

Aus der
Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen
Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik
(Schwerpunkt: Hämatologie, Onkologie, Gastroenterologie, Nephrologie,
Rheumatologie)

**Verbesserung der klinischen Anwendbarkeit von AdCAR-T
Zellen**

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

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

vorgelegt von

Hausmann, Patrick Leander

2024

Dekan: Professor Dr. B. Pichler
1. Berichterstatter: Professor. Dr. S. Huber
2. Berichterstatter: Professorin Dr. C. Weigert
Tag der Disputation: 19.07.2024

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1 Einleitung.....	8
a) Checkpoint-Inhibition.....	8
b) Bi-spezifische Antikörper.....	9
c) Zelluläre Immuntherapien.....	9
Limitationen der CAR-T-Zell-Therapie.....	14
Fragestellung und Ziele.....	21
2 Materialien und Methoden.....	22
2.1 Materialien.....	22
2.2 Methoden.....	26
2.2.1 Zellkultur.....	26
2.2.2 Transfektionstechniken.....	27
2.2.3 Bestimmung der Transfektionseffizienz.....	35
3 Ergebnisse.....	44
3.1 Transfektionsvergleich.....	44
3.2 Knock-out.....	47
3.2.1 KO in Jurkat-Zellen.....	47
3.2.2 KO in T-Zellen.....	52
4 Diskussion.....	58
4.1 Transfektionsvergleich.....	58
4.2 CARs ohne TCR.....	59
4.3 Weiterführende Studien.....	59
4.4 Schlussfolgerung.....	62

5	Zusammenfassung	62
	Supplements:	64
6	Literaturverzeichnis	65
7	Erklärung zum Eigenanteil	70
8	Danksagung	71

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte	22
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien	23
Tabelle 3: Zelllinien	23
Tabelle 4: Reagenzien und Chemikalien.....	23
Tabelle 5: Puffer und Lösungen	24
Tabelle 6: Kits	24
Tabelle 7: Plasmide und mRNA.....	25
Tabelle 8: Primer	25
Tabelle 9: Software	25
Tabelle 10: Protokoll für die Transfektion mit CaPO ₄ -Kit	27
Tabelle 11: Protokoll für die Transfektion mit CaPO ₄	28
Tabelle 12: Protokoll für die Transfektion mit Lipofectamine™ 2000	29
Tabelle 13: Protokoll für die Transfektion mit Lipofectamine™ 3000	30
Tabelle 14: Protokoll für die Transfektion mit Polyethylenimin	31
Tabelle 15: Protokoll für die Elektroporation von Jurkat-Zellen.....	32
Tabelle 16: Protokoll für die Elektroporation von AdCAR-T-Zellen.....	34
Tabelle 17: Isolierung genomischer DNA.	38
Tabelle 18: PCR-Reagenzien	40
Tabelle 19: Zykluseinstellungen der PCR.....	40
Tabelle 20: T7-Assay Reagenzien.....	41
Tabelle 21: Zykluseinstellungen des T7-Assays	41
Tabelle 22: Ergebnisse des Transfektionsvergleichs mit eGFP.	45
Tabelle 23: Ergebnisse der Elektroporation mit RFP.....	48
Tabelle 24: Ergebnisse des KO mittels Elektroporation des CRISPR/Cas9-Systems in Jurkat- Zellen, gefärbt mit Anti-TCRab.	50
Tabelle 25: Ergebnisse des KO mittels Elektroporation des CRISPR/Cas9-Systems in Jurkat- Zellen, gefärbt mit Anti-CD3.	52
Tabelle 26: Ergebnisse des KO mittels Elektroporation des CRISPR/Cas9-Systems in AdCAR-T-Zellen, gefärbt mit Anti-CD3.....	54
Tabelle 27: Auswertung des KO nach T7-Endonuklease I Assay bei Jurkat-Zellen.	56
Tabelle 28: Auswertung des KO nach T7-Endonuklease I Assay bei AdCAR-T-Zellen.....	57

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau eines T-Zell-Rezeptors (TCR)	10
Abbildung 2: Aufbau von CARs der ersten bis vierten Generation.....	13
Abbildung 3: Bindungsschema des AdCARs.	15
Abbildung 4: Schematische Darstellung des CRISPR/Cas9-Systems in Bakterien.	18
Abbildung 5: Übertragung des CRISPR/Cas9-Systems zur Anwendung an menschlichen Zellen.....	19
Abbildung 6: Exemplarische Darstellung der angewandten Gating-Strategie.....	37
Abbildung 7: Exemplarische Darstellung der Übertragung des Gatings auf die transfizierten Zellen.....	38
Abbildung 8: Exemplarische Auswertung von DNA-Banden nach Elektrophorese.	43
Abbildung 9: Bestimmung der Transfektionseffizienz von eGFP in HEK293-Zellen.	45
Abbildung 10: Gegenüberstellung der Transfektionsmethoden.....	47
Abbildung 11: Bestimmung der Transfektionseffizienz von RFP in Jurkat-Zellen.....	48
Abbildung 12: Färbung von TCRAb auf Jurkat-Zellen zehn Tage nach Transfektion.....	49
Abbildung 13: Färbung von CD3 auf Jurkat-Zellen zehn Tage nach Transfektion.....	52
Abbildung 14: Färbung von CD3 auf AdCAR-T-Zellen zehn Tage nach Transfektion.....	53
Abbildung 15: T7-Endonuklease-I-Assay der DNA von AdCAR-Jurkat mit und ohne KO von TCR-alpha.	55
Abbildung 16: T7-Endonuklease-I-Assay der DNA von AdCAR-T-Zellen mit und ohne KO von TCR-alpha.	56
Abbildung 17: T7-Endonuklease-I-Assay der DNA von AdCAR-Jurkat und AdCAR-T-Zellen mit und ohne KO von TCR-alpha. Initialbild vor Zusammenschnitt zur besseren Übersicht.	64

Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Amino-Actinomycin
AICD	activation-induced cell death
ALL	Akute lymphatische Leukämie
CaPO ₄	Calciumphosphat
CAR	chimeric antigen receptor
Cas9	CRISPR associated endonuclease
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
CRISPR	clustered regulary interspaced short palindromic repeats
CRS	cytokine release syndrome, cytokine release syndrome
CTLA4	zytotoxisches Lymphozytenantigen 4
FACS	fluorescence-activated cell sorting
fcut	cutting fraction
FSC	forward scatter
GvHR	Graft-versus-Host-Reaktion
HLA	Humanes Leukozytenantigen
IDLV	integrase-defizienter lentiviraler Vektor
Indels	Insertionen und Deletionen
KO	knock-out
NHEJ	non-homologous end joining, Non-homologous end joining
nrLAM-PCR	uneingeschränkte LAM-PCR
PAM	protospacer adjacent motif
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD-L1	programmed cell death ligand 1
PEI	Polyethylenimin
pre-crRNA	pre-CRISPR-RNA
RFP	Red Fluorescence Protein
sgRNA	single guide RNA
SIRS	systemic inflammatory response syndrom
SSC	side scatter
TALEN	transcription activator-like effector nucleases
TCR	T-Zell-Rezeptor, T-Zell-Rezeptor
TRAC	TCR-alpha-Kette
TRUCK	T cells redirected for universal cytokine killing
tru-gRNA	truncated gRNA
ZFN	Zinkfingernukleasen

1 Einleitung

In den letzten Jahrzehnten wurden viele neue Erkenntnisse im Bereich der Tumorbiologie erlangt und Therapien für Tumorerkrankungen entwickelt. Tumorzellen unterscheiden sich in einigen Faktoren und Fähigkeiten von normalen Körperzellen [1]. Unter anderem ist eine der „*Hallmarks of Cancer*“ das Umgehen einer Zerstörung durch Immunzellen [2]. Das Immunsystem selbst ist deshalb – trotz außergewöhnlicher Effizienz – nicht immer in der Lage, die Tumorzellen zu erkennen und/oder anzugreifen und zu zerstören [2, 3]. Neben den Tumorthérapien wie Operation, Strahlentherapie und Chemotherapie wurde die Immuntherapie in den letzten Jahren intensiv weiter entwickelt, um das Immunsystem zu unterstützen oder so zu modifizieren, dass Tumorzellen durch die körpereigenen Immunzellen erfolgreich angegriffen werden können [4]. Bisher wurden drei Hauptkategorien an Immuntherapien entwickelt. Erstens, die Immuncheckpoint-Inhibition, die sich durch das Auslösen einer wirksamen T-Zell-Antwort charakterisiert [4]; Zweitens, bi-spezifische Antikörper, die eine Verbindung zwischen Tumorzellen und zytotoxischen T-Zellen herstellen [5]; Drittens, die zellulären Immuntherapien, die mit Hilfe von modifizierten Immunzellen in der Krebstherapie angewandt werden [4].

a) Checkpoint-Inhibition

T-Lymphozyten spielen eine große Rolle in der Immuntherapie und somit auch in der Immunonkologie. Um eine überschießende Immunreaktion zu vermeiden, besitzen humane Zellen Mechanismen, deren Aufgabe es ist, die Immunreaktion zu regulieren, sogenannte Immuncheckpoints. Wenn T-Zellen mit ihren T-Zell-Rezeptoren (TCR) an Antigen-präsentierende MHC-Moleküle binden, werden ebenfalls Ko-Stimulationen anderer Rezeptoren (bspw. CD3) benötigt, um die T-Zelle zu aktivieren. Andere Ko-Stimulatoren wirken inhibitorisch, um eine ungewollte Aktivierung zu verhindern und somit zu vermeiden, dass körpereigene gesunde Zellen ungewollt angegriffen werden. Die wichtigsten Vertreter dieser inhibitorischen Checkpoints sind das zytotoxische T-Lymphozytenantigen 4 (CTLA4) und der *programmed cell death ligand 1* (PD-L1). Diese Checkpoints kommen ebenfalls auf Tumorzellen vor. Durch eine Inhibition (Blockierung) dieser Checkpoints bekommt die T-Zelle keine Signale mehr, inaktiv zu bleiben und kann die Tumorzelle nach Bindung des TCRs angreifen [4]. Einer der häufig angewandten Immuncheckpoint-Inhibitoren ist das Pembrolizumab: Ein Antikörper, der an PD-L1 bindet und somit die Funktion von PD-L1 unterbindet. Pembrolizumab wurde mittlerweile für viele solide Tumoren zugelassen [6].

b) Bi-spezifische Antikörper

Alternativ zu den Checkpoint-Inhibitoren werden in der Immunonkologie auch bi-spezifische Antikörper zur Therapie verwendet. Bi-spezifische Antikörper sind eine Kombination aus zwei verbundenen Antikörpern, deren variable Teile gegen verschiedene Antigene (bzw. Epitope zweier verschiedener Antigene) gerichtet sind, um eine Verbindung zwischen Tumorzelle und zytotoxischer Zelle herzustellen. Somit sollen Immunzellen die Tumorzellen erkennen und angreifen können [5]. Bisher sind diverse bi-spezifische Antikörper für die Tumorthapie zugelassen. Beispielweise wird Blinatumomab, ein bispezifischer Antikörper gegen CD19-positive Blasten, bei einer therapierefraktären akuten lymphoblastischen Leukämie angewandt [7].

c) Zelluläre Immuntherapien

Anders als die eben genannten Immuntherapien, die mittels Blockaden von Rezeptoren oder Addition von Antikörpern arbeiten, werden in den zellulären Immuntherapien die bereits vorhandenen Immunzellen selbst modifiziert, um eine erfolgreiche Tumorthapie zu erreichen. Zu den zellulären Immuntherapien gehören tumorinfiltrierende T-Lymphozyten, engineered T-Zellrezeptoren, natürliche Killerzellen und Chimäre Antigen-Rezeptor- (*engl. chimeric antigen receptor* = CAR) T-Zellen.

Die zellulären Immuntherapien adressieren folgendes Problem: Natürlich vorkommende T-Zellen erkennen Tumorzellen und besitzen die Fähigkeit diese anzugreifen. Jedoch ist eine erfolgreiche T-Zell-Aktivierung und deren Aufrechterhaltung notwendig. Ein klinischer Ansatz hierbei ist es, natürlich vorkommende, bereits in Tumorgewebe infiltrierte T-Zellen (*tumorinfiltrierende T-Lymphozyten*, TIL) zu extrahieren, aktivieren und expandieren. Anschließend werden diese wieder in die Patienten zurückgegeben. Somit können die aktivierten und expandierten T-Zellen den Tumor angreifen [8].

Nicht in jedem Patienten kommen T-Zellen vor, die bereits die Fähigkeit haben Tumorgewebe angreifen können. Dies kann verschiedene Gründe haben. Zum einen ist es möglich, dass diese T-Zellen nicht aktiviert oder expandiert werden können. Dies führt dazu, dass eine ausreichende Menge aktiver T-Zellen nicht aufrechterhalten werden kann, die den Tumor erkennen und angreifen können. Ein Ansatz dieses Problem zu überwinden ist es, die T-Zellen mit einem neuen T-Zell-Rezeptor (TCR), dem *engineered T-Zellrezeptor* auszustatten, der den T-Zellen erlaubt, die spezifischen Tumorantigene zu erkennen und anzugreifen.

Der molekulare Mechanismus, der der Entwicklung von CAR-T-Zellen zugrunde liegt, ist wie folgt. Auf der Oberfläche von allen T-Zellen werden TCRs exprimiert, an denen ein CD3-Molekül gekoppelt ist. Verbunden mit diesem CD3-Rezeptor binden T-Zellen an die präsentierten Antigene im MHC-Komplex. Während durch den MHC-II-Komplex präsentierte Antigene über die CD4-Moleküle an den TCR von CD4⁺-Zellen (T_H-Zellen) gebunden werden, binden durch den MHC-I-Komplex präsentierte Antigene über die CD8-Moleküle von CD8⁺-Zellen (CTL) [9]. Die Bindung des TCR an den MHC-II-Komplex und das entsprechend gebundene Antigen aktiviert die T-Zelle. Hierauf können intrazelluläre Proteinkinasen an die intrazelluläre Domäne des TCR binden und beginnen mit der Phosphorylierung nachgeschalteter Proteine. Dies führt zu einer intrazellulären Signalkaskade. Die Kaskade führt zu einer vermehrten Transkription, vermehrten Expression von Rezeptoren und Freisetzung von Zytokinen. Zum anderen führt die Signalkaskade zur Mitose wirkt somit als Anregung zur Zellproliferation [10]. Aufgebaut ist der TCR aus entweder einer α - und β -Kette, oder einer γ - und δ -Kette, die jeweils aus einem variablen und einem konstanten Teil bestehen [11, 12] (Abbildung 1). Diese stellen den extrazellulären Teil des Rezeptors dar. Anbindend an die konstanten Teile der Ketten, liegt eine Transmembrandomäne, die mit einer intrazellulär liegenden ζ -Kette verbunden ist. Assoziiert danebenliegend befinden sich transmembranär die CD3-Moleküle. Diese bilden mit dem TCR den TCR-CD3-Komplex [11, 13].

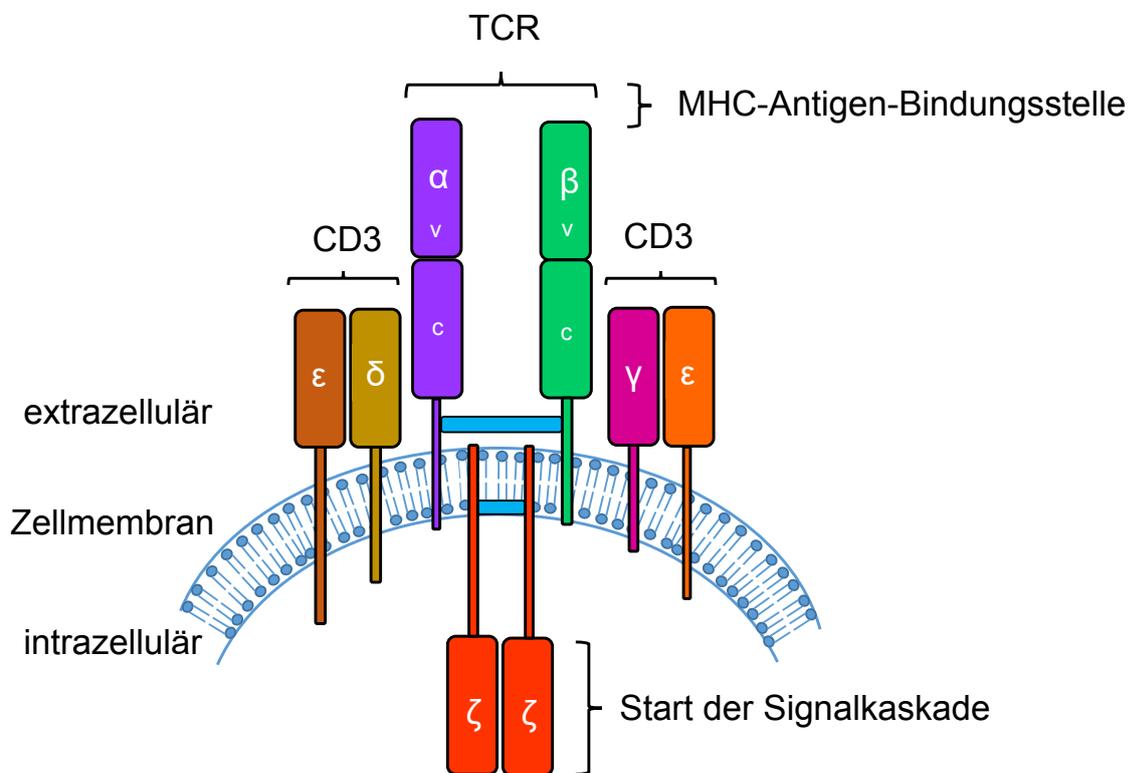


Abbildung 1: Aufbau eines T-Zell-Rezeptors (TCR)

Illustration der Bausteine eines endogenen TCR. Extrazellulär liegen α - und β -Ketten mit ihrem variablen Anteil (v) für die MHC-Antigen-Bindung und ihrem konstanten Anteil (c). Die α - und β -Ketten sind extrazellulär über Disulfidbrücken (blau)

verbunden. Im Gegensatz dazu sind die intrazellulären ζ -Ketten innerhalb der Zellmembran über eine Disulfidbrücke verbunden. Die ζ -Ketten sind für die intrazelluläre Weiterleitung der externen Signale verantwortlich. Neben den verschiedenen Ketten werden auch CD3-Moleküle mit dem TCR assoziiert. (Adaptiert aus Hauth, F., et al. [14]).

Eine Alternative zu den T-Zellen mit spezifischen TCRs, die Tumorantigene erkennen können, stellen *natürlichen Killerzellen* (NK-Zellen) dar. Der Ansatz, die NK-Zellen in die Immunonkologie zu integrieren z.B. mittels einer CAR-NK-Zell-Strategie, ist eine der neuesten und neben den CAR-T-Zellen vielversprechendsten Alternativen.

Die oben genannten tumorinfiltrierenden T-Zellen und hergestellten T-Zell-Rezeptoren sind zwar vielversprechend, haben jedoch Limitationen: -Eine wesentliche Limitation von Therapien basierend auf adoptiven T-Zell-Transfer ist die MHC-Restriktion, der die Aktivierung von T-Zellen unterliegen. Dies bedeutet, dass eine Aktivierung des endogenen T-Zell-Rezeptors nur dann erfolgt, wenn neben dem zelleigenen TCR-CD3-Rezeptorkomplex eine zusätzliche Bindung zwischen dem CD4- bzw. CD8-Molekül und dem MHC-Molekül der antigenpräsentierenden bzw. infizierten/Tumor-Zelle vorliegt [12]. Somit sind T-Zellen in der Lage, nur Antigene, die auf MHC-Molekülen präsentiert werden, zu erkennen. Regulieren Tumorzellen ihre MHC-Moleküle herunter, können sie von T-Zellen nicht bekämpft werden. Des Weiteren ist die Lebensdauer von T-Zellen *in vivo* nicht regulierbar, was für eine gezielte Therapie hinderlich ist.

Zu den Vorteilen der T-Zellen gehören zum einen eine hohe Effizienz, vorausgesetzt eine TCR-Antigen-Bindung findet statt. Weiterhin sind sie in der Lage zu proliferieren und Gedächtniszellen zu bilden – was bei einer weiteren Immunreaktion die Effizienz steigert und in der Krebstherapie zu Langzeiteffekten führen könnte. Vor diesem Hintergrund wurde in der Leukämieforschung eine Möglichkeit gesucht, um die genannten Limitationen zu umgehen ohne die oben beschriebenen Vorteile einer T-Zell-Therapie zu verlieren. Ein Ansatzpunkt war die Verbindung von T-Zellen mit Antikörpern. Die Vorteile der Antikörper sind zum einen die Fähigkeit, eine Bindung einzugehen, sobald sie ihr Epitop an der Zielzelle erkennen. Weiterhin sind sie durch eine gute Steuerbarkeit gekennzeichnet, da sie nach Applikation (bei Immuntherapien) nur eine gewisse Zeit im Körper präsent sind. Außerdem haben sie ein geringeres Risiko für generalisierte Entzündungsreaktionen (*engl. Systemic inflammatory response syndrom =SIRS*), wie bei T-Zellen [15, 16]. Leider besitzen Antikörper keine eigene Effektorfunktion um ihre Zielzellen anzugreifen. Es wird stets zusätzlich das Komplementsystem und/oder eine T-Zelle benötigt.

Gegenübergestellt besitzen die T-Zellen zwar eine Effektorfunktion, unterliegen jedoch der MHC-Restriktion und können ihre Effektorfunktion nicht so effektiv ausüben. Da die Proliferation der T-Zellen im Blut schlecht gesteuert werden kann, ist eine Kontrolle der Immunreaktion ebenfalls schwierig. Ein großer Nachteil ist ebenfalls das Risiko eines SIRS. Die Vorteile von Antikörpern und T-Zellen zu verbinden führte zu der Entwicklung der CAR-T-Zellen [17].

Ein CAR besteht aus einer Polypeptidkette mit einer extrazellulären Domäne, der Ektodomäne (Abbildung 2a). Die Struktur wird aus den leichten und schweren Ketten des variablen Anteils von Antikörpern hergeleitet. Der intrazelluläre Anteil, die Endodomäne, ist der Effektor-Anteil des CARs, der die Signalkaskade initiiert und in der ersten Generation der CARs aus der ζ -Kette eines TCR besteht (Abbildung 2a). Um die Effizienz und T-Zell-Persistenz zu verbessern, wurde in den CARs der zweiten Generation eine intrazelluläre co-stimulatorische Domäne hinzugefügt [17-20] (Abbildung 2b). In der dritten Generation wurde in der Endodomäne des CARs eine zweite co-stimulatorische Domäne eingebaut, um die Immunantwort weiter zu verbessern (Abbildung 2c).

Die ersten Generationen der CARs zeigten große Erfolge in der Behandlung von CD19⁺ Leukämien wie der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) [21], sowie der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) [20, 22]. Jedoch unterlag auch die dritte Generation der CARs weiteren Limitationen wie bspw. eine Resistenz der Tumorzellen gegenüber dem zytologischen Angriff der CARs [18]. Weiterhin erhöht sich bei fortschreitender Erkrankung die Variabilität des Phänotyps der Tumorzellen, sodass eine zunehmende Zellzahl weniger oder keine Antigene mehr exprimieren, gegen die die CARs gerichtet waren [18]. Ein Ansatz diese Beschränkungen zu überwinden, wurde mit den CARs der vierten Generation entwickelt (Abbildung 2d). Diese bestehen aus CARs mit einer CAR-induzierten Freisetzung von Zytokinen, um Zelltod zu erreichen (engl. T cells redirected for universal cytokine killing = TRUCK). Nachdem diese CARs an ihre spezifischen Antigene an der Tumorzelle gebunden haben, setzen sie Zytokine wie bspw. IL-12 frei und vermitteln somit eine inflammatorische Immunreaktion durch das unspezifische Immunsystem, das nicht von Tumorantigenen abhängig ist. Somit kann eine kombinierte Immunreaktion durch die CAR-T-Zellen und das unspezifische Immunsystem (bspw. NK) erreicht werden [18, 23, 24].

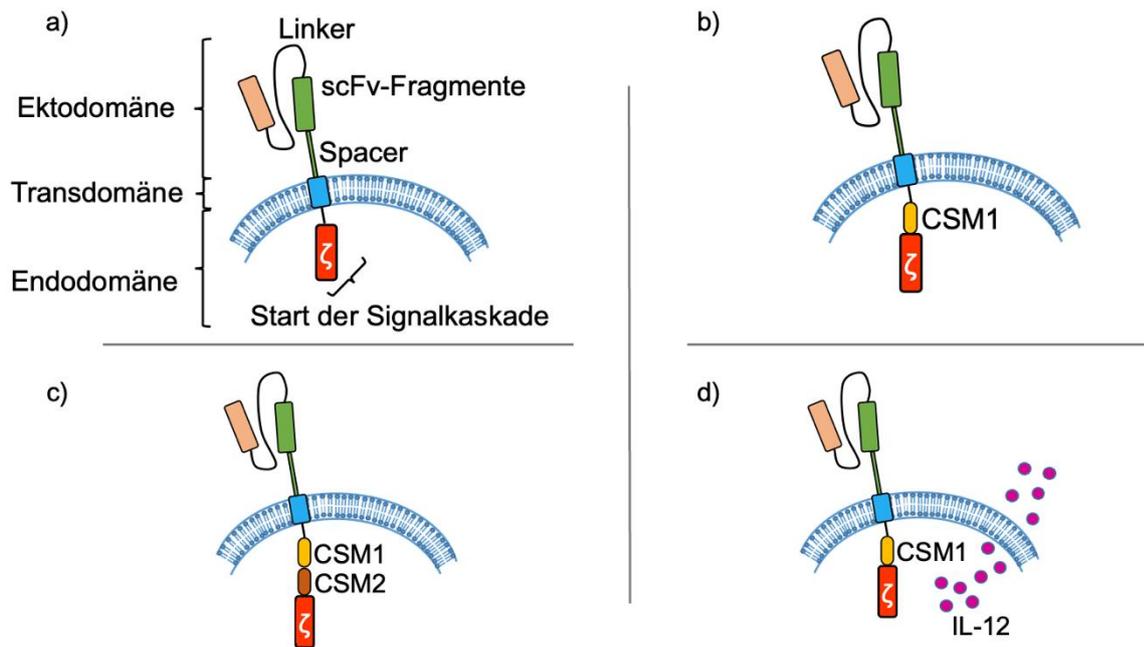


Abbildung 2: Aufbau von CARs der ersten bis vierten Generation.

Illustration des Aufbaus von CARs mit der Ektodomäne, bestehend aus variablen Anteilen von Antikörpern (scFV-Fragmente), einer Transdomäne für die Verbindung zur intrazellulären Endodomäne, die im CAR der ersten Generation aus der CD3- ζ -Kette eines TCR stammt (a). Im CAR der zweiten Generation enthält die Endodomäne eine co-stimulierende Domäne (b). Der CAR der dritten Generation enthält zusätzlich zur CD3- ζ -Kette zwei weitere co-stimulierende Domänen (c). In der Endodomäne des CARs der vierten Generation, den TRUCKS, befinden sich im Vergleich zur zweiten Generation, induzierbare Zytokine (IL-12), die nach Bindung des CARs an das passende Antigen der Tumorzelle, in das Stroma ausgeschüttet werden können (d).

(Adaptiert aus Hauth et al. [14]).

Die CAR-T-Zell-Therapie ist mittlerweile eine klinisch etablierte Therapie. Zum Beispiel beim therapierefraktären B-Zell-Lymphom sind von der Europäischen Zulassungsbehörde (EMA) die beiden Produkte Axicabtagen-Ciloleucel und Tisagenlecleucel zugelassen [25, 26]. In den Zulassungsstudien wurden 101 Patienten mit therapierefraktärem mediastinalem B-Zell-Lymphom, follikulärem Lymphom oder diffus großzelligem B-Zell-Lymphom bzw. 28 Patienten mit diffus großzelligem B-Zell-Lymphom oder follikulärem Lymphom mit anti-CD19 CAR-T-Zellen behandelt. Es ergab sich eine Ansprechrate von 82% bzw. 64% und eine Komplettremissions-Rate von 40% bzw. 43%. Das Gesamtüberleben lag bei 52% nach 18 Monaten, bzw. bei 50% nach 5 Jahren. Zu den häufigsten Nebenwirkungen zählten Neutropenie, Anämie und Thrombozytopenie. Seltene Nebenwirkungen waren das Zytokinfreisetzungssyndrom (engl. cytokine release syndrome = CRS), neurologische Ereignisse wie Enzephalopathie oder tödliche Ausgänge (n=3, bzw. n=1) [25, 26]. Aktuell wird eine Vielzahl von klinischen Studien in weiteren Indikationen, einschließlich solider Tumoren, durchgeführt. Es wurden vor allem die Anwendung von CAR-T-Zellen an soliden Tumoren des Gastrointestinaltraktes, Gehirns und der Lunge untersucht, die jedoch alle ein geringes Ansprechen aufwiesen [27].

Limitationen der CAR-T-Zell-Therapie

Die Limitationen der CARs bestehen in den oben genannten Nebenwirkungen, der CAR-Aktivität und deren Steuerung. Einmal in den Körper infundiert, reagieren die CAR-T-Zellen, sobald sie auf ihr passendes Antigen auf der Zieltumorzelle treffen, unkontrolliert und sind aktiv so lange deren passende Antigene im Körper vorhanden sind. Eine Steuerung der Aktivität ist mit den herkömmlichen CARs nicht möglich. Somit kann es zu schwerwiegenden inflammatorischen Reaktionen kommen, wie bspw. einer massiven Ausschüttung von Zytokinen, dem Zytokin-Freisetzungssyndrom (engl. cytokine release syndrome = CRS), das unter anderem zu erhöhter Neurotoxizität führen kann [28]. Ferner besteht das Risiko eines Angriffes gesunder Körperzellen, die zufällig auch das passende Antigen exprimieren. Dies führt zu einer „On-Target-, Off-Tumor“-Toxizität und kann lebensbedrohliche Nebenwirkungen auslösen [29]. Um diese Nebenwirkungen zu verhindern, wurde in den letzten Jahren verschiedene Strategien verfolgt. Zum Beispiel mit ON-Switch-CARs, die sowohl ein passendes Antigen, als auch ein Aktivierungsmolekül benötigen um ihre Funktion aufzunehmen [30]. Ein weiterer Lösungsansatz besteht aus den Adapter-CARs (AdCAR) [31]. Die Besonderheit hierbei besteht darin, dass die scFv-Fragmente der Ektodomäne nicht spezifisch gegen ein Epitop eines Antigens auf einer Tumorzelle gerichtet sind, sondern gegen ein Biotinlabel, welches an einen Linker gekoppelt ist (Abbildung 3). Um eine therapeutische Funktion zu erreichen ist ein Adaptermolekül notwendig. Hierbei besteht der Adapter aus einem monoklonalen Antikörper, der selbst gegen die Antigene auf den Tumorzellen gerichtet ist. In seinem konstanten Abschnitt (Fc-Fragment) exprimiert der Antikörper ein Linker-gekoppeltes Biotin, welches wiederum als Epitop für den CAR fungiert. Appliziert man nun AdCAR-T-Zellen einem Patienten, sind diese zunächst funktionslos. Um ihre therapeutische Funktion aufzunehmen ist es notwendig, die oben genannten Antikörper zu applizieren. Diese binden dann spezifisch an die Tumorzellen, woraufhin die AdCAR-T-Zellen an deren Biotin-Marker binden und anschließend die Zelle angreifen können (Abbildung 3) [32].

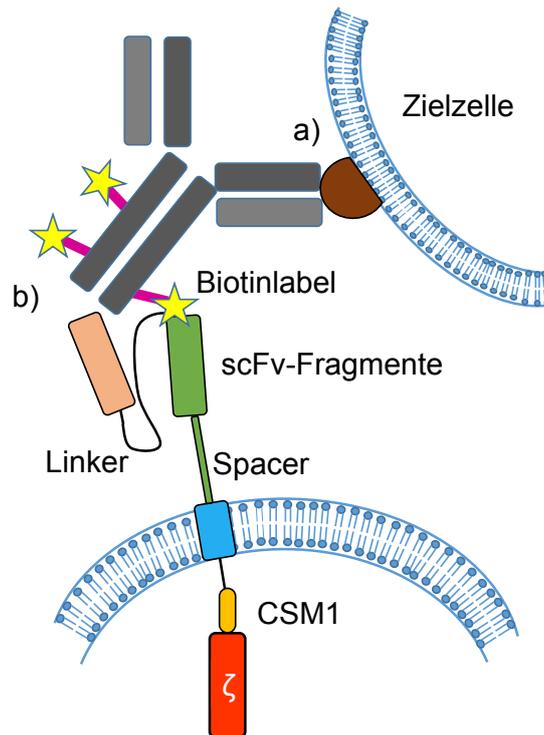


Abbildung 3: Bindungsschema des AdCARs.

Antikörper (grau) gerichtet gegen das Epitop des Tumorantigens (braun) binden an die Tumorzelle (a). Die AdCAR-T-Zelle bindet mit dem scFv-Fragment ihres AdCARs an das Linker (pink)-Biotinlabel (Stern)-Epitop am Fc-Abschnitt des Antikörpers (b). Hierdurch wird die Signalkaskade in der AdCAR-T-Zelle aktiviert und die Zielzelle angegriffen. (Adaptiert aus Seitz, C.M. et al. Novel adapter CAR-T cell technology for precisely controllable multiplex cancer targeting. *OncoImmunology* 10, 2003532 (2021) [31]).

Auf diese Weise kann zum einen die Aktivität der Immunreaktion durch Applikation von Antikörpern gesteuert werden, als auch Antikörper, die gegen unterschiedliche Epitope gerichtet sind, verwendet werden. Hierdurch können mit denselben AdCAR-T-Zellen multiple Antigene angegriffen und sogleich das Aktivitätsintervall kontrolliert werden [31]. Durch Titration der Adaptermoleküle als An-Schalter kann die Aktivität der AdCAR-T-Zellen zusätzlich kontrolliert werden. Der Aus-Schalter spiegelt sich in der Abwesenheit der Adaptermoleküle wieder [31]. Die AdCARs für diese Dissertation wurden von Dr. Christian Seitz et. al. produziert und zur Verfügung gestellt.

Eine weitere Limitation der CAR-T Zelltherapie ist die Beschränkung auf autologe Ansätze (ein:e Patient:in kann nur mit den eigenen T-Zellen behandelt werden). Dies führt zu hohem Zeitaufwand und Kosten. Allogene Therapien, die potenziell diese Limitationen adressieren könnten, sind durch das Risiko einer Graft-versus-Host-Reaktion (GvHR) charakterisiert. Die GvHR oder auch umgekehrte Abstoßungsreaktion genannt, kann nach bspw. allogenen Stammzelltransplantationen auftreten. Die Abstoßungsreaktion wird dabei durch ein Mismatch der humanen Leukozytenantigens (HLA) zwischen Spender und Empfänger verursacht, [33,

34]. Die transplantierten T-Lymphozyten attackieren den Empfängerorganismus als Fremdkörper greifen z.B. Epithelzellen von Leber, Darm oder Haut an [35]. Erstlinientherapien gegen diese GvHR mit Methylprednisolon oder Prednison zeigen Ansprechraten von nur ca. 30%. Alternative Zweitlinientherapien wie z.B. extrakorporale Photopherese oder systemische Antikörpertherapien werden ebenfalls erwogen um die Immunreaktion der GvHR zu bremsen [36].

Bei der CAR-T-Zell-Therapie besteht ebenso das Risiko einer GvHR. Hierbei werden allogene T-Zellen, die sowohl einen CAR als auch einen endogenen TCR auf der Oberfläche exprimieren, zur Tumorthherapie in einen Patienten infundiert [37]. Bei simultaner Präsentation von TCR-Antigenen und CAR-Antigenen ist unklar welche der Beiden Antigen-Rezeptor-Bindung dominiert. Weiterhin ist unklar, inwiefern die Antigen-TCR-Bindung die Antigen-CAR-Bindung beeinflusst. Weiterhin besteht das Risiko eines Aktivierungsinduzierten Zelltods (*engl. activation-induced cell death*) (AICD) – dem programmierten Zelltod nach Aktivierung der allogenen T-Zellen [38, 39]. Neben der gewünschten Wirkung des CARs – die Tumorzellen zu erkennen und anzugreifen – steht die unerwünschte Wirkung der allogenen T-Zell-Reaktion gegen normales Gewebe wie bspw. die GvHR.

Um eine GvHR zu verhindern, findet sich ein möglicher Lösungsansatz in der Genomik. Durch Ausschalten bestimmter Gene (*engl. knock-out* = KO) ist es möglich, Gene von Immunzellen in einer Weise zu modifizieren, dass bestimmte Proteine nicht mehr auf der Zelloberfläche exprimiert werden können. Hierzu gehören z.B. Proteine des endogenen TCRs, der unter anderem für die GvHR verantwortlich ist [37]. In den letzten Jahren wurden verschiedene Methoden zur Gentherapie verwendet. Die Anfänge der Gentherapie zeichneten die Zinkfingernukleasen (ZFN) [40] und Transkriptionsaktivator-artige Effektor-nukleasen (*engl. transcription activator-like effector nucleases* = TALEN) [41]. Aktuell ist eine vielversprechende Methodik der Gentherapie das System der clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) und CRISPR-associated Endonuklease (Cas9). CRISPR sind sich wiederholende Palindrome von DNA-Basen, die in Prokaryoten wie z.B. *Streptococcus pyogenes* vorkommen und genutzt werden um eine adaptive Immunantwort auf Viren zu erzielen [42]. Infiziert ein Virus ein solches Bakterium, integriert es seine Virus-DNA in die variablen Genabschnitten zwischen den CRISPR (Spacer) (Abbildung 4a). Die Bakterien sind in der Lage anhand dieser CRISPR durch Transkription eine pre-CRISPR-RNA (pre-crRNA) herzustellen, die komplementären Basen zu den CRISPR und der integrierten Virus-

DNA enthält (Abbildung 4b). Die Bakterien enthalten ebenfalls die Nuklease Cas9 und tracrRNA. Die tracrRNA sind komplementär zu den CRISPR-Abschnitten in der pre-crRNA und können hier binden. Im Anschluss schneidet eine RNase III die RNA- Bindungen in Stränge (Abbildung 4c). Somit erhält die Bakterie zu jedem Spacer und Repeat einen Komplex aus pre-crRNA, tracrRNA und Cas9 (Abbildung 4d). Der Komplex erkennt nun die komplementären DNA-Abschnitte und bindet dort. Erkennt der Komplex ein protospacer adjacent motif (PAM), eine Erkennungssequenz für die Cas9, führt die Cas9 hier einen Doppelstrangbruch durch (Abbildung 4e) [42].

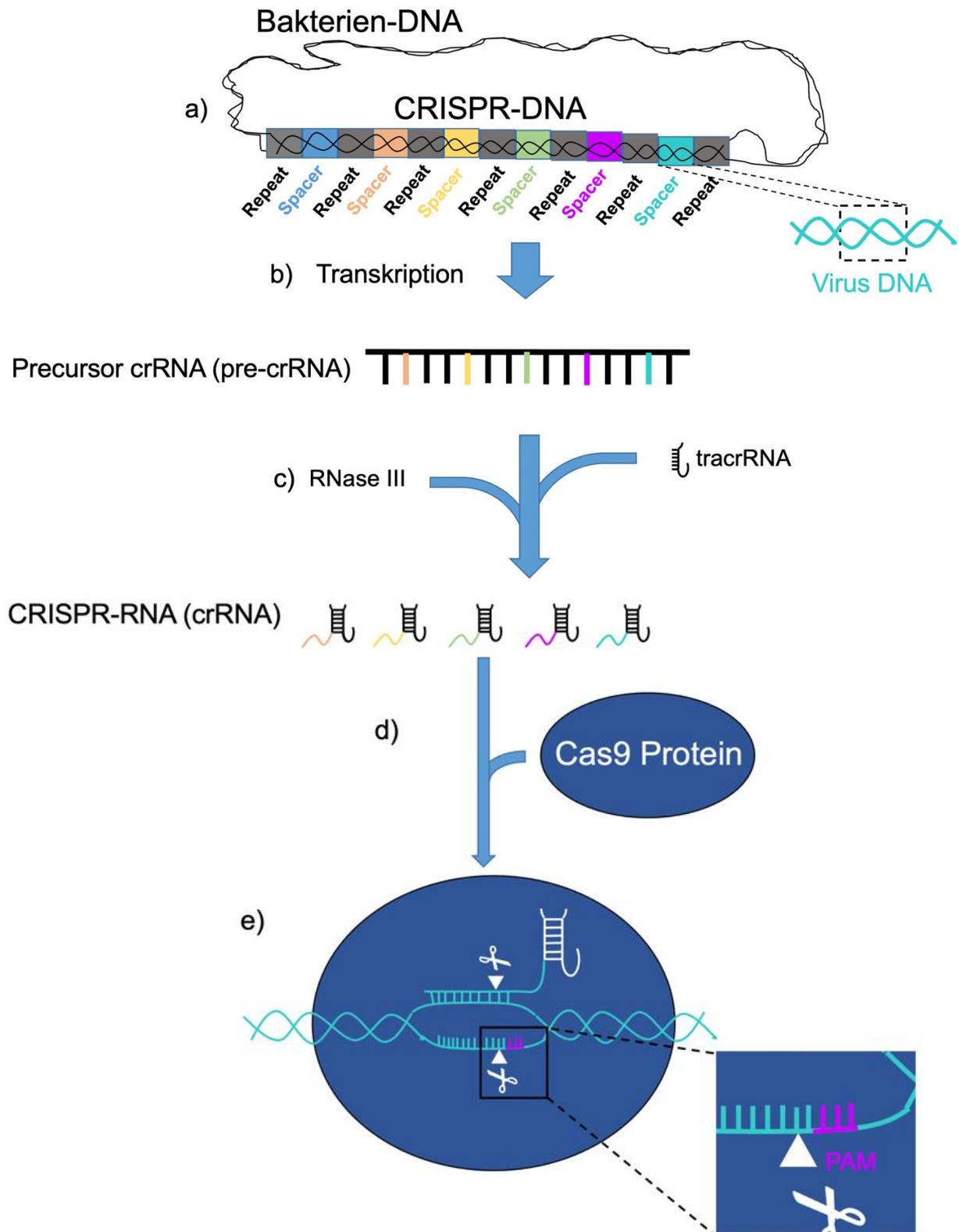


Abbildung 4: Schematische Darstellung des CRISPR/Cas9-Systems in Bakterien.

Abschnitte der Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) in der DNA. Dazwischen befinden sich Spacer (a) in dem sich in einem eine Virus-DNA integriert hat. Eine Precursor CRISPR-RNA (pre-crRNA) wird durch Transkription erstellt (b). Anschließend lagern sich tracrRNA an ihre komplementären Spacer-Repeat-Stränge, die dann durch die RNase III in einzelne crRNAs geschnitten wird (c). Die passende crRNA bindet zusammen mit einem Cas9-Protein an die komplementäre Stelle der DNA, an der sich die Virus-DNA lokalisiert. Die Cas9 schneidet an der gebundenen Stelle ein paar Basen vor der protospacer adjacent motif (PAM) und erzeugt einen Doppelstrangbruch (e).

Das CRISPR/Cas9-System lässt sich auf Eukaryoten übertragen. Durch einen Linker werden die crRNA und tracrRNA verbunden und bilden eine single guide RNA (sgRNA). Wird diese komplementär zu einer Zielsequenz in der menschlichen DNA synthetisiert, kann sie anschließend gemeinsam mit einem Cas9-Protein in menschliche Zellen eingeschleust werden. So kann das System auch bei menschlicher DNA in Zellen einen Doppelstrangbruch verursachen (Abbildung 5) [42].

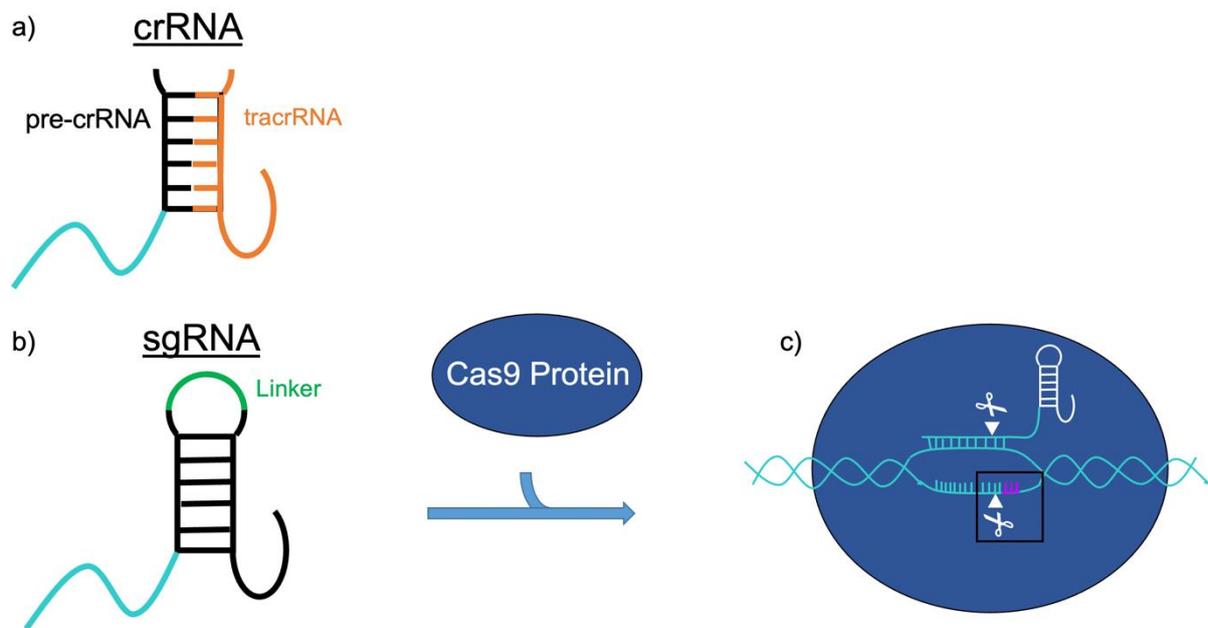


Abbildung 5: Übertragung des CRISPR/Cas9-Systems zur Anwendung an menschlichen Zellen.

Im Vergleich zu bakterieller crRNA, die aus einem Teil der pre-crRNA und einer tracrRNA besteht (a), lässt sich durch Hinzufügen eines Linkers (grün) im Labor eine single guide RNA (sgRNA) synthetisieren (b), die zusammen mit einem Cas9-Protein (alternativ einer mRNA, die für das Cas9-Protein codiert) in eine menschliche Zelle transfizieren. Hier schneidet die Cas9 an entsprechender Stelle (c).

Nach Bildung der Doppelstrangbrüche verbinden zelleigene Reparaturenzyme die DNA durch non-homologous end joining (NHEJ). Da hierdurch Insertionen und Deletionen (Indels) entstehen, besitzt das Gen in diesem Bereich nicht mehr seine ursprüngliche Funktion und ist in den meisten Fällen funktionslos. Ein Protein, das in diesem Gen codiert war, kann nun nicht mehr synthetisiert werden. [43]. Durch Anwendung dieser Methode kann mit einer sgRNA, die komplementär zu einer Basensequenz im Bereich des Gens, das für die Alpha-Kette des endogenen TCR codiert, dort ein Doppelstrangbruch erzeugt werden, um das Gen somit auszuschalten [37].

Die oben beschriebene Methode des CRISPR/Cas9-Systems wurde in dieser Arbeit verwendet, um AdCAR-T-Zellen zu entwickeln, bei denen ein KO des endogenen TCR vorliegt. So soll versucht werden die oben genannten Limitationen, insbesondere das Auftreten einer GvHR, zu umgehen. Grundlage hierfür ist die Publikation von *Jensen et. al* [37], in der mittels Elektroporation von sgRNA und Cas9-Protein in Jurkat- & CAR-T-Zellen eingeschleust und

somit KOs in CAR-T-Zellen erreicht wurden. In dieser Arbeit wurde der KO in AdCAR-T-Zellen durchgeführt [31] um AdCAR-T-Zellen ohne endogenen TCR zu erhalten. Auf Grundlage dieser Arbeit soll eine Universalität der T-Zell-Therapie etabliert und die patientenspezifische Therapie erweitert werden.

Fragestellung und Ziele

Neben anderen Therapieansätzen gehören CAR-T-Zellen zu den großen Hoffnungsträgern zellbasierter Krebstherapien. Obwohl in den vergangenen Jahren bereits viele Fortschritte zur Verbesserung der Anwendbarkeit und therapeutischen Effizienz von CAR-T-Zellen erzielt wurden, bestehen weiterhin noch viele Limitationen. Diese schränken sowohl die Einsatzfähigkeit als auch die Integration in der klinischen Routine ein. Dabei stellt vor allem die eingeschränkte Transfektionseffizienz von CARs ein entscheidendes Hindernis in der Herstellung therapeutischer CAR-T-Zellen dar. Außerdem ist die CAR-T Zelltherapie aktuell noch darauf angewiesen, patientenspezifische (autologe) T-Zellen zu gewinnen, die anschließend transfiziert werden können. Hintergrund hierzu stellt das Risiko einer GvHR und deren schwerwiegenden Verlaufs dar, wenn patientenfremde (allogene) CAR-T-Zellen zur Therapie verwendet werden.

Daraus wurden für die vorliegende Arbeit zwei Fragestellungen und Ziele abgeleitet:

1. Es sollen vergleichende Analysen zur Optimierung der etablierten Transfektionsmethoden für die Herstellung von CAR-T-Zellen durchgeführt werden. Zentraler Bestandteil war dabei die Herstellung von lentiviralen CAR-Expressionsvektoren in HEK293T-Zellen.
2. Optimierung der Anwendungsmöglichkeiten von CAR-T-Zellen durch CRISPR/Cas9 KO des endogenen TCR, um das Risiko einer GvHR zu reduzieren.

2 Materialien und Methoden

Aktenzeichen des Ethikvotums: 761/2015BO2

2.1 Materialien

Tabelle 1: Geräte

Geräte	Hersteller
Easypet	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Pipetten (0,1-2,5 µl; 0,5-10µl; 2-20 µl; 10-100 µl; 20-200 µl; 100-1000 µl)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Neubauer Zählkammer	Hecht-Assistent (Sondheim von der Röhn, Deutschland)
Wasserbad	Memmert (Schwabach, Deutschland)
Vortex Mixer PV-1	Grant Instruments (Cambridge, Vereinigtes Königreich)
Zentrifuge 5430 R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge Megafuge 16R	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
Vortex Mixer (Vortex-Genie-2)	Scientific Industries (Bohemia, NY, USA)
Minizentrifuge Sprout	Biozym (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
Invers Mikroskop (Wilovert Standard HF 20)	Hund (Wetzlar, Deutschland)
Zellzähler (Countess)	Invitrogen (Waltham, MA, USA)
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank Typ BDK	Faust (Klettgau, Deutschland)
CO ₂ -Inkubator (Heracell 150)	Marshall Scientific (Hampton, NH, USA)
Auoklav Systec VX-150	Systec (Linden, Deutschland)
Kühlschrank medline (-22 °C)	Liebherr (Bulle, Schweiz)
Kühlschrank medline (4 °C)	Liebherr (Bulle, Schweiz)
Ultratiefkühlschrank FORMA 900 Series (-80 °C)	Thermo scientific (Waltham, MA, USA)
NanoPhotometer TM Pearl, Denville®	Implen (München, Deutschland)
Flockeneisbereiter AF 80	Scotsman (Vernon Hills, IL, USA)
Transfection System (Neon®)	Invitrogen (Waltham, MA, USA)
Pipette Neon® Transfection System	Invitrogen (Waltham, MA, USA)

FACSCalibur	BD Bioscience (Franklin Lakes, NJ, USA)
Darkhood DH-50	Biostep (Houdan, Frankreich)

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Reaktionsgefäße Cellstar® Tubes (15 ml)	Greiner bio-one (Kremsmünster, Österreich)
Reaktionsgefäße Cellstar® Tubes (50ml)	Greiner bio-one (Kremsmünster, Österreich)
Reaktionsgefäße Eppendorf® Tubes (0,5 ml; 1,2 ml; 2 ml)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Einmalhandschuhe Peha-soft nitrile	Hartmann (Heidenheim, Deutschland)
Pipettenspitzen (10 µl)	Greiner bio-one (Kremsmünster, Österreich)
Pipettenspitzen (200 µl)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Pipettenspitzen (1000 µl)	Greiner bio-one (Kremsmünster, Österreich)
Stabpipetten Costar® (5 ml, 10 ml, 50 ml)	Corning (Corning, NY, USA)
Cryovials (mit Schraubverschluss)	Fisher scientific (Waltham, MA, USA)
Descosept AF Desinfektionsmittel	Dr. Schumacher
DNA Dekonaminationsreagenz	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Zellkulturplatten Costar™ (12-well)	Corning (Corning, NY, USA)
Zellkulturplatten Costar™ (6-well)	Corning (Corning, NY, USA)
Reaktionsgefäße Safe-Lock (0,5 ml; 1,5 ml)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Zellkulturflaschen (50 ml, 250 ml)	Greiner bio-one (Kremsmünster, Österreich)
Parafilm M	Bemis (Neenah, WI, USA)
Einmalspritzen Injekt® 10 ml	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Millipore Membranfilter 0,45 µm	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Rundbodenröhrchen 5 ml	BD Bioscience (Franklin Lakes, NJ, USA)

Tabelle 3: Zelllinien

Zelllinien	Hersteller
HEK293T	Zelllinie (gestellt von Dr. Patrick Schlegel)
Jurkat-Zellen	Zelllinie (gestellt von Dr. Patrick Schlegel)
T-Lymphozyten	Primärzellen aus Patienten

Tabelle 4: Reagenzien und Chemikalien

Reagenzien/Chemikalien	Hersteller
Ethanol 100%	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Penicillin-Streptomycin (10.000 U/mL)	ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Fötale Bovines Serum (FBS)	Merck Millipore (Burlington, MA, USA)
Lipofectamine® 2000	ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Lipofectamine® 3000	ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA)
P3000 Reagenz	ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Polyethylenimine, linear, average M_n 25,000 (PEI)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Trypanblau	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Trypsin-EDTA (0,25%)	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
Natriumbutyrat (500mM)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
LE Agarose	Biozym (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
Tris-Acetat-EDTA Puffer (TAE)	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)

Tabelle 5: Puffer und Lösungen

Puffer/Lösungen	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Opti-MEM, Reduced Serum Medium	ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA)
RPMI-1640 (L-Glutamin 1%; NaHCO ₃ 2,0 g/L)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

Tabelle 6: Kits

Kits	Hersteller
Neon® Transfection System 10 µl-Kit	Invitrogen (Waltham, MA, USA)
Neon® Transfection System 100 µl-Kit	Invitrogen (Waltham, MA, USA)

CalPhos™ Mammalian Transfection Kit	Clontech
-------------------------------------	----------

Tabelle 7: Plasmide und mRNA

Plasmide/mRNA	Transgen	Hersteller
pVAX.A120 eGFP	eGFP	Kloniert und bereit gestellt durch Dr. Patrick Schlegel und Dr. Christian Seitz
pCS2+_DsRED.T4 (modified)	DsRED	Clontech
DsRED mRNA CAP 0 (ARCA)	DsRED	Vaccinia
CleanCap Cas9 mRNA (modified)	Sp-Cas9	TriLink (San Diego, CA, USA)
Custom modified gRNA Sequenz (5'-): AAUCAAAAUCGGUGAAUGUUUUAGAGCUAGAAA UAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAA CUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC		TriLink (San Diego, CA, USA)

Tabelle 8: Primer

Primer	Sequenz
TRAC F	ATCACGAGCAGCTGGTTTCT [37]
TRAC R	CCCGTGTCATTCTCTGGACT [37]

Tabelle 9: Software

Software	Entwickler
ImageJ	Wayne Rasband
Graphpad Prism®	GraphPad Software
FlowJo™	BD Biosciences

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Zellen auftauen

Folgende Prozedur diente dazu, die für folgende Versuche benötigten HEK293-Zellen aus ihrer Kryokonservierung aufzutauen, die zur Aufbewahrung mit Stickstoff auf -196 °C eingefroren wurden [44, 45]. Die Jurkat- und CAR-T-Zellen waren bei Erhalt nicht eingefroren, sodass hier ein Auftauen nicht notwendig war. Zur Vorbereitung der HEK293-Zellen wurde das Medium (*engl. Duplecco's Modified Eagle Medium* = DMEM) mit 10% (*engl. fetal bovine serum* = FBS) und 3700 mg/L Bicarbonat (bereits im Serum enthalten) in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgewärmt und die Zellkulturbank desinfiziert. Pro Aufbewahrungsgefäß mit gefrorenen Zellen werden insgesamt 25 ml Medium benötigt. Zu Beginn wurden pro Aufbewahrungsgefäß 10 ml Medium in ein 15 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Anschließend tauten Zellen in ihren Kryoröhrchen für ein bis zwei Minuten schnell in einem 37 °C warmen Wasserbad auf. Anschließend erfolgte die Resuspendierung der Zellen und Überführung in die vorbereiteten Reaktionsgefäße mit 10 ml vorgewärmten Medium. Nach der anschließenden Zentrifugation der Zellen mit 200x g für 3 Minuten bei Raumtemperatur wurde der Überstand behutsam abgesaugt und das Zellpellet in 5 ml frischem Medium resuspendiert. Daraufhin erfolgte die Überführung der Zellsuspension in eine 75 cm² Zellkulturflasche die mit 10 ml Medium vorbereitet wurde und anschließender Inkubation über Nacht in einem Brutschrank bei 37 °C unter wassergesättigter 5% CO₂-Atmosphäre. Am nächsten Tag wurde 5 ml frisches Medium hinzugegeben und die Zellen täglich beobachtet.

Die bei dieser Arbeit genutzten Jurkat-Zellen und AdCAR-T-Zellen wurden von der Arbeitsgruppe Dr. Patrick Schlegel und Dr. Christian Seitz in laufender Kultur übernommen und weiter passagiert.

2.2.1.2 Zellen zählen und aussäen

Um adhärente Zellen in ihren Zellkulturflaschen für kleinere Versuche zu verwenden, wurden die Zellen wie im folgenden Prozedere behandelt. Zuerst erfolgte ein behutsames Absaugen des Mediums aus den Zellkulturflaschen, gefolgt von einer Spülung der Zellen mit 10 ml PBS. Anschließend wurde 2 ml Trypsin hinzugegeben, und 3 Minuten bei 37 °C inkubiert, um die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche zu lösen. Um die Trypsinreaktion zu stoppen erfolgte im nächsten Schritt die Addition von 5 ml DMEM +FBS (10%). Die Zellsuspension wurde anschließend in ein 15 ml Reaktionsgefäß gegeben und für 5 Minuten mit 1000 RPM zentrifugiert. Nach der Zentrifugation folgte ein erneutes Absaugen des Überstandes und

Addition von 13 ml PBS und einer anschließenden Resuspendierung. Von der Zellsuspension wurde 1 ml in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, um diese für die Zellzählung zu nutzen. Anschließend wurden 10 µl Zellsuspension und 10 µl Trypanblau gemischt und in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Gezählt wurden 2 x 4 Quadrate (je 1 mm x 1 mm x 0.1 mm = 0.1 µl). Das Zählergebnis wurde folgendermaßen berechnet: Mittelwerte x 2 (Trypanblau-Verdünnung) x 10.000 (Umrechnung in ml) x 13 (Menge in Reaktionsgefäß) = Zellzahl gesamt in 13 ml Zellsuspension

2.2.2 Transfektionstechniken

2.2.2.1 Calcium-Phosphat-Präzipitations-Kit und Calcium-Präzipitation

Hierbei wird eine übersättigte Lösung von Calciumphosphat durch Reaktion von Calciumchlorid und Natriumphosphat gebildet. Das dabei ausfallende Calciumphosphat bildet spontan mit der zu transfizierenden RNA einen Komplex. Die Zielzellen nehmen den Komplex aus Calciumphosphat (CaPO₄) und RNA durch Endozytose auf [46]. Die funktionellen Eigenschaften des Komplexes sind abhängig von Einflussfaktoren wie Konzentration von Calciumchlorid, Natriumphosphat und DNA bzw. RNA, sowie Temperatur, Inkubationszeit und pH-Wert [47]. Die Transfektion mittels CaPO₄ erfolgte einerseits mittels des CalPhos™ Mammalian Transfection Kits nach den Anweisungen des Herstellers (Tabelle 10).

Tabelle 10: Protokoll für die Transfektion mit CaPO₄-Kit

CaPO ₄ -Kit		
Schritt	Durchführung	
Vermischung	Lösung A: 33 µl CaCl ₂ 280 µl Aqua dest. 4 µl eGFP- Plasmid Lösung B: HBS 313 µl	Lösung B unter Vortexen langsam tropfenweise zu einem Reagenzglas mit Lösung A hinzugeben
Inkubation	Inkubieren für 10-15 min in 37 °C	
Aussaat	200 µl	Tropfenweise zu HEK293T-Zellen in je eine Well einer 6-Well-Plate hinzufügen
Inkubation	Inkubieren für 8 h oder über Nacht bei 37 °C in einem CO ₂ -Brutschrank	

Medienwechsel	Transfektionslösung abpipettieren
	200 µl Opti-MEM ersetzen
Inkubation	Für weitere 24-72 h bei 37 °C in einem CO ₂ -Brutschrank inkubieren
Analyse	Zellen bereit für die Analyse mittels Durchflusszytometrie

Zusätzlich dazu erfolgte eine separate Transfektion mit CaPO₄ wie von Chen, Y. beschrieben (Tabelle 11) [48].

Tabelle 11: Protokoll für die Transfektion mit CaPO₄

CaPO ₄	
Schritt	Durchführung
Vorbereitung:	2 M CaCl ₂ -Lösung in Wasser Steril filtrieren und bei Raumtemperatur lagern
	2x HBS-Puffer: <ul style="list-style-type: none"> • 50 mM HEPES • 280 mM NaCl • 1,5 mM Na₂HPO₄ pH mit HCl auf pH 7,0 titrieren und steril filtrieren. Lösung kann zur Lagerung maximal einmal eingefroren werden
Vermischung	Lösung 1: <ul style="list-style-type: none"> • 33 µl CaCl₂ • 280 µl Aqua dest • 4 µl eGFP-Plasmid Lösung 2: <ul style="list-style-type: none"> • 2x HBS-Puffer 313 µl Lösung 2 unter Vortexen langsam tropfenweise zu Lösung 1 im Reagenzglas hinzugeben
Inkubation	Inkubieren für 30 min in 37 °C
Aussaat	200 µl Tropfenweise zu HEK293T-Zellen in je eine Well einer 6-Well-Plate hinzufügen
Inkubation	Inkubieren für 8 h oder über Nacht
Medienwechsel	Transfektionslösung abpipettieren und mit 200 µl Opti-MEM ersetzen
Inkubation	Für weitere 24-72 h bei 37 °C in einem CO ₂ -Brutschrank inkubieren

Analyse	Zellen bereit für die Analyse mittels Durchflusszytometrie
----------------	--

2.2.2.2 Lipofectamine™2000 & Lipofectamine™3000

Transfektionen von Nukleinsäuren in Zellen mittels kationischer Lipide, auch Lipofektion genannt, gehört – als eine der chemischen Methoden für Gentransfers – zu einer weit verbreiteten und effizienten Technik. Hierbei interagieren anionische Nukleinsäuren mit den kationischen Lipiden, die sich um die Nukleinsäuren hüllen und einen Komplex bilden. Dieses als Lipoplex bezeichnetes Konstrukt kann anschließend an die Zellmembran der Zielzelle gebracht werden und durch Clathrin-vermittelte Endozytose in die Zielzelle aufgenommen werden [49, 50]. Anschließend werden die Nukleinsäuren intrazellulär freigesetzt [51]. Das erste Produkt – damals von Invitrogen™, heute Teil des Konzerns Thermo Fisher Scientific – mit den Eigenschaften dieser Technik, ist Lipofectamine™ 2000 [52]. Das Nachfolger Lipofectamine™ 3000 mit zusätzlichem Reagenz P3000™ wird ebenfalls zur Lipofektion verwendet. Dabei hebt der Hersteller die erhöhte Effektivität bei der Lipofektion von Lipofectamine™ 3000 gegenüber Lipofectamine™ 2000 hervor. Der Gentransfer mittels Lipofectamine™ 2000 wurde nach Anweisungen des Herstellers (Tabelle 12) mit HEK293T-Zellen durchgeführt, die am Tage zuvor in einer 6-Well-Platte ausgesät wurden.

Tabelle 12: Protokoll für die Transfektion mit Lipofectamine™ 2000

Lipofectamine™ 2000		
Schritt	Durchführung	
Vorbereitung	Lösung 1 (Plasmid): <ul style="list-style-type: none"> • Opti-MEM 250 µl • eGFP-Plasmid 4 µl 	In Reaktionsgefäß 1 (1,5 ml) pipettieren und 5 Minuten inkubieren
	Lösung 2 (Lipofectamine): <ul style="list-style-type: none"> • Opti-MEM 250 µl • Lipofectamine 10 µl 	In Reaktionsgefäß 2 (1,5 ml) pipettieren und 5 Minuten inkubieren
Vermischung	Lösung 2 tropfenweise unter Vortexen in Reaktionsgefäß 1 mit Lösung 1 pipettieren und mischen	
Inkubation	20 min bei Raumtemperatur inkubieren, um Lipofectamine einen Komplex mit dem Plasmid bilden zu lassen	

Aussaat	Lipofectamine-Plasmid-Komplex tropfenweise komplett zu HEK293T-Zellen in 6-Well-Platten pipettieren. Währenddessen die 6-Well-Platte behutsam hin und her rütteln
Inkubation	Für 8 h oder über Nacht bei 37 °C in einem CO ₂ -Brutschrank inkubieren
Analyse	Zellen bereit für die Analyse mittels Durchflusszytometrie

Bei der Verwendung von Lipofectamine™ 3000 wurde ebenfalls nach den Anweisungen des Herstellers (Tabelle 13) vorgegangen.

Tabelle 13: Protokoll für die Transfektion mit Lipofectamine™ 3000

Lipofectamine™ 3000		
Schritt	Durchführung	
Vorbereitung	Lösung 1 (Plasmid): <ul style="list-style-type: none"> • Opti-MEM 250 µl • P3000™ 10 µl • eGFP-Plasmid 8 µl 	In Reaktionsgefäß 1 (1,5 ml) pipettieren
	Lösung 2 (Lipo low): <ul style="list-style-type: none"> • Opti-MEM 125 µl • Lipofectamine 3,75 µl 	In Reaktionsgefäß 2 (1,5 ml) pipettieren
	Lösung 3 (Lipo high): <ul style="list-style-type: none"> • Opti-MEM 125 µl • Lipofectamine 7,5 µl 	In Reaktionsgefäß 3 (1,5 ml) pipettieren
Vermischung	Je 125 µl von Lösung 1 zu Lösung 2 bzw. 3 in Reaktionsgefäß 2 bzw. 3 hinzugeben	
Inkubation	Für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren	
Aussaat	Je 250 µl aus Reaktionsgefäß 2 bzw. 3 in je eine Well pipettieren. Währenddessen die 6-Well-Platten behutsam hin und her rütteln	
Inkubation	Für 8 h oder über Nacht bei 37 °C in einem CO ₂ -Brutschrank inkubieren	
Analyse	Zellen bereit für die Analyse mittels Durchflusszytometrie	

2.2.2.3 Polyethylenimin

Transfektionen mit Polyethylenimin (PEI) gehören zu den nichtviralen Gentransfersystemen, dessen Grundgerüst aus zwei Kohlenstoffatomen und einem Stickstoffatom besteht, aus denen positiv geladene, lineare oder verzweigte Polymere gebildet werden können. Bevorzugt genutzt, durch eine höhere Effektivität des Gentransfers, wird die verzweigte Form [53]. Da dieses Polymer eine positive Ladung besitzt, kann es somit eine Komplexbildung mit negativ

geladenen Nukleinsäuren eingehen, indem sich die Nukleinsäuren nicht wie bei Liposomen umschließen lassen, sondern unter Anwesenheit von PEI kondensieren [54]. Diese Polyplexe gelangen anschließend nicht nur durch Clathrin-vermittelte Endozytose nach intrazellulär, sondern ebenfalls durch Caveolae-vermittelte Endozytose [49, 50]. Bei der Transfektion unter Verwendung von PEI erfolgte der Versuchsablauf gemäß folgender Tabelle (Tabelle 14). Unter Berücksichtigung, dass das Ausmaß der DNA-Kondensation von der Relation zwischen DNA und PEI abhängig ist [55], wurde ein DNA-PEI-Verhältnis von 1:4 verwendet [56].

Tabelle 14: Protokoll für die Transfektion mit Polyethylenimin

Polyethylenimin (PEI)		
Schritt		Durchführung
Vorbereitung:	Lösung 1 (Plasmid):	In Reaktionsgefäß 1 (1,5 ml)
	<ul style="list-style-type: none"> • DMEM (ohne Zusätze) 196 µl • eGFP-Plasmid 4 µl 	pipettieren und kurz vortexen
Vermischen	Lösung 2 (PEI):	In Reaktionsgefäß 2 (1,5 ml)
	<ul style="list-style-type: none"> • DMEM (ohne Zusätze) 184 µl • PEI 16 µl 	pipettieren und kurz vortexen
	Lösung 1 aus Reaktionsgefäß 1 in zu Lösung 2 in Reaktionsgefäß 2 pipettieren und mischen	
Inkubation	Für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren	
Medienwechsel	DMEM ohne Zusätze durch DMEM mit Zusatz (10% FBS) ersetzen	
Aussaat	Je 400 µl des Reaktionsgemisches in eine Well pipettieren Nach 4 h 200 µl FBS hinzugeben	
Inkubation	Für 8 h oder über Nacht bei 37 °C in einem CO ₂ -Brutschrank inkubieren	
Analyse	Zellen bereit für die Auswertung mit einer Durchflusszytometrie	

2.2.2.4 Verbindungsschritt

Die oben genannten Transfektionsmethoden wurden anschließend verglichen, um die effizienteste Methode für HEK293T-Zellen zu evaluieren, um anschließend wie folgt AdCAR-T-Zellen herzustellen. Dies wurde von Dr. Christian Seitz et. al. durchgeführt. Zu Beginn erfolgte die Produktion von replikations-defekten lentiviralen Vektoren, die für AdCARs codierende mRNA enthalten. Hierbei wurden folgende Plasmide mittels Lipofectamine™ 3000

in HEK293T-Zellen transfiziert. Zum einen wurde für die benötigte Virushülle ein Envelope-Plasmid (VSV-G) transfiziert, zum anderen ein Transfervektorplasmid das den Code für die AdCARs enthält und zuletzt ein Packaging-Plasmid (gag/pol), das den lentiviralen Vektor zusammenstellt.

Der Produzierte Vektor wurde anschließend aufgereinigt und konnte seine enthaltene AdCAR-RNA in T-Lymphozyten mittels Elektroporation (siehe unten) transduzieren.

Die T-Lymphozyten, die später AdCARs auf ihrer Zellmembran exprimieren sollen, wurden durch eine Leukapherese und anschließender Aufreinigung von Patienten entnommen. In diese Zellen wurde die AdCAR-RNA in den lentiviralen Vektoren transduziert. Die RNA wurde in DNA reverse transkribiert und integrierte sich anschließend in die DNA der T-Lymphozyten. Somit enthält die T-Zelle den Code, um durch Proteinbiosynthese AdCARs zu produzieren und an der Zelloberfläche zu exprimieren.

2.2.2.5 Elektroporation

Eine Alternative zu den chemischen Verfahren des Gentransfers stellt die physikalische Methode der Elektroporation dar, bei der kein Transporter genutzt wird. Wird den Zellen ein elektrischer Impuls zugeführt, der je nach Zelltyp einen bestimmten Schwellenwert überschreitet, orientieren sich die Lipidmole temporär um und es entstehen kurzzeitig Poren in der Plasmamembran, durch die Moleküle in die Zelle aufgenommen werden können [57, 58]. Durch elektrische Impulse von 1,4 Volt mit drei Pulsen und einer Dauer von je 10 ms, wird eine deutlich erhöhte Aufnahme von DNA und RNA in T-Zellen, beziehungsweise mit drei Impulsen von 1,325 Volt und einer Dauer von 10 ms in Jurkat-Zellen erreicht. Dies wurde sich zu Nutze gemacht um RNA kodierend für Cas9 und die Guide-RNA für den KO in AdCAR T-Zellen beziehungsweise in Jurkat-Zellen zu transfizieren.

Im Folgenden wurde für die AdCAR-Jurkat-Zellen das Neon® electroporation transfection system 10 µl und 100 µl Kit verwendet und entsprechend dem Zelltyp nach Anweisung des Herstellers (Tabelle 15) verfahren. Zur Vorbereitung wurden AdCAR-Jurkat-Zellen in Kultur angezüchtet und nach einer Zellzählung jeweils 200 000 Zellen pro Well verwendet.

Tabelle 15: Protokoll für die Elektroporation von Jurkat-Zellen.

Elektroporation von Jurkat-Zellen	
Materialien:	Jurkat-Zellen mit AdCAR no. 10 RPMI 1640 Medium

- + 2,0 g/L NaHCO₃
- + L-Glutamin 1%
- + FBS 10%
- + Antibiotika (Penicillin, Streptomycin)
- PBS
- + CaCl₂
- + MgCl₂
- Cas9 mRNA (1000 ng/μl)
- sgRNA (5000 ng/μl)
- Neon electroporation transfection System 10 μl Kit
- Electrolytpuffer E
- Resuspensionspuffer R

Durchführung:

Zellen folgendermaßen in Reaktionsgefäße (1,5 ml) pipettieren

Reaktionsgefäße	Cells only	1 μg	3 μg	5 μg
Zellen	200 000	200 000	200 000	200 000
Cas9 mRNA	1 μg Cas9			
3 x waschen mit PBS (1 ml) und Überstand absaugen				
Puffer R	11 μl	10 μl	8 μl	6 μl
Cas9 mRNA	1 μl	1 μl	3 μl	5 μl
sgRNA		1 μl	1 μl	1 μl

Elektroporationstube mit 2 ml Puffer E2 befüllen

Mit der im Kit enthaltenen Pipette und jeweils der dazugehörigen 10 μl Pipettenspitze die Zellen aus dem Reaktionsgefäß entnehmen und in die dafür vorgesehene Vorrichtung des Neon Transfection Systems platzieren, die unten genannten Einstellungen vornehmen und anschließend die Elektroporation starten.

Einstellung der Elektroporationsparameter:

Volt	Pulslänge	Pulszahl	Pipettenspitze
1325	10 ms	3	10 μl

Nach sieben bis neun Tagen sind die Zellen bereit für die Auswertung mittels Durchflusszytometrie

Für die Elektroporation von AdCAR-T-Zellen wurden folgende Parameter gemäß ihrem Zelltyp aus den Angaben des Herstellers verwendet (Tabelle 16).

Die Cas9-mRNA und sgRNA wurde von TriLink bestellt und hergestellt. Die sgRNA wurde von *Jensen et. al.* adaptiert und mit folgender Sequenz genutzt [37]:

5'AAUCAAAAUCGGUGAAUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGG
CUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC.

Tabelle 16: Protokoll für die Elektroporation von AdCAR-T-Zellen.

Elektroporation von AdCAR T-Zellen		
Materialien:	Menschliche T-Zellen mit AdCAR	
	TexMACS™ Medium	
	+ 2,0 g/L NaHCO ₃	
	+ L-Glutamin 1%	
	+ FBS 10%	
	+ Antibiotika (Penicillin, Streptomycin)	
	PBS	
	+ CaCl ₂	
	+ MgCl ₂	
	Cas9 mRNA (1000 ng/μl)	
sgRNA (5000 ng/μl)		
Neon electroporation transfection System 100 μl Kit		
<ul style="list-style-type: none"> • Elektrolytpuffer E • Resuspensionspuffer T 		
Durchführung:		
Zellen folgendermaßen in Reaktionsgefäße (1,5 ml) pipettieren		
Reaktionsgefäße	Cells only	sgRNA
Zellen	2x 10 ⁶	2x 10 ⁶
Cas9 mRNA	10 μg Cas9	
3 x waschen mit PBS (1 ml) und Überstand absaugen		
Puffer T	100 μl	90 μl
Cas9 mRNA	10 μl	10 μl
sgRNA		10 μl
Elektroporationstube mit 2 ml Puffer E2 befüllen		

Mit der im Kit enthaltenen Pipette und jeweils der dazugehörigen 100 µl Pipettenspitze die Zellen aus dem Reaktionsgefäß entnehmen und in die dafür vorgesehene Vorrichtung des Neon Transfection Systems platzieren, die unten genannten Einstellungen vornehmen und anschließend die Elektroporation starten.

Einstellung der Elektroporationsparameter:

Volt	Pulslänge	Pulszahl	Pipettenspitze
1400	10 ms	3	100 µl

Nach sieben bis neun Tagen sind die Zellen bereit für die Auswertung mittels Durchflusszytometrie

2.2.3 Bestimmung der Transfektionseffizienz

2.2.3.1 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, bei dem sich die physikalischen Eigenschaften der Zellen zu Nutze gemacht werden, um diese zu zählen und charakterisieren [59]. Die Zellen werden hierbei in PBS oder anderen nicht fluoreszierenden isotonischen Flüssigkeiten resuspendiert. Anschließend werden diese in das Durchflusszytometer gesaugt und darin einzeln von einem Laser mit definierter Wellenlänge bestrahlt. Trifft der Laser auf die Zelle wird die dabei entstehende Streustrahlung registriert und gemessen werden. Die Vorwärtsstreustrahlung (engl.: Forward Scatter = FSC) gibt die Partikelgröße an, wohingegen die gemessene Seitwärtsstreustrahlung den Verdichtungsgrad (Granularität) der Partikel angibt (engl.: Side Scatter = SSC). Auf diesen Grundlagen können gemessene Zellpopulationen – unter Limitation von Größe und Granularität – voneinander differenziert werden. Um unterschiedliche Zellen mit identischer Größe und Granularität differenzieren zu können, werden die zu untersuchenden Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern gefärbt [60]. Die Fluoreszenz der gebundenen Antikörper kann vom Durchflusszytometer erfasst werden. Eine weitere Möglichkeit ist, die Zellen mit fluoreszierenden Proteinen zu transfizieren deren jetzt intrazelluläre Fluoreszenz ebenfalls vom Durchflusszytometer erfasst werden kann. Mithilfe dieser Eigenschaften ist es möglich, die FSC in Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität graphisch darzustellen. Somit kann die erfolgreiche Bindung fluoreszierender Antikörper, oder die Effizienz einer Transfektion mit fluoreszierenden Proteinen bestimmt werden. Um

Zelloberflächen mit fluoreszierenden Antikörpern zu färben, wurde zur Vorbereitung der benötigte Puffer, bestehend aus 500 ml PBS mit 4,2 ml EDTA und 10 ml FBS, hergestellt. In jede der zu analysierenden Proben wurde die entsprechende Menge Antikörper – gerichtet gegen die zu färbende Oberflächenstruktur – in jeweils ein Rundbodenröhrchen (5 ml) hinzugegeben. Anschließend erfolgte die Überführung der zu färbenden Zellen in die jeweiligen Rundbodenröhrchen und deren Vermischung mittels Vortexens und anschließender Inkubation im Dunkeln von 15-30 Minuten bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden die einzelnen Proben mit 3 ml Puffer gewaschen, fünf Minuten bei 400x g zentrifugiert und der Überstand bis auf circa 50 µl abgenommen. Damit waren die Proben vorbereitet, um die durchflusszytometrische Analyse durchzuführen. Im Folgenden wurde eine exemplarische Strategie des Gatings der zu untersuchenden Zellen dargestellt, indem das Gating zunächst an einer nicht-transfizierten Zellkontrolle durchgeführt wurde. Im ersten Schritt erfolgte die Auswahl einer Zellpopulation, dargestellt als Pseudocolor-Plot mit annähernd ähnlicher FSC-H und SSC-H, um Zellfragmente und Dubletten von der Analyse auszuschließen (Abbildung 6a). Die ausgewählte Zellpopulation von 93,7 % wurde anschließend in einem weiteren Fenster angezeigt, das die Fluoreszenz-Intensität der 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) auf der X-Achse darstellt und die eGFP-Fluoreszenz-Intensität auf der Y-Achse (Abbildung 6b). Um die Transfektionseffizienz auf einen dimensionslosen Wert zu reduzieren, wurde die totale Expression ausgerechnet. Sie erhält man, indem der Prozentsatz an positiven lebenden Zellen mit dem Median der Expression multipliziert wurde.

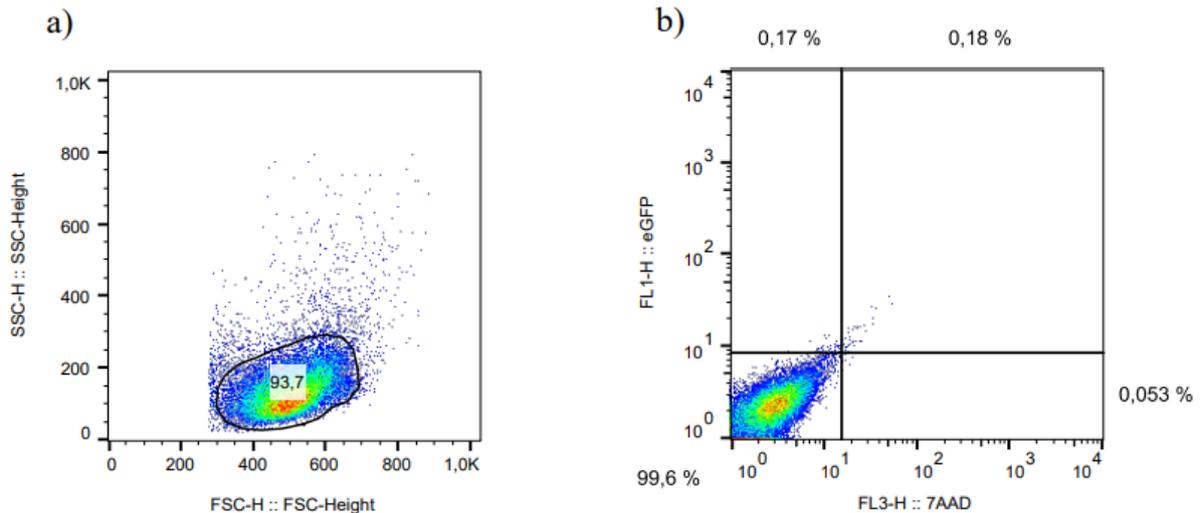


Abbildung 6: Exemplarische Darstellung der angewandten Gating-Strategie.

a) Pseudocolor-Plot aufgenommen mittels Durchflusszytometrie nicht transfizierter HEK293T-kontroll-Zellen. Als Maß für die Partikelgröße wird der FSC-H auf der X-Achse dargestellt und der SSC-H auf der Y-Achse. Zellen mit ähnlicher FSC und SSC hier als Population einzelner lebender HEK293T-Zellen schwarz umrandet. Der Anteil gatedeter Zellen von allen gemessenen Events (Zellfragmente, Doubletten) innerhalb der Umrandung als Zahl in % angezeigt. b) Pseudocolor-Plot der in a) gatedeten Zellpopulation, dargestellt in Abhängigkeit der 7AAD-Fluoreszenzintensität auf der X-Achse und der eGFP-Fluoreszenzintensität auf der Y-Achse. Angelegt an die Population ist ein Vier-Quadranten-Gating, das 99,6% der Kontroll-Zellen im unteren linken Quadranten einschließt.

Anschließend wurde in Abbildung 6b ein Vier-Quadranten-Plot dahingehend gewählt, dass sich die Zellen der nicht-transfizierten HEK293T-Kontrolle, als Bezugspunkt für 7AAD negative und eGFP negative Zellen, im unteren linken Quadranten befinden. 7AAD wurde hierbei als Bezugspunkt für Zellen ohne intakte Zellmembran verwendet. Dieses Gating wurde anschließend auf die jeweiligen mit den zu vergleichenden transfizierten Zellen übertragen, um deren Anteil an 7AAD-negativen und eGFP-positiven Zellen zu detektieren.

Das Gating der HEK293T-Zellen wurde übernommen und auf die transfizierten Zellen übertragen (Abbildung 7). Somit konnte die eGFP negative von der eGFP positiven Zellpopulation differenziert und somit die Fluoreszenzintensität ausgewertet werden. Gezeigt wird es hier am Beispiel der Transfektion mit LipofectamineTM2000. Zur besseren Veranschaulichung wurde die Zellzahl in Abhängigkeit der eGFP-Expression als Histogramm dargestellt. Da die Kurven des Histogramms nah bei einander liegen, wurde der Bereich der erhöhten eGFP-Expression in einer angepassten Skalierung zusätzlich eingefügt.

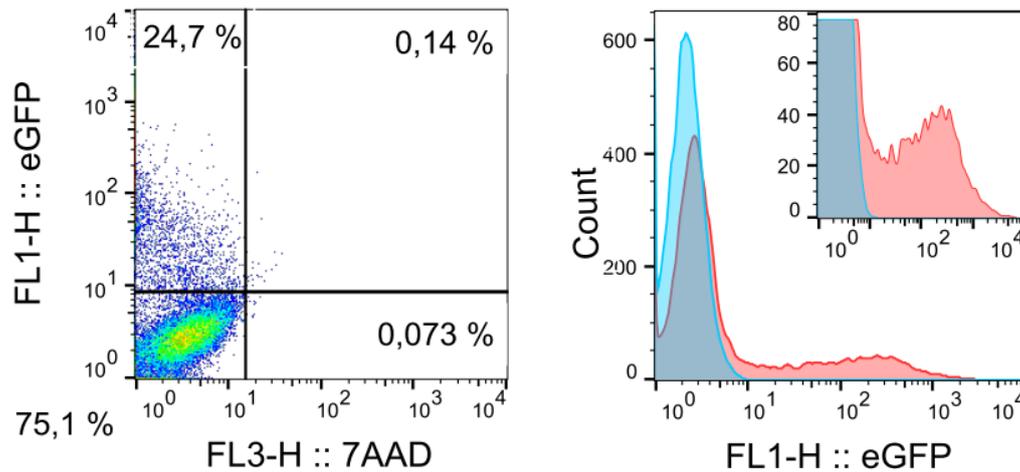


Abbildung 7: Exemplarische Darstellung der Übertragung des Gatings auf die transfizierten Zellen.

Links: Exemplarischer Pseudocolor-Plot aufgenommen mittels Durchflusszytometrie transfizierter Zellen mit eGFP. Als Maß für die Zellvitalität wird die 7AAD-Fluoreszenzintensität auf der X-Achse dargestellt und die eGFP-Fluoreszenzintensität auf der Y-Achse. Die Zahlen im linken oberen und neben dem linken unteren Quadranten zeigen die positive und negative Transfektion in %, abgegrenzt von den 7AAD-positiven Zellen im rechten oberen und unteren Quadranten, die als tote Zellen gewertet werden. **Rechts:** Exemplarisches Histogramm der in den Pseudocolor-Plots dargestellten Bilder als rote Kurve im Vergleich mit den nicht transfizierten Zellen der Zellkontrolle als blaue Kurve. Innerhalb im rechten oberen Eck zeigt einen Ausschnitt des Histogramms mit einer angepassten Skalierung der Y-Achse zum genaueren Vergleich.

2.2.3.2 DNA-Aufreinigung

Um DNA aus Zellen zu extrahieren und isolieren, wurde sich das Prinzip der Präzipitation zu Nutze gemacht. Hierbei wird durch Verwendung unterschiedlicher Verfahren, die Löslichkeit der in Flüssigkeit gelöster DNA mit z.B. Ethanol reduziert, sodass diese ausfällt. Begonnen wird mit einer Lyse der DNA-enthaltenen Zellen durch Zugabe von Lysepuffer. Durch Zugabe von Proteinase K wurden alle Proteine die mit der DNA/RNA assoziiert sind verdaut. Somit war der erste Schritt der Aufreinigung erreicht. Die weitere DNA-Aufreinigung erfolgte mittels der Silica Membran Methode, bei der die gelöste DNA unter präzipitierenden Bedingungen durch Ethanol und chaotropen Salzen auf eine Matrix aus Silicagel aufgetragen wird und reversibel an diese bindet. Das Entfernen der Verunreinigungen wird durch mehrere Waschschritte erreicht. Anschließend erfolgt die Elution mittels eines alkalischen Puffers oder Wasser. Die DNA-Aufreinigung nach diesem Prinzip erfolgte mit dem NucleoSpin® Tissue Kit der Firma Machery-Nagel und wurde nach Herstellerprotokoll durchgeführt (Tabelle 17).

Tabelle 17: Isolierung genomischer DNA.

Durchgeführt mittels Nucleospin^(R) Tissue Kit der Firma Machery-Nagel.

Direkt übernommen aus <https://www.mn-net.com/media/pdf/5b/d0/d9/Instruction-NucleoSpin-Tissue.pdf>

Schritt	Volumen	Durchführung
Pre-lyse Probe	180 µl	Zellen in Puffer T1 resuspendieren

Lyse Probe	25 µl	Proteinase hinzugeben
	200 µl	Hinzufügen von Puffer B3, anschließend vortexen für 10-15 min bei 70 °C inkubieren
Bedingungsanpassung für die DNA-Bindung	210 µl	96-100 %igen Alkohol hinzufügen
DNA-Bindung	615 µl	Probe in NucleoSpin ^(R) Tissue-Gefäß geben und bei 11 000 g für 1 min. zentrifugieren. Anschließend den Durchfluss verwerfen
1. Waschen	500 µl	BW Puffer hinzugeben und bei 11 000 g für 1 min. zentrifugieren. Anschließend den Durchfluss verwerfen
2. Waschen	600 µl	B5 Puffer hinzugeben und bei 11 000 g für 1 min. zentrifugieren. Anschließend Durchfluss verwerfen
Membran trocknen		Gefäß bei 11 000 g für 1 min. zentrifugieren
DNA eluieren	100 µl	Bei 70 °C vorgewärmten Puffer BE hinzugeben und für 1 min. bei Raumtemperatur inkubieren. Anschließend bei 11 000 g für 1 min. zentrifugieren

2.2.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um spezifische DNA-Abschnitte für weitere Diagnostik zu vervielfältigen, bedient man sich der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Hierbei wird das thermostabile Enzym DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) zum Einsatz gebracht, dessen Eigenschaft, hohen zyklischen Schwankungen standzuhalten Voraussetzung ist, um die PCR durchzuführen. Für die DNA-Amplifikation werden Nukleotid-Triphosphate als Bausteine benötigt, die von der Taq-Polymerase an Oligonukleotide (Primer) angebaut werden. Diese Primer sind sequenzspezifisch und bestimmen den DNA-Abschnitt, der amplifiziert werden soll. Initial wird die DNA auf 95 °C erhitzt, sodass diese denaturiert und Einzelstränge entstehen. Für das anschließende Annealing werden die Einzelstränge abhängig von der Schmelztemperatur der Primer, (hier auf 56 °C) heruntergekühlt, damit sich spezifische komplementär zur DNA befindliche Primer an die Einzelstränge binden können. Daraufhin erfolgt eine Erhöhung der Temperatur auf 72 °C, sodass die Taq-Polymerase, die bei dieser Temperatur ihr Aktivitätsmaximum besitzt, die Nukleotid-Triphosphate an die gebundenen Primer anlagert

und diese mit zur DNA komplementären Nukleotiden verlängert (Elongation). Hierbei entsteht aus jedem Einzelstrang ein Doppelstrang, der sich bei einer erneuten Denaturierungs-Phase zu zwei Einzelsträngen teilt, sodass die Taq-Polymerase erneut anlagern kann. Dieser Schritt wird je nach Protokoll circa 40-mal wiederholt. Dadurch ist es möglich, einen durch spezifische komplementäre Primer bestimmten DNA-Abschnitt exponentiell zu vervielfältigen [61]. Für die anschließende Durchführung eines T7-Assays wurde die Zielregion der in (Tabelle 17) isolierten DNA mittels PCR amplifiziert. Um die Zielregion auf der DNA anzuvisieren, wurden die Primer TRAC F und TRAC R in (Tabelle 8) verwendet. Es wurden die Reagenzien in (Tabelle 18) und Zykluseinstellungen in (Tabelle 19) verwendet.

Tabelle 18: PCR-Reagenzien

Reagenz	Volumen [μ l] pro Ansatz
1x Reaktionspuffer S	5
dNTP-Mix	1
Primer Forward (10 μ M)	2
Primer Reverse (10 μ M)	2
Taq DNA Polymerase (5 U/ μ l)	0,5
Millipore Wasser	ad 50 μ l
DNA	100 ng

Tabelle 19: Zykluseinstellungen der PCR

Zyklusschritt	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zeit [min]
Aktivierung der Taq DNA-Polymerase	95	10
40 Zyklen	Denaturierung	95
	Annealing	56
	Synthese	72
Beendigung der Synthese	72	7

2.2.3.4 T7 Endonuklease I-Assay

Mit der T7-Endonuklease I ist es möglich, Insertionen oder Deletionen in mutierten oder artifizuell veränderten DNA-Sequenzen zu erkennen und zu detektieren. Diese Mutationen können beispielsweise durch Nicht-homologe Endverknüpfung (engl. non-homologous end joining = NHEJ) nach CRISPR/Cas-induziertem DNA-Doppelstrangbruch entstehen. Hierfür wird initial eine PCR durchgeführt, die den DNA-Abschnitt des Genoms, der mögliche

Insertionen oder Deletionen enthält, amplifiziert. Anschließend erfolgt eine Rehybridisierung, bei der sich – nach Denaturierung – nicht-mutierte DNA-Einzelstränge und Einzelstränge mit Deletion (kürzer als die nicht-mutierten) oder Insertion (länger als die nicht-mutierten) zu Heteroduplexen zusammenlagern. Da die jeweiligen Einzelstränge eine unterschiedliche Länge im Bereich der Mutation besitzen, kommt es zu Mismatches, bei denen Basen keinen komplementären Gegenpart finden [62]. Die T7-Endonuklease I erkennt diese Mismatches und schneidet den Doppelstrang an genannter Stelle. In Abhängigkeit der Indel-Rate entstehen zwei kürzere DNA-Fragmente, die sich aufgrund ihrer Länge in einer Gelelektrophorese von den nicht-Mismatch-Amplifikons differenzieren lassen. Anschließend kann die Bandenintensität bei der Gelelektrophorese mit der Software ImageJ bestimmt werden, welche für eine Semiquantifizierung des Verhältnisses von geschnittenen zu nicht-geschnittenen DNA-Fragmenten verwendet werden kann. Daraus lässt sich ein Zahlenwert für die Indel-Rate bestimmen. Der T7-Assay wurde mit in (Tabelle 20) genannten Reagenzien und in Tabelle (Tabelle 21) genannten Zykluseinstellungen durchgeführt.

Tabelle 20: T7-Assay Reagenzien

Reagenz	Volumen [μ l]
NE-Puffer 2	2
PCR-Produkt	200 ng
H ₂ O	ad 20
T7-Endonuklease I (10 U)	1

Tabelle 21: Zykluseinstellungen des T7-Assays

Zyklusschritt	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zeit [min]
Denaturierung	95	5
Annealing	95-85	-2 $^{\circ}$ C/s
	85-25	-0,1 $^{\circ}$ C/s
Aufbewahrung	4	So lange wie nötig

2.2.3.5 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist ein etabliertes Verfahren, mit dem in der PCR vervielfältigte DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Angewandt werden kann diese Technik für Fragmente von einer Größe von 100 – 25 000 Basenpaare. Die Trennung erfolgt hierbei in einem Agarosegel, umgeben von isotonischem Puffer. Die angefärbten DNA-Fragmente werden an einem Ende des Gels in bestehende Taschen pipettiert. Durch Anlegen eines

elektrischen Feldes wandern die DNA-Fragmente aufgrund der negativen Ladung ihrer Phosphat-Anteile in Richtung Anode. Abhängig von ihrem Molekulargewicht, Konzentration und Art des Agarosegels, sowie der Stromstärke und Spannung, wandern die DNA-Fragmente unterschiedlich schnell, wobei diese mit niedrigerem Molekulargewicht schneller wandern, als jene mit größerem [63]. Nach definierter Zeit erreicht man eine ausreichende Auftrennung der DNA-Fragmente in einzelne Banden, die sich anhand einer Positivkontrolle aus unterschiedlich großen DNA-Fragmenten mit definierter Größe vergleichen – und somit auf die Größe der einzelnen zu messenden DNA-Fragmente schließen lässt. Sichtbar wird die mit Farbstoffen – wie bspw. Ethidiumbromid oder Gelred – angefärbte DNA unter UV-Licht.

2.2.3.6 Bestimmung der Indel-Rate

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der DNA-Fragmente, ist es möglich, die optische Intensität der Banden mittels ImageJ zu analysieren, als Kurve in einem Schaubild darzustellen und den Anteil jeder Bande zu berechnen, indem das Integral unter der jeweiligen Kurve berechnet wird. Im Folgenden exemplarisch dargestellt (Abbildung 8). Zunächst erfolgt der Import des aufgenommenen Gelbildes. Anschließend wird die zu analysierende Spur und deren enthaltenen DNA-Banden ausgewählt. Danach werden alle ausgewählten Spuren, abhängig von ihrer optischen Intensität, als Kurven in einem Schaubild dargestellt. Hierbei entsprechen die Kurven von links nach rechts, den DNA-Banden von oben nach unten. In diesem Schaubild kann das Integral jeder Kurve berechnet werden und erhält einen numerischen Wert. Der erste Wert zeigt das Integral der Kurve im Schaubild links, die dem ungeschnittenen DNA-Fragmente entspricht. Das zweite und dritte Integral entspricht demnach der Fläche unter der mittleren bzw. rechten Kurve, die den zwei kürzeren DNA-Fragmenten entsprechen. Um die Schnittfraktion (engl.: cutting fraction = f_{cut}) zu erhalten, wird aus diesen Werten das Verhältnis der beiden Kurzen Banden zur Langen wie folgt berechnet.

$$f_{cut} = \frac{(Integral\ 2 + Integral\ 3)}{(Integral\ 1 + Integral\ 2 + Integral\ 3)}$$

Durch die Rehybridisierung während des T7-Endonuklease-I-Assays, entspricht die Wahrscheinlichkeit der Duplexformierungen der Binominalverteilung. Um die tatsächliche Indel-Rate zu bestimmen, muss der f_{cut} mit folgender Formel korrigiert werden [64].

$$Indel\ (\%) = 100 \times (1 - \sqrt{(1 - f_{cut})})$$

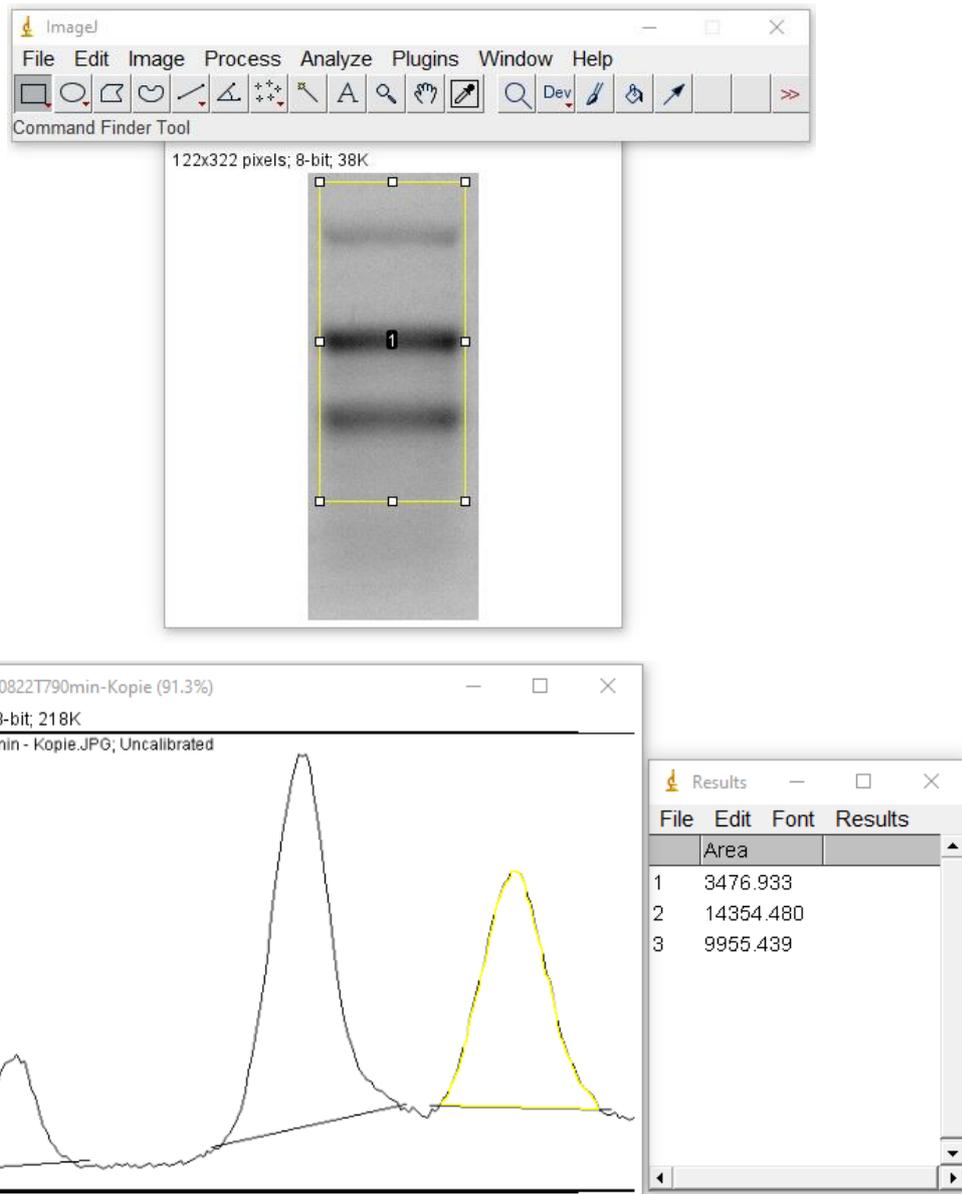


Abbildung 8: Exemplarische Auswertung von DNA-Banden nach Elektrophorese.
Oben: Zeigt die Auswahl der zu bestimmenden Gel-Spur und den darin enthaltenen DNA-Banden. **Unten:** Schaubild berechnet aus der optischen Intensität des oben ausgewählten Fensters (rechts). Daten der ausgewählten Integrale (links).

3 Ergebnisse

3.1 Transfektionsvergleich

Für die Produktion, der im späteren Verlauf benötigten AdCAR-T-Zellen, wurde ein Vergleich verschiedener Transfektionsverfahren durchgeführt, die als Grundlage für die Anwendung idealer Transfektionsbedingungen dienten. AdCAR-T-Zellen werden mittels lentiviraler Transduktion durch AdCAR-Expressionsvektoren hergestellt (nicht Teil dieser Dissertation). Um die maximale Transfektionseffizienz bei HEK293T-Zellen zu ermitteln, welche als Produzent oben genannter Lentiviren fungieren, wurden HEK293T-Zellen mit einem Plasmid, codierend für eGFP, unter Verwendung von folgenden Techniken transfiziert. Als Vertreter der chemischen Verfahren, wurde eine Transfektion mittels der Calcium-Phosphat-Präzipitation unter Gebrauch des in Tabelle 10 genannten CaPO_4 -Kits genutzt. Weiterhin erfolgte ein Vergleichsansatz unter Verwendung eines, wie in 2.2.2.1 beschriebenen, selbst titrierten CaPO_4 -Ansatzes. Um die Effektivität der Transfektion von HEK293T-Zellen durch Lipofektion zu untersuchen, wurde ein Ansatz mit LipofectamineTM 2000 durchgeführt und ein weiterer mit LipofectamineTM 3000 (siehe Kapitel 2.2.2.2). Zu guter Letzt erfolgte eine weitere Transfektion mittels Polyethylenimin (PEI) (siehe Kapitel 2.2.2.3 Tabelle 14), um bei diesem Vergleich auch einen Vertreter der kationischen Polymere miteinzubeziehen. Um den Anteil der erfolgreich transfizierten Zellen zu erkennen und darzustellen, erfolgte eine Auswertung mittels Durchflusszytometrie (siehe Kapitel 2.2.3.1) unter Berücksichtigung der Fluoreszenzintensität.

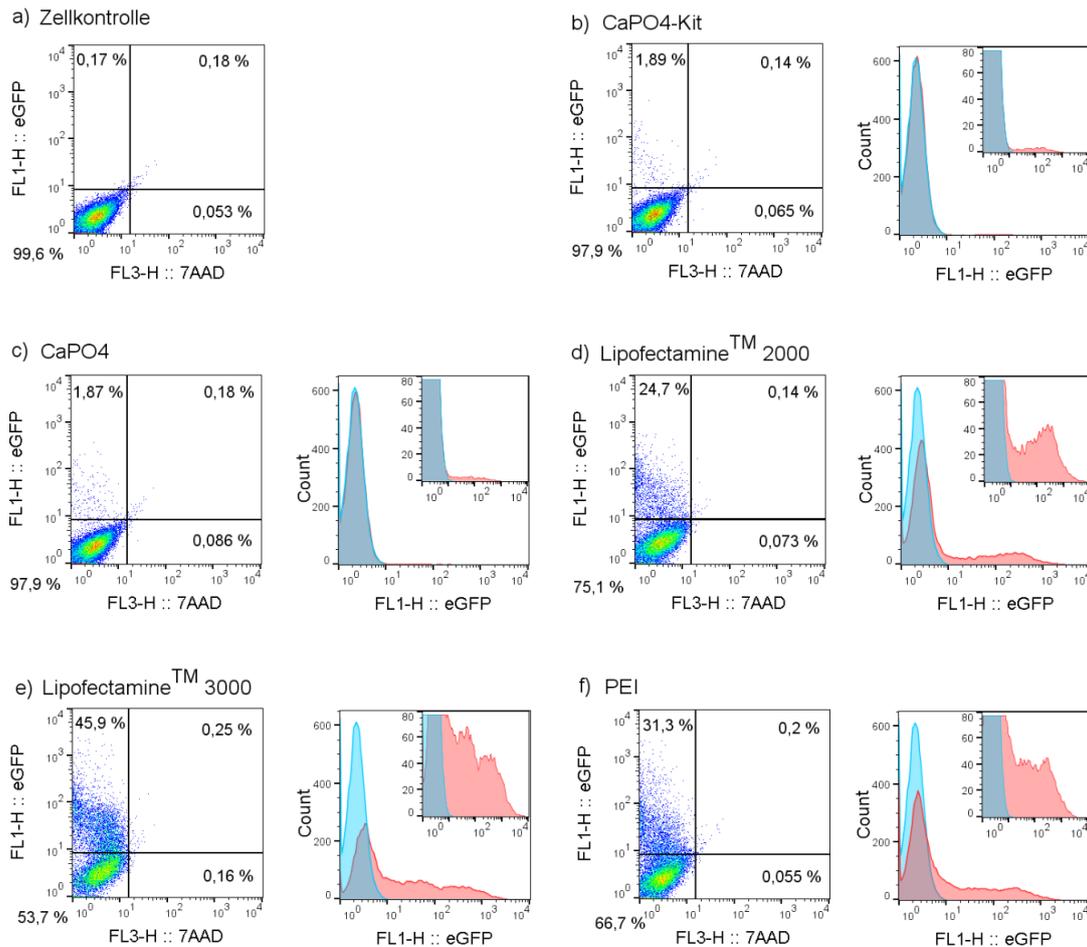


Abbildung 9: Bestimmung der Transfektionseffizienz von eGFP in HEK293-Zellen.

Nicht transfizierte HEK293-Zellen als Negativkontrolle (a) für den Vergleich der eGFP-Expression zwölf Stunden nach Transfektion mittels CaPO₄-Kit (b), CaPO₄(c), Lipofectamine™ 2000 (d), Lipofectamine™ 3000 (e) und PEI (f). Gezeigt wird jeweils links: Pseudocolor-Plots aufgenommen mittels Durchflusszytometrie transfizierter Zellen mit eGFP. Als Maß für die Zellvitalität wird die 7AAD-Fluoreszenzintensität auf der X-Achse dargestellt und die eGFP-Fluoreszenzintensität auf der Y-Achse. Die Zahlen im linken oberen und neben dem linken unteren Quadranten zeigen die positive und negative Transfektion in %, abgegrenzt von den 7AAD-positiven Zellen im rechten oberen und unteren Quadranten, die als tote Zellen gewertet werden. Rechts: Histogramme der in den Pseudocolor-Plots dargestellten Bilder als rote Kurve im Vergleich mit den nicht transfizierten Zellen der Zellkontrolle als blaue Kurve. Innerhalb der Histogramme im rechten oberen Eck zeigt einen Ausschnitt des jeweiligen Histogramms mit einer angepassten Skalierung der Y-Achse zum genaueren Vergleich.

Tabelle 22: Ergebnisse des Transfektionsvergleichs mit eGFP.

Darstellung der Ergebnisse mit den Daten der nicht transfizierten Zellen als HEK293T Zellkontrolle beschriftet und den jeweiligen mit eGFP transfizierten Verfahren aus Abbildung 9. Gezeigt wird die Gesamtzahl der jeweils gezählten Zellen, der Median der Fluoreszenzintensität, sowie die totale Expression von eGFP.

Probenname	Zellzahl	Median	Totale Expression
HEK293T Zellkontrolle	18 669	2,17	0,37 (0,17%)
CaPO ₄ -Kit	18 495	4,99	9,43 (1,89%)
CaPO ₄	18 575	2,23	4,17 (1,87%)
Lipofectamine™ 2000	17 637	3,21	79,29 (24,7%)
Lipofectamine™ 3000	16 527	6,75	309,83 (45,9%)
PEI	18 172	3,6	112,68 (31,3%)

Nach der Transfektion von eGFP-Plasmid in HEK293T-Zellen mittels des CaPO₄-Kits zeigte sich im Ergebnis der Durchflusszytometrie, unter Ausschluss aller 7AAD-positiven Zellen, eine eGFP fluoreszierende Zellpopulation von 1,89 % der Gesamtzahl der transfizierten Zellen (Abbildung 9b). 7AAD wird hierbei verwendet, um tote Zellen zu markieren und auszuschließen, da 7AAD an DNA bindet. Dies ist nur möglich, wenn die Zellmembran nicht mehr intakt ist und somit lebende gesunde Zellen nicht angefärbt werden können. Um die Effizienz der Transfektion weiter zu beurteilen, wurde neben dem prozentualen Anteil der eGFP-positiv-fluoreszierenden Zellen, derselbe Wert mit dem Median der Fluoreszenzintensität multipliziert, um die totale Expression zu erhalten. Bei der Transfektion mit dem CaPO₄-Kit zeigte sich eine totale Expression von 9,31 (Tabelle 22). Bei der Transfektion mit selbst titriertem CaPO₄ ergab sich ein prozentualer Anteil der Gesamtzahl der transfizierten Zellen von 1,87 % (Abbildung 9c), die in der durchflusszytometrischen Analyse eGFP-positiv dargestellt wurden und somit eine totale Expression von 4,17 (Tabelle 22). Die eGFP-positiven Zellen nach der Transfektion durch Lipofectamine™ 2000 stellten einen Anteil von 24,7 %, aller mit Lipofectamine™ 2000 transfizierten Zellen dar (Abbildung 9d). Dementsprechend ergab sich hierbei eine totale Expression von 79,29 (Tabelle 22). Als Transfektionseffizienz von Lipofectamine™ 3000 wurde ein eGFP-positiver Zellanteil von 45,9 % aller 7AAD-negativen Zellen gemessen (Abbildung 9e) und unter Einbeziehen des Medians der Fluoreszenzintensität eine totale Expression von 309,83 (Tabelle 22). Zellen in die eGFP mittels Polyethylenimin transfiziert wurden, zeigten nach durchflusszytometrischer Analyse einen eGFP-positiven Anteil von 31,3% (Abbildung 9f) und eine totale Expression von 112,68 (Tabelle 22).

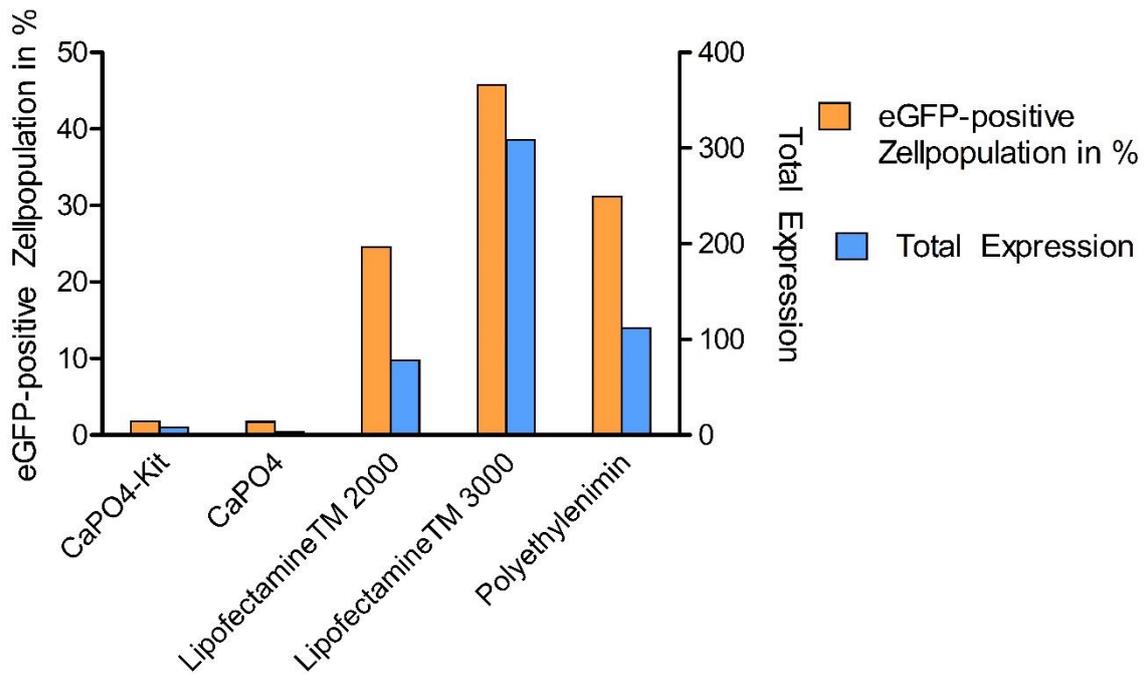


Abbildung 10: Gegenüberstellung der Transfektionsmethoden.

Gezeigt wird der in der Durchflusszytometrie dargestellten jeweilige prozentuale Anteil der HEK293T-Zellen mit positiver eGFP-Fluoreszenz als Maß für die Effektivität der Transfektion mit dem jeweiligen Transfektionsreagenz. Von links nach rechts: CaPO4-Kit, CaPO4 (selbst titriert), Lipofectamine™ 2000, Lipofectamine™ 3000 und Polyethylenimin. Die Bestimmung der Transfektionseffizienz wurde initial zum Vergleich einmal durchgeführt (n=1).

Nach Analyse und Auswertung der jeweiligen Transfektionsmethoden unter Berücksichtigung der eGFP-positiven Populationen, der jeweiligen totalen Expression und dem Anteil der 7AAD-negativen Zellen, scheint Lipofectamine™ 3000 unter den verwendeten Reaktionsbedingungen die Methode als diejenige mit der größten Transfektionseffizienz zu sein, um Plasmide wie eGFP zu transfizieren. Auf Grund dieses Ergebnisses erfolgte die Produktion, von den für die AdCAR-Produktion nötigen lentiviralen AdCAR-Expressionsvektoren, unter Verwendung von Lipofectamine™ 3000 (nicht Teil dieser Dissertation).

3.2 Knock-out

3.2.1 KO in Jurkat-Zellen

Um einen gezielten KO des endogenen TCRs zur Vermeidung einer GvHR zu erreichen, erfolgte zunächst ein Vorversuch unter Verwendung von AdCAR-Jurkat-Zellen, deren Kultivierung durch schnelles Wachstum und hohe Tenazität ideale Bedingungen bietet. Da die für den KO nötigen Nukleinsäuren (Cas9 mRNA und sgRNA) in oben genannte Jurkat-Zellen elektroporiert werden sollten, wurde die Transfektionseffizienz und Toxizität der Elektroporation in Jurkat-Zellen mit einem Red Fluorescence Protein (RFP) untersucht.

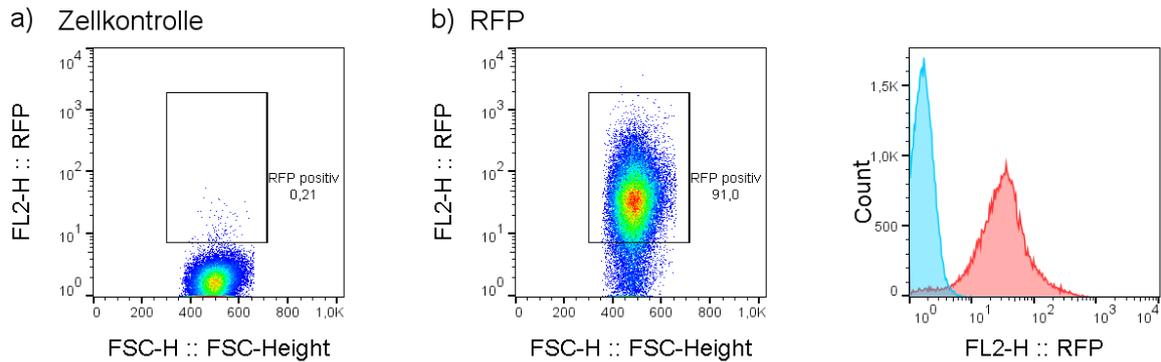


Abbildung 11: Bestimmung der Transfektionseffizienz von RFP in Jurkat-Zellen.

Pseudocolor-Plots aufgenommen mittels Durchflusszytometrie elektroporierter Jurkat-Zellen mit RFP. Als Maß für die Partikelgröße wird der FCS-H auf der X-Achse dargestellt und die RFP-Fluoreszenzintensität auf der Y-Achse. Das rechteckige Gate und die Zahl rechts daneben zeigen die RFP-positiv fluoreszierenden Zellen nach Elektroporation in %. Zellkontrolle ohne Elektroporation zum Vergleich der Expression von RFP (a). Expression von RFP nach Elektroporation (b).

Histogramm: Zeigt die Daten der in den Pseudocolor-Plots dargestellten Bilder als rote Kurve im Vergleich mit den nicht elektroporierten Zellen der Zellkontrolle als blaue Kurve. Gezeigt ist die RFP-Fluoreszenzintensität auf der X-Achse.

Die Auswertung der Daten aus der durchflusszytometrischen Analyse zeigte einen deutlichen Anteil RFP-positiver Zellen (Abbildung 11). Bei Einbeziehen des Medians der Fluoreszenzintensität ergab sich nach der Elektroporation eine Erhöhung der totalen Expression (Tabelle 23).

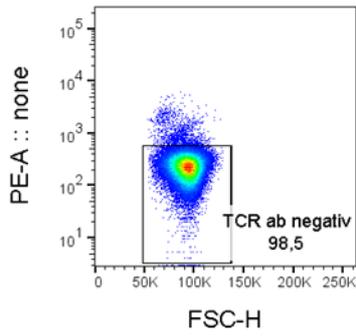
Tabelle 23: Ergebnisse der Elektroporation mit RFP.

Darstellung der Ergebnisse mit den Daten der nicht transfizierten Zellen als Zellkontrolle und den mit RFP transfizierten Zellen aus Abbildung 11. Gezeigt wird die Gesamtzahl der jeweils gezählten Zellen, der Median der Fluoreszenzintensität, sowie die totale Expression von RFP.

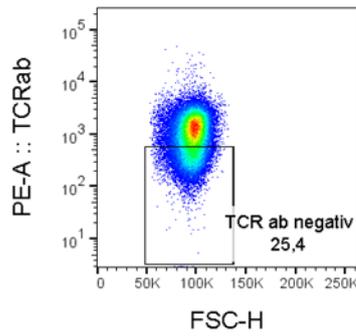
Probenname	Zellzahl	Median	Totale Expression
Zellkontrolle	48 611	1,60	0,336
RFP	84 107	30,6	2 784,6

Nach oben genannter Analyse der Elektroporationseffizienz erfolgte anschließend die Untersuchung des CRISPR/Cas9-Systems und dessen KO-Potentials bei Jurkat-Zellen. Hierbei wurde Cas9-mRNA in verschiedenen Mengen und eine sgRNA, gegen die Alpha-Kette des endogenen TCRs, unter Verwendung von Tabelle 15 in Jurkat-Zellen elektroporiert. Nach zehn Tagen wurde bei der durchflusszytometrischen Analyse die Alpha- und Beta-Kette des endogenen TCRs mit fluoreszierenden Antikörpern angefärbt und anschließend deren Fluoreszenzintensität bestimmt und analysiert.

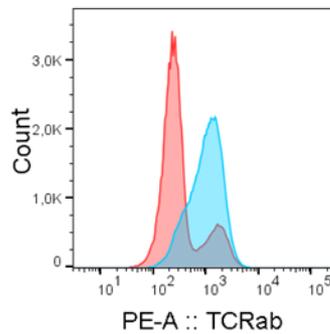
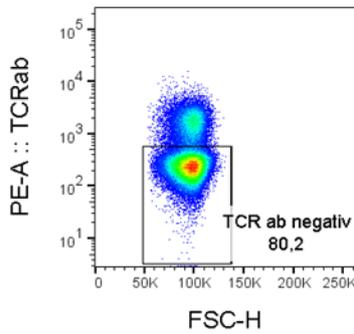
a) Ungefärbte Zellkontrolle



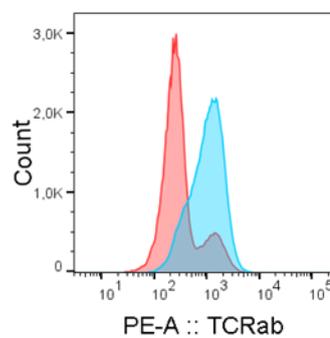
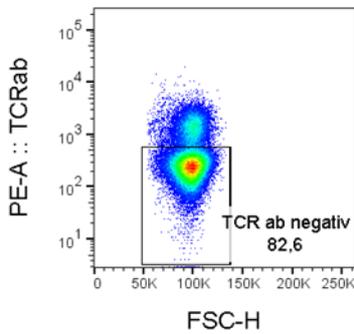
b) Zellkontrolle gefärbt (TCRab)



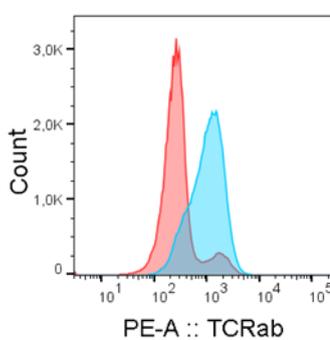
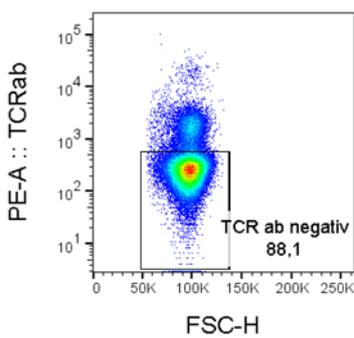
c) 1 µg Cas9 und 5 µg sgRNA



d) 3 µg Cas9 und 5 µg sgRNA



e) 5 µg Cas9 und 5 µg sgRNA



f)

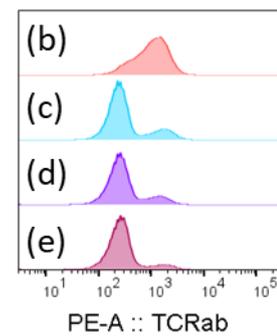


Abbildung 12: Färbung von TCRab auf Jurkat-Zellen zehn Tage nach Transfektion.

Pseudocolor-Plots aufgenommen mittels Durchflusszytometrie elektroporierter Jurkat-Zellen mit Cas9 RNA und sgRNA. Als Maß für die Partikelgröße wird der FSC auf der X-Achse dargestellt und die Fluoreszenzintensität gebundener Fluoreszenz-Antikörper gegen die Alpha- und Beta-Kette der TCRs. Das rechteckige Gate zeigt den Anteil der

Zellpopulation ohne Alpha- und Beta-Kette des TCSs an. Ungefärbte Kontrollzellen (ohne Antikörper), deren Population zum Einstellen des Gates für die TCRab-negativen Zellen dient (a). Mit Antikörpern gefärbte Kontroll-Zellen, elektroporiert mit 1 µg Cas9 RNA, aber ohne sgRNA (b). Mit 5 µg sgRNA und 1 µg (c, links), 3 µg (d, links) bzw. 5 µg (e, links) Cas9 RNA transfizierte Jurkat-Zellen, gefärbt mit Anti-TCRab.

Die Histogramme (in c-e, rechts) zeigen jeweils die TCRab-Oberflächenexpression der transfizierten Zellen (rot) im Vergleich zu nicht elektroporierten Kontroll-Zellen (blau).

Diese Histogramme sind zur besseren Veranschaulichung nochmals untereinander gelagert in hellrot (Kontrollzellen aus (b)), hellblau (1 µg aus (c)), violett (3 µg aus (d)) und dunkelrot (5 µg Cas9 RNA transfizierte Zellen aus (e)) dargestellt (f).

Im Vergleich von Zellkontrolle ohne sgRNA (somit ohne KO) und allen drei Ansätzen des KO mit jeweils unterschiedlicher Menge an Cas9 mRNA zeigte die durchflusszytometrische Untersuchung hierbei eine deutliche Verschiebung der Fluoreszenzintensität von gebundenen TCRab-Antikörpern (Abbildung 12). Unter Berücksichtigung des Medians der TCRab-Expression ergab sich ebenfalls eine Reduktion der totalen Expression (Tabelle 24).

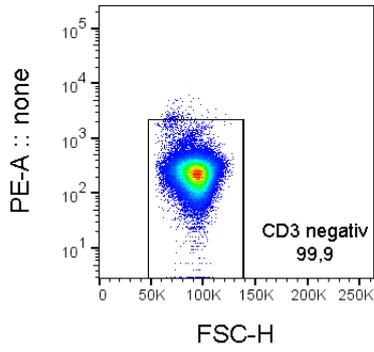
Tabelle 24: Ergebnisse des KO mittels Elektroporation des CRISPR/Cas9-Systems in Jurkat-Zellen, gefärbt mit Anti-TCRab.

Darstellung der Ergebnisse aus Abbildung 12 mit den Daten der Zellkontrolle ohne sgRNA und den mit Cas9 mRNA und sgRNA elektroporierten Zellen. Gezeigt wird die Gesamtzahl der jeweils gezählten Zellen, der Median der TCRab-Expression, sowie die Totale Expression von TCRab.

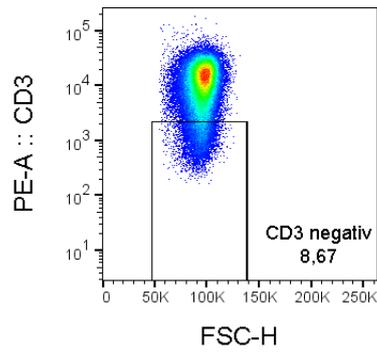
Probenname	Zellzahl	Median	Totale Expression
Zellkontrolle ohne sgRNA	84 930	1 033	77 061,8
1 µg Cas9 und 5 µg sgRNA	91 257	255	5 049
3 µg Cas9 und 5 µg sgRNA	82 147	258	4 489,2
5 µg Cas9 und 5 µg sgRNA	80 848	255	3 034,5

Zusätzlich wurden für die durchgeführte Durchflusszytometrie fluoreszierende Antikörper gegen die transmembranär anliegenden CD3-Moleküle gemessen. Damit sollte gezeigt werden, dass im Vergleich von ohne KO zu mit KO der alpha-Kette nicht nur ein Verlust der Alpha- und Beta-Ketten auf der Zelloberfläche zu detektieren ist, sondern auch ein Verlust der transmembranären CD3-Moleküle. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass der gesamte Proteinkomplex des TCR einschließlich der CD3-Moleküle nicht mehr auf der Oberfläche exprimiert wird.

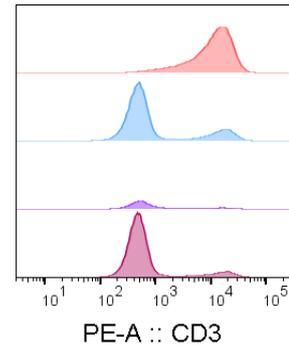
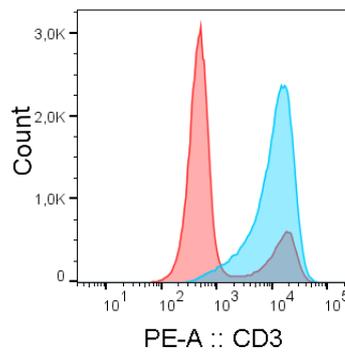
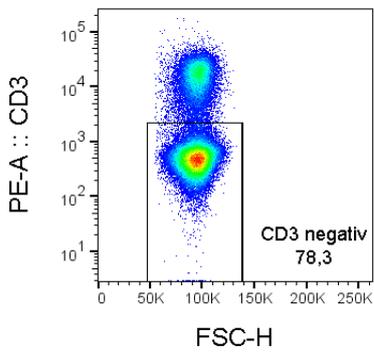
a) Ungefärbte Zellkontrolle



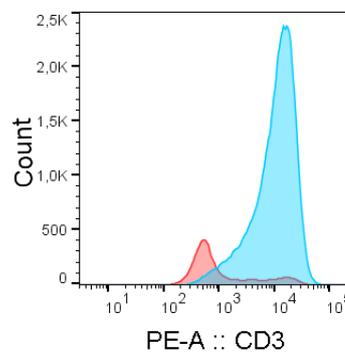
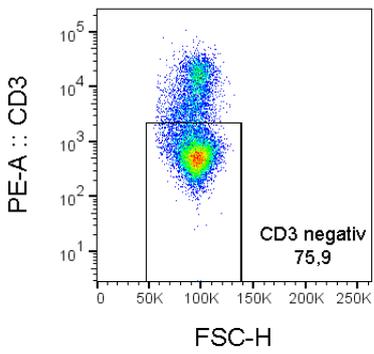
b) Zellkontrolle gefärbt (CD3)



c) 1 µg Cas9 und 5 µg sgRNA



d) 3 µg Cas9 und 5 µg sgRNA



e) 5 µg Cas9 und 5 µg sgRNA

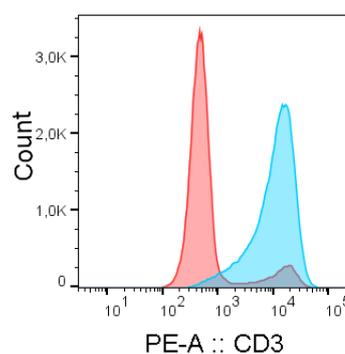
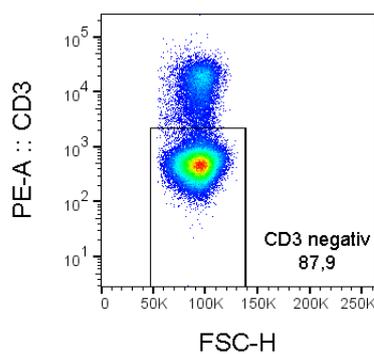


Abbildung 13: Färbung von CD3 auf Jurkat-Zellen zehn Tage nach Transfektion.

Pseudocolor-Plots aufgenommen mittels Durchflusszytometrie elektroporierter Jurkat-Zellen mit Cas9 RNA und sgRNA. Als Maß für die Partikelgröße wird der FSC-H auf der X-Achse dargestellt und die Fluoreszenzintensität gebundener Antikörper gegen CD3 auf der Y-Achse. Das rechteckige Gate zeigt den Anteil der Zellpopulation ohne transmembranär gebundene CD3-Moleküle des TCRs an. Ungefärbte Zellkontrolle (ohne Antikörper), deren Population als Einstellen des Gates für die CD3-negative Zellpopulation dient (a). Mit Antikörpern gefärbte Kontroll-Zellen, elektroporiert mit 1 µg Cas9 RNA, aber ohne sgRNA (b). Mit 5 µg sgRNA und 1 µg (c, links), 3 µg (d, links) bzw. 5 µg (e, links) Cas9 RNA transfizierte Jurkat Zellen, gefärbt mit Anti-CD3 ab. Die Histogramme (in c-e, rechts) zeigen jeweils die CD3 Oberflächenexpression der transfizierten Zellen (rot) im Vergleich zu nicht elektroporierten Kontroll-Zellen (blau). Diese Histogramme sind zur besseren Veranschaulichung nochmals untereinander gelagert in hellrot (Kontrollzellen aus (b)), hellblau (1 µg aus (c)), violett (3 µg aus (d)) und dunkelrot (5 µg Cas9 RNA transfizierte Zellen aus (e)) dargestellt (f).

Die durchflusszytometrische Analyse unter Messung der Anti-CD3-Fluoreszenzintensität in allen drei Ansätzen mit unterschiedlichen Mengen an Cas9 mRNA ergab ebenfalls eine deutliche Verschiebung der CD3-positiven Zellen (Abbildung 13). Der Median der CD3-Expression und somit die totale Expression reduzierten sich hierbei ebenso (Tabelle 25).

Tabelle 25: Ergebnisse des KO mittels Elektroporation des CRISPR/Cas9-Systems in Jurkat-Zellen, gefärbt mit Anti-CD3.

Darstellung der Ergebnisse aus

Abbildung 13 mit den Daten der Zellkontrolle ohne sgRNA und den mit Cas9 mRNA und sgRNA elektroporierten Zellen. Gezeigt wird die Gesamtzahl der jeweils gezählten Zellen, der Median der CD3-Expression, sowie die Totale Expression von CD3.

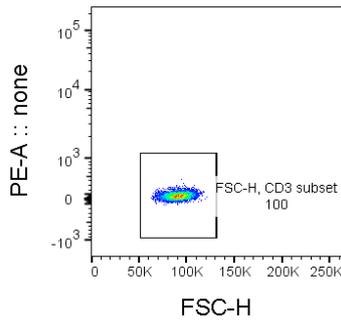
Probenname	Zellzahl	Median	Totale Expression
Zellkontrolle ohne sgRNA	91 114	11 549	1 054 770,17
1 µg Cas9 und 5 µg sgRNA	87 789	528	11 457,6
3 µg Cas9 und 5 µg sgRNA	13 903	628	15 134,8
5 µg Cas9 und 5 µg sgRNA	79 743	485	5 868,5

Die Ergebnisse dieser Vorversuche mit AdCAR-Jurkat-Zellen zeigten einen erfolgreichen KO der Alpha-Kette im endogenen TCR, welcher durch Anfärben zweier seiner Oberflächenstrukturen gezeigt werden konnte. Weder 3 µg noch 5 µg Cas9 mRNA zeigten einen erhöhten KO-Anteil im Vergleich zu 1 µg Cas9 mRNA. Daher wurde für weitere Experimente 1 µg Cas9 mRNA verwendet.

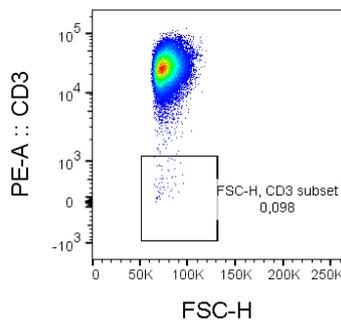
3.2.2 KO in T-Zellen

Damit erfolgte im weiteren Verlauf die Anwendung dieser Methode bei AdCAR-T-Zellen, die zuvor als T-Zellen aus einem Patienten isoliert und durch lentivirale Transduktion mit einem AdCAR versehen wurden (nicht Teil dieser Dissertation). Auf Grund einer Kongruenz der durchflusszytometrischen Ergebnisse der Färbungen von TCRab und CD3, erfolgte beim anschließenden KO der AdCAR-T-Zellen lediglich eine Färbung von CD3.

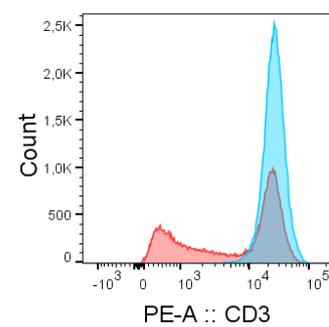
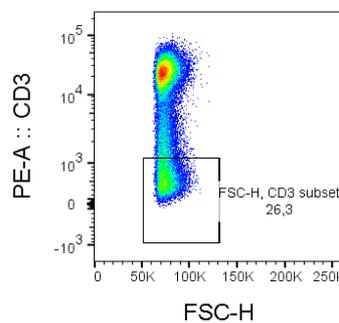
a) Ungefärbte Zellkontrolle



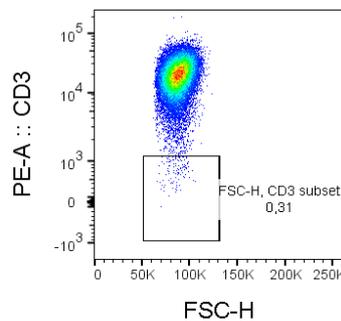
b) 1 µg Cas9 ohne sgRNA nicht stimuliert



1 µg Cas9 und 5 µg sgRNA nicht stimuliert



c) 1 µg Cas9 ohne sgRNA stimuliert



1 µg Cas9 und 5 µg sgRNA stimuliert

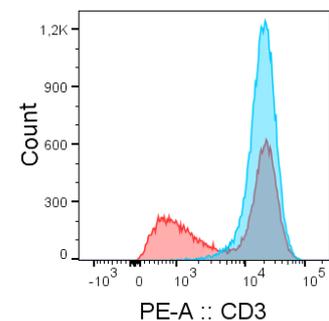
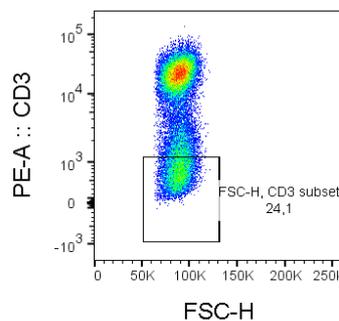


Abbildung 14: Färbung von CD3 auf AdCAR-T-Zellen zehn Tage nach Transfektion.

Pseudocolor-Plots aufgenommen mittels Durchflusszytometrie elektroporierter AdCAR-T-Zellen mit Cas9 RNA und sgRNA. Als Maß für die Partikelgröße wird der FSC-H auf der X-Achse dargestellt und die Fluoreszenzintensität der gebundenen Antikörper gegen CD3 auf der Y-Achse. Das rechteckige Gate zeigt den Anteil der Zellpopulation ohne transmembranär gebundene CD3-Moleküle des TCRs an. Ungefärbte Kontroll-Zellen (ohne Antikörper), deren Population zum Einstellen des Gates für die CD3-negativen Zellen dient (a). Nicht stimulierte AdCAR-T-Zellen (b) und stimulierte AdCAR-T-Zellen (c). Jeweils gefärbt mit CD3-Antikörpern ohne sgRNA (links), mit sgRNA (mitte) und deren Darstellung als Histogramm (rechts) mit den Daten ohne sgRNA als blaue Kurve und mit sgRNA als rote Kurve. Gezeigt ist die Anti-CD3-Fluoreszenzintensität auf der X-Achse.

Der Versuch hierbei wurde bei nicht stimulierten als auch bei stimulierten AdCAR-T-Zellen durchgeführt, um herauszufinden, ob es einen Unterschied in der Effektivität des KO gibt und weitere Versuche gegebenenfalls anzupassen. Hierbei ergab sich sowohl bei den nicht

stimulierten als auch bei den mit Anti-CD2, -3 und -28 Antikörpern stimulierten AdCAR-T-Zellen [32, 37] eine CD3-abhängige Aufteilung der Zellpopulation, die in den Pseudocolor-Plots und den zugehörigen Histogrammen dargestellt wurden (Abbildung 14). Die Stimulation wurde nicht selbst durchgeführt. Die stimulierten und nicht stimulierten Zellen wurden von Dr. Patrick Schlegel und Dr. Christian Seitz bereitgestellt. Weiterhin zeigte sich ebenfalls eine Verschiebung des Medians der CD3-Expression und somit auch eine Verringerung der totalen Expression (Tabelle 26).

Tabelle 26: Ergebnisse des KO mittels Elektroporation des CRISPR/Cas9-Systems in AdCAR-T-Zellen, gefürbt mit Anti-CD3.

Darstellung der Ergebnisse aus Abbildung 14 mit den Daten der nicht stimulierten und stimulierten AdCAR-T-Zellen im Vergleich der Zellkontrolle ohne elektroporierter sgRNA und mit 5 µg sgRNA. Gezeigt wird die Gesamtzahl der jeweils gezählten Zellen, der Median der CD3-Expression, sowie die Totale Expression von CD3.

Probe		Zellzahl	Median	Totale Expression
Nicht stimuliert	1 µg Cas9 ohne sgRNA	62 345	25 038	2 501 296,2
	1 µg Cas9 und 5 µg sgRNA	44 408	14 054	1 035 779,8
Stimuliert	1 µg Cas9 ohne sgRNA	39 606	18 808	1 874 969,5
	1 µg Cas9 und 5 µg sgRNA	30 728	13 235	1 004 536,5

Somit wurde gezeigt, dass nach Elektroporation von Cas9 RNA und sgRNA, gegen die Alpha-Kette des endogenen TCRs, die Expression des endogenen TCR-Komplexes auf der Zelloberfläche verringert.

Um anschließend zu zeigen, dass ein erfolgreicher KO nicht nur zu einer Verringerung des endogenen TCRs auf der Zelloberfläche resultiert, erfolgte ein weiterer Nachweis auf genetischer Ebene. Die DNA mit Insertionen und Deletionen, die nach dem Doppelstrangbruch als Heteroduplex entstand, wurden von der T7-Endonuklease in zwei kürzere DNA-Fragmente geschnitten. Die Schnittrate korreliert hier direkt mit der Editingrate und kann zur Quantifizierung verwendet werden, indem die DNA-Fragmente anschließend durch eine

Elektrophorese voneinander getrennt werden. Das Verhältnis der Bandenintensitäten (ungeschnitten vs. geschnitten) entspricht der Editingrate.

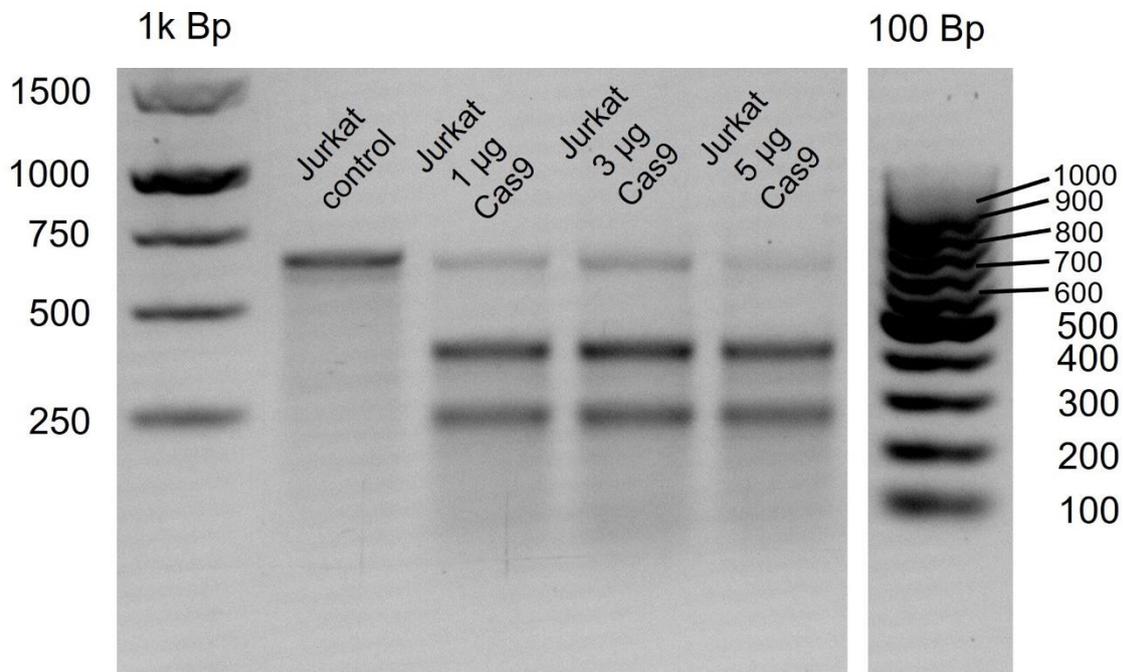


Abbildung 15: T7-Endonuclease-I-Assay der DNA von AdCAR-Jurkat mit und ohne KO von TCR-alpha.
 Von links nach rechts: **Spur 1** zeigt eine 1k Basenpaar-Leiter als Größenmarker. **Spur 2** zeigt eine DNA-Bande nicht-elektroporierter AdCAR-Jurkat-Zellen als Negativkontrolle für die Jurkat-Zelllinie. **Spur 3** zeigt drei DNA-Banden aus AdCAR-Jurkat-Zellen, elektroporiert mit 1 µg Cas9 mRNA und 1 µg sgRNA. **Spur 4** zeigt drei DNA-Banden aus AdCAR-Jurkat-Zellen, elektroporiert mit 3 µg Cas9 mRNA und 1 µg sgRNA. **Spur 5** zeigt drei DNA-Banden aus AdCAR-Jurkat-Zellen, elektroporiert mit 5 µg Cas9 mRNA und 1 µg sgRNA. **Spur 6** zeigt eine 100 Basenpaar-Leiter als weiterer Größenmarker.

Nach Auftrennung der DNA-Fragmente mittels Elektrophorese zeigte sich in der Kontrolle der Jurkat-Zellen eine DNA-Bande. Bei allen drei Ansätzen der Jurkat-Zellen, die mit unterschiedlicher Menge Cas9 RNA elektroporiert wurden, entstanden drei DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe. Eine Bande stimmte mit derer der Jurkat-Kontrolle überein, wohingegen die anderen beiden Banden im elektrischen Feld schneller wanderten und somit den Anteil zweier kürzerer DNA-Fragmente zeigten (Abbildung 15). Das Verhältnis der Banden, zwischen den zwei kurzen DNA-Fragmenten zu allen dreien, repräsentierte die Indel-Rate. Diese wurde mit Image-J verglichen, um einen prozentualen Wert zu erhalten.

Tabelle 27: Auswertung des KO nach T7-Endonuklease I Assay bei Jurkat-Zellen.

Gezeigt werden die Daten des T7-Endonuklease-I-Assays nach gelelektrophoretischer Auftrennung, analysiert mittels ImageJ als Tabelle. Das Integral nach Bestimmung durch ImageJ wird als cutting fraction (fcut) gezeigt und daraus die Indel-Rate berechnet.

	Jurkat-Zellen		
Ansatz	1 µg Cas9	3 µg Cas9	5 µg Cas9
fcut	0,923	0,873	0,933
Indel %	72,16	64,36	74,07

Wie ebenfalls schon durch die Oberflächenfärbung, während der Durchflusszytometrie gezeigt, bestätigte sich der erfolgreiche KO nach Analyse des T7-Endonuklease-I-Assays und nachfolgender Auswertung der Indel-Raten (Tabelle 27). Ein quantitativer Vergleich zur Oberflächenfärbung ist jedoch nicht gegeben.

Der T7-Endonuklease-I-Assay wurde ebenfalls bei den AdCAR-T-Zellen durchgeführt, um den KO auch hier auf genetischer Ebene nachzuweisen (n = 2). Auch hier zeigte sich eine Separierung der DNA-Banden.

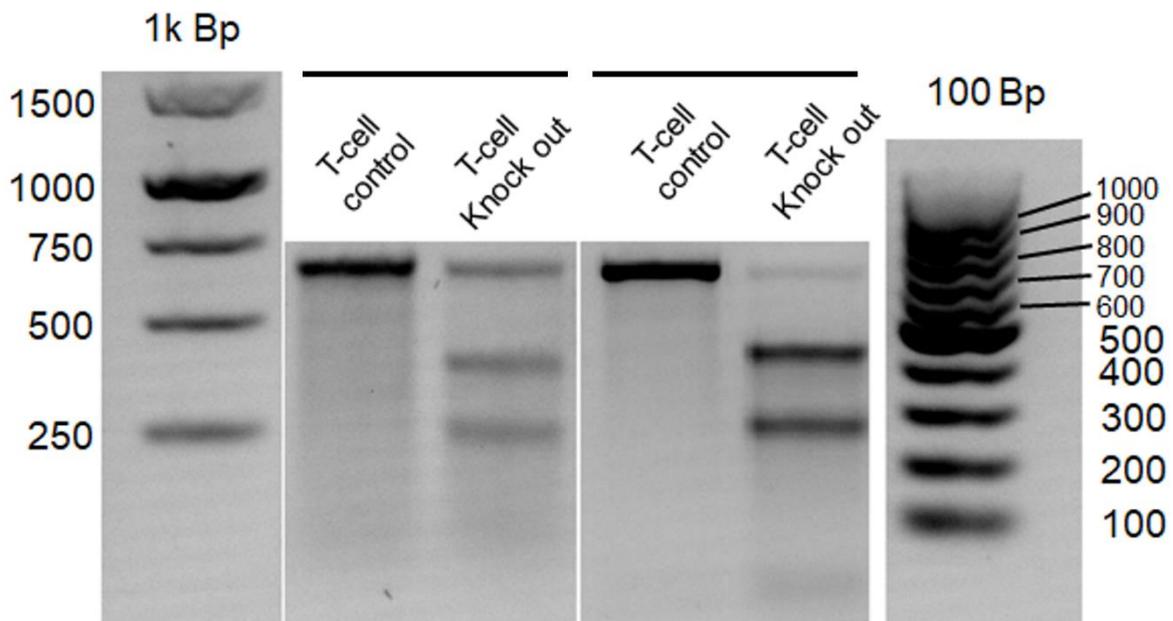


Abbildung 16: T7-Endonuklease-I-Assay der DNA von AdCAR-T-Zellen mit und ohne KO von TCR-alpha.

Elektrophorese analysierter DNA nach Durchführung eines T7-Endonuklease-I-Assays ohne und mit KO mittels Elektroporation von AdCAR-T-Zellen mit Cas9 mRNA und sgRNA.

Von Links nach rechts: **Spur 1** zeigt die 1k Basenpaar-Kontrollleiter als Größenmarker. **Spur 2** zeigt eine DNA-Bande nicht-elektroporierter AdCAR-T-Zellen (n=1). **Spur 3** zeigt drei DNA-Banden aus AdCAR-T-Zellen, elektroporiert mit 10 µg Cas9 mRNA und 10 µg sgRNA (n=1). **Spur 4** zeigt eine DNA-Bande nicht-elektroporierter AdCAR-T-Zellen des biologischen Replikats (n=2). **Spur 5** zeigt drei DNA-Banden aus AdCAR-T-Zellen des biologischen Replikats ebenfalls elektroporiert mit 10 µg Cas9 mRNA und 10 µg sgRNA (n=2).

Die Wiederholung des KO und Analyse nach gefolgtm T7-Endonuklease-I-Assay, ergab nach der gelelektrophoretischen Auftrennung erneut drei Banden unterschiedlich langer DNA-Fragmente (Abbildung 16). Ebenso konnte nach Auswertung der Banden mittels ImageJ eine erfolgreiche Indel-Rate berechnet werden (Tabelle 28).

Tabelle 28: Auswertung des KO nach T7-Endonuklease I Assay bei AdCAR-T-Zellen.

Gezeigt werden die Daten des T7-Endonuklease-I-Assays nach gelelektrophoretischer Auftrennung, analysiert mittels ImageJ als Tabelle. Das Integral nach Bestimmung durch ImageJ wird als cutting fraction (fcut) gezeigt und daraus die Indel-Rate berechnet.

DNA-Bande	AdCAR-T-Zellen (n=1)	AdCAR-T-Zellen (n=2)
Ansatz	1 µg Cas9	1 µg Cas 9
<i>fcut</i>	0,618	0,95
Indel %	38,20	77,59

Nach initial erfolgreicher Prüfung einer Methode um RNA in Jurkat-Zellen zu elektroporieren, wurde gezeigt, dass durch Elektroporation des CRISPR/Cas9-Systems zusammen mit einer passenden sgRNA, ein KO des endogenen TCRs in Jurkat-Zellen möglich war. Diese Methode wurde anschließend auf AdCAR-T-Zellen übertragen und zum einen durch Oberflächenfärbung der Zielstruktur bestätigt, aber auch auf DNA- Ebene mittels T7-Endonuklease-I.

4 Diskussion

4.1 Transfektionsvergleich

In der Gentherapie ist es grundlegend essenziell, einen effizienten Weg zu finden, um sowohl DNA als auch RNA in gewünschte Zielzellen einzuschleusen. Ziel dieser Arbeit war es, eine effiziente und kostengünstige Methode herauszukristallisieren. Hierzu wurden bereits etablierte Verfahren, wie die Calcium-Phosphat-Präzipitation (Kit und selbst-Titration), Polyethylenimin und Lipofectamin 2000 bzw. 3000 verwendet, um funktionelle RNA-Replikat in Zellen einzuschleusen [65-70].

Beim Vergleich der hier verwendeten Methoden ergab die Transfektion mittels einer Calcium-Phosphat-Präzipitation in der nachfolgenden durchflusszytometrischen Analyse die geringste eGFP-Fluoreszenz und somit das geringste Transfektionsergebnis. Zusätzlich erfolgte der Vergleich zwischen der Nutzung von selbst titriertem Calcium-Phosphat und einem CaPO_4 -Kit. Hier zeigte sich hinsichtlich der anschließend gemessenen Expression von eGFP, ein ähnliches Ergebnis. Eine Verbesserung der Transfektionseffizienz durch die Calcium-Phosphat Präzipitation könnte mittels verschiedener Verfahren erreicht werden: Da die Transfektion mittels dieser Methode maßgeblich von den Konzentrationen der Reagenzien, sowie Inkubationszeit und Temperatur abhängig ist, besteht die Möglichkeit einer Optimierung dieser Parameter. Da annähernd die gesamte DNA in unter einer Minute einen Komplex mit dem Calcium-Phosphat bildet und eine längere Inkubationszeit die anschließend gemessene Expression stark reduziert, wäre ein Ansatzpunkt die Verkürzung der Inkubationszeit. Eine weitere Möglichkeit bestünde in einer Variierung der Konzentrationen einzelner Reagenzien oder der Inkubationstemperatur [47]. Da die Expression von eGFP mittels Calcium-Phosphat im Vergleich zu den hier ebenfalls verwendeten Methoden jedoch ein deutlich schlechteres Ergebnis aufwies, wurde auf die Durchführung von Versuchen zur Optimierung der Transfektionsparameter verzichtet.

Mit deutlichem Unterschied zeigte die Transfektion mit Polyethylenimin als Vertreter der Polymere eine fünfzehnfach höhere eGFP-Expression als durch CaPO_4 . Polyethylenimin ist als breiter Vertreter der transienten Transfektion eine effiziente Alternative zur Lipofektion. Jedoch geht diese Methode mit einer großen Zytotoxizität bei niedriger Zellkonzentration (<60% Konfluenz) oder niedriger Transfektionseffizienz bei bspw. falscher Inkubationszeit einher [71].

Im Vergleich zu allen anderen Methoden ergab die Transfektion mittels LipofectamineTM3000 in der gemessenen durchflusszytometrischen Auswertung die höchste Expression. Die hier gewonnenen Ergebnisse konnten bereits durch Shi, B. et al. 2018 mit einer

Transfektionseffizienz von 90% durch LipofectamineTM3000 und 60% durch LipofectamineTM2000 gezeigt werden [72].

In Zusammenschau der Ergebnisse wurde für die weiteren Versuche entschieden, LipofectamineTM3000 zu nutzen, da hier die höchste Transfektionseffizienz erreicht werden konnte und somit die besten Bedingungen für die weitergehenden Versuche bestehen. Alternativ wären weitere Versuche möglich, um – wie oben beschrieben – die Verkürzung der Inkubationszeit, Inkubationstemperatur oder Variierung der Konzentrationen der einzelnen Reagenzien zu optimieren.

4.2 CARs ohne TCR

Das zweite Ziel der Arbeit war die Etablierung eines effizienten KO des Gens für die TCR-alpha-Kette. (*engl. TCR alpha chain* = TRAC), sodass die Alpha-Kette nicht mehr funktionell hergestellt werden kann und der endogene TCR nicht mehr als Komplex an der Zelloberfläche exprimiert wird. Im durchgeführten Vor-Versuch an Jurkat-Zellen zeigte sich die Verwendung von 1 µg Cas9-RNA ausreichend zur Erreichung eines effizienten KO. Auch der Nachweis des KO auf genetischer Ebene mittels T7-Endonuklease-I-Assay bestätigte eine hohe Indelrate (72.16 %) mit 1 µg Cas9-RNA.

Dies geht einher mit den bisherigen Ergebnissen der Veröffentlichung von *Jensen et. al.*, die eine Indelrate von 85 % erreichten [37, 73]. Neben dem CRISPR/Cas-System wurden bereits verschiedene Methoden entwickelt um Gene gezielt durch Doppelstrangbrüche auszuschalten. Zu den gängigsten Methoden gehören ZFN, und TALENs. Wie bereits gezeigt besitzen beispielsweise ZFN zwar eine enorme Spezifität, müssen jedoch für jedes Target spezifisch hergestellt werden. Da das CRISPR/Cas9-System bei einer hohen Verfügbarkeit die effizienteste und einfachste Handhabung aufweist, wurde sich in dieser Dissertation für die Verwendung dieses Systems und gegen ZFN oder TALENs entschieden [37, 43, 74-79].

4.3 Weiterführende Studien

Nach erfolgreicher Transfektion müssen die erhaltenen Zellpopulationen (CD3 positiv und negativ bzw. mit und ohne TCR) zur weiteren Nutzung der CAR-T Zellen jedoch getrennt werden. Hierzu können etablierte Verfahren wie beispielsweise der Magnetaktivierte Zelltrennung (*eng. Magnetic activated cell sorting*) (MACS) oder EasySepTM verwendet werden [80]. Die Magnetaktivierte Zelltrennung kann sehr zeitsparend durchgeführt werden und erreicht durch Wiederholung des Prozesses eine Trennungseffizienz von bis zu 99% [37], geht jedoch mit einem möglichen Zellverlust und großem Aufwand einher bezüglich

und Lagerung der Geräte [81]. Dennoch ist diese Methodik schonender für fragile Zellen als andere Zellsortierverfahren [82]. Hierbei werden magnetische Kügelchen mit entsprechenden Antikörpern oder Enzymen auf deren Oberfläche versehen. Für die Zelltrennung der in dieser Dissertation zu separierenden Zellen wären die Antikörper gegen CD3 gerichtet. AdCAR-T-Zellen mit endogenem TCR und CD3 wären somit mit magnetischen Beads versehen, die in einem magnetischem Feld von nicht-gebundenen AdCAR-T-Zellen ohne TCR und CD3 separierbar sind [80]. Eine alternative Zellsortierung stellt die durchflusszytometrische Zellsortierung mittels Fluoreszenzaktivierung (engl. fluorescence-activated cell sorting = FACS) dar. Ein großer Vorteil hierbei ist die Sortierung nach mehreren Merkmalen wie z.B. Zellgröße, Zelldichte und/oder Fluoreszenzmarkierung [83]. Ein großer Nachteil war früher die Sortiergeschwindigkeit mit maximal 500 Zellen pro Sekunde [83]. Mit der heutigen Technik ist dieser Nachteil mit 100 000 Zellen pro Sekunde eindeutig behoben [84]. Die Zellsortierung ermöglicht es annähernd reine Populationen von AdCAR-T-Zellen ohne endogenen TCR zu erhalten.

Zur Qualitätssicherung der KO-AdCAR-T Zellen müssen im Weiteren zwei wichtige Fragen beantwortet werden: 1) Sind während des CRISPR/Cas9 KO neben dem gewünschten KO auch KOs an weiteren Stellen im Genom der Zelle aufgetreten und 2) Erleiden die T-Zellen durch die Transfektion einen Funktionsverlust und verlieren ihre Zellodfunktion. Zur Evaluation möglicher ungewollter KOs können Integrase-defiziente lentivirale Vektoren (IDLV) genutzt werden [37, 85]. Diese sind von selbst nicht in der Lage sich in die intakte DNA zu integrieren. Da deren Endabschnitt aus bekannten, sich wiederholenden Sequenzen bestehen, ist es möglich, mit diesen IDLV jeden Doppelstrangbruch zu markieren [37, 85]. Die bekannten sich wiederholenden Sequenzen können mit einer linearen amplifikationsvermittelten PCR (LAM-PCR) oder einer uneingeschränkten LAM-PCR (nrLAM-PCR) amplifiziert werden. Die Amplikons stellen sich in der dann folgenden Gelelektrophorese als Bande dar. Ist nur ein einziger Doppelstrang erzeugt worden und somit an einer einzigen Stelle die IDLV integriert, so zeigt sich eine einzelne Bande. Sollten durch den KO sogenannte Off-Target-Effekte als weitere Doppelstrangbrüche entstanden sein, so zeigt sich dies in entweder einer zweiten Bande in der Gelelektrophorese oder einer „verwaschenen“ Bande, falls sich viele Doppelstrangbrüche entwickelt haben [85, 86]. Im Folgenden wäre dann eine Sequenzierung der einzelnen Amplikons sinnvoll. Falls sich sowohl in der Gelelektrophorese, als auch in der Sequenzierung lediglich eine Sequenz zeigt, wäre ein KO an ungewollten Stellen der DNA ausgeschlossen. Dies wäre eine Möglichkeit die Ergebnisse dieser Dissertation weiter zu verifizieren. Jedoch

lässt sich das nicht unbedingt auf Ad-CAR-T-Zellen von anderen Zellspendern übertragen, da das persönliche Genom in jedem Menschen unterschiedlich ist. Es könnten Spender existieren, deren persönliche DNA eine Sequenzvariante enthält, die als Off-Target fungiert [87, 88]. Die Guide-RNA würde sich an diese Sequenz binden und das CRISPR-Protein einen Off-Target-Effekt in Form eines Doppelstrangbruches verursachen. Hierbei wäre die Guide-RNA für das CRISPR-Protein zu unspezifisch [87]. Ein Ansatz dieses Problem zu beheben, wurde bereits untersucht. Durch Entfernung einiger Nukelotide vom 5'-Ende kann eine gekürzten Guide-RNA (engl. truncated gRNA = tru-gRNA) erzeugt werden. Dies kann die Off-Target-Rate der Doppelstrangbrüche reduzieren [87].

Bezüglich der Überprüfung der Funktion der KO-AdCAR-T-Zellen kann beispielsweise ein Killing-Assay durchgeführt werden. Bisher wurden hierbei *in vitro* funktionelle Killing-Assays mit CAR-T-Zellen in Zellkulturen mit Zielzellen verwendet. Hierbei bilden CAR-T-Zellen beim Kontakt mit antigenpräsentierenden Zellen lytische Granulome, die mittels FACS-Analyse gezeigt werden können [37]. Jedoch sind die Ergebnisse der *in vitro* Versuche mit den *in vivo*-Versuchen nicht immer vergleichbar [89]. Deshalb wurden bereits 3D-Modelle mit Sphäroiden entwickelt. Hierbei zeigen sich diverse Vorteile wie die Möglichkeit zur Darstellung des Sphäroidwachstums, der Zytotoxizität von CAR-T-Zellen und der Lyserate der Zielzellen [89, 90]. Um nachzuweisen, dass die in dieser Dissertation verwendeten AdCAR-T-Zellen nach dem KO des endogenen TCR auch weiterhin ihre gewünschte Funktion ausüben können, wäre ein Killing-Assay anzustreben. Beispiele hier wären der Luciferase-Assay, bei dem Biolumineszenz-Luciferase-Reportergene in Zielzellen transduziert werden. Da nur lebende Zellen das Luciferase-Substrat enzymatisch verarbeiten können, würde die Biolumineszenz, bei durch die AdCAR-T-Zellen erfolgreich angegriffenen Zellen, abnehmen [91]. Da die Halbwertszeit der Luciferase jedoch nur ungefähr 30 Minuten beträgt, beschränkt sich der Biolumineszenz-Luciferase-Assay nur auf Tests, bei denen sich die Zytotoxizität innerhalb kurzer Zeit ereignet [91]. Eine Alternative wäre die Testung mittels Durchflusszytometrie. Hierbei wird der Zelltod durch Propidiumjodid, das in die DNA interkalieren kann, markiert und kann durchflusszytometrisch gemessen werden [91]. Im Anschluss daran wäre als nächster Schritt ein *in vivo* Nachweis im Mausmodell zu etablieren. Bisher konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass AdCARs ohne KO in Mäusen eine Komplettremission ohne GvHD erzeugen konnten [31]. Um die AdCAR-T-Zellen mit KO des endogenen TCR ebenfalls *in vivo* zu testen, wäre hier ebenfalls der Versuch im Mausmodell anzustreben.

4.4 Schlussfolgerung

Das Ziel der Dissertationsarbeit war, Strategien zu entwickeln, die die klinische Anwendbarkeit von AdCAR-T Zellen verbessern könnten. Hierzu wurden zunächst ein Protokoll zur Verbesserung der Transfektionseffizienz etabliert und folgend das bereits bekannte Prinzip des KO des Gens für den endogenen TCR mittels CRISPR/Cas9 in CAR-T-Zellen auf AdCAR-T-Zellen übertragen. Der KO wurde sowohl mittels Durchflusszytometrie gezeigt, in dem auf der Zelloberfläche keine TCR- $\alpha\beta$ -Kette oder CD3-Kette angefärbt wurde, als auch auf genetischer Ebene, indem die Doppelstrangbrüche mittels T7-Endonuklease-I-Assay auf der Gelelektrophorese dargestellt wurden. Zusammenfassend kann mittels der Durchführung eines KO des endogenen TCRs eine große Limitation der AdCAR-T-Zell-Therapie überwunden werden, in dem die AdCAR-T-Zellen in ihrer Therapiefunktion nicht mehr nur auf den Spender-Patienten beschränkt sind. Es könnte sich somit ein größeres therapeutisches Spektrum erschließen um die AdCAR-T-Zell-Therapie schneller zugänglich, kostengünstiger und somit niederschwelliger erreichbar zu machen.

Um die weitere Funktion der AdCARs nachzuweisen sind weitere Schritte wie der Ausschluss von Off-Target-Effekten, gegebenenfalls die Reduktion von Off-Target-Effekten und funktionelle Tests sowohl *in vitro* als auch *in vivo* notwendig.

5 Zusammenfassung

In der Immunonkologie wurde neben den Immuncheckpoint-Inhibitoren und den bispezifischen Antikörpern in den letzten Jahren viel an den zellulären Immuntherapien geforscht. Etabliert sind mittlerweile diverse Therapien. Beim therapierefraktären B-Zell-Lymphom sind z.B. die zwei CAR-T-Zell-Therapien mit Axicabtagen-Ciloleucel und Tisagenlecleucel von der europäischen Zulassungsbehörde freigegeben und weisen Erfolge im Therapieverlauf auf. Leider sind derartige Therapien mit immensen Kosten und großem Aufwand verbunden. Die Produktion der CAR-T-Zellen nehmen einige Tage in Anspruch, da die patienteneigenen T-Zellen zunächst vom Patienten extrahiert werden müssen, in verschiedenen Schritten mit dem CAR versehen werden und anschließend stimuliert werden müssen. Bisher werden Lentiviren, hergestellt, die das Gen, kodierend für den CAR, beinhalten und anschließend das Gen in die isolierten T-Zellen *ex vivo* transduzieren. Die Herstellung der Lentiviren erfolgt mittels Transfektion. Um die effizienteste Transfektionsmethode zu evaluieren, wurden im ersten Teil dieser Arbeit verschiedene Transfektionsverfahren verglichen. Es erfolgte der Vergleich der

Calciumphosphat-Präzipitation sowohl als Kit, als auch selbst hergestellt. Weiterhin wurde die Effizienz der Transfektion mittels LipofectamineTM2000, LipofectamineTM3000, als auch Polyethylenimin evaluiert. Es zeigte sich, dass LipofectamineTM3000 die effizienteste Methode ist, um eine hohe Rate an Transfektion zu erhalten. Vor diesem Hintergrund baute sich der zweite Teil dieser Arbeit auf, indem die für die weiteren CAR-T-Zell-Produktion LipofectamineTM3000 verwendet wurde.

Die CARs selbst – sofern bereits hergestellt – beschränken sich mit ihrer therapeutischen Wirksamkeit nur auf das für sie spezifische Antigen und somit auf eine therapeutische Indikation. Um diese Limitation zu überwinden, wurden von Christian Seitz et. al. der AdCAR entwickelt. Ein Adapter-CAR, der nicht gegen ein spezifisches Antigen gerichtet ist, sondern gegen Biotin. Durch Zugabe von Antikörpern, gerichtet gegen gewünschte Antigene, die zusätzlich Biotin enthalten, wirken diese als Adapter. Die Antikörper binden an die gewünschten Antigene an der Tumorzelle und präsentieren Biotin. Die AdCAR-T-Zelle erkennt das Biotinlabel und bindet somit über den Antikörper an die Tumorzelle. Somit kann die Limitation der Indikation überwunden werden. Neben der Indikationsbeschränkung bestehen weitere Limitationen wie z.B. die der allogenen Anwendungen. Werden T-Zellen von Patienten isoliert und *ex vivo* mit AdCARs versehen, ist eine autologe Verwendung problemlos. Bei allogenen Verwendungen besteht die Gefahr der GvHR durch den endogenen TCR, der initial bereits auf den T-Zellen vorlag. Um die Limitation der drohenden GvHR zu überwinden, beschäftigt sich der zweite Teil dieser Arbeit. Ziel war es das Gen, codierend für den endogenen TCR mittels CRISPR/Cas9 auszuschalten, damit der endogene TCR nicht mehr produziert werden kann und somit keine GvHR ausgelöst werden kann. Als Vorlage wurde die Veröffentlichung von Jensen et. al. verwendet, die den KO bereits an anderen CAR-T-Zellen zeigen konnten und in dieser Arbeit auf die AdCAR-T-Zellen übertragen [37]. Als Vorversuch erfolgte der KO auf Jurkat-Zellen, die sich dadurch charakterisieren, einen endogenen TCR zu besitzen und leicht anzuzüchten sind. Durch Adressieren der alpha-Kette des endogenen TCR mittels Guide-RNA konnte ein Doppelstrangbruch erzeugt werden. Im Anschluss wurde sowohl in der Durchflusszytometrie das Fehlen der endogenen TCRs, als auch auf genetischer Ebene mittels T7-Endonuklease-I Assay der Nachweis der Doppelstrangbrüche gezeigt. Im Anschluss erfolgte das gleiche Verfahren im Anschluss mit den Ad-CAR-T-Zellen. Hierbei konnte ebenfalls ein erfolgreicher KO des Gens sowohl in der Durchflusszytometrie als auch auf genetischer Ebene gezeigt werden. Die Ergebnisse zeigen, dass ein gezielter KO des Gens, kodierend für die alpha-Kette des endogenen TCR dazu führt, dass dieser nicht mehr auf der

Zelloberfläche exprimiert werden kann und somit ein wichtiger Faktor für eine drohende GvHR eliminiert werden kann.

Supplements:

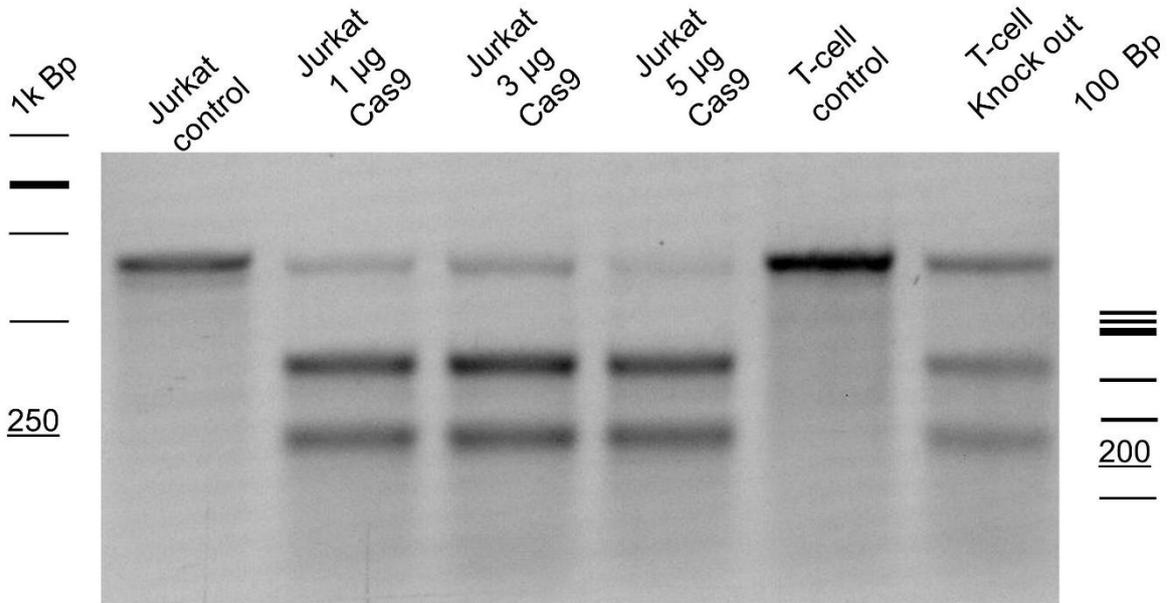


Abbildung 17: T7-Endonuklease-I-Assay der DNA von AdCAR-Jurkat und AdCAR-T-Zellen mit und ohne KO von TCR-alpha. Initialbild vor Zusammenschnitt zur besseren Übersicht.

Von links nach rechts: Der linke Rand zeigt eine schematische 1k Basenpaar-Leiter als Größenmarker. Spur 1 zeigt eine DNA-Bande nicht-elektroporierter AdCAR-Jurkat Zellen als Negativkontrolle für die Jurkat-Zelllinie. Spur 2 zeigt drei DNA-Banden aus AdCAR-Jurkat-Zellen, elektroporiert mit 1 µg Cas9 mRNA und 1 µg sgRNA. Spur 3 zeigt drei DNA-Banden aus AdCAR-Jurkat-Zellen, elektroporiert mit 3 µg Cas9 mRNA und 1 µg sgRNA. Spur 4 zeigt drei DNA-Banden aus AdCAR-Jurkat-Zellen, elektroporiert mit 5 µg Cas9 mRNA und 1 µg sgRNA. Spur 5 zeigt eine DNA-Bande nicht-elektroporierter AdCAR-T-Zellen als Negativkontrolle für die T-Zelllinie. Spur 6 zeigt eine schematische 100 Basenpaar-Leiter als weiterer Größenmarker

6 Literaturverzeichnis

1. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
2. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
3. Hanahan, D., *Hallmarks of Cancer: New Dimensions*. Cancer Discov, 2022. **12**(1): p. 31-46.
4. Waldman, A.D., J.M. Fritz, and M.J. Lenardo, *A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice*. Nature Reviews Immunology, 2020. **20**(11): p. 651-668.
5. Shim, H., *Bispecific Antibodies and Antibody-Drug Conjugates for Cancer Therapy: Technological Considerations*. Biomolecules, 2020. **10**(3).
6. Website, F. *FDA approves first cancer treatment for any solid tumor with a specific genetic feature*. 2017 10.04.2023]; Available from: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-cancer-treatment-any-solid-tumor-specific-genetic-feature?source=govdelivery>.
7. Kantarjian, H., et al., *Blinatumomab versus Chemotherapy for Advanced Acute Lymphoblastic Leukemia*. New England Journal of Medicine, 2017. **376**(9): p. 836-847.
8. Paijens, S.T., et al., *Tumor-infiltrating lymphocytes in the immunotherapy era*. Cell Mol Immunol, 2021. **18**(4): p. 842-859.
9. Delves, P.J. and I.M. Roitt, *The immune system*. New England journal of medicine, 2000. **343**(1): p. 37-49.
10. Murphy, K. and W.C.J. Immunologie, 9. Aufl. 2018, Berlin: Springer Spektrum.
11. Kang, J. and D.H. Raulet. *Events that regulate differentiation of $\alpha\beta$ TCR+ and $\gamma\delta$ TCR+ T cells from a common precursor*. in *Seminars in immunology*. 1997. Elsevier.
12. Davis, M.M. and P.J. Bjorkman, *T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition*. Nature, 1988. **334**(6181): p. 395-402.
13. Mariuzza, R.A., P. Agnihotri, and J. Orban, *The structural basis of T-cell receptor (TCR) activation: An enduring enigma*. Journal of Biological Chemistry, 2020. **295**(4): p. 914-925.
14. Hauth, F., et al., *Radiotherapy to Enhance Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapeutic Efficacy in Solid Tumors: A Narrative Review*. JAMA oncology, 2021. **7**(7): p. 1051-1059.
15. Titov, A., et al., *The biological basis and clinical symptoms of CAR-T therapy-associated toxicities*. Cell Death & Disease, 2018. **9**(9): p. 897.
16. Fitzgerald, J.C., et al., *Cytokine Release Syndrome After Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia*. Crit Care Med, 2017. **45**(2): p. e124-e131.
17. Zhang, C., et al., *Engineering car-t cells*. Biomarker research, 2017. **5**(1): p. 1-6.
18. Chmielewski, M., A.A. Hombach, and H. Abken, *Of CAR s and TRUCK s: chimeric antigen receptor (CAR) T cells engineered with an inducible cytokine to modulate the tumor stroma*. Immunological reviews, 2014. **257**(1): p. 83-90.
19. Hoyos, V., et al., *Engineering CD19-specific T lymphocytes with interleukin-15 and a suicide gene to enhance their anti-lymphoma/leukemia effects and safety*. Leukemia, 2010. **24**(6): p. 1160-1170.

20. Brentjens, R.J., et al., *CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia*. *Science translational medicine*, 2013. **5**(177): p. 177ra38-177ra38.
21. Kalos, M., et al., *T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia*. *Science translational medicine*, 2011. **3**(95): p. 95ra73-95ra73.
22. Grupp, S.A., et al., *Chimeric antigen receptor–modified T cells for acute lymphoid leukemia*. *New England Journal of Medicine*, 2013. **368**(16): p. 1509-1518.
23. Pegram, H.J., et al., *Tumor-targeted T cells modified to secrete IL-12 eradicate systemic tumors without need for prior conditioning*. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 2012. **119**(18): p. 4133-4141.
24. Chmielewski, M. and H. Abken, *TRUCKs: the fourth generation of CARs*. *Expert opinion on biological therapy*, 2015. **15**(8): p. 1145-1154.
25. Schuster, S.J., et al., *Chimeric Antigen Receptor T Cells in Refractory B-Cell Lymphomas*. *New England Journal of Medicine*, 2017. **377**(26): p. 2545-2554.
26. Neelapu, S.S., et al., *Axicabtagene CiloleuceL CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma*. *New England Journal of Medicine*, 2017. **377**(26): p. 2531-2544.
27. Schaff, N., *The Landscape of CAR-T Cell Clinical Trials against Solid Tumors—A Comprehensive Overview*. *Cancers*, 2020. **12**(9): p. 2567.
28. Gust, J., et al., *Cytokines in CAR T cell–associated neurotoxicity*. *Frontiers in Immunology*, 2020: p. 3271.
29. Lamers, C.H., et al., *Treatment of metastatic renal cell carcinoma with CAIX CAR-engineered T cells: clinical evaluation and management of on-target toxicity*. *Molecular therapy*, 2013. **21**(4): p. 904-912.
30. Wu, C.-Y., et al., *Remote control of therapeutic T cells through a small molecule–gated chimeric receptor*. *Science*, 2015. **350**(6258): p. aab4077.
31. Seitz, C.M., et al., *Novel adapter CAR-T cell technology for precisely controllable multiplex cancer targeting*. *Oncolmmunology*, 2021. **10**(1): p. 2003532.
32. Hau, J.M.-Y., *Präklinische Evaluation des Adapter CAR Systems (AdCAR-T)*. 2021, Universität Tübingen.
33. Anasetti, C., et al., *Effect of HLA incompatibility on graft-versus-host disease, relapse, and survival after marrow transplantation for patients with leukemia or lymphoma*. *Human immunology*, 1990. **29**(2): p. 79-91.
34. Anasetti, C., et al., *Effect of HLA compatibility on engraftment of bone marrow transplants in patients with leukemia or lymphoma*. *New England Journal of Medicine*, 1989. **320**(4): p. 197-204.
35. Jagasia, M.H., et al., *National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. The 2014 diagnosis and staging working group report*. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2015. **21**(3): p. 389-401. e1.
36. Martin, P.J., et al., *First-and second-line systemic treatment of acute graft-versus-host disease: recommendations of the American Society of Blood and Marrow Transplantation*. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2012. **18**(8): p. 1150-1163.
37. Osborn, M.J., et al., *Evaluation of TCR gene editing achieved by TALENs, CRISPR/Cas9, and megaTAL nucleases*. *Molecular Therapy*, 2016. **24**(3): p. 570-581.

38. Brochu, S., et al., *Massive activation-induced cell death of alloreactive T cells with apoptosis of bystander postthymic T cells prevents immune reconstitution in mice with graft-versus-host disease*. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 1999. **94**(2): p. 390-400.
39. Meunier, M.-C., et al., *Tissue distribution of target antigen has a decisive influence on the outcome of adoptive cancer immunotherapy*. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 2003. **101**(2): p. 766-770.
40. Bibikova, M., et al., *Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases*. *Science*, 2003.
41. Boch, J., et al., *Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors*. *Science*, 2009. **326**(5959): p. 1509-1512.
42. Jinek, M., et al., *A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity*. *science*, 2012. **337**(6096): p. 816-821.
43. Eid, A. and M.M. Mahfouz, *Genome editing: the road of CRISPR/Cas9 from bench to clinic*. *Experimental & molecular medicine*, 2016. **48**(10): p. e265-e265.
44. Freshney, R.I., *Basic principles of cell culture*. *Culture of cells for tissue engineering*, 2006: p. 11-14.
45. Jang, T.H., et al., *Cryopreservation and its clinical applications*. *Integrative medicine research*, 2017. **6**(1): p. 12-18.
46. Graham, F.L. and A.J. van der Eb, *A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA*. *virology*, 1973. **52**(2): p. 456-467.
47. Jordan, M., A. Schallhorn, and F.M. Wurm, *Transfecting Mammalian Cells: Optimization of Critical Parameters Affecting Calcium-Phosphate Precipitate Formation*. *Nucleic Acids Research*, 1996. **24**(4): p. 596-601.
48. Chen, Y., *Calcium phosphate transfection of eukaryotic cells*. *Bio-protocol*, 2012: p. e86-e86.
49. Pandey, A.P. and K.K. Sawant, *Polyethylenimine: A versatile, multifunctional non-viral vector for nucleic acid delivery*. *Materials Science and Engineering: C*, 2016. **68**: p. 904-918.
50. Rejman, J., A. Bragonzi, and M. Conese, *Role of clathrin-and caveolae-mediated endocytosis in gene transfer mediated by lipo-and polyplexes*. *Molecular Therapy*, 2005. **12**(3): p. 468-474.
51. Zabner, J., et al., *Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid*. *Journal of Biological Chemistry*, 1995. **270**(32): p. 18997-19007.
52. Bonetta, L., *The inside scoop—evaluating gene delivery methods*. *Nature Methods*, 2005. **2**(11): p. 875-883.
53. Godbey, W., K.K. Wu, and A.G. Mikos, *Poly (ethylenimine) and its role in gene delivery*. *Journal of controlled release*, 1999. **60**(2-3): p. 149-160.
54. Dunlap, D.D., et al., *Nanoscope structure of DNA condensed for gene delivery*. *Nucleic acids research*, 1997. **25**(15): p. 3095-3101.
55. Minagawa, K., et al., *Direct observation of the biphasic conformational change of DNA induced by cationic polymers*. *FEBS letters*, 1991. **295**(1-3): p. 67-69.
56. Lesch, H., et al., *Production and purification of lentiviral vectors generated in 293T suspension cells with baculoviral vectors*. *Gene therapy*, 2011. **18**(6): p. 531-538.
57. Tsong, T.Y., *Electroporation of cell membranes*, in *Electroporation and electrofusion in cell biology*. 1989, Springer. p. 149-163.
58. Kotnik, T., et al., *Cell membrane electroporation-Part 1: The phenomenon*. *IEEE Electrical Insulation Magazine*, 2012. **28**(5): p. 14-23.
59. Givan, A.L., *Flow cytometry: first principles*. 2013: John Wiley & Sons.

60. Shapiro, H., *Parameters and probes: flow cytometric detection of apoptosis*. Practical flow cytometry, 3rd ed. New York: Wiley-Liss, Inc, 1995: p. 308-309.
61. Ishmael, F.T. and C. Stellato, *Principles and applications of polymerase chain reaction: basic science for the practicing physician*. Annals of Allergy, Asthma & Immunology, 2008. **101**(4): p. 437-443.
62. Mashal, R.D., J. Koontz, and J. Sklar, *Detection of mutations by cleavage of DNA heteroduplexes with bacteriophage resolvases*. Nature genetics, 1995. **9**(2): p. 177-183.
63. Lee, P.Y., et al., *Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments*. JoVE (Journal of Visualized Experiments), 2012(62): p. e3923.
64. Ran, F.A., et al., *Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system*. Nature protocols, 2013. **8**(11): p. 2281-2308.
65. Ho, Y. and H. Too, *Development of a laboratory scalable process for enhancing lentivirus production by transient transfection of HEK293 adherent cultures*. Gene Therapy, 2020: p. 1-13.
66. Lee, J. and M. Welsh, *Enhancement of calcium phosphate-mediated transfection by inclusion of adenovirus in coprecipitates*. Gene therapy, 1999. **6**(4): p. 676-682.
67. Tang, Y., et al., *Optimization of lentiviral vector production using polyethylenimine-mediated transfection*. Oncology letters, 2015. **9**(1): p. 55-62.
68. Merten, O.-W., M. Hebben, and C. Bovolenta, *Production of lentiviral vectors*. Molecular Therapy-Methods & Clinical Development, 2016. **3**: p. 16017.
69. van der Loo, J.C. and J.F. Wright, *Progress and challenges in viral vector manufacturing*. Human molecular genetics, 2016. **25**(R1): p. R42-R52.
70. Kuroda, H., et al., *Simplified lentivirus vector production in protein-free media using polyethylenimine-mediated transfection*. Journal of virological methods, 2009. **157**(2): p. 113-121.
71. Yang, S., et al., *Optimized PEI-based transfection method for transient transfection and lentiviral production*. Current Protocols in Chemical Biology, 2017. **9**(3): p. 147-157.
72. Shi, B., et al., *An improved method for increasing the efficiency of gene transfection and transduction*. International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology, 2018. **10**(2): p. 95.
73. Cong, L., et al., *Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems*. Science, 2013. **339**(6121): p. 819-23.
74. Xu, P., et al., *Both TALENs and CRISPR/Cas9 directly target the HBB IVS2–654 (C> T) mutation in β -thalassemia-derived iPSCs*. Scientific reports, 2015. **5**(1): p. 1-12.
75. Antony, J.S., et al., *Gene correction of HBB mutations in CD34+ hematopoietic stem cells using Cas9 mRNA and ssODN donors*. Molecular and cellular pediatrics, 2018. **5**(1): p. 1-7.
76. Mahiny, A.J., et al., *In vivo genome editing using nuclease-encoding mRNA corrects SP-B deficiency*. Nature biotechnology, 2015. **33**(6): p. 584-586.
77. Durai, S., et al., *Zinc finger nucleases: custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells*. Nucleic acids research, 2005. **33**(18): p. 5978-5990.
78. Ureña-Bailén, G., et al., *CRISPR/Cas9 technology: towards a new generation of improved CAR-T cells for anticancer therapies*. Briefings in Functional Genomics, 2020. **19**(3): p. 191-200.
79. Sapranauskas, R., et al., *The Streptococcus thermophilus CRISPR/Cas system provides immunity in Escherichia coli*. Nucleic acids research, 2011: p. gkr606.

80. Miltenyi, S., et al., *High gradient magnetic cell separation with MACS*. Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology, 1990. **11**(2): p. 231-238.
81. Tang, W., et al., *Recent advances in microfluidic cell sorting techniques based on both physical and biochemical principles*. Electrophoresis, 2019. **40**(6): p. 930-954.
82. Schmitz, B., et al., *Magnetic activated cell sorting (MACS)--a new immunomagnetic method for megakaryocytic cell isolation: comparison of different separation techniques*. Eur J Haematol, 1994. **52**(5): p. 267-75.
83. Orfao, A. and A. Ruiz-Argüelles, *General concepts about cell sorting techniques*. Clinical biochemistry, 1996. **29**(1): p. 5-9.
84. [20.08.2022]; Available from: <https://flow.usc.edu/faqs/sorting-faqs-2/>.
85. Gabriel, R., et al., *An unbiased genome-wide analysis of zinc-finger nuclease specificity*. Nature biotechnology, 2011. **29**(9): p. 816-823.
86. Paruzynski, A., et al., *Genome-wide high-throughput integrome analyses by nrLAM-PCR and next-generation sequencing*. Nature protocols, 2010. **5**(8): p. 1379-1395.
87. Lessard, S., et al., *Human genetic variation alters CRISPR-Cas9 on-and off-targeting specificity at therapeutically implicated loci*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2017. **114**(52): p. E11257-E11266.
88. Herring-Nicholas, A., et al., *Selection of Extended CRISPR RNAs with Enhanced Targeting and Specificity*. bioRxiv, 2023: p. 2023.01. 11.523593.
89. Dillard, P., et al., *A spheroid killing assay by CAR T cells*. JoVE (Journal of Visualized Experiments), 2018(142): p. e58785.
90. Amann, A., et al., *Development of an innovative 3D cell culture system to study tumour-stroma interactions in non-small cell lung cancer cells*. PloS one, 2014. **9**(3): p. e92511.
91. Kiesgen, S., et al., *Comparative analysis of assays to measure CAR T-cell-mediated cytotoxicity*. Nature protocols, 2021. **16**(3): p. 1331-1342.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die experimentell-praktische Arbeit wurde in der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin unter Betreuung von apl.Prof. Dr. Michael Kormann durchgeführt. Nach dem Erstellen einer präfinalen Version der Promotionsschrift wurde die Promotionsbetreuung von Herrn Apl. Prof. Dr. rer. nat. Stephan Huber übernommen.

Die Konzeption der Arbeit erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Christian Seitz, Arzt in der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Dr. Patrick Schlegel, Arzt in der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin und Prof. Dr. Michael Kormann, Professor und Arbeitsgruppenleiter der Genomik in der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin.

Die Versuche wurden (nach Einarbeitung durch Dr. rer. nat. Justin Antony Selvaraj, Dr. med. Patrick Schlegel, Dr. med. Christian Seitz, Ngadhnjim Latifi) von mir (in Zusammenarbeit mit Dr. med. Patrick Schlegel und Dr. med. Christian Seitz und mit Unterstützung durch Ngadhnjim Latifi) durchgeführt. (Die Antikörperfärbung von CD3 wurde durch Dr. med. Patrick Schlegel durchgeführt. Die AdCAR-T-Zell-Produktion und Stimulation wurden durch Dr. med. Patrick Schlegel und Dr. med. Christian Seitz durchgeführt).

Die durchflusszytometrische Auswertung des erfolgte nach Anleitung durch Dr. AKM Ashiquil Haque und Ngadhnjim Latifi durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig (nach Anleitung durch Prof. Dr. Stephan Huber, Prof. Dr. Franziska Eckert) verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 19.07.2024

8 Danksagung

Mein Dank gilt allen Personen, die mich bei dieser Dissertation unterstützt haben.

Prof. Dr. Michael Kormann danke ich für die Möglichkeit, dieses Projekt zu beginnen und in seinem Laborteam mitarbeiten zu können.

Dr. Patrick Schlegel und Dr. Christian Seitz danke ich, für die Möglichkeit an diesem Kooperationsprojekt mitzuwirken und die wissenschaftliche sowie praktische Unterstützung.

Dr. AKM Ashiqul Haque, Brian Weidensee, und Dr. Justin Antony Selvaraj danke ich für die Unterstützung in der Zeit im Labor und ihre Weitergabe an wissenschaftlicher Erfahrung.

Ngadhnjim Latifi danke ich für seine stetige Unterstützung in all der Zeit. Ebenso danke ich ihm für seine Geduld, Bereitschaft und seinen Humor in der Zeit in und nach dem Labor, der diese Zeit unvergesslich gemacht hat.

Prof. Dr. Daniel Zips danke für die Möglichkeit, innerhalb des Berufslebens diese Dissertation fortzuführen und seine Lehre der wissenschaftlichen Arbeit.

Ich danke meiner wundervollen Frau Franziska, die moralisch als auch motivierend stets an meiner Seite stand.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Stephan Huber und Prof. Dr. Franziska Eckert, die mir die Unterstützung gaben, diese Dissertation zu beenden und die Promotionsbetreuung übernahmen. Ohne euch wäre es mir nicht möglich gewesen, diese Dissertation zu vollenden.