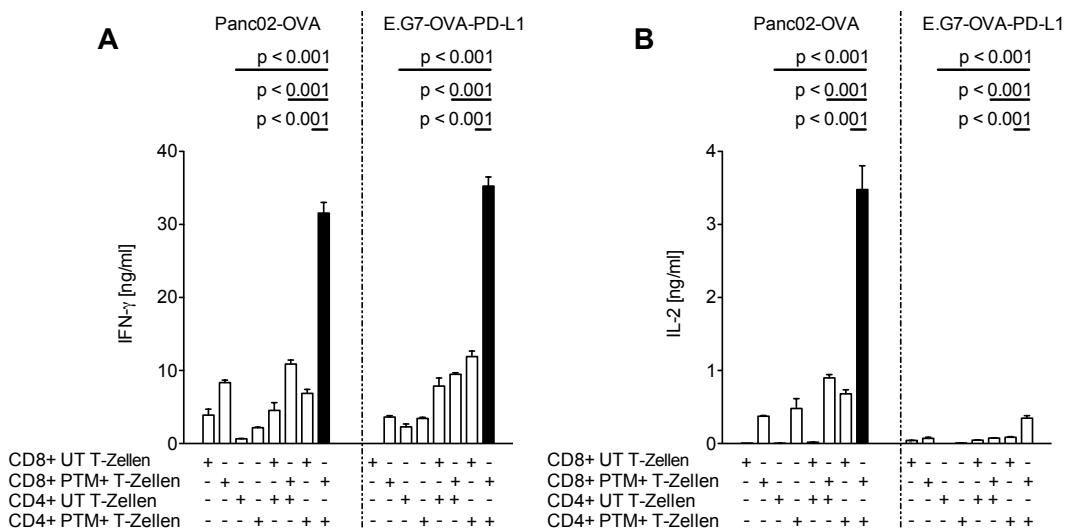


Abbildung 4: Zytokinfreisetzung in T-Zell-Tumorzell-Co-Kulturen: PTM-transduzierte (PTM+) oder untransduzierte (UT) primäre murine OT-1 T-Zellen, PTM+ oder UT primäre murine OT-2 T-Zellen oder OT-1 zusammen mit OT-2 T-Zellen wurden für 24 Stunden mit anti-CD3 Antikörpern und rekombinantem PD-L1 stimuliert. Anschließend wurden die T-Zellen für 16 Stunden mit Panc02-OVA oder E.G7-OVA-PD-L1 co-kultiviert. Sowohl während der Vorstimulation als auch während der T-Zell-Tumorzell-Co-Kultur betrug das Verhältnis von CD4+ zu CD8+ T-Zellen in den gemischten Konditionen 1 : 1. IFN- γ (A) und IL-2-Konzentrationen (B) im Überstand wurden mittels ELISA ermittelt. Die Abbildung ist repräsentativ für $n = 3$ voneinander unabhängige Experimente. Jede Versuchskondition lag in Triplikaten vor. Der SEM wurde durch Fehlerbalken markiert und P-Werte mittels zweiseitigem Student t-Test bestimmt.

Das unterschiedliche Aktivierungsmaß der T-Zellen spiegelte sich in ihrer Effektoraktivität wider. Vorstimulierte CD4+ und CD8+ PTM-transduzierte T-Zellen induzierten eine signifikant stärkere Tumorzelllyse in Co-Kultur mit Panc02-OVA- oder E.G7-OVA-PD-L1-Zellen als ihre untransduzierten Kontrollen. Wie bereits im Falle der Zytokinproduktion war auch die zytotoxische Aktivität der T-Zellen dann am höchsten, wenn CD4+ PTM+ mit CD8+ PTM+ T-Zellen kombiniert wurden (Abbildung 5 A). Die Menge an freigesetztem Granzym B korrelierte mit der Effektoraktivität der T-Zellen und wies auf die mechanistisch bedeutsame Rolle der T-Zell-Degranulation als Mediator der PTM-vermittelten Lyseaktivität hin (Abbildung 5 B).

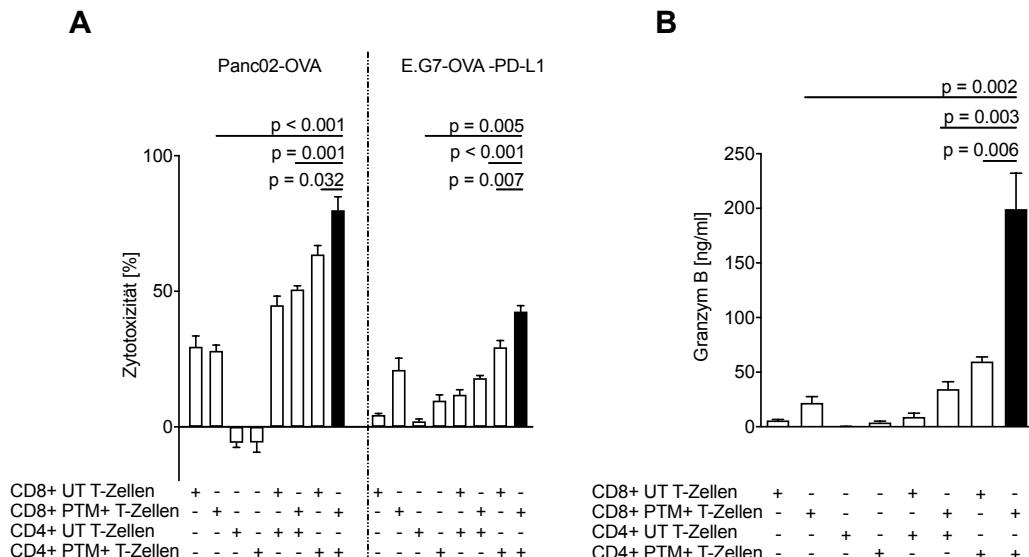


Abbildung 5: Tumorzelllyse und Granzym B-Freisetzung in T-Zell-Tumorzell-Co-Kulturen:
 PTM-transduzierte (PTM+) oder untransduzierte (UT) primäre murine OT-1, PTM+ oder UT primäre murine OT-2 T-Zellen oder OT-1 kombiniert mit OT-2 T-Zellen wurden über 24 Stunden mit anti-CD3 Antikörpern und rekombinantern PD-L1 vorstimuliert. Währenddessen wurden Panc02-OVA oder E.G7-OVA-PD-L1 ausgesät und bis zur Zugabe der vorstimulierten T-Zellen bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Konzentration des durch Zelluntergang freigesetzten LDH wurde nach 16-stündiger Co-Kultur mittels *CytoTox96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay* gemessen (A). Die Granzym B-Freisetzung der T-Zellen in Co-Kultur mit E.G7-OVA-PD-L1-Tumorzellen wurde nach 16 Stunden mittels ELISA quantifiziert (B). Das Verhältnis CD4+ zu CD8+ T-Zellen betrug in Vorstimulation und Co-Kultur 1 : 1; das Verhältnis der T-Zellen zu Tumorzellen 10 : 1. Die Abbildung ist repräsentativ für $n = 3$ voneinander unabhängige Experimente. Jede Versuchskondition lag in Triplikaten vor. Der SEM wurde durch Fehlerbalken markiert und P-Werte mittels zweiseitigem Student t-Test bestimmt.

In Co-Kultur mit CD4+ T-Zellen und Panc02-OVA ging die Steigerung des zytotoxischen Potenzials der CD8+ T-Zellen mit einer verstärkten Proliferation einher (Abbildung 6).

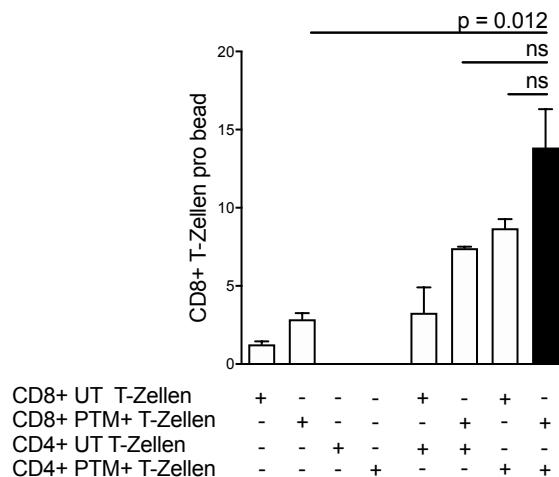


Abbildung 6: Proliferation von CD8+ T-Zellen in Co-Kultur mit CD4+ T-Zellen und Panc02-OVA:

PTM-transduzierte (PTM+) oder untransduzierte (UT) primäre murine OT-1 T-Zellen, PTM+ oder UT primäre murine OT-2 T-Zellen oder OT-1 kombiniert mit OT-2 T-Zellen wurden über 24 Stunden mit anti-CD3 Antikörpern und rekombinantem PD-L1 vorstimuliert und dann mit Panc02-OVA-Zellen co-kultiviert. Die Anzahl der T-Zellen wurde durchflusszytometrisch mittels *CountBright™ Absolute Counting Beads* zwischen den Konditionen vergleichbar gemacht. Die Abbildung ist repräsentativ für $n = 3$ voneinander unabhängige Experimente. Jede Versuchskondition lag in Triplikaten vor. Der SEM wurde durch Fehlerbalken markiert und P-Werte mittels zweiseitigem Student t-Test bestimmt.

4.3 Charakterisierung des Phänotyps PTM-transduzierter CD4+ und CD8+ T-Zellen in T-Zell-Tumorzell-Co-Kulturen

Entsprechend ihres Differenzierungsgrades werden innerhalb der CD3+ CD4+ aber auch der CD3+ CD8+ Lymphozytenpopulationen zentrale Gedächtnis-T-Zellen von Effektor-T-Gedächtniszellen abgegrenzt. Dabei unterscheiden sich die schwächer ausdifferenzierten zentralen T-Gedächtniszellen in ihrem C-C *chemokine receptor type* 7-positiven (CCR7+) und L-Selektin-positiven (CD62L+) Phänotyp *per definitionem* von den bereits stärker differenzierten, CCR7- und CD62L- Effektor-T-Gedächtniszellen (Sallusto et al., 1999). Ziel der Phänotypisierungsexperimente dieser Arbeit war es, Veränderungen in den Differenzierungsstadien von PTM+ oder untransduzierten CD4+ und CD8+ T-Zellen in Co-Kultur mit Panc02-OVA-PD-L1-Tumoren zu registrieren.

In T-Zell-Tumorzell-Co-Kulturen prägten PTM-transduzierte CD4+ T-Zellen überwiegend den Phänotyp zentraler Gedächtnis-T-Zellen aus. Der Effekt auf CD4+ T-Zellen war dann am stärksten, wenn sie mit CD8+ T-Zellen kombiniert wurden, jedoch unabhängig davon, ob letztere PTM-transduziert oder untransduziert waren. Auch die CD8+ T-Zellen differenzierten zu zentralen Gedächtnis-T-Zellen (Abbildung 7).

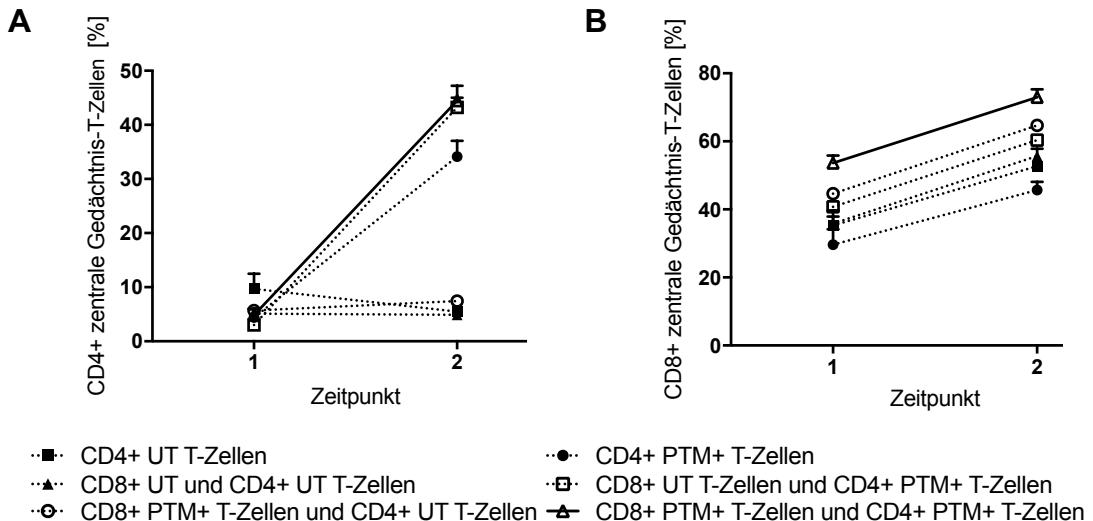


Abbildung 7: Anteil CD4+ (A) und CD8+ (B) zentraler Gedächtnis-T-Zellen in T-Zell-Tumorzell-Co-Kulturen: PTM-transduzierte (PTM+) oder untransduzierte (UT) primäre murine OT-1 T-Zellen, PTM+ oder UT primäre murine OT-2 T-Zellen oder OT-1 zusammen mit OT-2 T-Zellen wurden für 24 Stunden mit anti-CD3 Antikörpern und rekombinantern PD-L1 stimuliert. Anschließend wurden die T-Zellen mit Panc02-OVA-PD-L1 co-kultiviert. Die Expression der Oberflächenmarker CCR7 und CD62L wurde zu Beginn (Zeitpunkt 1) und am Ende (Zeitpunkt 2) der 36-stündigen T-Zell-Tumorzell-Co-Kultur durchflusszytometrisch bestimmt. Die Abbildung ist repräsentativ für $n = 3$ voneinander unabhängige Experimente. Jede Versuchskondition lag mindestens in Duplikaten vor. Der SEM wurde durch Fehlerbalken markiert.

Der Anteil der Effektor-T-Gedächtnis-Zellen war sowohl innerhalb der PTM+ CD4+ als auch innerhalb der PTM+ CD8+ T-Zellpopulation reduziert (Abbildung 8).

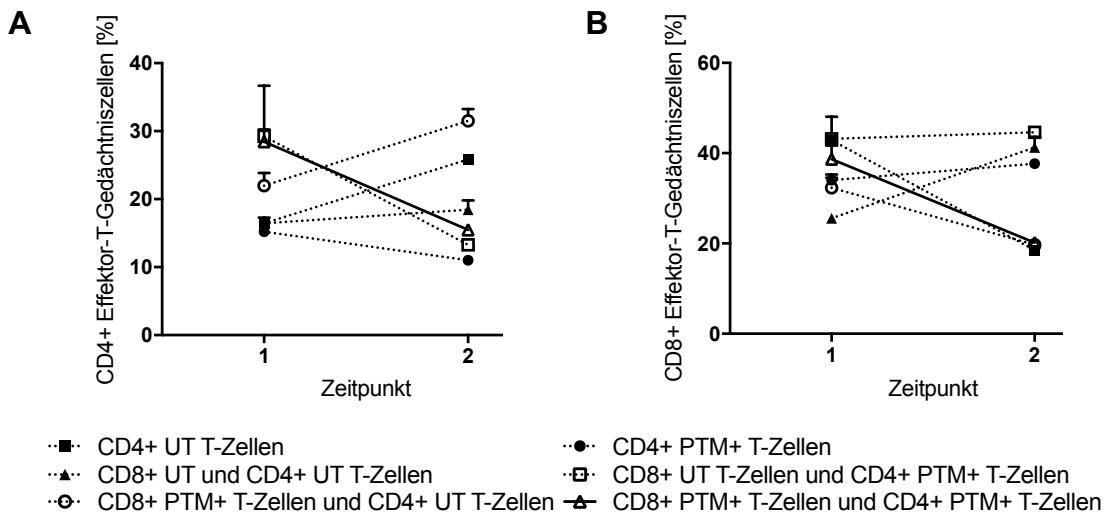


Abbildung 8: Anteil CD4+ (A) und CD8+ (B) Effektor-T-Gedächtniszellen in T-Zell-Tumorzell-Co-Kulturen: PTM-transduzierte (PTM+) oder untransduzierte (UT) primäre murine OT-1 T-Zellen, PTM+ oder UT primäre murine OT-2 T-Zellen oder OT-1 zusammen mit OT-2 T-Zellen wurden für 24 Stunden mit anti-CD3 Antikörpern und rekombinantem PD-L1 stimuliert. Anschließend wurden die T-Zellen mit Panc02-OVA-PD-L1 co-kultiviert. Die Expression der Oberflächenmarker CCR7 und CD62L wurde zu Beginn (Zeitpunkt 1) und am Ende (Zeitpunkt 2) der 36-stündigen T-Zell-Tumorzell-Co-Kultur durchflusszytometrisch bestimmt. Die Abbildung ist repräsentativ für $n = 3$ voneinander unabhängige Experimente. Jede Versuchskondition lag mindestens in Duplikaten vor. Der SEM wurde durch Fehlerbalken markiert.

Die gezeigten *in-vitro*-Ergebnisse sprachen für die therapeutische Aktivität CD4+ PTM-transduzierter T-Zellen im Sinne eines synergistischen Zusammenwirkens von CD4+ und CD8+ T-Zellen. Dieser Synergismus war dann am stärksten, wenn PTM sowohl von CD4+ als auch CD8+ T-Zellen exprimiert wurde.

4.4 ***In-vivo*-Verlangsamung des Tumorwachstums durch Kombination von PTM-transduzierten CD4+ und PTM-transduzierten CD8+ T-Zellen**

In vivo führte eine Kombinationstherapie aus PTM-transduzierten OT-1 T-Zellen und PTM-transduzierten OT-2 T-Zellen im E.G7-OVA-PD-L1-Modell zu einer signifikant verbesserten Tumorkontrolle im Vergleich zu den Kontrollgruppen (untransduzierte OT-1 T-Zellen, PTM+ OT-1 T-Zellen, untransduzierte OT-1 T-Zellen in Kombination mit untransduzierten OT-2 T-Zellen, untransduzierte OT-1 T-Zellen in Kombination mit PTM+ OT-2 T-Zellen) (Abbildung 9).

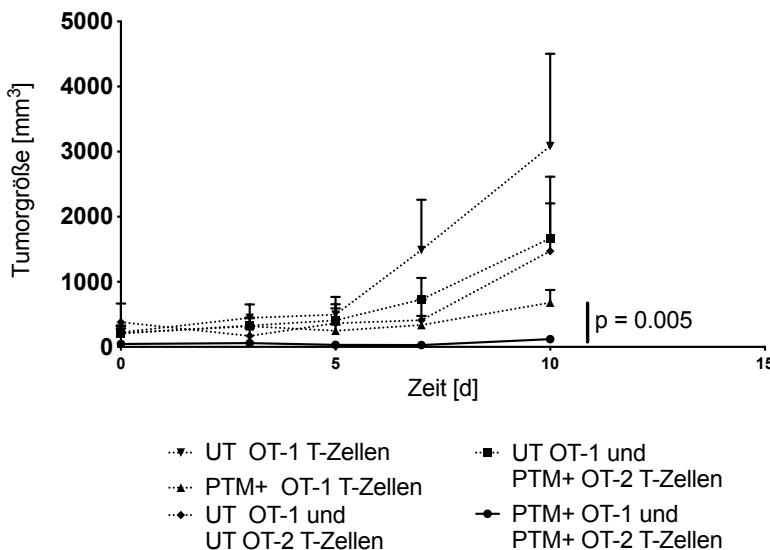


Abbildung 9: In-vivo-Wachstum von E.G7-OVA-PD-L1-Tumoren nach Therapie mit untransduzierten oder PTM-transduzierten CD4+ und CD8+ T-Zellen: In zwei unabhängigen Experimenten wurden 30 Mäusen E.G7-OVA-PD-L1-Tumorzellen subkutan injiziert. Nach Anwachsen der Tumore wurden die Mäuse entsprechend der Größe ihrer Tumore randomisiert, in fünf verschiedene Behandlungsgruppen eingeteilt und entweder mit untransduzierten (UT) ($n = 7$) oder PTM-transduzierten (PTM+) ($n = 6$) primären murinen OT-1 T-Zellen, oder mit UT ($n = 4$) oder PTM+ ($n = 4$) primären OT-2 T-Zellen in Kombination mit UT OT-1 T-Zellen oder PTM+ OT-1 T-Zellen ($n = 9$) behandelt. Unter Verblindung wurden alle Tumore jeden zweiten Tag gemessen und das Tumorvolumen berechnet. Der hier gezeigte Graph fasst die Messwerte zweier unabhängiger in-vivo-Versuche zusammen. Der Abbruch der Kurven markiert den ersten Zeitpunkt, zu dem eine Maus auf Grund von Tumogröße oder -ulzeration aus dem Versuch genommen werden musste. Der SEM wurde durch Fehlerbalken markiert und P-Werte mittels zweiseitigem Student t-Test bestimmt.

4.5 Positive Korrelation des Mengenverhältnisses CD4+ zu CD8+ T-Zellen mit der synergistischen Aktivität der T-Zellen

Um das synergistische Potenzial CD4+ und CD8+ T-Zellen in Abhängigkeit ihres Mengenverhältnisses zu untersuchen, wurden Antigen-spezifische PTM+ oder untransduzierte CD8+ T-Zellen in einem 1 : 3, 1 : 1 oder 3 : 1 Verhältnis mit Antigen-spezifischen PTM+ oder untransduzierten CD4+ T-Zellen vorstimuliert und anschließend mit Panc02-OVA- oder E.G7-OVA-PD-L1-Tumorzellen co-kultiviert. Durch Messung der IFN- γ -Konzentration in den Co-Kulturüberständen konnten Rückschlüsse auf die Aktivität der T-Zellen gezogen werden. In beiden Tumormodellen war die IFN- γ -Freisetzung am stärksten, sobald PTM+ CD4+ und PTM+ CD8+ T-Zellen kombiniert wurden und korrelierte positiv mit der Anzahl der CD4+ T-Zellen in der Co-Kultur (Abbildung 10).

Ergebnisse

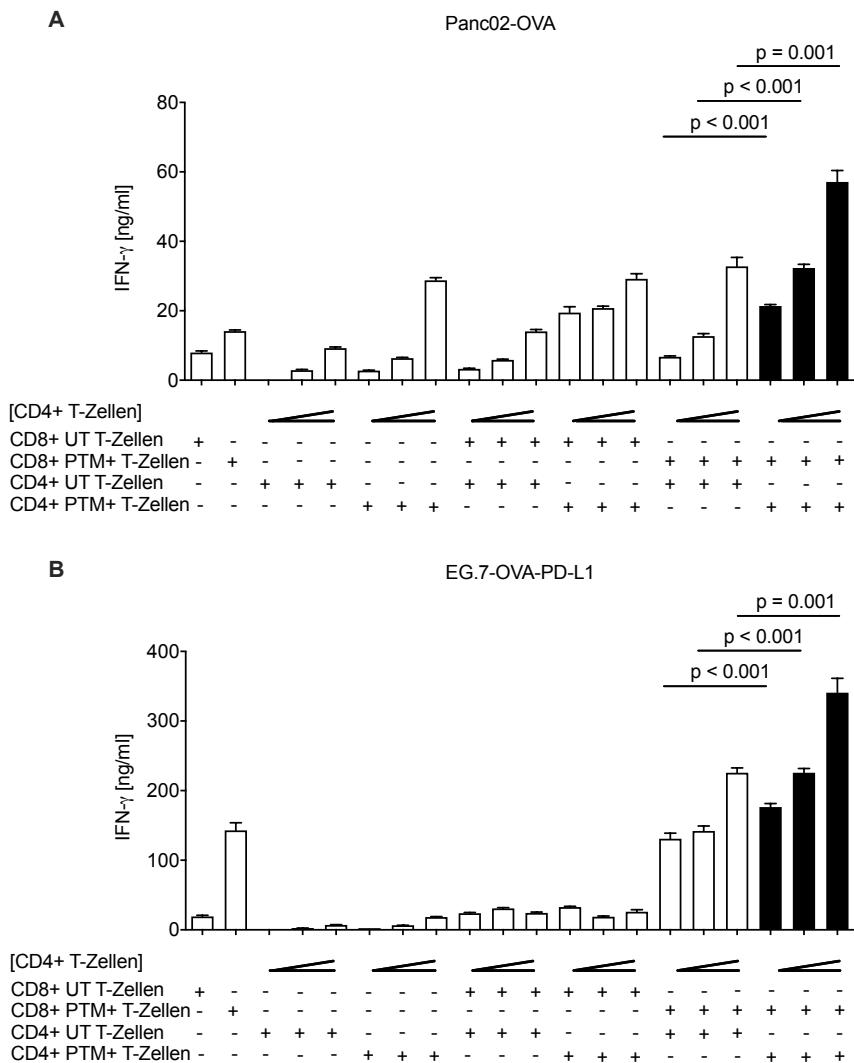


Abbildung 10: IFN- γ -Konzentration in T-Zell-Tumorzell-Co-Kulturen in Abhängigkeit vom Verhältnis CD4+ zu CD8+ T-Zellen: PTM-transduzierte (PTM+) oder untransduzierte (UT) primäre murine OT-1 T-Zellen sowie PTM+ oder UT primäre murine OT-2 T-Zellen wurden alleine oder zusammen über 24 Stunden mit anti-CD3 Antikörpern und rekombinantem PD-L1 vorstimuliert. Die CD4+ und die CD8+ T-Zellen wurden dazu entweder in einem 3 : 1, 1 : 1 oder 1 : 3 Verhältnis kombiniert. Anschließend wurden die T-Zellen mit Panc02-OVA- oder E.G7-OVA-PD-L1-Zellen für weitere 48 Stunden co-kultiviert und das währenddessen sezernierte IFN- γ mittels ELISA quantifiziert. Die Abbildungen sind repräsentativ für n = 3 voneinander unabhängige Experimente. Jede Versuchskondition lag in Triplikaten vor. Der SEM wurde durch Fehlerbalken markiert und P-Werte mittels zweiseitigem Student t-Test bestimmt.

Die IL-2-Sekretion folgte einem der IFN- γ -Sekretion vergleichbaren Muster. Sie war dann am höchsten, wenn PTM+ CD4+ T-Zellen und PTM+ CD8+ T-Zellen zusammen mit Tumorzellen co-kultiviert wurden und korrelierte eng mit der Anzahl der CD4+ T-Zellen (Abbildung 11).

Ergebnisse

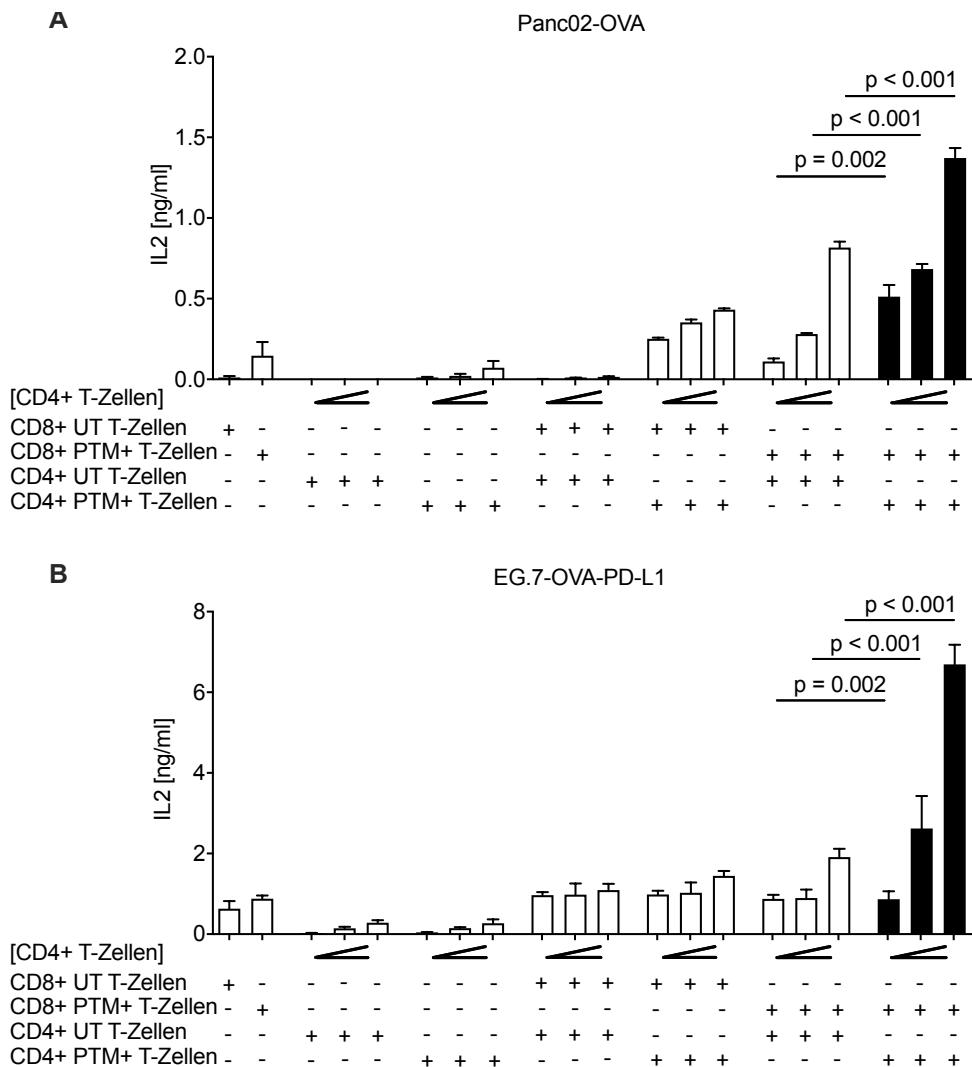


Abbildung 11: IL-2-Konzentration in T-Zell-Tumorzell-Co-Kulturen in Abhängigkeit vom Verhältnis der CD4+ und CD8+ T Zellen: PTM-transduzierte (PTM+) oder untransduzierte (UT) primäre murine OT-1 sowie PTM+ oder UT primäre murine OT-2 T-Zellen wurden alleine oder zusammen über 24 Stunden mit anti-CD3 Antikörpern und rekombinantem PD-L1 vorstimuliert. Die CD4+ und die CD8+ T-Zellen wurden dabei entweder in einem 3 : 1, 1 : 1 oder 1 : 3 Verhältnis kombiniert. Anschließend wurden die T-Zellen mit Panc02-OVA- (**A**) oder E.G7-OVA-PD-L1-Zellen (**B**) für weitere 48 Stunden co-kultiviert und das währenddessen sezernierte IL-2 mittels ELISA quantifiziert.

Die Abbildungen sind repräsentativ für $n = 3$ voneinander unabhängige Experimente. Jede Versuchskondition lag in Triplikaten vor. Der SEM wurde durch Fehlerbalken markiert und P-Werte mittels zweiseitigem Student t-Test bestimmt.

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse konnte eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen den CD4+ T-Zellen und der synergistischen Aktivität transduzierter CD4+ und CD8+ T-Zellen angenommen werden.

4.6 Aufhebung des Einflusses PTM-transduzierter CD4+ T-Zellen auf Interferon- γ -Sekretion und Zytotoxizität mittels Interleukin-2-Neutralisation

Die enge Korrelation der Anzahl CD4+ T-Zellen mit erstens, der synergistischen Aktivität transduzierter CD4+ und CD8+ T-Zellen und zweitens, mit der IL-2-Konzentration der Co-Kultur-Überstände wies IL-2 eine potenzielle Schlüsselrolle als Mediator des Synergismus zu. Zur Klärung des mechanistischen Zusammenhangs wurden untransduzierte oder PTM-transduzierte CD4+ und CD8+ T-Zellen mit Panc02-OVA-Zellen co-kultiviert und ein anti-IL-2 Neutralisationsantikörper zugesetzt. Die IFN- γ -Konzentration im Co-Kultur-Überstand diente als Maß für die T-Zell-Aktivität und war nach Aufhebung des IL-2-Effektes deutlich verringert (Abbildung 12).

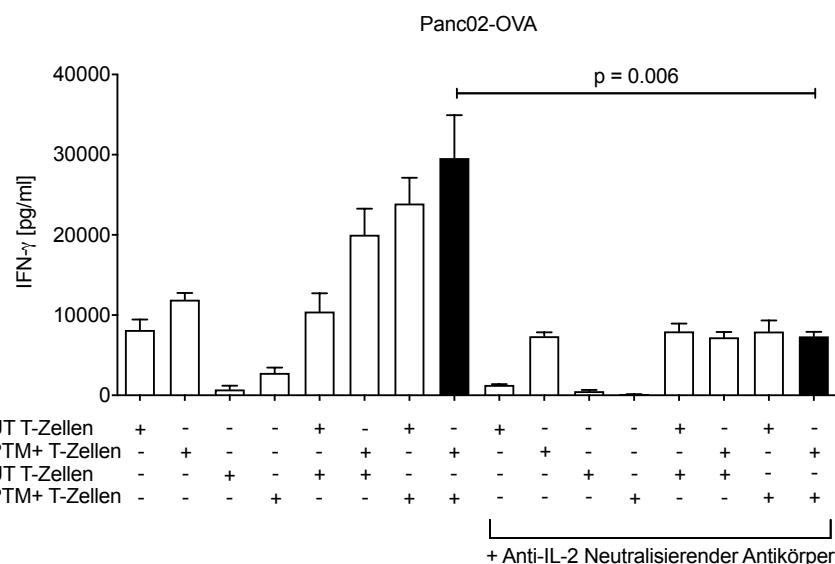


Abbildung 12: IFN- γ -Konzentration in T-Zell-Tumorzell-Co-Kulturen in An- oder Abwesenheit eines anti-IL-2 Neutralisationsantikörpers: Untransduzierte (UT) oder PTM-transduzierte (PTM+) primäre murine OT-1 T-Zellen sowie UT oder PTM+ primäre murine OT-2 T-Zellen wurden einzeln oder in einem 1 : 1 Verhältnis über 24 Stunden mit anti-CD3 Antikörpern und rekombinantem PD-L1 vorstimuliert. Anschließend wurden die T-Zellen mit Panc02-OVA co-kultiviert. Zur Aufhebung der IL-2-Wirkung wurde sowohl während der Vorstimulation als auch während der Co-Kultur ein anti-IL-2 Neutralisationsantikörper verwendet. Die resultierende IFN- γ -Freisetzung wurde mittels ELISA quantifiziert.

Die Abbildung ist repräsentativ für $n = 3$ voneinander unabhängige Experimente. Jede Versuchskondition lag in Triplikaten vor. Der SEM wurde durch Fehlerbalken markiert und P-Werte mittels zweiseitigem Student t-Test bestimmt.

Ebenso konnte die synergistische Verstärkung der Zytotoxizität PTM+ CD4+ und PTM+ CD8+ T-Zellen im Panc02-OVA-Tumormodell mittels IL-2-Blockade aufgehoben werden. In der Zusammenschau der Ergebnisse wurde somit IL-2 als Mediator des beschriebenen Synergismus identifiziert (Abbildung 13).

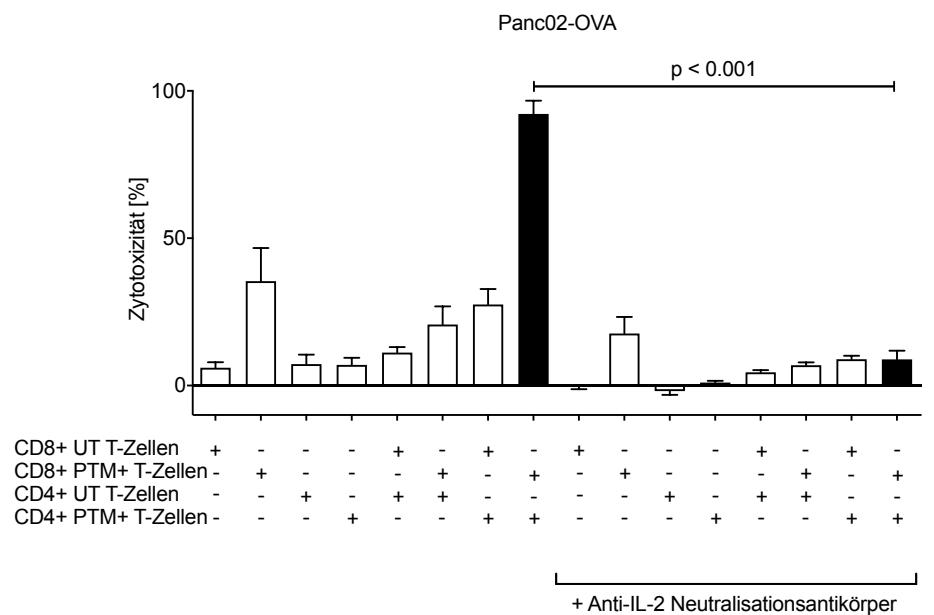


Abbildung 13: Zytotoxische Aktivität untransduzierter oder PTM-transduzierter CD4+ und CD8+ T-Zellen in T-Zell-Tumorzell-Co-Kulturen in An- oder Abwesenheit eines anti-IL-2 Neutralisationsantikörpers: Untransduzierte (UT) oder PTM-transduzierte (PTM+) primäre murine OT-1 T-Zellen, UT oder PTM+ primäre murine OT-2 T-Zellen oder OT-1 zusammen mit OT-2 T-Zellen wurden für 24 Stunden mit anti-CD3 Antikörpern und rekombinantern PD-L1 vorstimuliert. Anschließend wurden die T-Zellen mit Panc02-OVA-Tumorzellen co-kultiviert. Sowohl während der Vorstimulation als auch während der Co-Kultur wurde zur IL-2-Blockade ein anti-IL-2 Neutralisationsantikörper eingesetzt. Das von lysierten Tumorzellen freigesetzte LDH wurde im Co-Kultur-Überstand gemessen. Jede Versuchskondition lag in Quadruplikaten vor. Der SEM wurde durch Fehlerbalken markiert und P-Werte mittels zweiseitigem Student t-Test bestimmt.

5. Diskussion

Erste Hinweise auf die Funktionalität von PD-1-CD28-Fusionsproteinen in CD4+ T-Zellen ergaben Studien an einer gemischt CD4+ und CD8+ TIL-Population (Liu et al., 2016) sowie an der humanen CD4+ Lymphomzelllinie H9 (Prosser et al., 2012). Vor diesem Hintergrund beschreibt die vorliegende Arbeit erstmals, wie PTM+ CD4+ T-Zellen die immuninhibitorische PD-1-PD-L1-Achse selektiv überwinden und ihre anti-tumorale Helferfunktion wiedererlangen. Dabei neutralisieren sie das PD-L1-Signal nicht lediglich, sondern konvertieren es zusätzlich in Immunstimulation und verstärken so synergistisch die anti-tumorale Wirkung von PTM+ CD8+ Lymphozyten *in vitro* und *in vivo* (Rataj et al., 2018).

5.1.1 Einordnung und Interpretation der erzielten Ergebnisse

5.1.2 Funktionalitätsnachweis PTM-transduzierter CD4+ T-Zellen

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurden Funktionalität und Wirkpotenzial von PTM-transduzierten CD8+ T-Zellen *in vitro* sowie *in vivo* charakterisiert (Kobold et al., 2015). Zusätzlich legte der therapeutische Vorteil, den CD4+ T-Zellen durch Transduktion mit einem CTLA-4-CD28-Fusionsrezeptor erlangten (Shin et al., 2012), die grundsätzliche Übertragbarkeit der Wirkung von B7-CD28-Fusionsrezeptoren von CD8+ auf CD4+ T-Zellen nahe.

Tatsächlich gelang im ersten Datensatz der vorliegenden Arbeit der Funktionalitätsnachweis für PTM-transduzierte CD4+ T-Zellen. Unter Stimulation mit anti-CD3 Antikörpern und rekombinantem PD-L1 wiesen PTM+ CD4+ T-Zellen eine signifikante Steigerung ihrer IFN- γ -Sekretion auf (Abbildung 1), analog zu derjenigen, welche bereits im Kontext von PTM+ CD8+ T-Zellen beschrieben worden war (Kobold et al., 2015). Weitere Übereinstimmungen, auch im Hinblick auf die Stimulierbarkeit und Effektoraktivität von PTM+ T-Zellen, ergaben Versuche mit der humanen CD4+ T-Zell-Lymphomlinie H9, welche zuvor mit einer PD-1-CD28-Rezeptorvariante transduziert worden war (Prosser et al., 2012). Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen des Weiteren im Einklang mit Berichten über die gesteigerte IFN- γ -Sekretion von Antikörper-aktivierten, CTLA-4-CD28-transduzierten T-Helferzellen (Shin et al., 2012).

Ein wichtiger Unterschied zwischen PTM- und CTLA-4-CD28-transduzierten T-Helferzellen ergibt sich hingegen aus der Betrachtung ihres jeweiligen Zellteilungsverhaltens. Während PTM+ T-Helferzellen in Stimulationsexperimenten

einen deutlichen Proliferations- und Überlebensvorteil erlangten (Abbildung 2), demonstrierten CTLA-4-CD28-transduzierte CD4+ T-Zellen unter vergleichbaren Bedingungen eine moderate und auf ein frühes Differenzierungsstadium begrenzte Steigerung ihrer Zellteilungsaktivität (Shin et al., 2012). Mögliche Erklärungen könnten in den unterschiedlichen Stimulationsbedingungen der jeweiligen Versuche gefunden werden. Ebenso ist es denkbar, dass die Variationen in Struktur und Aufbau der beiden B7-CD28-Fusionskonstrukte für den dargestellten Effekt verantwortlich zeichnen. So sind bereits geringfügige Veränderungen der Aminosäureabfolge dazu in der Lage, einen deutlichen Abfall der Rezeptoraffinität zu bewirken (Kobold et al., 2015), während die Verwendung eines extrazellulären CTLA-4- oder PD-1-Elementes maßgeblich darüber entscheiden könnte, in welchem T-Zell-Stadium der jeweilige Fusionsrezeptor sein größtes Wirkpotenzial entfaltet. So spielen CTLA-4-Liganden vor allem in der frühen Phase der T-Zell-Aktivierung eine wichtige Rolle, während die PD-L1-Wirkung eher im späten Effektorstadium der T-Zellen zum Tragen kommt (Buchbinder et al., 2016).

Im Hinblick auf Viabilität und Proliferationsverhalten *in-vitro*-aktivierter PTM+ T-Helferzellen fällt auf, dass sich unter Stimulation mit anti-CD28 Antikörpern zwar ihre Anzahl erhöhte, nicht jedoch die Zellzahl in der untransduzierten Kontrollgruppe (Abbildung 2 A). Im Vergleich zu den anderen Datensätzen dieser Arbeit ist der Effekt jedoch auf die T-Zell-Proliferation beschränkt und erstreckt sich weder auf das Aktivierungspotenzial noch auf das Ki67- oder EOMES-Expressionsprofil der T-Zellen (Abbildung 3). Darüber hinaus röhrt er nicht von Unterschieden in der CD28-Expression PTM-transduzierter und untransduzierter T-Zellen her (Daten nicht gezeigt). Ein möglicher Erklärungsansatz geht davon aus, dass die promitotische Wirkung einer CD28-vermittelten Co-Stimulation auch von der Intensität des TZR-Signals abhängt (Bluestone, 1995). Liegt diese außerhalb eines definierten Wirkbereiches, könnte die CD28-bedingte Co-Stimulation nur noch unzureichend in einen effektiven Zellteilungsstimulus übersetzt werden und so das Ausbleiben eines CD28-bedingten Proliferationsschubes für untransduzierte T-Zellen bewirken. In Analogie dazu ließe sich auch die vergleichsweise hohe Ki67-Expression der Antikörper-stimulierten PTM+ T-Zellen erklären. Ein möglicher Grund für die unterschiedlich starke TZR-Signalintensität von PTM-transduzierten und untransduzierten T-Zellen liegt in der unterschiedlichen Sättigung der TZR mit anti-CD3 Antikörpern, zumal letztere nicht nur innerhalb der Stimulations-Assays, sondern auch im Expansionsprotokoll zur T-Zell-Transduktion Anwendung fanden.

Wie bereits aus dem Kontext von PTM+ CD8+ T-Zellen bekannt (Kobold et al., 2015; Schlenker et al., 2017), wiesen auch PTM+ CD4+ T-Zellen unter stimulatorischen Bedingungen eine verstärkte Ki67- und EOMES-Produktion auf (Abbildung 3). Gerade letztere kann, in Übereinstimmung mit den Daten dieser Arbeit ebenso wie mit Blick auf die aktuelle Fachliteratur, schlüssig mit der PTM-abhängig erhöhten IL-2-Sekretion von transduzierten CD4+ T-Zellen erklärt werden (Liao et al., 2013). Außerdem korreliert sie negativ mit der Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 (Kayser et al., 2015). So könnten PTM+ CD4+ T-Zellen durch ihre gesteigerte EOMES-Expression innerhalb des Tumormikromilieus vor einer Differenzierung in immunsuppressive T_{reg} bewahrt werden. Tatsächlich wurde die vermutete Absenz FoxP3-positiver T_{reg} im Rahmen dieser Arbeit durchflusszytometrisch überprüft und bestätigt (Daten nicht gezeigt).

5.1.3 Der anti-tumorale Wirksynergismus PTM-transduzierter CD4+ und CD8+ Lymphozyten

Der Nachweis einer synergistischen Verstärkung von Zytokinfreisetzung (Abbildung 4), Proliferation (Abbildung 6) und Zytotoxizität (Abbildung 5) durch Kombination von PTM+ CD4+ mit PTM+ CD8+ Lymphozyten in Tumorzell-Co-Kulturen weist Parallelen zu Versuchen an CTLA-4-CD28-transduzierten T-Zellen auf (Shin et al., 2012). Doch ist darauf hinzuweisen, dass sowohl PTM+ CD4+ als auch PTM+ CD8+ T-Zellen hinsichtlich Zytokinfreisetzung und Proliferationstätigkeit profitierten (Kobold et al., 2015; Rataj et al., 2018), während sich der diesbezügliche CTLA-4-CD28-vermittelte Effekt überwiegend auf CD4+ T-Zellen konzentrierte (Shin et al., 2012). Der direkte Vergleich beider B7-CD28-Fusionskonstrukte dürfte allerdings nicht zuletzt durch ihre strukturellen Eigenheiten ebenso wie durch die unterschiedlich starke Expression ihrer jeweiligen Liganden (CD80 bzw. CD86 [Brown et al., 1998; Tatsumi et al., 1997] und PD-L1 [Blank et al., 2007]) auf den verschiedenen Tumorzelllinien deutlich erschwert werden.

Abweichungen im strukturellen Aufbau verschiedener B7-CD28-Fusionskonstrukte bieten nicht nur einen Erklärungsansatz für die Wirkdifferenzen zwischen CTLA-4-CD28- und PD-1-CD28-Fusionsrezeptoren, sondern auch für Effektivitätsunterschiede innerhalb der PD-1-CD28-Rezeptorfamilie. Im Laufe der vergangenen Jahre wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen unterschiedliche Rezeptoraufbauten erprobt, welche *bis dato* vor allem in ihrer transmembranösen Rezeptordomäne variieren. Während Ankri et al., 2013 den extrazellulären PD-1-Anteil mit der intrazellulären CD28-Domäne über die Transmembrandomäne des

CD28-Rezeptors verbanden (PD-1-CD28:tm), entschieden sich Prosser et al., 2012 für einen analogen Rezeptoraufbau unter Hinzunahme eines membrannahen, extrazellulären Cystein-Restes (PD-1-CD28:tmCys). Schlenker et al., 2017 stellten diesen Rezeptoren eine weitere Strukturvariante mit einem transmembranösen CD8-Anteil gegenüber. Eine grundlegende Erweiterung erfuhr das Rezeptor-Repertoire, indem Kobold et al., 2015 als bisher einzige Arbeitsgruppe einen funktionellen PD-1-CD28-Fusionsrezeptor mit der Transmembrandomäne eines PD-1-Rezeptors vorstellten (PTM). Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Versuchsaufbauten und Modellsysteme der anderen Arbeitsgruppen gelang es Kobold et al., 2015, durch Vergleich verschiedener Rezeptorvarianten im murinen Modell, deren Wirksamkeitsunterschiede u.a. auf ihre unterschiedlich starke Liganden-Bindungsaffinität sowie auf Unterschiede in ihrer Oberflächen-Exposition zurückzuführen. Dabei erwies sich PTM den anderen PD-1-CD28-Rezeptorvarianten durch seine ca. 300-fache Steigerung der IFN- γ - und IL-2-Sekretionskapazität transduzierter und Antikörper-stimulierter T-Zellen ebenso wie durch die signifikante Erhöhung ihres proliferativen und zytotoxischen Potenzial deutlich überlegen (Kobold et al., 2015).

Diesen Eindruck bestätigen auch die Co-Kultur-Experimente der vorliegenden Arbeit. Während PD-1-CD28:tm die IFN- γ - ebenso wie die IL-2-Sekretionskapazität transduzierter humaner PBMC vervierfachte, ohne einen relevanten Vorteil für die Zytotoxizität der T-Zellen im 4-Stunden-Co-Kultur-Assay zu liefern (Ankri et al., 2013), erzielten auch Prosser et al., 2012 durch PD-1-CD28:tmCys-Transduktion der CD4+ humanen T-Zell-Lymphomzelllinie H9 nur eine moderate Erhöhung der IL-2-Sekretion. Diese Daten konnten von Schlenker et al., 2017 im Wesentlichen reproduziert werden.

Im Unterschied dazu wurde durch Transduktion mit dem PTM-Rezeptor eine dreifache Steigerung der IFN- γ -Freisetzung sowie eine hundertfache Zunahme der IL-2-Sekretion Antigen-stimulierter, muriner T-Helferzellen erreicht. Analog hierzu sezernierten murine PTM+ CD8+ T-Zellen in Co-Kultur mit Tumorzellen zwei Mal mehr IFN- γ und fünfundfünfzig Mal mehr IL-2. Dabei konnte die Zytotoxizität der CD8+ T-Zellen durch PTM-Transduktion um das Fünffache, ihre Zellzahl um das Doppelte gesteigert werden. Diese Kennzahlen isoliert betrachteter CD4+ oder CD8+ T-Zellpopulationen konnten durch Kombination von PTM+ CD4+ und PTM+ CD8+ T-Zellen noch einmal deutlich verbessert werden. So sezernierten PTM+ CD4+ und PTM+ CD8+ T-Zellen zusammen sieben Mal mehr IFN- γ und rund zweihundert Mal mehr IL-2 als untransduzierte CD4+ und CD8+ T-Zellen (Abbildung 4). Dieser Trend

setzte sich auch mit Blick auf die proliferative Aktivität der T-Zellen fort (Abbildung 6). Während sich die Menge an CD8+ T-Zellen in den 24-stündigen Co-Kultur-Experimenten mittels PTM-Transduktion verdoppeln ließ, konnte sie durch zusätzliche Kombination von PTM+ CD8+ T-Zellen mit PTM+ CD4+ T-Zellen sogar verelfacht werden (Rataj et al., 2018).

Eine mögliche Alternative zur Transduktion TZR-modifizierter T-Zellen mit PD-1-CD28-Rezeptorvarianten (Ankri et al., 2013; Prosser et al., 2012), stellt die Verwendung von CAR-T-Zellen zu diesem Zwecke dar. Doch auch durch Kombination eines humanen anti-CD19 oder eines anti-Mesothelin CAR mit dem PD-1-CD28:tm-Rezeptor konnten IFN- γ - und IL-2-Sekretion der transduzierten Zellen in Co-Kultur mit Tumorzellen lediglich verdoppelt (Huang et al., 2019) bzw. verzwei- und vervierzehnfacht (Liu et al., 2016) werden. Ebenso wie für TZR-modifizierte T-Zellen beschrieben, ist es auch mit CAR-T-Zellen nicht gelungen, durch PD-1-CD28:tm-Rezeptorvarianten eine gleichwertige Steigerung der Zytokinproduktion zu erreichen, wie dies mit Hilfe des PTM-Rezeptors in TZR-modifizierten T-Zellen möglich war (Kobold et al., 2015; Rataj et al., 2018).

Darüber hinaus wurden in den letzten Jahren zunehmend Versuche unternommen, CAR-T-Zell-Therapien mit Strategien zur Neutralisation des inhibitorischen PD-1-Signals zu kombinieren, wie z.B. durch Transduktion funktionell inaktiver PD-1-Rezeptormutanten, durch Verwendung von anti-PD-1 Neutralisationsantikörpern (Cherkassky et al., 2016) sowie durch Generierung von PD-1-defizienten T-Zellen zum AZT mittels CRISPR-Cas-Technologie (Guo et al., 2020). Obschon *Checkpoint*-Inhibitoren wie Pembrolizumab oder Nivolumab beeindruckende Therapieerfolge feiern konnten, gelang Cherkassky et al., 2016 durch Zugabe von anti-PD-1 Antikörpern lediglich eine moderate Steigerung der IFN- γ - und IL-2-Freisetzung ihrer mit einem CD28-co-stimulierenden anti-Mesothelin CAR der zweiten Generation transduzierten T-Zellen. Auch durch Transduktion mit einer funktionell inaktiven PD-1-Variante konnte die Zytokinsekretion der CAR-T-Zellen nicht über das Zwei- bis Dreifache hinaus gesteigert werden (Cherkassky et al., 2016).

Ein vielversprechender Ansatz zur Elimination des PD-1-Signals in adoptiv transferierten T-Zellen könnte in der Anwendung der CRISPR-Cas-Technologie liegen. So ist es Guo et al., 2020 erstmals gelungen, durch PD-1-*Knockout* die Zytokinsekretion und Effektoraktivität von humanen T-Zellen zu verdoppeln, welche zuvor mit einem CD28-co-stimulierenden CAR transduziert worden waren. Obwohl

eine solche Wirkverstärkung im Kontext der gegenwärtigen Literatur eher moderat erscheinen mag, gilt die CRISPR-Cas-Technologie als vielversprechender Ansatz für künftige Kombinationen aus AZT und *Checkpoint*-Blockade.

Jenseits der PD-1-CD28-Fusionskonstrukte und als Weiterentwicklung oder Ergänzung der sich bereits in klinischer Anwendung befindlichen *Checkpoint*-Inhibitoren umfassen innovative Strategien zur Blockade der PD-1-PD-L1-Achse einerseits und zur simultanen CD28-Stimulation andererseits die Verabreichung löslicher CD80-Fc-Proteine (Haile et al., 2013) oder nicht-blockierender anti-PD-1 Antikörper mit CD28-agonistischer Wirkkomponente (Fenwick et al., 2019). Im Unterschied zum AZT mit PTM+ CD4+ und CD8+ T-Zellen setzen diese Strategien jedoch allesamt auf eine Reaktivierung tumorspezifischer T-Zellen, ohne dabei die Stärke des T-Zell-Infiltrates selbst direkt modulieren zu können. Im Gegensatz dazu könnte sich gerade in PD-L1+ Tumoren mit einer nur geringfügigen T-Zell-Infiltration die PTM-basierte CD4+-CD8+-Kombinationstherapie besonders auszahlen (Liu et al., 2016) und selbst in PD-L1-negativen Tumoren wäre ein therapeutischer Nutzen dieser Strategie noch immer denkbar, da der PTM-Rezeptor auch von PD-L2-tragenden APZ, DZ und Makrophagen (Akinleye et al., 2019) innerhalb des Tumormikromilieus aktiviert werden kann.

5.1.4 Das Überwiegen weniger ausdifferenzierter PTM-transduzierter T-Zellen in T-Zell-Tumorzell-Co-Kulturen

Die Ausprägung eines zentralen Gedächtnis-Phänotyps in PTM+ T-Zellen, die mit Antigen-spezifischen Tumorzellen co-kultiviert wurden, erscheint in mehrfacher Hinsicht bemerkenswert (Abbildung 7). Zum einen wurde dieser Effekt nicht für alle PD-1-CD28-Rezeptorvarianten beschrieben. So reiften murine T-Zellen, die mit einem, dem vorbeschriebenen PD-1-CD28:tm-Fusionskonstrukt verwandten, CD28-co-stimulierenden anti-PD-1 CAR der zweiten Generation transduziert wurden, überwiegend zu Effektor-T-Gedächtniszellen heran (Lynch et al., 2017). Zum anderen konnte im Rahmen dieser Arbeit IL-2 als Mediator des anti-tumoralen Synergismus von PTM+ CD4+ und CD8+ T-Zellen identifiziert werden. IL-2 wiederum wirkt überwiegend beschleunigend auf die Ausdifferenzierung aktiver Lymphozyten (Boyman et al., 2012). Allerdings betonen vereinzelte Quellen auch den positiven Einfluss von IL-2 auf die Persistenz schwach differenzierter Gedächtnis-T-Zell-Vorstufen mit besonderer Bedeutung für die Entstehung einer sekundären Immunantwort (Hughes et al., 2005).

Gründe für diese unterschiedliche IL-2-Wirkung können u.a. in Variationen zwischen den jeweils verwendeten T-Zell-Expansionsprotokollen (Crompton et al., 2014) ebenso wie in den starken Schwankungen der lokalen IL-2-Signalintensität und -dauer gesucht werden (Boyman et al., 2012). Für ein tieferes Verständnis der zugrundeliegenden Physiologie und zur Abschätzung des Gedächtnis-Potenzials transferierter PTM+ CD4+ und CD8+ T-Zellen er scheinen weitergehende *in-vivo*-Analysen angezeigt, z.B. in Form von Tumor-*Rechallenge*-Versuchen sowie als organspezifische T-Zell-Phänotypisierungs-Experimente.

Anerkannt jedoch ist, dass das anti-tumorale Wirkpotenzial adoptiv transferierter T-Zellen mit zunehmendem Differenzierungsgrad von zentralen Gedächtnis-T-Zellen zu Effektor-T-Gedächtniszellen abnimmt (Xu et al., 2016; Li et al., 2017). Gründe hierfür werden einerseits in der Abschwächung der Lymphozyten-Co-Stimulation und -homöostase sowie des T-Zell-*Homings* gesucht, zum anderen in der erniedrigten IL-2-Produktionskapazität (Gattinoni et al., 2005) und *in-vivo*-Persistenz (Golubovskaya et al., 2016) von CD8+ Effektor-T-Gedächtniszellen gefunden.

Vor diesem Hintergrund könnte der zentrale Gedächtnis-T-Zell-Phänotyp, den PTM+ T-Zellen während der Tumorzell-Co-Kultur erlangen, für die anti-tumorale Effizienz der PTM+ CD4+-CD8+-Kombinationstherapie von erheblichem Vorteil sein, insbesondere im Vergleich mit konventionellen AZT-Protokollen mit systemischer IL-2-Applikation.

5.1.5 *In-vivo*-Tumorkontrolle durch den adoptiven Transfer von PTM-transduzierten CD4+ und CD8+ T-Zellen

In Übereinstimmung mit ihrem bereits *in vitro* charakterisierten anti-tumoralen Wirksynergismus erlangte die Kombination von PTM+ CD4+ und CD8+ T-Zellen auch *in vivo* Kontrolle über das Wachstum von subkutan implantierten E.G7-OVA-PD-L1-Tumoren (Abbildung 9).

Die therapeutische Wirkung dieser Kombinationsstrategie fußt einerseits auf der Helferfunktion von CD4+ T-Zellen, welche selbst anerge CD8+ TIL wieder in den Stand der anti-tumoralen Reaktivität versetzen können (Arina et al., 2017). Andererseits wiesen präklinische Daten mit dem CTLA-4-CD28-Fusionsrezeptor auf die Möglichkeit hin, den anti-tumoralen Synergismus einer kombinierten CD4+ und CD8+ T-Zelltherapie durch Transduktion beider Lymphozytenpopulationen mit einem B7-CD28-Fusionsrezeptor zusätzlich zu verstärken. So wurde in Mausversuchen durch

Kombination von CTLA-4-CD28-transduzierten CD4+ und CD8+ T-Zellen eine signifikante Verbesserung der therapeutischen Tumorkontrolle erzielt (Shin et al., 2012).

Mit den hier dargestellten Tierexperimenten gelang schließlich die Übertragung jenes Effektes in das PTM-Modell. Im Vergleich zu CTLA-4-CD28-basierten Behandlungsstrategien (Shin et al., 2012) liegt eine besondere Stärke der PTM-haltigen Kombinationstherapie einerseits in dem hohen anti-tumoralen Potenzial von PTM+ CD8+ T-Zell-basierten Monotherapien (Kobold et al., 2015), welches andererseits durch ihre Kombination mit PTM+ CD4+ T-Zellen im Rahmen dieser Arbeit noch zusätzlich verstärkt werden konnte.

Außerdem bietet die PTM-basierte Kombinationsstrategie den Vorteil eines signifikanten und raschen Therapieansprechens bereits nach je einmaliger Verabreichung der CD8+ und CD4+ T-Zellen. Damit steht sie in deutlichem Gegensatz zu bisherigen *in-vivo*-Therapieversuchen von Tang et al., 2015, in denen T-Zellen, welche mit einem dem PD-1-CD28:tm-Rezeptor verwandten Fusionsprotein transduziert worden waren, insgesamt vier Mal über drei Wochen transferiert werden mussten, um ein Ansprechen der Tumore zu erreichen. In diesem Punkt heben sich PTM-basierte Kombinationstherapien auch von zahlreichen Antikörper-Therapie-Protokollen der aktuellen klinischen Praxis ab. Während diese oftmals multiple Injektionen eines Immuncheckpoint-Inhibitors vorsehen (Postow et al., 2015), die wiederum ihrerseits das Risiko starker, systemischer Nebenwirkungen bergen (Topalian et al., 2012), ist die Aktivierung PTM+ T-Zellen maximal auf das Tumorgewebe konzentriert und erfolgt nur nach spezifischer Erkennung ihres jeweiligen Tumorantigens (Kobold et al., 2015).

5.1.6 Positive Korrelation des CD4+ : CD8+ T-Zell-Verhältnisses mit dem synergistischen Wirkpotenzial der T-Zellen

In Co-Kultur-Versuchen mit Panc02-OVA- und E.G7-OVA-PD-L1-Tumorzellen konnte eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen dem Verhältnis von CD4+ zu CD8+ T-Zellen einerseits und den freigesetzten Mengen an IFN- γ (Abbildung 10) und IL-2 (Abbildung 11) andererseits nachgewiesen werden.

Die Etablierung einer solchen Dosis-Wirkungs-Beziehung befindet sich zum einen mit präklinischen Experimenten im Einklang, die zur Maximierung des AZT-Erfolges

unterschiedliche Mengenverhältnisse zwischen CD4+ und CD8+ T-Zellen im Mausmodell erprobten (Moeller et al., 2005; Kennedy et al., 2006; Wang et al., 2007). Zum anderen deckt sie sich mit präklinischen Versuchsergebnissen zu CTLA-4-CD28-transduzierten T-Zellen (Shin et al., 2012) ebenso wie mit Beobachtungen aus klinischen Studien, welche zur Optimierung unterschiedlicher CAR-T-Zell-Therapieprotokolle verschiedene Mengenverhältnisse zwischen CD4+ und CD8+ T-Zellen evaluierten (Turtle et al., 2016; Turtle, Gooley et al., 2016). Außerdem steht sie im Einklang mit der Identifikation von IL-2 als Mediator des Wirksynergismus von PTM+ CD4+ und CD8+ T-Zellen sowie insbesondere mit deren IL-2-abhängig gesteigerter IFN- γ -Sekretion und Mitoseaktivität (Lai et al., 2009). Umgekehrt führen suboptimale IL-2-Signalintensitäten *in vitro* sowie *in vivo* zu einer deutlich reduzierten Primär- und Sekundärexploration anti-tumoraler CD8+ T-Zellen (Boyman et al., 2012).

In letzter Konsequenz könnte durch die T-Helferzell-bedingte Erhöhung der intratumoralen IL-2-Spiegel mit deren promitotischer und Anergie-protektiven Wirkung eine Reduktion der benötigten CD8+ T-Zell-Dosis bei gleichbleibendem oder sogar besserem Therapieeffekt erreicht werden. Auf diese Weise könnte das Risiko für Therapieabbrüche wegen unzureichender T-Zell-Expansionsraten verringert und der zur T-Zell-Expansion notwendige Zeit- und Arbeitsaufwand reduziert werden. Gerade für Patienten mit fortgeschrittenen Tumorerkrankungen wäre dies von entscheidendem Vorteil.

5.1.7 Interleukin-2 als Mediator des PTM-abhängig gesteigerten anti-tumoralen Synergismus

In beiden Tumormodellen gelang es durch IL-2-Neutralisation, das synergistische Zusammenspiel PTM+ CD4+ und PTM+ CD8+ T-Zellen vollständig aufzuheben (Abbildung 12 und 13). Die mittels PTM-Transduktion vermittelte Wirkverstärkung der isolierten CD4+ oder CD8+ T-Zellpopulationen blieb jedoch auch unter IL-2-Antagonisierung bestehen, was in Übereinstimmung mit vorausgegangenen Versuchen auf ein Zusammenspiel unterschiedlicher Signalwege bei der Erzielung des PTM-Effekts rückschließen lässt (Kobold et al., 2015).

Bei der Bewertung der hier entwickelten Therapiestrategie kommt den IL-2-Neutralisationsversuchen in doppelter Hinsicht eine bedeutende Rolle zu. Erstens kann die signifikante Steigerung der anti-tumoralen Wirkung von PTM+ CD8+ T-Zellen durch die IL-2-vermittelte Helferfunktion der PTM+ CD4+ T-Zellen schlüssig erklärt

werden. Zweitens darf dies als starker Hinweis auf eine T-Helferzell-vermittelt lokal deutlich erhöhte IL-2-Konzentration verstanden werden, welche die routinemäßige, systemische IL-2-Applikation als festen Bestandteil bisheriger ACT-Protokolle obsolet machen könnte.

Als Hauptquelle für IL-2 gelten innerhalb des Tumormikromilieus CD4+ T-Zellen, gefolgt von aktivierten CD8+ T-Zellen und DZ, NK-Zellen, NK-T-Zellen und Mastzellen (Boymann et al., 2015). IL-2 kommt eine bedeutende Rolle für die Aktivierung, die Differenzierung ebenso wie, durch Induktion antiapoptotischer Mechanismen, für das Überleben von CD8+ T-Zellen zu. Durch Hochregulation der Zykline A, D1, E und Herabregulation des Zellzyklusinhibitors p27 erhöht eine frühe IL-2-Exposition außerdem die Proliferationstätigkeit von CD8+ T-Zellen (Marchetti et al., 2004). Sie verstärkt die Expression des Zelldifferenzierungsmarkers EOMES, steigert die Produktion von IFN- γ und Granzym B durch CD8+ T-Zellen (Lai et al., 2009) und verbessert deren Migration in den Tumor (Santos et al., 2017).

IL-2 wirkt jedoch nicht nur auf CD8+ sondern auch auf CD4+ T-Zellen. Über den STAT5-Signalweg sowie durch Induktion der Zytokinrezeptoren für IL-4 und IL-12 leistet IL-2 einen maßgeblichen Beitrag zur T_{reg} -Homöostase sowie zur Ausbildung der Helferzell-Phänotypen Th1 und Th2 (Liao et al., 2013). Mittels PD-1-CD28:tm-Rezeptor-Transduktion von CD4+ T-Zellen ist es außerdem gelungen, die Ausprägung des anti-tumoral wirksameren Th1-Zell-Phänotyps zusätzlich zu verstärken (Schlenker et al., 2017). Eine definitive Bestätigung dieses Zusammenhangs auch im PTM-Rezeptormodell könnte ein wichtiger Bestandteil künftiger Studien sein.

In der Gesamtschau stimmt die hier zusammengefasste IL-2-Wirkung gut mit den durch Kombination von PTM+ CD4+ und CD8+ T-Zellen erzielten und mittels IL-2-Blockade wieder aufgehobenen *in-vitro*-Effekten dieser Arbeit überein. Darüber hinaus ist die Wirkung des IL-2 von entscheidender Bedeutung für die Wirkeffizienz von Immuntherapien *in vivo*, insbesondere für den AZT. Trotz alledem muss die systemische IL-2-Gabe als Bestandteil fast aller gegenwärtiger AZT-Regime auch kritisch gesehen werden.

Besonders in lokal zu niedrigen Konzentrationen wirkt IL-2 durch seine hohe Affinität zu bestimmten, CD25-enthaltenden IL-2-Rezeptorvarianten bevorzugt auf CD25+ T_{reg} und Endothelzellen und weniger auf ruhende Effektor-T-Zellen, welche meist die nur

niedriger-affinen IL-2-Rezeptorketten β und γ_C exprimieren. Hieraus resultiert einerseits eine vor allem intratumoral kontraproduktive, immunsuppressive Wirkkomponente, zum anderen zeichnen u.a. die Endothelveränderungen verantwortlich für das als Komplikation einer IL-2-Therapie gefürchtete, schockähnliche Kapillarlecksyndrom (Schwartz et al., 2002). Hinzu kommt, dass auf Grund der schlechten Bioverfügbarkeit von IL-2 dessen Nebenwirkungen nicht einfach mit einer Dosisreduktion begegnet werden kann, da nur bei ausreichend hohen lokalen Wirkspiegeln der Erhalt von Effektor- und Gedächtnisfunktion der anti-tumoralen T-Zellen gewährleistet ist.

Um dafür zumindest eine selektivere Wirkung des IL-2 zu erreichen, wurde mit vielversprechendem Erfolg die Gabe künstlich mutierter IL-2-Varianten sowie von IL-2-Antigen-Antikörper-Komplexen mit einer erhöhten Affinität für die IL-2-Rezeptoren auf T-Effektor- und NK-Zellen erprobt (Boyman et al., 2012). Doch auch diese IL-2-Derivate bedürfen noch immer einer systemischen Applikation.

Eine Alternative zu IL-2-Abkömmlingen mit spezifischerer Wirkung stellen lokale IL-2-Therapien dar. Adoptiv transferierte und sodann tumorspezifisch aktivierte PTM+ CD4+ T-Zellen könnten mittels parakriner IL-2-Sekretion die anti-tumorale Antwort co-transferierter und tumorresidenter Effektorzellen lokal stärken, ohne dabei mit den Nachteilen einer systemischen IL-2-Hochdosistherapie einher zu gehen. Frühere Ansätze zur lokalen IL-2-Applikation, beispielsweise mittels Aerosolen in der Therapie von pulmonalen Sarkommetastasen (Khanna et al., 1997) oder durch den adoptiven Transfer von IL-2-transduzierten und -sezernierenden TIL (Heemskerk et al., 2008) brachten noch keinen durchschlagenden Erfolg. Ein vielversprechenderer Ansatz erprobte den simultanen Transfer von TIL in Kombination mit der intratumoralen Applikation von IL-2-kodierenden onkolytischen Adenoviren einmal wöchentlich. Auf diese Weise gelang Santos et al., 2017 im Mausmodell die Erhöhung der intratumoralen IL-2-Konzentration um das Vierundneunzigfache im Vergleich zur systemischen IL-2-Applikation mit ermutigenden Folgen auch hinsichtlich Migration, Persistenz sowie anti-tumoraler Reaktivität der TIL. Auf Grund der Notwendigkeit multipler, intratumoraler Virusinjektionen scheint diese Therapiestrategie jedoch, im Vergleich zum adoptiven Transfer PTM+ CD4+ und CD8+ T-Zellen, nur zur Behandlung gut zugänglicher, solider Tumore in der Nähe der Körperoberfläche geeignet. Selbst in diesem Fall ist jedoch die hohe Variabilität der Lyseeffizienz onkolytischer Viren in Abhängigkeit von der exakten Tumorentität (Hong et al., 2019) stellvertretend als eine von mehreren derzeitigen Limitationen dieser Strategie zu nennen. Darüber hinaus steht den wöchentlichen Virusinjektionen in den

in-vivo-Versuchen von Santos et al., 2017, die in unserem Therapieversuch gezeigte Möglichkeit gegenüber, bereits durch jeweils einmaligen Transfer von PTM+ CD4+ und PTM+ CD8+ T-Zellen eine signifikante Tumorkontrolle zu erreichen.

Weitere Klärung verlangt außerdem die Frage, inwieweit PTM+ CD4+ T-Zellen, zusätzlich zu ihrer Rolle als IL-2-Donoren, anti-tumorale Therapiewirksamkeit besitzen. Sie ist gerade deshalb von Bedeutung, da IL-2 die Sensibilität anti-tumoraler Zellen für eine Vielzahl an Zytokinen erhöht (Spolski et al., 2018), anstatt ausschließlich über einen eigenen Signalweg zu wirken, was in der Ausbildung einer breiten Palette an zellulären Phäno- und Funktionstypen resultiert. Diese verdienen ebenso weitere Charakterisierung wie die Funktions- und Phänotypen anderer anti- und pro-tumoraler Zellarten innerhalb des Tumormikromilieus.

5.2 Limitationen der Arbeit

5.2.1 Die offene Frage nach der *in-vitro*-Antigenerkennung durch CD4+ T-Zellen

Unklar bleibt, wie es zur Antigen-spezifischen *in-vitro*-Aktivierung von CD4+ T-Zellen in Abwesenheit MHC-II-tragender APZ kommen konnte. Hierzu kommen eine Reihe MHC-II-abhängiger und -unabhängiger Aktivierungswege in Frage. Beispielsweise können CD4+ T-Zellen direkt von MHC-II-exprimierenden Tumorzellen aktiviert werden. Weder für Panc02-OVA- noch E.G7-OVA-PD-L1-Zellen gelang bisher jedoch der Nachweis einer MHC-II-Expression, noch ließ sich diese in den durchflusszytometrischen Untersuchungen dieser Arbeit bestätigen (Daten nicht gezeigt). Ebenso konnte für murine, im Unterschied zu humanen T-Zellen (Holling et al., 2002), bisher keine endogene MHC-II-Transkription gezeigt werden (Mangalam et al., 2006). Dennoch besitzen sowohl CD8+ (Romagnoli et al., 2013) als auch CD4+ T-Zellen grundsätzlich die Fähigkeit, sich die MHC-II Moleküle antigenpräsentierender Zellen anzueignen, entweder mittels Exosomen-Transfer oder einzeln oder im Verbund mit anderen (z.B. co-stimulatorischen) Membranrezeptoren durch Tropozytose während des APZ-T-Zell-Kontaktes (immunologische Synapse) (Wetzel et al., 2005). Die hier verwendeten T-Zellen wurden jedoch seit ihrer Isolation aus der Maus für mindestens eine Woche in Absenz anderer Zellpopulationen kultiviert und auch für die jeweiligen Stimulations- und Co-Kultur-Assays wurden keine APZ verwendet, sodass diese Mechanismen vor allem für die *in-vivo*-Versuche von Bedeutung sind.

Zum Ausschluss verfälschter Ergebnisse durch eine unspezifische Aktivierung der OT-2 T-Zellen konnten in zusätzlichen Versuchen drei notwendige Voraussetzungen für die synergistische Aktivität der CD4+ T-Zellen identifiziert werden: Erstens, die OVA-Expression in Tumorzellen, zweitens, die nachfolgende Präsentation der OVA-Peptidfragmente auf MHC-I Molekülen sowie drittens, die spezifische Erkennung dieser MHC-I-gebundenen Tumorantigene durch CD8+ T-Zellen (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse geben Spekulationen Raum, die das Vorliegen MHC-I-spezifischer CD4+ T-Zellen zum Thema haben (Boyle et al., 2004). Diese konnten in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht nachgewiesen werden. Ein alternativer Erklärungsansatz beruht auf der Erkenntnis, dass CD4+ T-Zellen im Allgemeinen und OT-2 T-Zellen im Besonderen durch große Mengen löslichen Antigens, unabhängig von der Präsenz von MHC-II-Molekülen, aktiviert werden können (Li et al., 2001). Tumorzellen kommen als mögliche Quelle des löslichen OVA in zweierlei Hinsicht in Betracht: Bereits mehrfach wurde in verschiedenen Tumormodellen gezeigt, dass stabil mit Ovalbumin transfizierte Zellen OVA in den Extrazellulärraum sezernieren (Haabeth et al., 2014). Zusätzliches OVA könnte außerdem aus den untergegangenen Tumorzellen im Anschluss an deren Lyse durch die OT-1 T-Zellen freigesetzt worden sein. Es liegt nahe, dass durch das Zusammenspiel beider Mechanismen die Konzentration des löslichen OVA im Überstand der T-Zell-Tumorzell-Co-Kulturen das für die Aktivierung der CD4+ OT-2 T-Zellen erforderliche Maß überschritt. Dieser Mechanismus konnte wiederholt auch *in vivo* bestätigt werden, wenngleich seine genaue Bedeutung *bis dato* noch nicht vollständig geklärt ist (Haabeth et al., 2014).

5.2.2 Die Übertragbarkeit der Ergebnisse vom murinen OT-1-OT-2-Modellsystem in den humanen Organismus

In Tierexperimenten wurde durch kombinierten Einsatz von PTM+ OT-1 und PTM+ OT-2 T-Zellen die wirkungsvollste Tumorkontrolle erreicht. Dieser Therapieerfolg wird durch die *in-vivo*-Ergebnisse zum CTLA-4-CD28-Therapiekonzept zusätzlich bestätigt (Shin et al., 2012) und regt zur Translation des dargestellten AZT-Konzeptes in die klinische Anwendung an.

Dennoch kann die Frage nach der Übertragbarkeit der Erfahrungen aus dem OT-1-OT-2-Modell auf Systeme mit endogenen Antigenen und unterschiedlichen TZR-Affinitäten gegenwärtig nur unzureichend beantwortet werden. Immerhin gilt das OT-1-OT-2-Antigensystem als eines der am weitest verbreiteten Tumormodelle der T-Zell-Forschung, in welchem noch dazu ein signifikanter Anteil unseres bisherigen

Wissens generiert und die Grundlage für erfolgreiche klinische Studien gelegt werden konnte (Graef et al., 2014; Neuenhahn et al., 2017). Auch ein Blick auf die funktionelle Erprobung des CTLA-4-CD28-Fusionsrezeptors mag zuversichtlich stimmen: Dieser erwies sich nicht nur im OT-I-OT-II-Therapiemodell als wirksam, sondern bewährte sich auch im Kontext Melanom-spezifischer Pmel-1 T-Zellen und B16-Tumorzellen (Shin et al., 2012). Darüber hinaus fand die Helferfunktion von CD4+ T-Zellen gegenüber CD8+ Lymphozyten bereits in anderen Tumormodellen Bestätigung.

Die Erprobung von B7-CD28-Fusionsrezeptoren im Modellorganismus Maus ist jedoch grundsätzlich dadurch limitiert, dass murine T-Zellen, im Gegensatz zu humanen Lymphozyten, CD28 kaum herabregulieren (Weng et al., 2009). Der Bedarf muriner T-Zellen an zusätzlicher Co-Stimulation ist somit nur eingeschränkt mit dem menschlichen Lymphozyten vergleichbar (Schlenker et al., 2017), sodass das volle Therapiepotenzial PTM-transduzierter T-Zellen vermutlich erst in humanen Therapiemodellen vollständig abgeschätzt werden kann (Mestas et al., 2004).

5.3 Ausblick: Das therapeutische Potenzial PTM-transduzierter CD4+ T-Zellen

Obwohl die vorliegende Arbeit die Steigerung des anti-tumoralen Wirksynergismus von CD4+ und CD8+ Lymphozyten mittels PTM-Transduktion grundsätzlich belegt, bedarf es weiterer präklinischer Forschungsanstrengungen zur Translation des Konzeptes in die klinische Anwendung. Neben einer detaillierten Beschreibung der *in vivo* auftretenden Phänotypen und Differenzierungsstadien von PTM+ T-Zellen könnten künftige Untersuchungen auch die systematische Erfassung unterschiedlicher T-Helferzellsubtypen anstreben und deren Distribution, Proliferation und Persistenz *in vivo* näher charakterisieren. Ebenso sollten etwaige Auswirkungen der PTM+ CD4+-CD8+-Kombinationstherapie auf andere Zellpopulationen des Tumormikromilieus (z.B. MDSZ, Treg oder Stromazellen) näher beleuchtet werden (Kobold et al., 2015; Schlenker et al., 2017). Nicht zuletzt wäre die Bestätigung des PTM-vermittelten anti-tumoralen Effektes in Verbindung mit anderen, z.B. CAR-T-Zell-basierten (Liu et al., 2016), Behandlungsstrategien in humanen Therapiemodellen von großer Bedeutung.

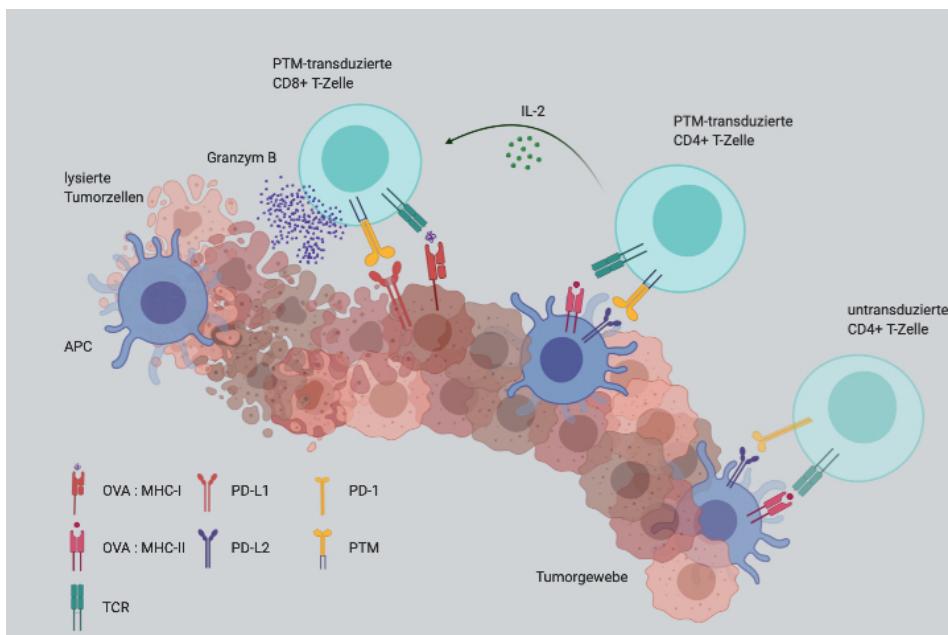


Abbildung 14: Schema des anti-tumoralen Wirkungsmechanismus therapeutisch transferierter PTM+ CD4+ und PTM+ CD8+ T-Zellen *in vivo*:

Antigen-spezifisch aktivierte PTM+ T-Helfer- und Effektor-T-Zellen sind vor einer PD-1-vermittelten Inaktivierung geschützt. *In vivo* vermag die Kombination aus CD4+ und CD8+ T-Zellen einen signifikanten Beitrag zur Kontrolle des Tumorwachstums zu leisten. Der anti-tumorale Wirkungsmechanismus beider Zellarten hängt von der spezifischen Erkennung eines MHC-I-gebundenen Tumorantigens durch die T-Zellen ab und wird durch IL-2 vermittelt (eigene Abbildung).

6 Zusammenfassung

Die Bindung des *programmed cell death protein 1* (PD-1) an seinen Liganden *programmed death-ligand 1* (PD-L1) führt zur Inaktivierung tumorresidenter und -infiltrierender T-Zellen. Diesen Mechanismus machen sich Tumore zunutze und entziehen sich so der T-Zell vermittelten Immunantwort. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass PD-1-CD28-Fusionsrezeptor- (PTM-) transduzierte CD8+ T-Zellen vor PD-L1-vermittelter Inaktivierung geschützt waren. Ungeklärt blieb bislang jedoch, welche Rolle PTM-transduzierte CD4+ T-Zellen, alleine oder in Kombination mit CD8+ T-Zellen, in zukünftigen Strategien zum adoptiven T-Zell-Transfer spielen könnten.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde unter Stimulation mit anti-CD3 Antikörpern und rekombinantem PD-L1 ein Aktivierungsvorteil für PTM-transduzierte CD4+ T-Zellen nachgewiesen. Dieser manifestierte sich sowohl in einer erhöhten Interferon- γ -Sekretion als auch in einer verstärkten Proliferationsrate PTM-transduzierter T-Zellen. In Tumorzell-Co-Kulturen waren die spezifische Aktivierung der T-Zellen sowie deren Granzym B-vermittelte Zytotoxizität am stärksten ausgeprägt, wenn PTM-transduzierte CD4+ und PTM-transduzierte CD8+ T-Zellen kombiniert eingesetzt wurden. Dabei differenzierten sowohl CD4+ als auch CD8+ T-Zellen überwiegend zu zentralen Gedächtnis-T-Zellen. In Tumorzell-Co-Kulturen gingen verschiedene Zahlenverhältnisse von CD4+ zu CD8+ T-Zellen mit einer unterschiedlichen Sekretionskapazität für Interferon- γ und Interleukin-2 einher, wobei die Konzentration der freigesetzten Zytokine positiv mit dem Anteil der CD4+ T-Helferzellen korrelierte. *In vivo* vermittelten PTM-transduzierte CD4+ und CD8+ T-Zellen eine signifikante Verlangsamung des Tumorwachstums. Unter mechanistischen Gesichtspunkten wurde Interleukin-2 als zentraler Mediator des synergistischen Zusammenwirkens beider T-Zell-Subpopulationen identifiziert.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass PTM-transduzierte CD4+ T-Zellen die anti-tumorale Wirkung PTM-transduzierter CD8+ T-Zellen signifikant verbesserten. *In vitro* wie auch *in vivo* bewies die Kombination beider T-Zell-Subpopulationen das Potenzial, die PD-1-vermittelte Immunsuppression zu überwinden und in zwei verschiedenen murinen Tumormodellen (E.G7-OVA-PD-L1 und Panc02-OVA) eine anti-tumorale Immunantwort zu induzieren. Weitere Experimente in anderen Therapiemodellen könnten dazu beitragen, das bisherige Verständnis dieses Synergismus zu vertiefen, seine Therapiewirkung gezielt zu optimieren und so die Translation des hier entwickelten Ansatzes in die klinische Anwendung voranzutreiben.

7 Summary

Ligation of the programmed death-ligand 1 (PD-L1) by its receptor, programmed cell death protein 1 (PD-1), is known to inactivate tumor-resident and tumor-infiltrating T cells. Tumors often exploit this mechanism to escape T cell mediated immune surveillance. Preparatory data suggested that PD-1-CD28-fusion receptor (PTM)-transduced CD8+ T cells are, however, protected from PD-1-mediated exhaustion. In the context of adoptive T cell transfers, the potential role of PTM-transduced CD4+ T cells, either alone or in combination with CD8+ T cells, remains to be explored.

During stimulation with anti-CD3 antibodies and recombinant murine PD-L1, PTM-transduced CD4+ T cells showed an enhanced activation capacity, which was paired with an increase in interferon γ secretion and T cell proliferation. In T cell-tumor cell-co-cultures, specific target cell lysis depended on granzyme B release and could be maximized by combining PTM-transduced CD4+ and PTM-transduced CD8+ T cells. Upon antigen-specific stimulation, both T cell populations acquired a central memory phenotype. Moreover, interferon γ and interleukin 2 secretion positively correlated with the ratio of CD4+ to CD8+ T cells. In mouse experiments, PTM-transduced CD4+ T cells together with PTM-transduced CD8+ T cells led to a significant slowdown in tumor growth. Mechanistically interleukin 2 was identified as a major mediator of the herein described synergistic effect.

In summary, the available data suggests that PTM-transduced CD4+ T cells are capable of enhancing the anti-tumoral effect of PTM-transduced CD8+ T cells. *In vitro* as well as *in vivo*, combining both T cell populations demonstrated the potential to overcome PD-1-mediated immunosuppression and to induce a tumor-specific immune response in two different murine tumor models (E.G7-OVA-PD-L1 and Panc02-OVA). Further experiments in additional therapeutic models are advisable in order to deepen the current understanding of the described synergism and to optimize its therapeutic efficacy as a basis for clinical translation.

8 Literaturverzeichnis

1. Abate-Daga D, Hanada K, Davis JL, Yang JC, Rosenberg SA, Morgan RA. Expression profiling of TCR-engineered T cells demonstrates overexpression of multiple inhibitory receptors in persisting lymphocytes. *Blood* 2013; 122:1399-410.
2. Abdin SM, Zaher DM, Arafa EA, Omar HA. Tackling cancer resistance by immunotherapy: Updated clinical impact and safety of PD-1/PD-L1 inhibitors. *Cancers (Basel)* 2018; 10.
3. Akinleye A, Rasool Z. Immune checkpoint inhibitors of PD-L1 as cancer therapeutics. *J Hematol Oncol* 2019; 12:92.
4. Alsaab HO, Sau S, Alzhrani R, Tatiparti K, Bhise K, Kashaw SK, Iyer AK. PD-1 and PD-L1 checkpoint signaling inhibition for cancer immunotherapy: Mechanism, combinations, and clinical outcome. *Front Pharmacol* 2017; 8:561.
5. Ankri C, Shamalov K, Horovitz-Fried M, Mauer S, Cohen CJ. Human T cells engineered to express a programmed death 1/28 costimulatory retargeting molecule display enhanced antitumor activity. *J Immunol* 2013; 191:4121-9.
6. Arina A, Garrison T, Galka E, Schreiber K, Weichselbaum RR, Schreiber H. Transfer of allogeneic CD4+ T cells rescues CD8+ T cells in anti-PD-L1-resistant tumors leading to tumor eradication. *Cancer Immunol Res* 2017; 5:127-36.
7. Bellmunt J, de Wit R, Vaughn DJ, Fradet Y, Lee JL, Fong L, Vogelzang NJ, Climent MA, Petrylak DP, Choueiri TK, Necchi A, Gerritsen W, Gurney H, Quinn DI, Culine S, Sternberg CN, Mai Y, Poehlein CH, Perini RF, Bajorin DF, Investigators K-. Pembrolizumab as second-line therapy for advanced urothelial carcinoma. *N Engl J Med* 2017; 376:1015-26.
8. Blank C, Mackensen A. Contribution of the PD-L1/PD-1 pathway to T-cell exhaustion: An update on implications for chronic infections and tumor evasion. *Cancer Immunol Immunother* 2007; 56:739-45.
9. Bluestone JA. New perspectives of CD28-B7-mediated T cell costimulation. *Immunity* 1995; 2:555-9.
10. Blum JS, Wearsch PA, Cresswell P. Pathways of antigen processing. *Annu Rev Immunol* 2013; 31:443-73.
11. Boyle LH, Goodall JC, Gaston JS. Major histocompatibility complex class I-restricted alloreactive CD4+ T cells. *Immunology* 2004; 112:54-63.

12. Boyman O, Kolios AG, Raeber ME.
Modulation of T cell responses by IL-2 and IL-2 complexes.
Clin Exp Rheumatol 2015; 33:S54-7.
13. Boyman O, Sprent J.
The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system.
Nat Rev Immunol 2012; 12:180-90.
14. Brown RD, Pope B, Yuen E, Gibson J, Joshua DE.
The expression of T cell related costimulatory molecules in multiple myeloma.
Leuk Lymphoma 1998; 31:379-84.
15. Buchbinder EI, Desai A.
CTLA-4 and PD-1 pathways: Similarities, differences, and implications of their inhibition.
Am J Clin Oncol 2016; 39:98-106.
16. Chen L.
Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity.
Nat Rev Immunol 2004; 4:336-47.
17. Cherkassky L, Morello A, Villena-Vargas J, Feng Y, Dimitrov DS, Jones DR, Sadelain M, Adusumilli PS.
Human CAR T cells with cell-intrinsic PD-1 checkpoint blockade resist tumor-mediated inhibition.
J Clin Invest 2016; 126:3130-44.
18. Corthay A, Skovseth DK, Lundin KU, Rosjo E, Omholt H, Hofgaard PO, Haraldsen G, Bogen B.
Primary antitumor immune response mediated by CD4+ T cells.
Immunity 2005; 22:371-83.
19. Crompton JG, Sukumar M, Restifo NP.
Uncoupling T-cell expansion from effector differentiation in cell-based immunotherapy.
Immunol Rev 2014; 257:264-76.
20. Daud AI, Wolchok JD, Robert C, Hwu WJ, Weber JS, Ribas A, Hodi FS, Joshua AM, Kefford R, Hersey P, Joseph R, Gangadhar TC, Dronca R, Patnaik A, Zarour H, Roach C, Toland G, Lunceford JK, Li XN, Emancipator K, Dolled-Filhart M, Kang SP, Ebbinghaus S, Hamid O.
Programmed death-ligand 1 expression and response to the anti-programmed death 1 antibody pembrolizumab in melanoma.
J Clin Oncol 2016; 34:4102-9.
21. Ding ZC, Blazar BR, Mellor AL, Munn DH, Zhou G.
Chemotherapy rescues tumor-driven aberrant CD4+ T-cell differentiation and restores an activated polyfunctional helper phenotype.
Blood 2010; 115:2397-406.
22. Ding ZC, Huang L, Blazar BR, Yagita H, Mellor AL, Munn DH, Zhou G.
Polyfunctional CD4(+) T cells are essential for eradicating advanced B-cell lymphoma after chemotherapy.
Blood 2012; 120:2229-39.

23. Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, Roche PC, Lu J, Zhu G, Tamada K, Lennon VA, Celis E, Chen L.
Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion.
Nat Med 2002; 8:793-800.
24. Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, Sherry R, Restifo NP, Hubicki AM, Robinson MR, Raffeld M, Duray P, Seipp CA, Rogers-Freezer L, Morton KE, Mavroukakis SA, White DE, Rosenberg SA.
Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes.
Science 2002; 298:850-4.
25. Dudley ME, Wunderlich JR, Shelton TE, Even J, Rosenberg SA.
Generation of tumor-infiltrating lymphocyte cultures for use in adoptive transfer therapy for melanoma patients.
J Immunother 2003; 26:332-42.
26. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD.
Cancer immunoediting: From immunosurveillance to tumor escape.
Nat Immunol 2002; 3:991-8.
27. El-Daly SM, Hussein J.
Genetically engineered CAR T-immune cells for cancer therapy: Recent clinical developments, challenges, and future directions.
J Appl Biomed 2019; 17/1:1-11
28. Fenwick C, Loredo-Varela JL, Joo V, Pellaton C, Farina A, Rajah N, Esteves-Leuenberger L, Decaillon T, Suffiotti M, Noto A, Ohmiti K, Gottardo R, Weissenhorn W, Pantaleo G.
Tumor suppression of novel anti-PD-1 antibodies mediated through CD28 costimulatory pathway.
J Exp Med 2019; 216:1525-41.
29. Fisher J, Abramowski P, Wisidagamage Don ND, Flutter B, Capsomidis A, Cheung GW, Gustafsson K, Anderson J.
Avoidance of on-target off-tumor activation using a co-stimulation-only chimeric antigen receptor.
Mol Ther 2017; 25:1234-47.
30. Gardner RA, Finney O, Annesley C, Brakke H, Summers C, Leger K, Bleakley M, Brown C, Mgebroff S, Kelly-Spratt KS, Hoglund V, Lindgren C, Oron AP, Li D, Riddell SR, Park JR, Jensen MC.
Intent-to-treat leukemia remission by CD19 CAR T cells of defined formulation and dose in children and young adults.
Blood 2017; 129:3322-31.
31. Gattinoni L, Klebanoff CA, Palmer DC, Wrzesinski C, Kerstann K, Yu Z, Finkelstein SE, Theoret MR, Rosenberg SA, Restifo NP.
Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8+ T cells.
J Clin Invest 2005; 115:1616-26.
32. Geukes Foppen MH, Donia M, Svane IM, Haanen JB.
Tumor-infiltrating lymphocytes for the treatment of metastatic cancer.
Mol Oncol 2015; 9:1918-35.

33. Gibbons Johnson RM, Dong H.
Functional expression of programmed death-ligand 1 (B7-H1) by immune cells and tumor cells.
Front Immunol 2017; 8:961.
34. Golubovskaya V, Wu L.
Different subsets of T cells, memory, effector functions, and CAR-T immunotherapy.
Cancers (Basel) 2016; 8.
35. Gonzalez H, Hagerling C, Werb Z.
Roles of the immune system in cancer: From tumor initiation to metastatic progression.
Genes Dev 2018; 32:1267-84.
36. Goral S.
The three-signal hypothesis of lymphocyte activation/targets for immunosuppression.
Dialysis & Transplant 2011; 40:14-6.
37. Gorer PA.
Studies in antibody response of mice to tumour inoculation.
Br J Cancer 1950; 4:372-9.
38. Graef P, Buchholz VR, Stemberger C, Flossdorf M, Henkel L, Schiemann M, Drexler I, Hofer T, Riddell SR, Busch DH.
Serial transfer of single-cell-derived immunocompetence reveals stemness of CD8(+) central memory T cells.
Immunity 2014; 41:116-26.
39. Griffith KD, Read EJ, Carrasquillo JA, Carter CS, Yang JC, Fisher B, Aebersold P, Packard BS, Yu MY, Rosenberg SA.
In vivo distribution of adoptively transferred indium-111-labeled tumor infiltrating lymphocytes and peripheral blood lymphocytes in patients with metastatic melanoma.
J Natl Cancer Inst 1989; 81:1709-17.
40. Grupp SA, Kalos M, Barrett D, Aplenc R, Porter DL, Rheingold SR, Teachey DT, Chew A, Hauck B, Wright JF, Milone MC, Levine BL, June CH.
Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia.
N Engl J Med 2013; 368:1509-18.
41. Guo X, Jiang H, Shi B, Zhou M, Zhang H, Shi Z, Du G, Luo H, Wu X, Wang Y, Sun R, Li Z.
Disruption of PD-1 enhanced the anti-tumor activity of chimeric antigen receptor T cells against hepatocellular carcinoma.
Front Pharmacol 2018; 9:1118.
42. Haabeth OA, Tveita AA, Fauskanger M, Schjesvold F, Lorvik KB, Hofgaard PO, Omholt H, Munthe LA, Dembic Z, Corthay A, Bogen B.
How do CD4(+) T cells detect and eliminate tumor cells that either lack or express MHC class II molecules?
Front Immunol 2014; 5:174.
43. Haile ST, Horn LA, Ostrand-Rosenberg S.
A soluble form of CD80 enhances antitumor immunity by neutralizing programmed death ligand-1 and simultaneously providing costimulation.
Cancer Immunol Res 2014; 2:610-5.

44. Heemskerk B, Liu K, Dudley ME, Johnson LA, Kaiser A, Downey S, Zheng Z, Shelton TE, Matsuda K, Robbins PF, Morgan RA, Rosenberg SA.
Adoptive cell therapy for patients with melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes genetically engineered to secrete interleukin-2.
Hum Gene Ther 2008; 19:496-510.
45. Hino R, Kabashima K, Kato Y, Yagi H, Nakamura M, Honjo T, Okazaki T, Tokura Y.
Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma.
Cancer 2010; 116:1757-66.
46. Holling TM, van der Stoep N, Quinten E, van den Elsen PJ.
Activated human T cells accomplish MHC class II expression through T cell-specific occupation of class II transactivator promoter III.
J Immunol 2002; 168:763-70.
47. Hong J, Yun C-O.
Overcoming the limitations of locally administered oncolytic virotherapy.
BMC Biomed Engin 2019; 1:17.
48. Houot R, Schultz LM, Marabelle A, Kohrt H.
T-cell-based immunotherapy: Adoptive cell transfer and checkpoint inhibition.
Cancer Immunol Res 2015; 3:1115-22.
49. Hu B, Zou Y, Zhang L, Tang J, Niedermann G, Firat E, Huang X, Zhu X.
Nucleofection with plasmid DNA for CRISPR/Cas9-mediated inactivation of programmed cell death protein 1 in CD133-specific CAR T cells.
Hum Gene Ther 2019; 30:446-58.
50. Huang B, Luo L, Wang J, He B, Feng R, Xian N, Zhang Q, Chen L, Huang G.
B7-H3 specific T cells with chimeric antigen receptor and decoy PD-1 receptors eradicate established solid human tumors in mouse models.
Oncoimmunology 2020; 9:1684127.
51. Huang H, Hao S, Li F, Ye Z, Yang J, Xiang J.
CD4+ Th1 cells promote CD8+ Tc1 cell survival, memory response, tumor localization and therapy by targeted delivery of interleukin 2 via acquired pMHC I complexes.
Immunology 2007; 120:148-59.
52. Huang J, Khong HT, Dudley ME, El-Gamil M, Li YF, Rosenberg SA, Robbins PF.
Survival, persistence, and progressive differentiation of adoptively transferred tumor-reactive T cells associated with tumor regression.
J Immunother 2005; 28:258-67.
53. Hughes DP, Baskar D, Urban FF, Friedman MS, Braun TM, McDonagh KT.
Fate and function of anti-CD3/CD28-activated T cells following adoptive transfer: IL-2 promotes development of anti-tumor memory T cells in vivo.
Cytotherapy 2005; 7:396-407.
54. Hui E, Cheung J, Zhu J, Su X, Taylor MJ, Wallweber HA, Sasmal DK, Huang J, Kim JM, Mellman I, Vale RD.
T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition.
Science 2017; 355:1428-33.

55. Hunder NN, Wallen H, Cao J, Hendricks DW, Reilly JZ, Rodmyre R, Jungbluth A, Gnjatic S, Thompson JA, Yee C.
Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4+ T cells against NY-ESO-1.
N Engl J Med 2008; 358:2698-703.
56. Hung K, Hayashi R, Lafond-Walker A, Lowenstein C, Pardoll D, Levitsky H.
The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response.
J Exp Med 1998; 188:2357-68.
57. Hunziker L, Klenerman P, Zinkernagel RM, Ehl S.
Exhaustion of cytotoxic T cells during adoptive immunotherapy of virus carrier mice can be prevented by B cells or CD4+ T cells.
Eur J Immunol 2002; 32:374-82.
58. Iafolla MAJ, Juergens RA.
Update on programmed death-1 and programmed death-ligand 1 inhibition in the treatment of advanced or metastatic non-small cell lung cancer.
Front Oncol 2017; 7:67.
59. Kamphorst AO, Wieland A, Nasti T, Yang S, Zhang R, Barber DL, Konieczny BT, Daugherty CZ, Koenig L, Yu K, Sica GL, Sharpe AH, Freeman GJ, Blazar BR, Turka LA, Owonikoko TK, Pillai RN, Ramalingam SS, Araki K, Ahmed R.
Rescue of exhausted CD8 T cells by PD-1-targeted therapies is CD28-dependent.
Science 2017; 355:1423-7.
60. Kasakovski D, Xu L, Li Y.
T cell senescence and CAR-T cell exhaustion in hematological malignancies.
J Hematol Oncol 2018; 11:91.
61. Kayser S, Bobeta C, Feucht J, Witte KE, Scheu A, Bulow HJ, Joachim S, Stevanovic S, Schumm M, Rittig SM, Lang P, Rocken M, Handgretinger R, Feuchtinger T.
Rapid generation of NY-ESO-1-specific CD4(+) Helper1 cells for adoptive T-cell therapy.
Oncoimmunology 2015; 4:e1002723.
62. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH.
PD-1 and its ligands in tolerance and immunity.
Annu Rev Immunol 2008; 26:677-704.
63. Kennedy R, Celis E.
T helper lymphocytes rescue CTL from activation-induced cell death.
J Immunol 2006; 177:2862-72.
64. Khanna C, Anderson PM, Hassz DE, Katsanis E, Neville M, Klausner JS.
Interleukin-2 liposome inhalation therapy is safe and effective for dogs with spontaneous pulmonary metastases.
Cancer 1997; 79:1409-21.
65. Kobold S, Duewell P, Schnurr M, Subklewe M, Rothenfusser S, Endres S.
Immunotherapy in tumors.
Dtsch Arztebl Int 2015; 112:809-15.

66. Kobold S, Grassmann S, Chaloupka M, Lampert C, Wenk S, Kraus F, Rapp M, Duwell P, Zeng Y, Schmollinger JC, Schnurr M, Endres S, Rothenfusser S. Impact of a new fusion receptor on PD-1-mediated immunosuppression in adoptive T cell therapy. *J Natl Cancer Inst* 2015; 107.
67. Krummel MF, Allison JP. Pillars article: CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *The journal of experimental medicine*. 1995. 182: 459-465. *J Immunol* 2011; 187:3459-65.
68. Kryczek I, Wei S, Szeliga W, Vatan L, Zou W. Endogenous IL-17 contributes to reduced tumor growth and metastasis. *Blood* 2009; 114:357-9.
69. Lai YP, Lin CC, Liao WJ, Tang CY, Chen SC. CD4+ T cell-derived IL-2 signals during early priming advances primary CD8+ T cell responses. *PLoS One* 2009; 4:e7766.
70. Leisegang M, Engels B, Meyerhuber P, Kieback E, Sommermeyer D, Xue SA, Reuss S, Stauss H, Uckert W. Enhanced functionality of T cell receptor-redirected T cells is defined by the transgene cassette. *J Mol Med (Berl)* 2008; 86:573-83.
71. Lesch S, Benmebarek MR, Cadilha BL, Stoiber S, Subklewe M, Endres S, Kobold S. Determinants of response and resistance to CAR T cell therapy. *Semin Cancer Biol* 2019.
72. Li K, Donaldson B, Young V, Ward V, Jackson C, Baird M, Young S. Adoptive cell therapy with CD4(+) T helper 1 cells and CD8(+) cytotoxic T cells enhances complete rejection of an established tumour, leading to generation of endogenous memory responses to non-targeted tumour epitopes. *Clin Transl Immunology* 2017; 6:e160.
73. Li M, Davey GM, Sutherland RM, Kurts C, Lew AM, Hirst C, Carbone FR, Heath WR. Cell-associated ovalbumin is cross-presented much more efficiently than soluble ovalbumin in vivo. *J Immunol* 2001; 166:6099-103.
74. Liao W, Lin JX, Leonard WJ. Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy. *Immunity* 2013; 38:13-25.
75. Liu X, Ranganathan R, Jiang S, Fang C, Sun J, Kim S, Newick K, Lo A, June CH, Zhao Y, Moon EK. A chimeric switch-receptor targeting PD1 augments the efficacy of second-generation CAR T cells in advanced solid tumors. *Cancer Res* 2016; 76:1578-90.

76. Liu Y, Chen X, Han W, Zhang Y.
Tisagenlecleucel, an approved anti-CD19 chimeric antigen receptor T-cell therapy for the treatment of leukemia.
Drugs Today (Barc) 2017; 53:597-608.
77. Lynch A, Hawk W, Nylen E, Ober S, Autin P, Barber A.
Adoptive transfer of murine T cells expressing a chimeric-PD1-DAP10 receptor as an immunotherapy for lymphoma.
Immunology 2017; 152:472-83.
78. Malhotra J, Jabbour SK, Aisner J.
Current state of immunotherapy for non-small cell lung cancer.
Transl Lung Cancer Res 2017; 6:196-211.
79. Mangalam A, Rodriguez M, David C.
Role of MHC class II expressing CD4+ T cells in proteolipid protein(91-110)-induced EAE in HLA-DR3 transgenic mice.
Eur J Immunol 2006; 36:3356-70.
80. Marchetti G, Meroni L, Molteni C, Bandera A, Franzetti F, Galli M, Moroni M, Clerici M, Gori A.
Interleukin-2 immunotherapy exerts a differential effect on CD4 and CD8 T cell dynamics.
Aids 2004; 18:211-6.
81. Martinez M, Moon EK.
CAR T cells for solid tumors: New strategies for finding, infiltrating, and surviving in the tumor microenvironment.
Front Immunol 2019; 10:128.
82. Marzo AL, Kinnear BF, Lake RA, Frelinger JJ, Collins EJ, Robinson BW, Scott B.
Tumor-specific CD4+ T cells have a major "post-licensing" role in CTL mediated anti-tumor immunity.
J Immunol 2000; 165:6047-55.
83. Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, Rives S, Boyer M, Bittencourt H, Bader P, Verneris MR, Stefanski HE, Myers GD, Qayed M, De Moerloose B, Hiramatsu H, Schlis K, Davis KL, Martin PL, Nemecek ER, Yanik GA, Peters C, Baruchel A, Boissel N, Mechinaud F, Balduzzi A, Krueger J, June CH, Levine BL, Wood P, Taran T, Leung M, Mueller KT, Zhang Y, Sen K, Lebwohl D, Pulsipher MA, Grupp SA.
Tisagenlecleucel in children and young adults with B-cell lymphoblastic leukemia.
N Engl J Med 2018; 378:439-48.
84. Mestas J, Hughes CC.
Of mice and not men: Differences between mouse and human immunology.
J Immunol 2004; 172:2731-8.
85. Moeller M, Haynes NM, Kershaw MH, Jackson JT, Teng MW, Street SE, Cerutti L, Jane SM, Trapani JA, Smyth MJ, Darcy PK.
Adoptive transfer of gene-engineered CD4+ helper T cells induces potent primary and secondary tumor rejection.
Blood 2005; 106:2995-3003.
86. Morita S, Kojima T, Kitamura T.
Plat-E: An efficient and stable system for transient packaging of retroviruses.
Gene Ther 2000; 7:1063-6.

87. Muranski P, Boni A, Antony PA, Cassard L, Irvine KR, Kaiser A, Paulos CM, Palmer DC, Touloukian CE, Ptak K, Gattinoni L, Wrzesinski C, Hinrichs CS, Kerstann KW, Feigenbaum L, Chan CC, Restifo NP.
Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma.
Blood 2008; 112:362-73.
88. Murphy KM, Travers P, Walport M.
Janeway Immunologie.
Springer Berlin Heidelberg; 2014.
89. Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, Lekakis LJ, Miklos DB, Jacobson CA, Braunschweig I, Oluwole OO, Siddiqi T, Lin Y, Timmerman JM, Stiff PJ, Friedberg JW, Flinn IW, Goy A, Hill BT, Smith MR, Deol A, Farooq U, McSweeney P, Munoz J, Avivi I, Castro JE, Westin JR, Chavez JC, Ghobadi A, Komanduri KV, Levy R, Jacobsen ED, Witzig TE, Reagan P, Bot A, Rossi J, Navale L, Jiang Y, Aycock J, Elias M, Chang D, Wiezorek J, Go WY.
Axicabtagene Ciloleucel CAR T-cell therapy in refractory large B-cell lymphoma.
N Engl J Med 2017; 377:2531-44.
90. Neuenhahn M, Albrecht J, Odendahl M, Schlott F, Dossinger G, Schiemann M, Lakshmipathi S, Martin K, Bunjes D, Harsdorf S, Weissinger EM, Menzel H, Verbeek M, Uharek L, Kroger N, Wagner E, Kobbe G, Schroeder T, Schmitt M, Held G, Herr W, Germeroth L, Bonig H, Tonn T, Einsele H, Busch DH, Grigoleit GU.
Transfer of minimally manipulated CMV-specific T cells from stem cell or third-party donors to treat CMV infection after allo-HSCT.
Leukemia 2017; 31:2161-71.
91. Nishimura T, Iwakabe K, Sekimoto M, Ohmi Y, Yahata T, Nakui M, Sato T, Habu S, Tashiro H, Sato M, Ohta A.
Distinct role of antigen-specific T helper type 1 (Th1) and Th2 cells in tumor eradication in vivo.
J Exp Med 1999; 190:617-27.
92. Pai SI, Faivre S, Licitra L, Machiels JP, Vermorken JB, Bruzzi P, Gruenwald V, Giglio RE, Leemans CR, Seiwert TY, Soulieres D.
Comparative analysis of the phase III clinical trials of anti-PD1 monotherapy in head and neck squamous cell carcinoma patients (checkmate 141 and keynote 040).
J Immunother Cancer 2019; 7:96.
93. Pardoll DM, Topalian SL.
The role of CD4+ T cell responses in antitumor immunity.
Curr Opin Immunol 1998; 10:588-94.
94. Paroder M, Le N, Pham HP, Thibodeaux SR.
Important aspects of T-cell collection by apheresis for manufacturing chimeric antigen receptor T cells.
Adv Cell Gene Ther 2019; 3.
95. Patel SP, Kurzrock R.
PD-L1 expression as a predictive biomarker in cancer immunotherapy.
Mol Cancer Ther 2015; 14:847-56.
96. Perez-Diez A, Joncker NT, Choi K, Chan WF, Anderson CC, Lantz O, Matzinger P.
CD4 cells can be more efficient at tumor rejection than CD8 cells.
Blood 2007; 109:5346-54.

97. Petrova V, Annicchiarico-Petruzzelli M, Melino G, Amelio I.
The hypoxic tumour microenvironment.
Oncogenesis 2018; 7:10.
98. Postow MA, Chesney J, Pavlick AC, Robert C, Grossmann K, McDermott D, Linette GP, Meyer N, Giguere JK, Agarwala SS, Shaheen M, Ernstoff MS, Minor D, Salama AK, Taylor M, Ott PA, Rollin LM, Horak C, Gagnier P, Wolchok JD, Hodi FS.
Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma.
N Engl J Med 2015; 372:2006-17.
99. Powell DJ, Jr., Dudley ME, Robbins PF, Rosenberg SA.
Transition of late-stage effector T cells to CD27+ CD28+ tumor-reactive effector memory T cells in humans after adoptive cell transfer therapy.
Blood 2005; 105:241-50.
100. Prlic M, Williams MA, Bevan MJ.
Requirements for CD8 T-cell priming, memory generation and maintenance.
Curr Opin Immunol 2007; 19:315-9.
101. Prosser ME, Brown CE, Shami AF, Forman SJ, Jensen MC.
Tumor PD-L1 co-stimulates primary human CD8(+) cytotoxic T cells modified to express a PD1:CD28 chimeric receptor.
Mol Immunol 2012; 51:263-72.
102. Qin L, Zhao R, Li P.
Incorporation of functional elements enhances the antitumor capacity of CAR T cells.
Exp Hematol Oncol 2017; 6:28.
103. Quezada SA, Simpson TR, Peggs KS, Merghoub T, Vider J, Fan X, Blasberg R, Yagita H, Muranski P, Antony PA, Restifo NP, Allison JP.
Tumor-reactive CD4(+) T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts.
J Exp Med 2010; 207:637-50.
104. Qui HZ, Hagymasi AT, Bandyopadhyay S, St Rose MC, Ramanarasimhaiah R, Menoret A, Mittler RS, Gordon SM, Reiner SL, Vella AT, Adler AJ.
CD134 plus CD137 dual costimulation induces eomesodermin in CD4 T cells to program cytotoxic Th1 differentiation.
J Immunol 2011; 187:3555-64.
105. Rafiq S, Yeku OO, Jackson HJ, Purdon TJ, van Leeuwen DG, Drakes DJ, Song M, Miele MM, Li Z, Wang P, Yan S, Xiang J, Ma X, Seshan VE, Hendrickson RC, Liu C, Brentjens RJ.
Targeted delivery of a PD-1-blocking scFv by CAR-T cells enhances anti-tumor efficacy in vivo.
Nat Biotechnol 2018; 36:847-56.
106. Rakhra K, Bachireddy P, Zabuawala T, Zeiser R, Xu L, Kopelman A, Fan AC, Yang Q, Braunstein L, Crosby E, Ryeom S, Felsher DW.
CD4(+) T cells contribute to the remodeling of the microenvironment required for sustained tumor regression upon oncogene inactivation.
Cancer Cell 2010; 18:485-98.

107. Rataj F, Kraus FBT, Chaloupka M, Grassmann S, Heise C, Cadilha BL, Duewell P, Endres S, Kobold S.
PD1-CD28 fusion protein enables CD4+ T cell help for adoptive T cell therapy in models of pancreatic cancer and non-hodgkin lymphoma.
Front Immunol 2018; 9:1955.
108. Riddell SR, Sommermeyer D, Berger C, Liu LS, Balakrishnan A, Salter A, Hudecek M, Maloney DG, Turtle CJ.
Adoptive therapy with chimeric antigen receptor-modified T cells of defined subset composition.
Cancer J 2014; 20:141-4.
109. Romagnoli PA, Premenko-Lanier MF, Loria GD, Altman JD.
CD8 T cell memory recall is enhanced by novel direct interactions with CD4 T cells enabled by MHC class II transferred from APCs.
PLoS One 2013; 8:e56999.
110. Rosenberg SA, Restifo NP.
Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer.
Science 2015; 348:62-8.
111. Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM, Kammula US, Hughes MS, Phan GQ, Citrin DE, Restifo NP, Robbins PF, Wunderlich JR, Morton KE, Laurencot CM, Steinberg SM, White DE, Dudley ME.
Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy.
Clin Cancer Res 2011; 17:4550-7.
112. Rozali EN, Hato SV, Robinson BW, Lake RA, Lesterhuis WJ.
Programmed death ligand 2 in cancer-induced immune suppression.
Clin Dev Immunol 2012; 2012:656340.
113. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A.
Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions.
Nature 1999; 401:708-12.
114. Santos JM, Havunen R, Siurala M, Cervera-Carrascon V, Tahtinen S, Sorsa S, Anttila M, Karell P, Kanerva A, Hemminki A.
Adenoviral production of interleukin-2 at the tumor site removes the need for systemic postconditioning in adoptive cell therapy.
Int J Cancer 2017; 141:1458-68.
115. Schlenker R, Olgun-Contreras LF, Leisegang M, Schnappinger J, Disovic A, Ruhland S, Nelson PJ, Leonhardt H, Harz H, Wilde S, Schendel DJ, Uckert W, Willimsky G, Noessner E.
Chimeric PD-1:28 receptor upgrades low-avidity T cells and restores effector function of tumor-infiltrating lymphocytes for adoptive cell therapy.
Cancer Res 2017; 77:3577-90.
116. Schuster SJ, Bishop MR, Tam CS, Waller EK, Borchmann P, McGuirk JP, Jager U, Jaglowski S, Andreadis C, Westin JR, Fleury I, Bachanova V, Foley SR, Ho PJ, Mielke S, Magenau JM, Holte H, Pantano S, Pacaud LB, Awasthi R, Chu J, Anak O, Salles G, Maziarz RT, Investigators J.
Tisagenlecleucel in adult relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma.
N Engl J Med 2019; 380:45-56.

117. Schwartz RN, Stover L, Dutcher JP.
Managing toxicities of high-dose interleukin-2.
Oncology (Williston Park) 2002; 16:11-20.
118. Sharpe AH, Abbas AK.
T-cell costimulation--biology, therapeutic potential, and challenges.
N Engl J Med 2006; 355:973-5.
119. Shin JH, Park HB, Oh YM, Lim DP, Lee JE, Seo HH, Lee SJ, Eom HS, Kim IH, Lee SH, Choi K.
Positive conversion of negative signaling of CTLA4 potentiates antitumor efficacy of adoptive T-cell therapy in murine tumor models.
Blood 2012; 119:5678-87.
120. Shresta S, Pham CT, Thomas DA, Graubert TA, Ley TJ.
How do cytotoxic lymphocytes kill their targets?
Curr Opin Immunol 1998; 10:581-7.
121. Sommermeyer D, Hudecek M, Kosashih PL, Gogishvili T, Maloney DG, Turtle CJ, Riddell SR.
Chimeric antigen receptor-modified T cells derived from defined CD8+ and CD4+ subsets confer superior antitumor reactivity in vivo.
Leukemia 2016; 30:492-500.
122. Spolski R, Li P, Leonard WJ.
Biology and regulation of IL-2: From molecular mechanisms to human therapy.
Nat Rev Immunol 2018; 18:648-59.
123. Stoiber S, Cadilha BL, Benmabarek MR, Lesch S, Endres S, Kobold S.
Limitations in the design of chimeric antigen receptors for cancer therapy.
Cells 2019; 8.
124. Surman DR, Dudley ME, Overwijk WW, Restifo NP.
Cutting edge: CD4+ T cell control of CD8+ T cell reactivity to a model tumor antigen.
J Immunol 2000; 164:562-5.
125. Tang X, Li Q, Zhu Y, Zheng D, Dai J, Ni W, Wei J, Xue Y, Chen K, Hou W, Zhang C, Feng X, Liang Y.
The advantages of PD1 activating chimeric receptor (PD1-ACR) engineered lymphocytes for PDL1(+) cancer therapy.
Am J Transl Res 2015; 7:460-73.
126. Tatsumi T, Takehara T, Katayama K, Mochizuki K, Yamamoto M, Kanto T, Sasaki Y, Kasahara A, Hayashi N.
Expression of costimulatory molecules B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) on human hepatocellular carcinoma.
Hepatology 1997; 25:1108-14.
127. Thommen DS, Schumacher TN.
T cell dysfunction in cancer.
Cancer Cell 2018; 33:547-62.

128. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, Powderly JD, Carvajal RD, Sosman JA, Atkins MB, Leming PD, Spigel DR, Antonia SJ, Horn L, Drake CG, Pardoll DM, Chen L, Sharfman WH, Anders RA, Taube JM, McMiller TL, Xu H, Korman AJ, Jure-Kunkel M, Agrawal S, McDonald D, Kollia GD, Gupta A, Wigginton JM, Sznol M.
Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer.
N Engl J Med 2012; 366:2443-54.
129. Tran E, Turcotte S, Gros A, Robbins PF, Lu YC, Dudley ME, Wunderlich JR, Somerville RP, Hogan K, Hinrichs CS, Parkhurst MR, Yang JC, Rosenberg SA.
Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4+ T cells in a patient with epithelial cancer.
Science 2014; 344:641-5.
130. Turtle CJ, Hanafi LA, Berger C, Gooley TA, Cherian S, Hudecek M, Sommermeyer D, Melville K, Pender B, Budiarto TM, Robinson E, Steevens NN, Chaney C, Soma L, Chen X, Yeung C, Wood B, Li D, Cao J, Heimfeld S, Jensen MC, Riddell SR, Maloney DG.
CD19 CAR-T cells of defined CD4+:CD8+ composition in adult B cell ALL patients.
J Clin Invest 2016; 126:2123-38.
131. Turtle CJ, Hanafi LA, Berger C, Hudecek M, Pender B, Robinson E, Hawkins R, Chaney C, Cherian S, Chen X, Soma L, Wood B, Li D, Heimfeld S, Riddell SR, Maloney DG.
Immunotherapy of Non-Hodgkin's lymphoma with a defined ratio of CD8+ and CD4+ CD19-specific chimeric antigen receptor-modified T cells.
Sci Transl Med 2016; 8:355ra116.
132. Voigt C, May P, Gottschlich A, Markota A, Wenk D, Gerlach I, Voigt S, Stathopoulos GT, Arendt KAM, Heise C, Rataj F, Janssen KP, Konigshoff M, Winter H, Himsi I, Thasler WE, Schnurr M, Rothenfusser S, Endres S, Kobold S.
Cancer cells induce interleukin-22 production from memory CD4(+) T cells via interleukin-1 to promote tumor growth.
Proc Natl Acad Sci U S A 2017; 114:12994-9.
133. Wang L, Yi T, Kortylewski M, Pardoll DM, Zeng D, Yu H.
IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-STAT3 signaling pathway.
J Exp Med 2009; 206:1457-64.
134. Wang LX, Shu S, Disis ML, Plautz GE.
Adoptive transfer of tumor-primed, in vitro-activated, CD4+ T effector cells (Tes) combined with CD8+ Tes provides intratumoral Te proliferation and synergistic antitumor response.
Blood 2007; 109:4865-76.
135. Wang X, Teng F, Kong L, Yu J.
PD-L1 expression in human cancers and its association with clinical outcomes.
Onco Targets Ther 2016; 9:5023-39.
136. Weng NP, Akbar AN, Goronzy J.
CD28(-) T cells: Their role in the age-associated decline of immune function.
Trends Immunol 2009; 30:306-12.

137. Wetzel SA, McKeithan TW, Parker DC.
Peptide-specific intercellular transfer of MHC class II to CD4+ T cells directly from the immunological synapse upon cellular dissociation.
J Immunol 2005; 174:80-9.
138. Wherry EJ.
T cell exhaustion.
Nat Immunol 2011; 12:492-9.
139. Xia A, Zhang Y, Xu J, Yin T, Lu XJ.
T cell dysfunction in cancer immunity and immunotherapy.
Front Immunol 2019; 10:1719.
140. Xia AL, Xu Y, Lu XJ.
Cancer immunotherapy: Challenges and clinical applications.
J Med Genet 2019; 56:1-3.
141. Xu Y, Dotti G.
Selection bias: Maintaining less-differentiated T cells for adoptive immunotherapy.
J Clin Invest 2016; 126:35-7.
142. Yannelli JR, Hyatt C, McConnell S, Hines K, Jacknin L, Parker L, Sanders M, Rosenberg SA.
Growth of tumor-infiltrating lymphocytes from human solid cancers: Summary of a 5-year experience.
Int J Cancer 1996; 65:413-21.
143. Zamarron BF, Chen W.
Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression.
Int J Biol Sci 2011; 7:651-8.
144. Zappasodi R, Budhu S, Hellmann MD, Postow MA, Senbabaoglu Y, Manne S, Gasmi B, Liu C, Zhong H, Li Y, Huang AC, Hirschhorn-Cyberman D, Panageas KS, Wherry EJ, Merghoub T, Wolchok JD.
Non-conventional inhibitory CD4(+)FoxP3(-)PD-1(hi) T cells as a biomarker of immune checkpoint blockade activity.
Cancer Cell 2018; 33:1017-32 e7.
145. Zhou F.
Molecular mechanisms of IFN-gamma to up-regulate MHC class I antigen processing and presentation.
Int Rev Immunol 2009; 28:239-60.
146. Zou W.
Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy.
Nat Rev Immunol 2006; 6:295-307.
147. Zou W, Chen L.
Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment.
Nat Rev Immunol 2008; 8:467-77.

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

APZ	Antigenpräsentierende Zellen
AZT	Adoptiver T-Zell-Transfer
BSA	Bovines Serumalbumin
CAR	Chimärer Antigen-Rezeptor
CCR7	<i>C-C chemokine receptor type 7</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CD62L	L-Selektin
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4</i>
DLBCL	Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMEM+++	DMEM Vollmedium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DZ	Dendritische Zellen
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EOMES	Eomesodermin
FBS	Fetales Kälberserum
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FoxP3	<i>Forkhead box P3</i>
IFN-γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
LDH	Laktatdehydrogenase
MACS	Magnetische Zellseparation
MDSZ	Myeloide Suppressorzellen
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>

NK-Zellen	Natürlichen Killerzellen
NSCLC	Nicht-Kleinzeliges Bronchialkarzinom
OVA	Ovalbumin
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PD-1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
PD-1-CD28:tm	PD-1-CD28-Fusionsrezeptor mit extrazellulärer PD-1-Domäne sowie transmembranösem und intrazellulärem CD28-Anteil
PD-1-CD28:tmCys	PD-1-CD28:tm-Fusionsrezeptor mit membrannahem Cystein-Rest
PD-L	<i>Programmed death-ligand</i>
PlatE	Platinum-E
PTM	Spezifisch in dieser Studie verwendeter PD-1-CD28-Fusionsrezeptor mit extrazellulärer und <u>transmembranöser</u> <u>PD-1-Domäne</u> sowie intrazellulärem CD28-Anteil (Kobold et al., 2015)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
scFv	<i>Single-chain-variable-Fragment</i>
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
Th1-Zelle	Typ-1-T-Helferzelle
Th2-Zelle	Typ-2-T-Helferzelle
Th17-Zelle	Typ-17-T-Helferzelle
TIL	Tumorinfiltrierende Lymphozyten
T_{reg}	Regulatorische T-Zellen
TZM	T-Zell-Medium
TZR	T-Zell-Rezeptor

9.2 Veröffentlichungen

9.2.1 Originalarbeiten

1. Kobold S, Grassmann S, Chaloupka M, Lampert C, Wenk S, **Kraus F**, Rapp M, Duewell P, Zeng Y, Schmollinger J, Schnurr M, Rothenfusser S, Endres S. Impact of a new fusion receptor on PD-1 mediated immunosuppression in adoptive T cell therapy. *J Natl Cancer Inst* 2015 Jun 23; 107(8).
2. Rataj F*, **Kraus F***, Chaloupka M, Grassmann S, Heise C, Duewell P, Endres S, Kobold S. (* geteilte Erstautorenschaft). PD1-CD28 fusion protein enables CD4+ T cell help for adoptive T cell therapy in models of pancreatic cancer and non-Hodgkin-lymphoma. *Front Immuno*. 2018 Aug 30; 9:1955.

9.2.2 Abstracts und Poster

1. **Kraus F**, Grassmann S, Chaloupka M, Lampert C, Endres S, Kobold S. A new PD1-CD28 fusion protein overcomes PD-L1-immunosuppression in tumors. *DoktaMed der Ludwig-Maximilians-Universität München, Deutschland, 24.05.2014*.
2. **Kraus F**, Grassmann S, Chaloupka M, Lampert C, Schmollinger J, Endres S, Kobold S. A new PD1-CD28 chimeric receptor overcomes PD-1-mediated immunosuppression in adoptive T cell therapy. *Immunofest München 2014 - erstes internationales Symposium des DFG-Graduiertenprogrammes 1202 "Oligonucleotides in Cell Biology and Therapy" - Eröffnungszeremonie des Graduiertenprogrammes des Elitenetzwerks Bayern "I-Target - Immunotargeting of Cancer", München, Deutschland, 25-26.09.2014*.
3. Kobold S, Grassmann S, Chaloupka M, Lampert C, **Kraus F**, Rothenfusser S, Schnurr M, Endres S. A new fusion receptor overcomes PD-1-mediated immunosuppression in adoptive T cell therapy. *2nd ImmunoTherapy of Cancer Conference, München, Deutschland, 25-27.03.2015*.
4. Kobold S, Grassmann S, Rataj F, **Kraus F**, Chaloupka M, Lampert C, Rothenfusser S, Schnurr M, Endres S. A new fusion receptor overcomes PD-1-mediated immunosuppression in adoptive T cell therapy. *13th CIMT Annual Meeting Cancer Immunotherapy, Mainz, Deutschland, 11-13.05.2015*.

5. **Kraus F**, Rataj F, Grassmann S, Chaloupka M, Endres S, Kobold S.
Functional characterization of different variants of a PD-1-CD28-fusion receptor.
14th CIMT Annual Meeting Cancer Immunotherapy, Mainz, Deutschland, 10-12.05.2016.
6. **Kraus F**, Rataj F, Grassmann S, Chaloupka M, Endres S, Kobold S.
Functional characterization of different variants of a PD-1-CD28-fusion receptor.
1. Symposium der Deutschen Krebshilfe für Promotionsstudenten, Bonn, Deutschland, 04-05.10.2016.
7. Rataj F, **Kraus F**, Grassmann S, Chaloupka M, Lesch S, Heise C, Endres S, Kobold S.
Preclinical characterization of a PD-1-CD28 fusion receptor for T cell-based immunotherapy of Non-Hodgkin Lymphoma.
4th ImmunoTherapy of Cancer Conference, Prag, Tschechien, 20-22.03.2017.
8. Berhe S, **Kraus F**, Tariq Hanifi M, Vlassakov K, Stopfkuchen-Evans M.
Use of transversus abdominis plane block for post-operative pain management in a patient with an open abdomen.
Anesthesiology 2017 Annual Meeting, Boston, USA, 21-25.10.2017.
9. Rataj F, **Kraus F**, Grassmann S, Chaloupka M, Ogonek J, Zhang J, Rausch S, Endres S, Kobold S.
Preclinical characterization of a PD-1-CD28 fusion receptor for T cell-based immunotherapy of pancreatic cancer and Non-Hodgkin Lymphoma.
5th ImmunoTherapy of Cancer Conference, Berlin, Deutschland, 19-21.03.2018.
10. **Kraus F**, Hindmarsh P, Spoudeas H.
Pulling the brakes — ‘Catch down growth’: a phenomenon for achieving mid-parental height centile after acquired, all-cause, brain injury.
57th Annual Meeting of the European Society of Paediatric Endocrinology (ESPE), Athen, Griechenland, 27-29.09.2018.
11. **Kraus F B T**, Mehta A, Wan D.
Autoinflammation in an immunocompromised lymphoma patient with sepsis.
ACG 2019 – American College of Gastroenterology Annual Scientific Meeting – San Antonio, USA, 25-30.10.2019.

10 Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich bei allen, die zur Erstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

Zuallererst bin ich meinen beiden Betreuern, Prof. Dr. Stefan Endres und Prof. Dr. Sebastian Kobold, zu großem Dank verpflichtet. Indem sie mir eine Doktorandenstelle in ihrer Arbeitsgruppe anboten und mir zudem ein hochrelevantes Forschungsprojekt anvertrauten, schenkten sie mir die Möglichkeit, wissenschaftlich-experimentelles Denken und Arbeiten unter ihrer Anleitung zu erlernen. Mit ihrer leidenschaftlichen Forschungsbegeisterung weckten sie meine Faszination für die Welt der Wissenschaft und lehrten mich in zahlreichen Gesprächen, mein Forschungsprojekt kritisch zu reflektieren und bis zur Publikation in einem internationalen Fachjournal eigenständig weiterzuentwickeln. In fachlicher wie auch zwischenmenschlicher Hinsicht haben mich beide sehr geprägt.

Bei Dr. Felicitas Stein und Constanze Heise bedanke ich mich herzlich für ihr stets offenes Ohr sowie ihre große Unterstützung bei der Konzeption, Durchführung und Diskussion meiner Experimente. Allen Doktoranden und Mitarbeitern der Abteilung für Klinische Pharmakologie bin ich für unser stets kollegiales und hilfsbereites Miteinander sehr dankbar.

Darüber hinaus danke ich dem Mildred-Scheel-Doktorandenprogramm der Deutschen Krebshilfe für seine finanzielle Unterstützung. Der Stiftung Maximilianeum sowie allen voran ihrem Vorstand, Hanspeter Beißer, bin ich für ihre freundliche Aufnahme zu großem Dank verpflichtet. Sie hat mir für meine Studien- und Promotionszeit eine Heimat gegeben und damit zahlreiche inspirierende Begegnungen und Freundschaften erst ermöglicht.

Zu guter Letzt gilt mein besonderer Dank meinen Eltern, Elisabeth und Bernhard Kraus, für ihre liebevolle Geduld und beständige Unterstützung, ohne die ich heute nicht wäre, wo ich bin.

11 Eidesstattliche Versicherung

Kraus, Fabian Bernhard Thaddäus

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**PD-1-CD28-Fusionsrezeptor-transduzierte CD4+ T-Zellen für die adoptive
T-Zell-Therapie von murinen Pankreaskarzinom- und
Non-Hodgkin-Lymphommodellen**

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 08. Juli 2020

Ort, Datum

Fabian B.T. Kraus

Unterschrift Doktorandin/Doktorand