



**Fakultät für Medizin**

**II. Medizinische Klinik und Poliklinik**

## **T-Zell-Rezeptor transgene T-Zellen als Immuntherapie und Zellvehikel für das Vesikuläre Stomatitis Virus als kombinierter Ansatz zur Behandlung der Akuten Myeloischen Leukämie**

**Michael Karl Melzer**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades

**eines Doktors der Medizin (Dr. med.)**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Jürgen Schlegel

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Oliver Ebert
2. Priv.-Doz. Dr. Martina Anton
3. apl. Prof. Dr. Per Sonne Holm

Die Dissertation wurde am 01.08.2019 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 10.03.2020 angenommen.



# Inhaltsverzeichnis

I	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	4
II	TABELLENVERZEICHNIS	6
III	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
IV	ZUSAMMENFASSUNG	5
<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>6</b>
<b>1.1</b>	<b>AML</b>	<b>6</b>
1.1.1	Allgemeines zur AML	6
1.1.2	Immuntherapien bei der AML	7
1.1.3	Immunescape von AML-Zellen	8
<b>1.2</b>	<b>Onkolytische Viren in der Krebstherapie</b>	<b>10</b>
1.2.1	Allgemeines zu onkolytischen Viren	10
1.2.2	Onkolytische Virotherapie bei AML	12
1.2.3	Das Vesikuläre Stomatitis Virus (VSV)	14
1.2.4	Das VSV als onkolytisches Virus	15
<b>1.3</b>	<b>Transgene T-Zellen</b>	<b>17</b>
1.3.1	Allgemeines zu transgenen T-Zellen	17
1.3.2	TZR-T-Zellen	18
1.3.3	CAR-T-Zellen	19
1.3.4	Transgene T-Zellen und das VSV	20
<b>2</b>	<b>ZIELSETZUNG</b>	<b>25</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>26</b>
<b>3.1</b>	<b>Material</b>	<b>26</b>
3.1.1	Chemikalien	26
3.1.2	Verbrauchsmaterialien	28
3.1.3	Kits	31
3.1.4	Durchflusszytometrie-Antikörper	32
3.1.5	Lebend-Tot-Färbungen	33
3.1.6	Immunfluoreszenz-Antikörper	33
3.1.7	Geräte	33
3.1.8	Software	36
3.1.9	RT-PCR	36
3.1.10	Primer-Sequenzen	37
3.1.11	DNA-Vektoren	37
3.1.12	Zellkulturmedien und –zusätze	37
3.1.13	Zytokine	39
3.1.14	Kulturmedien	39
3.1.15	Puffer und Lösungen	40
3.1.16	Zelllinien	40
3.1.17	Mauslinie	42
3.1.18	Anzahl verwendeter Mäuse in jedem Experiment	42

<b>3.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>47</b>
3.2.1	Isolation von humanen T-Zell-Populationen	47
3.2.2	Aktivierung und Kultur von T-Zellen	49
3.2.3	Kultur von Zelllinien	50
3.2.4	Trypanblau-Untersuchung	50
3.2.5	Testungen der Zellvitalität	51
3.2.6	Verwendete rekombinante Vesikuläre Stomatitis Viren	52
3.2.7	Virusquantifizierung	53
3.2.8	Virusinfektion	54
3.2.9	Retrovirale genetische Modifikation von Zellen	55
3.2.10	Überführung der transduzierten Zellen auf Sicherheitsstufe S1	56
3.2.11	Durchflusszytometrie/FACS	59
3.2.12	Immunfluoreszenz	60
3.2.13	ELISA	61
3.2.14	Tierversuche	61
3.2.15	Histologie, Immunhistologie, Nekrosequantifizierung	63
3.2.16	Statistische Auswertung	64
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>65</b>
<b>4.1</b>	<b>Identifizierung der als Shuttle für das VSV am besten geeigneten T-Zell-Population</b>	<b>65</b>
4.1.1	T-Zell-Vitalität und virale Genexpression nach VSV-Infektion	65
4.1.2	Virustiter in verschiedenen T-Zell-Populationen	68
4.1.3	Kinetik der viralen Genexpression und Replikation in T-Zellen	69
4.1.4	Kinetik der Replikation des VSV in J76-Zellen	71
<b>4.2</b>	<b>Interaktion von VSV mit CD8<sup>+</sup>-Tcm</b>	<b>75</b>
4.2.1	Vitalität der CD8 <sup>+</sup> -Tcm nach VSV-Infektion	75
4.2.2	Replikation des VSV in CD8 <sup>+</sup> -Tcm	76
4.2.3	Infektionseffizienz bei CD8 <sup>+</sup> -Tcm	78
4.2.4	Übertragung von infektiösen Virionen von CD8 <sup>+</sup> -Tcm an andere Zellen	80
<b>4.3</b>	<b>Behandlung von ML2-Leukämie-Zellen in vitro</b>	<b>83</b>
4.3.1	Abtötung von ML2-Zellen durch das VSV	84
4.3.2	Produktion von VSV durch ML2-Zellen	85
4.3.3	Therapie von ML2-Zellen durch eine Kombination aus TZR-T-Zellen und VSV	86
4.3.4	Erhaltene T-Zell-Funktionalität in einer Kombinationstherapie	94
4.3.5	Erhaltene virale Replikation in einer Kombinationstherapie	96
<b>4.4</b>	<b>In vivo: Toxizitätsstudie</b>	<b>100</b>
4.4.1	Testung unterschiedlicher Virusdosen im Mausmodell	100
4.4.2	Bestimmung einer sicheren Dosis für das VSV in NSG-Mäusen	102
4.4.3	Nachweis von VSV in bestimmten Organen der Mäuse	103
<b>4.5</b>	<b>Behandlung von NSG-Mäusen mit ML2-Tumoren</b>	<b>107</b>
4.5.1	Bestimmung der T-Zell-Akkumulation in den ML2-Tumoren	107
4.5.2	Replikation des VSV in ML2-Tumoren	112
4.5.3	Effektivität der Tumorabtötung in den NSG-Mäusen	115
<b>4.6</b>	<b>Gesamtüberleben und Tumorwachstum</b>	<b>123</b>
4.6.1	Tumorwachstum	123
4.6.2	Gesamtüberleben und Tumorrelapse nach Therapie	125
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>129</b>
<b>5.1</b>	<b>Identifizierung der am besten geeigneten T-Zell-Population für den VSV-Transport</b>	<b>129</b>

<b>5.2</b>	<b>Interaktion des VSV mit CD8<sup>+</sup>-Tcm</b>	<b>131</b>
<b>5.3</b>	<b>Behandlung von ML2-Leukämie-Zellen in vitro</b>	<b>133</b>
<b>5.4</b>	<b>MTD</b>	<b>136</b>
<b>5.5</b>	<b>Kinetik in den ML2-Tumoren</b>	<b>138</b>
<b>5.6</b>	<b>Tumorwachstum</b>	<b>140</b>
<b>5.7</b>	<b>Überleben</b>	<b>141</b>
<b>6</b>	<b>FAZIT UND AUSBLICK</b>	<b>143</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>144</b>
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>158</b>

# I Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Limitationen der systemischen Virotherapie.....	11
Abbildung 2: Strategie zur Überwindung der Limitationen systemischer Virotherapie .....	12
Abbildung 3: Limitationen adoptiver T-Zell-Therapie .....	18
Abbildung 4: Mögliche synergistische Effekte der Kombination aus Viro- und T-Zell-Therapie .....	23
Abbildung 5: Gewinnung von PBMC mittels Dichtegradientenzentrifugation .....	48
Abbildung 6: Exemplarische Darstellung der FACS-Sorting-Strategie.....	49
Abbildung 7: Exemplarische Standardkurve der Vitalitätsuntersuchung der ML2-Zellen durch Messung der Luciferase-Aktivität .....	52
Abbildung 8: Exemplarische Darstellung einer Gelelektrophorese eines erfolgreichen Downgradings transduzierter T-Zellen.....	58
Abbildung 9: Murines Modellsystem .....	63
Abbildung 10: Virale GFP-Expression in unterschiedlichen T-Zell-Populationen nach 24h ....	66
Abbildung 11: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der viralen Genexpression in verschiedenen T-Zell-Populationen nach 24h.....	67
Abbildung 12: Anteil toter T-Zellen in verschiedenen T-Zell-Populationen 24h nach der Infektion mit dem rVSV-GFP .....	68
Abbildung 13: Virale Titer 24h nach Infektion unterschiedlicher T-Zell-Populationen mit einer MOI von 1 .....	69
Abbildung 14: Kinetik der Abtötung unterschiedlicher T-Zell-Populationen durch das rVSV- GFP .....	70
Abbildung 15: Kinetik der viralen Replikation in unterschiedlichen T-Zell-Populationen.....	71
Abbildung 16: Repräsentativer FACS-Dotplot der GFP-Expression in J76-Zellen 24h nach der Infektion mit dem rVSV-GFP .....	72
Abbildung 17: Dosisabhängige virale Genexpression in J76-Zellen .....	73
Abbildung 18: Dosisabhängige virale Replikation in J76-Zellen .....	74
Abbildung 19: Vitalität der CD8 <sup>+</sup> -Tcm nach einer Infektion durch das VSV .....	76
Abbildung 20: Produktion von VSV durch CD8 <sup>+</sup> -Tcm .....	77
Abbildung 21: Immunfluoreszenzmikroskopie infizierter CD8 <sup>+</sup> -Tcm .....	78
Abbildung 22: Infektionseffizienz des VSV bei CD8 <sup>+</sup> -Tcm .....	79
Abbildung 23: Nachweis des Zusammenhanges zwischen viraler Genexpression und initialer Infektionsdosis bei BHK21-Zellen.....	81
Abbildung 24: Von CD8 <sup>+</sup> -Tcm überführbare infektiöse VSV .....	83
Abbildung 25: Kinetik der Abtötung von ML2-Zellen durch das VSV .....	85
Abbildung 26: Replikation des VSV in ML2-Zellen .....	86
Abbildung 27: Effizienz einer Kombinationstherapie aus T-Zellen und VSV zur Abtötung von ML2B7-Fluc-Zellen 24h nach Beginn der Therapie .....	89
Abbildung 28: Effizienz einer Kombinationstherapie aus T-Zellen und VSV zur Abtötung von ML2B7-Fluc-Zellen 48h nach Beginn der Therapie .....	90
Abbildung 29: Effizienz einer Kombinationstherapie aus T-Zellen und VSV zur Abtötung von ML2B15-Fluc-Zellen 24h nach Beginn der Therapie .....	92
Abbildung 30: Effizienz einer Kombinationstherapie aus T-Zellen und VSV zur Abtötung von ML2B15-Fluc-Zellen 48h nach Beginn der Therapie .....	93
Abbildung 31: IFN- $\gamma$ -Produktion in der Mischkultur aus ML2-Zellen und infizierten T-Zellen nach 24h .....	95

Abbildung 32: IFN- $\gamma$ -Produktion in der Mischkultur aus ML2-Zellen und infizierten T-Zellen nach 48h .....	96
Abbildung 33: Produktion des VSV 24h nach Beginn der Mischkultur aus ML2-Zellen und infizierten T-Zellen .....	98
Abbildung 34: Produktion des VSV 48h nach Beginn der Mischkultur aus ML2-Zellen und infizierten T-Zellen .....	99
Abbildung 35: Überlebenszeitkurve der MTD-Studie .....	102
Abbildung 36: Quantitativer Virusnachweis im Gehirn von Mäusen aus der MTD-Studie...	104
Abbildung 37: Prozentsatz der Mäuse einer Gruppe mit nachgewiesenem Virus im Gehirn während der MTD-Studie .....	104
Abbildung 38: Quantitativer Virusnachweis in der Leber von Mäusen aus der MTD-Studie	105
Abbildung 39: Quantitativer Virusnachweis in der Milz von Mäusen aus der MTD-Studie..	106
Abbildung 40: Quantitativer Virusnachweis in der Lunge von Mäusen aus der MTD-Studie	106
Abbildung 41: T-Zell-Akkumulation im ML2B7-Tumor .....	108
Abbildung 42: T-Zell-Akkumulation im ML2B15-Tumor .....	109
Abbildung 43: Immunhistochemischer Nachweis infiltrierender CD3 <sup>+</sup> -T-Zellen im ML2B7-Tumor.....	111
Abbildung 44: Immunhistochemischer Nachweis von T-Zell-Nestern im ML2B7-Tumor .....	112
Abbildung 45: Titer des VSV in den ML2B7-Tumoren zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Beginn der Therapie.....	113
Abbildung 46: Titer des VSV in den ML2B15-Tumoren zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Beginn der Therapie.....	114
Abbildung 47: Reduktion der GFP <sup>+</sup> -Zellen im ML2B7-Tumor zu unterschiedlichen Zeitpunkten .....	116
Abbildung 48: Reduktion der GFP <sup>+</sup> -Zellen im ML2B15-Tumor zu unterschiedlichen Zeitpunkten.....	117
Abbildung 49: Histologischer Schnitt zur Analyse des Anteils der Nekrose im Tumor .....	118
Abbildung 50: Nekroseinduktion im ML2B7-Tumor zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Therapiebeginn .....	120
Abbildung 51: Nekroseinduktion im ML2B15-Tumor zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Therapiebeginn .....	121
Abbildung 52: Histologische Nachweis von Nekrose im ML2B7-Tumor 120h nach Therapiebeginn .....	122
Abbildung 53: Histologischer Nachweis von Nekrose im ML2B15-Tumor 120h nach Therapiebeginn .....	123
Abbildung 54: Tumorwachstum der ML2B7-Tumoren nach Beginn der Behandlung .....	125
Abbildung 55: Überlebenskurve der NSG-Mäuse mit ML2B7-Tumor nach Therapie .....	127
Abbildung 56: HLA-B07:02-Verlust bei ML2B7-Tumoren in vivo .....	128

## II Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Abkürzungsverzeichnis .....	7
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien .....	26
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien und Gegenstände .....	28
Tabelle 4: Kits.....	31
Tabelle 5: Antikörper für die Durchflusszytometrie .....	32
Tabelle 6: Lebend-Tot-Färbungen für die Durchflusszytometrie .....	33
Tabelle 7: Antikörper für die Immunfluoreszenz .....	33
Tabelle 8: Verwendete Geräte.....	33
Tabelle 9: Verwendete Software .....	36
Tabelle 10: Reverse-Transkriptase PCR.....	36
Tabelle 11: Primer.....	37
Tabelle 12: DNA-Vektoren .....	37
Tabelle 13: Zellkulturmedien und -zusätze .....	37
Tabelle 14: Zytokine.....	39
Tabelle 15: Zusammensetzung der Kulturmedien .....	39
Tabelle 16: Zusammensetzung der Puffer .....	40
Tabelle 17: Verwendete Zelllinien und primäre Zellen .....	40
Tabelle 18: Verwendete Mauslinie .....	42
Tabelle 19: Auflistung der Anzahl verwendeter Mäuse in der MTD-Studie .....	42
Tabelle 20: Auflistung der Anzahl der verwendeten Tumoren zur Analyse der T-Zell- Infiltration im ML2B7-Tumor .....	42
Tabelle 21: Auflistung der Anzahl der verwendeten Tumoren zur Analyse der T-Zell- Infiltration im ML2B15-Tumor .....	43
Tabelle 22: Auflistung der Anzahl der verwendeten Tumoren zur Analyse der viralen Replikation im ML2B7-Tumor .....	43
Tabelle 23: Auflistung der Anzahl der verwendeten Tumoren zur Analyse der viralen Replikation im ML2B15-Tumor .....	43
Tabelle 24: Auflistung der Anzahl der verwendeten Tumoren zur Analyse GFP <sup>+</sup> -Zellen im ML2B7-Tumor .....	44
Tabelle 25: Auflistung der Anzahl der verwendeten Tumoren zur Analyse GFP <sup>+</sup> -Zellen im ML2B15-Tumor .....	44
Tabelle 26: Auflistung der Anzahl der verwendeten Tumoren zur Analyse der Nekrose im ML2B7-Tumor .....	44
Tabelle 27: Auflistung der Anzahl der verwendeten Tumoren zur Analyse der Nekrose im ML2B15-Tumor .....	45
Tabelle 28: Anzahl aller Mäuse für die Untersuchung des Tumorwachstums bis Tag 10 nach Therapiebeginn .....	45
Tabelle 29: Anzahl der in die Überlebensstudie eingeschlossenen Mäuse .....	45
Tabelle 30: Auflistung des Pipettieransatzes für die RT-PCR .....	57
Tabelle 31: Zeitliche Abfolge der PCR-Schritte .....	58
Tabelle 32: Toxische Ereignisse in unterschiedlichen Gruppen während der MTD-Studie ..	101



### III Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 1: Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	Anti/gegen	DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindole
#	Anzahl	DC	Dendritische Zelle
°C	Grad Celsius	ddH <sub>2</sub> O	Doppelt destilliertes Wasser
7AAD	7-Aminoactinomycin D	DEPC	Dethylidicarbonat
AML	Akute myeloische Leukämie	DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
APC	Allophycocyanin	DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
ATCC	American Type Culture Collection	DNS	Desoxyribonukleinsäure
BHK-21	Baby Hamster Kidney	ds	Doppelsträngig, Doppelstrang-
bp	Basenpaar	E:T	Effektor zu Target
BSA	Bovines Serum Albumin	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Ca	Calcium	ELISA	Enzyme linked immunosorbent Assay
CAR	Chimärer Antigen Rezeptor	EtOH	Ethanol
CD	Cluster of Differentiation	FACS	Fluorescence activated Cell Sorting
CD8 <sup>+</sup> -Tcm	CD8 <sup>+</sup> Zentrale-Gedächtnis-T-Zelle	FBS	Fetales bovines Serum
CIK	cytokine-induced killer	FcR	Fc-Rezeptor
CML	Chronische myeloische Leukämie	FCS	Fetales Kalbsserum
CPE	Zytopathischer Effekt	FDA	Food und Drug administration USA
CRS	Cytokine-Release-Syndrom	FITC	Fluorescein Isothiocyanat
CTLA-4	Cytotoxic T lymphocyte-associated Protein 4	FSC	Forward scatter
Cy	Cyanin	fwd	Forward/vorwärts
DAMP	Danger associated Molecular Pattern	G	Glykoprotein
		gDNA	Genomische DNA

GFP	Enhanced green fluorescent protein
GITR	Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor-related protein
GMEM	Glasgow Minimum Essential Medium
GvHD	Graft-versus-host-disease/ Spender-gegen-Empfänger-Krankheit
GvL	Graft-versus-leukemia Effekt/ Spender-gegen-Leukämie-Effekt
h	Stunden
h	Human
HE	Hämatoxylin&Eosin
HLA	Human leucocyte antigen/ Humanes Leukozytenantigen-System
HRP	Horse raddish peroxidase/Meerrettich Peroxidase
HS	Humanes Serum
HSV-1	Herpes Simplex Virus-1
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenös
IDO	Indolamin 2,3-Dioxygenase
IFN	Interferon
IFN- $\alpha$	Interferon alpha
IFN- $\beta$	Interferon beta
IFN- $\gamma$	Interferon gamma

IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
ING-4	Inhibitor of growth family 4
iRFP	Near infrared fluorescent Protein
J76	Jurkat76
kb	Kilobase
kDa	Kilo-Dalton
KIR	Killer Immunoglobuline-like Rezeptor
l	Liter
L	Large polymerase protein/Großes Polymerase Protein
LAK	lymphokine-activated Killer
LB	Luria Bertani
M	Matrix protein
M	Molar
m	Maus-, murin
mDC	Myeloische Dendritische Zelle
MDSC	Myeloische Suppressive Zellen/ Myeloid-derived suppressor cells
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
mg	Milligramm
Mg	Magnesium
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minuten
ml	Milliliter

mm	Millimeter
mM	Millimolar
mMDSC	Monozytische Myeloische Suppressive Zellen
MOI	Multiplicity of infection/Infektionsdosis pro Zelle
MPO	Myeloperoxidase
mRNA	Messenger RNA/ Boten RNS
MW	Mittelwert
N	Normal
N	Nukleoprotein
NaOH	Natriumhydroxidlösung/ Natronlauge
NK	Natürliche Killer
NKG2D	Natural killer group 2 member D
NOS	nitric oxide synthase
NSCLC	Non-small cell lung cancer
NSG	NOD. Cg-Prkdc <sup>scid</sup> Il2rg <sup>tm1Wjl</sup> /SzJ
OD	Optische Dichte
OV	Onkolytisches Virus
P	Phosphoprotein
p.i.	Post Infektion
p.i.	Post Injektion
P/S	Penicillin-Streptomycin
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern

PBMC	Peripheral blood mononuclear cells/ einkernige Zellen aus dem peripheren Blut
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PBS-T	PBS Tween-20
PCR	Polymerase chain reaction/ Polymerasekettenreaktion
PD-1	Programmed cell death Protein 1
pDC	Plasmazytoide Dendritische Zelle
PDL-1	Programmed cell death Protein 1 Ligand 1
PE	Phycoerythrin
PFU	Plaque forming unit/ Plaque bildende Einheit
PI	Propidium-Iodid
qPCR	Quantitative PCR
qRT-PCR	Quantitative Reverse Transkription PCR
r	rekombinant
RBC	Red blood cell/ Erythrozyt
rcf	Relative centrifugal force/ relative Zentrifugenkraft
RD114	293Vec-RD114™
rev	Reverse/ rückwärts
RLU	Relative luciferase units/ Relative Luciferase Einheiten
RNA	Ribonucleic acid
RNS	Ribonukleinsäure

rpm	Revolutions per minute/ Umdrehungen pro Minute
RT	Raum Temperatur
RT-PCR	Reverse Transkription PCR
rVSV	Rekombinantes VSV
s	Sekunde
s.c.	Subkutan
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium Dodecyl Sulphat
SEM	Standard error of the mean/ Standardfehler des Mittelwertes
SPF	Speziell Pathogen Frei
sr39tk	Semi-random <sup>39</sup> Thymidin Kinase (Mutierte Version der tk)
ss	Single strand/Einzelstrang-
SSC	Side scatter
TAA	Tumor assoziiertes Antigen
TAE	Tris-acetate-EDTA
TCID <sub>50</sub>	Tissue culture infectious dose 50
T <sub>cm</sub>	Zentrale-Gedächtnis T-Zelle
T <sub>em</sub>	Effektor-Gedächtnis-T-Zelle
TIL	tumor-infiltrating lymphocytes
tk	Thymidin Kinase
TK	Tyrosinkinase
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
Treg	Regulatorische T-Zelle

TZR	T-Zell-Rezeptor
TZR-T-Zelle	T-Zell-Rezeptor transgene T-Zelle
U	Units
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
Vgl.	Vergleiche
VSV	Vesikuläres Stomatitis Virus
w/v	Gewicht pro Volumen
Wt	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem
μ	Mikro

## IV Publikationsliste

Im Rahmen dieses Promotionsprojektes sind die in folgender Tabelle aufgelisteten Publikationen entstanden. Daten aus diesen Publikationen finden sich größtenteils auch im Ergebnisteil wieder. In dieser Dissertationsschrift finden sich nur solche Daten aus der Publikation, die auch von mir selbst erstellt wurden.

Art der Publikation	Titel	Journal	Autoren	Jahr der Publikation	Zitat
Original Article	Enhanced Safety und Efficacy of Oncolytic VSV Therapy by Combination with T Cell Receptor Transgenic T Cells as Carriers	Molecular Therapy Oncolytics	<b>Melzer, M. K.</b> Zeitlinger, L. Mall, S. Steiger, K. Schmid, R. M. Ebert, O. Krackhardt, A. Altomonte, J.	2019	(Melzer, Zeitlinger et al. 2019)
Review	Oncolytic Vesicular Stomatitis Virus as a Viro-Immunotherapy: Defeating Cancer with a "Hammer" und "Anvil"	Biomedicines	<b>Melzer, M. K.</b> Lopez-Martinez, A. Altomonte, J.	2017	(Melzer, Lopez-Martinez et al. 2017)

## V Zusammenfassung

Die akute myeloische Leukämie (AML) stellt eine häufige, ernstzunehmende und teilweise schwierig zu therapierende Erkrankung dar. Insbesondere bei älteren Patienten und Kindern sind die Therapieoptionen stark eingeschränkt. Das Gesamtüberleben aller Patienten ist trotz stetigen Fortschritts bei der Behandlung der AML immer noch bescheiden.

Innovative Therapieformen bei hämatologischen und anderen Neoplasien stellen die onkolytische Virotherapie und adoptive Zelltherapie mit transgenen T-Zellen dar. Die onkolytische Virotherapie zeigt hierbei direkte zytotoxische sowie auch immunstimulatorische Effekte, wohingegen die adoptive T-Zell-Therapie vor allem durch ihre Präzision bei der Antigenselektivität und der Etablierung eines Immungedächtnisses gegen Tumorantigene hervorsteicht.

In dieser Arbeit wird eine Kombinationstherapie aus T-Zell-Rezeptor transgenen T-Zellen (TZR-T-Zellen) und dem onkolytischen Vesikulären Stomatitis Virus (VSV) zur Behandlung der AML getestet. Hierbei zeigt sich, dass das VSV von T-Zellen vermehrt wird und eine potente Lyse von AML-Zellen hervorrufen kann. T-Zellen unterstützen hierbei nicht nur die Vervielfachung des VSV, sondern zeigen auch synergistische Effekte zur Abtötung von AML-Zellen. Hierbei ergibt sich kein Hinweis darauf, dass sich die Therapiepartner in ihrer jeweiligen Funktion stark einschränken. Im Maussystem zeigen sich bei einer Kombinationstherapie höhere virale Titer im Tumorgewebe sowie eine effektivere, zuverlässigere Tumorabtötung als bei einer Monotherapie mit dem VSV. Insgesamt besteht eine geringere Toxizität als bei einer VSV-Monotherapie. Gegenüber einer Monotherapie von Antigen exprimierenden Tumoren mit TZR-T-Zellen zeigt sich ein schnellerer Effekt bei der Minderung der Tumoralität. Zudem vermag die Kombinationstherapie auch Tumoren abzutöten, die von den TZR-T-Zellen nicht erkannt werden.

Insgesamt ergeben sich in dieser Studie Hinweise, dass eine Kombinationstherapie aus TZR-T-Zellen und VSV potentiell synergistische Effekte zur Behandlung der AML gegenüber jeder der Monotherapien aufweist.

## 2 Einleitung

### 2.1 AML

#### 1.1.1 Allgemeines zur AML

In Deutschland ist die AML (akute myeloische Leukämie) mit 80% die häufigste akute Leukämieform mit stark zunehmender Inzidenz ab einem Alter von 50 Jahren (Kraywinkel und Spix 2017). Die AML stellt eine heterogene Gruppe von Leukämieerkrankungen dar, wobei eine Einteilung anhand morphologischer Kriterien nach der FAB-Klassifikation (French, American, British) (Bennett, Catovsky et al. 1976) und anhand genetischer, morphologischer und anderer Kriterien nach der WHO-Klassifikation erfolgen kann (Arber, Orazi et al. 2016). Je nach Unterform unterscheidet sich die Prognose, jedoch gibt es insgesamt eher eine bescheidene Gesamtüberlebensrate (Kraywinkel und Spix 2017, Song, Peng et al. 2018). Eine Heilung kann mit steigender Tendenz bei rund einem Drittel der unter 60-jährigen Patienten erreicht werden, wohingegen der Therapieerfolg bei den über 60-jährigen Patienten wesentlich geringer ist (Shah, Andersson et al. 2013). Fünf-Jahres-Überlebensraten reichen in Deutschland von 4,6% bei den über 75-jährigen bis hin zu 60,2% bei den unter 35-jährigen (Kraywinkel und Spix 2017). Besonders ältere Patienten sehen sich bei Diagnosestellung nur einer eingeschränkten Anzahl an wirksamen Therapieformen gegenüber, was sich negativ auf die Prognose dieser Patienten auswirkt (Colovic, Colovic et al. 2012, Dohner, Estey et al. 2017). Obwohl mittlerweile auch bei älteren Patienten aggressivere und neuere Therapieschemata verfolgt werden, ist deren Anwendung oftmals auf Patienten mit geringer Komorbidität beschränkt (Colovic, Colovic et al. 2012, Brandwein, Zhu et al. 2017). Auch die Toleranz älterer Patienten gegenüber aggressiven Chemotherapieschemata ist reduziert (Dohner, Weisdorf et al. 2015, Brandwein, Zhu et al. 2017). Kinder sind ebenso stark gefährdet, da besonders durch Leukostase und Blutungen ein schneller Tod durch die Krankheit eintreten kann (Creutzig, Rossig et al. 2016). Erstlinientherapien beinhalten noch immer Induktionstherapieschemata gefolgt von Konsolidierungstherapien (Dohner, Estey et al. 2017, O'Donnell, Tallman et al. 2017). Nachfolgend werden allogene Stammzelltransplantationen erwogen (Dohner, Weisdorf et al. 2015, Dohner, Estey et al. 2017, O'Donnell, Tallman et al. 2017). Ein wohl bekannter und oft publizierter Effekt bei Stammzelltransplantation ist der Graft-versus-Leukämie-Effekt, bei dem sich das transferierte Immunsystem gegen verbliebene Leukämiezellen wendet (Negrin 2015). Eine damit verwandte, aber unerwünschte Folge ist die Graft-versus-Host-Krankheit, bei der

es zu einer Reaktion der transplantierten Zellen gegen den Körper des Empfängers kommt (Dohner, Weisdorf et al. 2015, Negrin 2015).

Eine Alternative zu herkömmlichen Chemotherapeutika in der Behandlung der AML stellen verschiedene FLT-3-TKI (fms like tyrosine kinase-3-Tyrosinkinaseinhibitoren), wie in den zitierten Übersichtsarbeiten genannt, dar (Chen, Pan et al. 2017, Hospital, Green et al. 2017). Diese wurden u.a. in Kombinationen mit herkömmlichen Chemotherapeutika untersucht (Stone, Mandrekar et al. 2017). Und obwohl diese Kombination ein besseres Gesamtüberleben gegenüber alleiniger Chemotherapie zeigte, traten schwere Nebenwirkungen in ähnlichem Maße auf (Stone, Mandrekar et al. 2017). Die FLT-3-TKI kommen für Patienten in Betracht, die ein durch Mutation aktivitätsgesteigertes FLT-3-TKI-Gen haben (Weisberg, Boulton et al. 2002). Verschiedene Resistenzmechanismen gegen einen FLT-3-TKI können im Laufe der Therapie auftreten, was deren Einsatz im weiteren Verlauf limitiert (Chen, Pan et al. 2017, Hospital, Green et al. 2017). Weitere Therapieoptionen für ältere Patienten sind bspw. demethylierende Substanzen mit einem möglicherweise besseren Therapieergebnis in bestimmten Untergruppen (Oh, Park et al. 2017). Insgesamt betrachtet besteht also noch weiterer Bedarf an wirksamen Therapeutika zur Behandlung der AML. Nach dieser allgemeinen Einführung zur AML wird in den kommenden Abschnitten auf die für dieses Dissertationsthema relevanten spezielleren Therapiemöglichkeiten, insbesondere die Immuntherapie, eingegangen.

### 1.1.2 Immuntherapien bei der AML

Als weitere Therapiemöglichkeiten zur Behandlung der AML wurden in unterschiedlichen Studien bereits Antikörper gegen Leukämiezellen, welche sich z.B. gegen die Antigene CD33 (Candoni, Papayannidis et al. 2018) oder CD123 (He, Busfield et al. 2015) richten, untersucht. Dabei sind die Antikörper unter anderem an zytotoxische Substanzen (Candoni, Papayannidis et al. 2018) gekoppelt oder werden als Radioimmuntherapien mit an Antikörper gekoppelten radioaktiven Isotopen verwendet (Rosenblatt, McDevitt et al. 2010).

Auch immunmodulatorische Substanzen wie Lenalidomid (Visani, Ferrara et al. 2017) oder Immuncheckpoint-Inhibitoren in Kombination mit demethylierenden Substanzen (Daver, Garcia-Manero et al. 2019) werden als Therapiemöglichkeiten für die AML untersucht.

Eine weitere immuntherapeutische Strategie ist die Vakzinierung gegen verschiedene Tumorantigene. Eine Impfung mit dendritischen Zellen, die ein Tumorantigen exprimieren, wurde



bereits an Patienten untersucht (Van Tendeloo, Van de Velde et al. 2010, Anguille, Van de Velde et al. 2017). Auch Impfstrategien mit Tumorpeptiden wurden bereits getestet (Brayer, Lancet et al. 2015).

Daneben können NK-Zellen bei Patienten als experimentelle Therapiemöglichkeit zur Behandlung der AML eingesetzt werden (Curti, Ruggeri et al. 2011, Curti, Ruggeri et al. 2016). Weiterhin sind CAR-T-Zellen (Chimärer-Antigen-Rezeptor transgene T-Zellen) (Gomes-Silva, Atila et al. 2019) und TZR-T-Zellen (T-Zell-Rezeptor transgene T-Zellen) (Xue, Gao et al. 2010, Tawara, Kageyama et al. 2017) Ziel von Untersuchungen zur Therapie der AML. Erwähnung finden sollte auch die potentielle Anwendung von LAKs (Lymphokine activated killer Zellen), TILs (Tumor infiltrating Lymphocytes), CIKs (Cytokine induced killer Zellen), auch wenn diese bei hämatologischen Neoplasien schwierig ist (Yang, Zhang et al. 2017).

An und für sich gibt es zu jeder dieser Therapieformen eine immense Anzahl an Studien, was die Relevanz der Thematik hervorhebt. Da aber in dieser Arbeit speziell auf die onkolytische Virotherapie und T-Zell-Therapie der AML eingegangen wird, beschränkt sich die Einleitung auf diese Auflistung der unterschiedlichen Ansätze.

Es sind einige interessante immuntherapeutische Ansätze zur Behandlung der AML beschrieben, jedoch ist die Immuntherapie bei der AML kompliziert, da sich AML-Zellen auf unterschiedliche Art und Weise der Effektivität eines immuntherapeutischen Ansatzes entziehen können. Die unterschiedlichen Schwierigkeiten einer immuntherapeutischen Therapie werden im Folgenden geschildert.

### 1.1.3 Immunescape von AML-Zellen

Trotz dieser Vielzahl unterschiedlicher immuntherapeutischer Ansätze zur Behandlung der AML entzieht sich die AML durch verschiedenste Mechanismen oft der Wirkung der Immuntherapeutika (Yang, Zhang et al. 2017). Zum einen können AML-Zellen die Abtötung durch NK-Zellen unterbinden, indem sie verschiedene Rezeptoren, die die Effektivität der Killer-Zellen vermindern, wie bspw. KIR-Liganden (Killer cell immunoglobuline like receptor) (Shen, Linn et al. 2016) und sowohl oberflächenexprimierte als auch lösliche GITR-Liganden (Glucocorticoid-induced TNFR-related protein) (Baessler, Krusch et al. 2009), exprimieren (Lion, Willemen et al. 2012).

Ebenfalls kann die Antitumor-T-Zell-Antwort durch die Expression von immunsuppressiven Molekülen wie z.B. der IDO (Indolamin-2,3-Dioxygenase) (Folgiero, Goffredo et al. 2014, Mansour, Zayed et al. 2016) und die Aktivierung von Immuncheckpoint-Signalwegen wie PD-1 (Programmed cell death protein 1) und CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) (Pistillo, Tazzari et al. 2003, Laurent, Palmisano et al. 2007, Yang, Bueso-Ramos et al. 2014, Tan, Chen et al. 2017) gehemmt werden. Für die Beschreibung und Entdeckung der Immuncheckpoint-Signalwege wurde 2018 schließlich der Nobelpreis für Physiologie und Medizin an James Allison und Tasuku Honjo verliehen. Weitere Mechanismen sind die eingeschränkte Fähigkeit der T-Zellen, eine funktionierende immunologische Synapse mit AML-Zellen zu bilden und diese zu zerstören (Le Dieu, Taussig et al. 2009). Weiterhin werden T-Zellen am Eintritt in den Zellzyklus gehindert und die Produktion proinflammatorischer Zytokine eingeschränkt (Buggins, Milojkovic et al. 2001). Außerdem wurde in Mausmodellen beobachtet, dass die AML mit einer Thymusatrophie und einer reduzierten Anzahl an CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen im peripheren Blut einhergeht, wohingegen die Zahl der Tregs erhöht ist (Driss, Quesnel et al. 2015). Bei Menschen zeigte sich in einer Studie eine positive Korrelation zwischen der Anwesenheit einer großen Anzahl von T-Zellen im Knochenmark und einem guten klinischen Outcome bei der AML (Ismail und Abdulateef 2017). Weiterhin sind die Ansichten über einen Zusammenhang zwischen der Anzahl von immunsuppressiven Tregs (regulatorische T-Zellen) im Knochenmark bzw. Blut und dem Verlauf einer AML diskrepant (Lamble und Lind 2018). So zeigten sich erhöhte Werte von Tregs bei AML-Patienten vor und nach Chemotherapie verglichen mit gesunden Kontroll-Personen (Szczepanski, Szajnik et al. 2009, Ersvaer, Liseth et al. 2010, Kanakry, Hess et al. 2011). Zudem scheint es einen inversen Zusammenhang zwischen der Anzahl der Tregs und dem Überleben zu geben (Shenghui, Yixiang et al. 2011). Eine andere Studie zeigt hingegen, dass eine erhöhte Anzahl von Tregs mit einem besseren Überleben einhergeht (Menter, Kuzmanic et al. 2017). Diskrepanzen können sich hier bspw. aufgrund der unterschiedlichen Messzeitpunkte (vor/ nach Therapiebeginn) oder auch aufgrund der Heterogenität der AML ergeben.

Eine weitere Strategie der AML-Zellen, der Erkennung durch das Immunsystem zu entgehen, besteht darin, die Oberflächenexpression von HLA-Molekülen (Human leucocyte antigen) einzuschränken, wodurch die Erkennung von Leukämiezellen durch T-Zellen eingeschränkt wird (Brouwer, van der Heiden et al. 2002). Auch Makrophagen mit einem immunsuppressiven (M2-)Phänotyp scheinen zum speziellen Milieu der AML zu gehören (Mussai, De Santo et al.

2013, Al-Matary, Botezatu et al. 2016). Genauso sind auch MDSC (Meyloid-derived suppressor cells) an Immunsuppression und Erkrankungsprogression bei der AML beteiligt (Pyzer, Stroopinsky et al. 2017).

Auch wenn man hier den Eindruck erhält, dass viele Mechanismen, die zu einem Immun-Escape der AML führen, bereits beschrieben wurden, so ist das Immunmilieu bei der AML letzten Endes nur unzureichend verstanden (Lamble und Lind 2018).

Es zeigen sich also diverse Mechanismen, die dazu führen, dass AML-Zellen vom Immunsystem nicht erkannt bzw. beseitigt werden können. Zusammengefasst sind dies im Wesentlichen die Inhibierung von NK-Zell- und T-Zell-Funktion, die Schaffung eines immunsuppressiven Milieus durch Tregs, M2-Makrophagen und MDSC und schließlich die Herabregulierung von Oberflächenmarkern, die zur Erkennung durch das Immunsystem führen könnten. Insgesamt sind also einige Schwierigkeiten bei der Immuntherapie der AML zu überwinden.

In dieser Arbeit soll unter anderem darauf eingegangen werden, welche unterschiedlichen Möglichkeiten eine Kombination aus TZR-T-Zellen und dem VSV diesem immunsuppressiven Milieu der AML entgegenwirken können. Zum besseren Verständnis wird in den nächsten Abschnitten auf die allgemeinen Grundsätze der onkolytischen Virotherapie eingegangen, bevor eine kurze Schilderung des aktuellen Standes der Virotherapie bei der AML im Besonderen erfolgt.

## 2.2 Onkolytische Viren in der Krebstherapie

### 2.2.1 Allgemeines zu onkolytischen Viren

Die ersten Versuche zur Krebsbehandlung mit onkolytischen Viren reichen bereits bis in die Mitte des letzten Jahrhunderts zurück (Kelly und Russell 2007). Nach einer Periode in den 1970er und 1980er Jahren, in der wenig zu diesem Thema geforscht wurde, gab es dann weitere relevante Publikationen zu Beginn der 1990er Jahre (Kelly und Russell 2007). Onkolytische Viren zeichnen sich unter anderem dadurch aus, dass sie überwiegend selektiv in Krebszellen replizieren und diese zerstören (Marelli, Howells et al. 2018). Eines dieser Viren hat es nach seiner klinischen Zulassung 2015 in das Portfolio der Therapieoptionen bei nicht resezierbaren Melanomen geschafft (Andtbacka, Kaufman et al. 2015, Coffin 2016, Pol, Kroemer et al. 2016). Hierbei handelt es sich um Talimogen laherparepvec, ein Herpes-Simplex-Virus-1, das als Transgen einen GM-CSF (Granulozyten-/Monozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor) enthält

(Pol, Kroemer et al. 2016). Zudem gibt es auch weitere klinische Studien an Patienten mit unterschiedlichen Tumorentitäten, die mit anderen onkolytischen Viren behandelt werden. Die Wirkung gegen Tumoren hängt bei onkolytischen Viren aber nicht nur von der direkten Lyse von Tumorzellen ab, sondern auch von der Stimulation einer Antitumor-Immunantwort wie in den zitierten Übersichtsarbeiten dargestellt (Melzer, Lopez-Martinez et al. 2017, Marelli, Howells et al. 2018). Die Verwendung onkolytischer Viren ist vielversprechend. Trotzdem gibt es bei diesem Therapieansatz das Problem, dass onkolytische Viren nach systemischer Applikation sehr schnell von unterschiedlichen Systemen, wie dem Monozyten-Makrophagen-System in Leber oder Milz oder dem Komplement-System neutralisiert werden und damit nur eine geringe Bioverfügbarkeit im Tumor besitzen (Abbildung 1) (Russell, Peng et al. 2012).

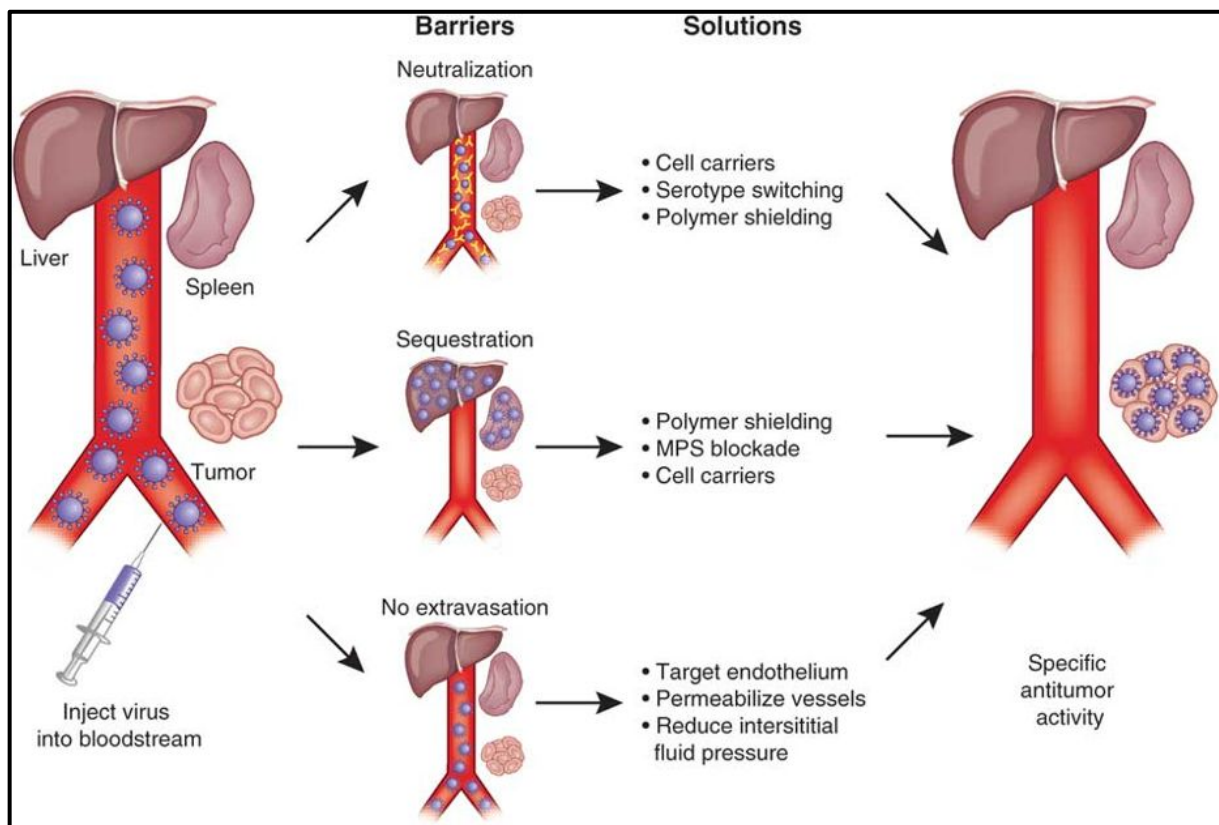


Abbildung 1: Limitationen der systemischen Virotherapie aus (Russell, Peng et al. 2012)

Gezeigt werden hier vor allem die bei systemischer Applikation von onkolytischen Viren auftretenden Hindernisse. Hierbei sind besonders in den Vordergrund gestellt: die Neutralisierung durch bspw. Antikörper, Komplement etc., die Sequestrierung durch Zellen und die Problematik, den Intravasalraum zu verlassen. (Russell, Peng et al. 2012), (mit Genehmigung von Springer Nature Customer Service Centre GmbH: Copyright bei Nature Biotechnology, Oncolytic Virotherapy, Russel, Peng et al. 2012)

In dieser Arbeit soll, wie auch in Abbildung 2 gezeigt, ein Zellvehikel für das VSV (Vesikuläre Stomatitis Virus) zur Abschirmung vor den neutralisierenden Faktoren untersucht werden. Eine schematische Darstellung des angedachten Ansatzes ist in der Abbildung 2 dargestellt.

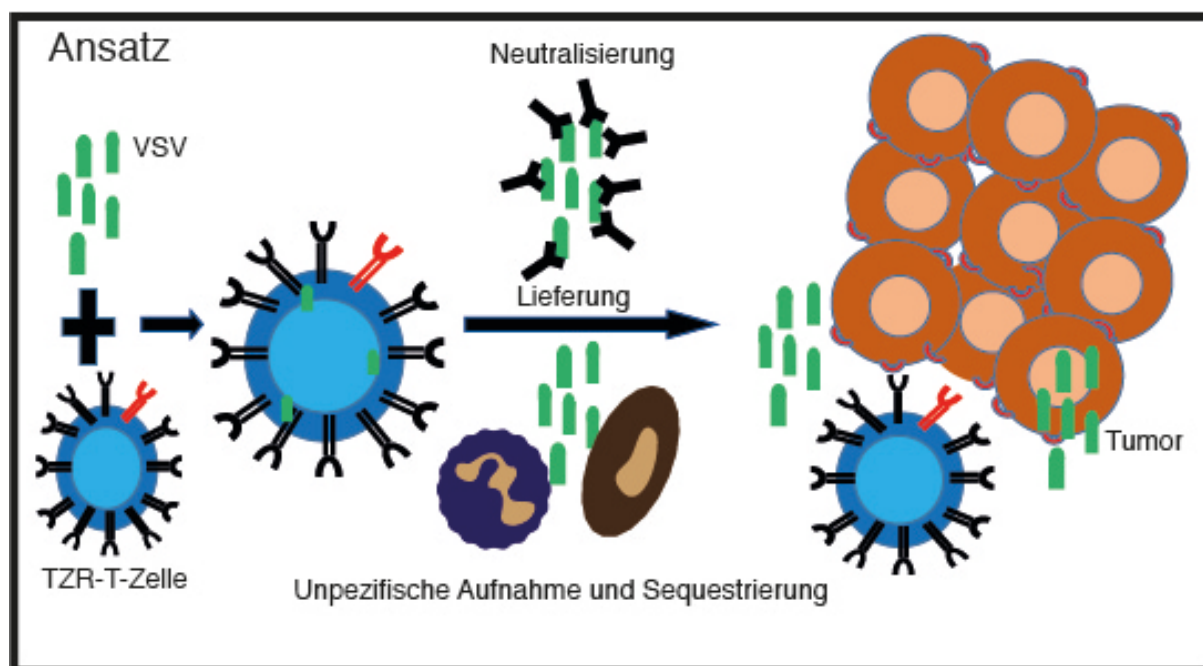


Abbildung 2: Strategie zur Überwindung der Limitationen systemischer Virotherapie, modifiziert nach (Melzer, Zeitlinger et al. 2018)

Strategie zur Überwindung der Problematik bei systemischer Applikation des VSV. Als konkretes Beispiel ist hier eine genmodifizierte TZR-T-Zelle zu sehen, die ein spezifisches Tumorantigen als Ziel hat, was durch den rot eingefügten TZR zu erkennen ist. Diese T-Zelle wird nun mit dem VSV beladen bzw. infiziert und kann dadurch die unspezifische und spezifische Neutralisierung, Aufnahme und Sequestrierung des VSV umgehen, um schließlich das Virus an den Tumor weiterzugeben. (Melzer, Zeitlinger et al. 2018)

Der aktuelle Stand der Virotherapie bei der AML wird nun skizziert.

### 2.2.2 Onkolytische Virotherapie bei AML

Bis jetzt ist in der Literatur nur wenig über onkolytische Virotherapie bei AML zu finden. Wenn man in Pubmed die Suchbegriffe „acute myeloid leukemia AND oncolytic“ eingibt und nur die

Artikel weiterbetrachtet, die onkolytische Viren enthalten, so ergibt sich folgende Studienlage (Stand Juli 2019). Im Weiteren werden die Hauptergebnisse dieser wenigen Studien beschrieben:

Ein Myxoma-Virus konnte eine AML-spezifische Aktivität zeigen, wobei gesunde hämatopoetische Stammzellen nicht vom Virus abgetötet wurden (Kim, Madlambayan et al. 2009). Weiterhin wurde in einer anderen Studie für ein Myxoma-Virus gezeigt, dass Tumorzellen sich weniger stark in Mäusen einnisten, wenn diese zuvor mit einem Myxoma-Virus behandelt worden waren (Madlambayan, Bartee et al. 2012). Eine andere Arbeitsgruppe zeigte, dass auch primäre humane AML-Zellen, gegen welche zusätzlich eine Immunantwort hervorgerufen wurde, durch Reoviren abgetötet wurden (Hall, Scott et al. 2012). Des Weiteren können auch Adenoviren AML-Zellen abtöten, indem sie proapoptotische Gene in diesen Zellen exprimieren (Tong, You et al. 2013). Zudem ist die Kolonie-Bildung von AML- und CML-Tumorproben schlechter, wenn diese mit dem gleichen Adenovirus vorbehandelt werden (Tong, You et al. 2013). Ein anderes genverändertes Adenovirus war in der Lage, CD123<sup>+</sup>-Leukämie-Zellen zu infizieren und AML-Zellen abzutöten (Li, Li et al. 2014). Ein weiteres Adenovirus konnte ebenfalls antileukämische Effekte in vitro demonstrieren (Wei, Liu et al. 2015). Ein Interleukin-24 exprimierendes Adenovirus konnte in vitro gute Ergebnisse zur Abtötung von Promyelozyten-Leukämie-Zellen erreichen (Liu, Ma et al. 2019). In Proben von Patienten mit einer Blastenkrise bei CML konnte gezeigt werden, dass nicht-replikationsfähige rhabdovirale Partikel eine vorhandene Multi-Resistenz gegen Medikamente aus den Zellen löschen konnten (Batenchuk, Le Boeuf et al. 2013). Bei diesen nicht replikationsfähigen rhabdoviralen Partikeln wurde gezeigt, dass deren Toxizität in vivo geringer war als die eines replizierenden VSV (Batenchuk, Le Boeuf et al. 2013). Zudem waren die rhabdoviralen Partikel in Mäusen mit einer leukämischen Blastenkrise auch effektiver (Batenchuk, Le Boeuf et al. 2013). In einer weiteren Studie wurde berichtet, dass rVSV-mIFN- $\beta$ -NIS in murinen AML-Zellen sowohl mIFN- $\beta$  (murines Interferon-  $\beta$  ) als auch NIS (Natrium-Iodid-Symporter) exprimiert und als effektives Therapeutikum wirkt (Shen, Patnaik et al. 2016). Auch Wt-VSV (Wildtyp-VSV) konnte selektiv AML-Tumorzelllinien effektiv abtöten, ohne dabei in sonstigen Zellen aus dem Knochenmark gesunder Spender Schaden zu verursachen (Stojdl, Lichty et al. 2000). In einer Studie, in der die Kombination einer PD-L1-Immuncheckpoint-Blockade mit VSV in Mäusen untersucht wurde, zeigte sich, dass sich beide Therapien sinnvoll ergänzen (Shen, Patnaik et al. 2016). Eine Publikation zur Behandlung der AML mit dem VSV ist aus dieser Arbeit hervorgegangen

und beschreibt die Möglichkeit der Behandlung humaner AML-Tumoren in Mäusen mit einer Kombination aus TZR-T-Zellen und VSV (Melzer, Zeitlinger et al. 2019). Das HSV-1 hat nicht nur direkt onkolytische Effekte bei Leukämien, sondern unterstützt auch die Ausbildung einer Antitumorimmunantwort (Samudio, Rezvani et al. 2016). Dabei wurde gezeigt, dass NK-Zellen effektiv durch UV-inaktiviertes HSV-1 dazu stimuliert werden, AML-Zellen abzutöten (Samudio, Rezvani et al. 2016). Es zeigte sich in einer Studie, dass ein onkolytisches Vakzinia-Virus mit zusätzlicher Expression des Transgens ING-4 (Inhibitor of Growth Family 4) effektiver als ein nicht modifiziertes Vakzinia-Virus zur Abtötung von AML-Zellen führte (Peng, Wang et al. 2018). Im Mausmodell konnte bei einer Kombinationstherapie aus Cytarabin und dem ING-4 exprimierenden Vakzinia-Virus gegenüber den jeweiligen Monotherapien ein verringertes AML-Tumorwachstum gezeigt werden (Peng, Wang et al. 2018). Ein Coxsackie-Virus konnte eine potente Antitumorimmunantwort bei AML-Patienten induzieren (Müller, Holmes et al. 2019).

Trotz der guten Ergebnisse dieser Studien bleibt deren Limitation, dass bis dato zur Therapie der AML die allermeisten onkolytischen Viren lediglich in vitro bzw. an murinen Modellen getestet wurden.

Da in dieser Arbeit ausschließlich mit dem VSV gearbeitet wurde, folgt nun eine eingehende Charakterisierung dieses onkolytischen Virus.

### 2.2.3 Das Vesikuläre Stomatitis Virus (VSV)

Das Vesikuläre Stomatitis Virus ist ein Negativ-Einzelstrang-RNA-Virus (Prevec und Whitmore 1963) aus der Familie der Rhabdoviren (Knudson 1973, Banerjee 1987) und der Ordnung der Mononegavirales (Hastie und Grdzlishvili 2012). Das VSV hat die Form eines Projektils (Chow, Chow et al. 1954, Howatson und Whitmore 1962, Huang, Greenawalt et al. 1966). Sein Genom enthält ca. 11kb und codiert für 5 Proteine: N- (Nukleokapsid), P- (Phospho), M- (Matrix), G- (Glyko), L- (Large Polymerase)-Protein (Hastie und Grdzlishvili 2012). Es gibt zwei unterschiedliche Serotypen des VSV: den Indiana- und den New-Jersey-Serotyp (Hastie und Grdzlishvili 2012). Das VSV ist in Teilen der USA, sowie in Süd- und Mittelamerika endemisch und obwohl es Nutztiere wie Rinder, Schweine und Pferde befällt, besitzt es nur eine geringe Pathogenität für Menschen (Hastie und Grdzlishvili 2012). Die Infektion von Zellen erfolgt

über Endozytose (Superti, Seganti et al. 1987, Cureton, Massol et al. 2010). Abhängig von den verschiedenen Bedingungen und einem variablen Anteil an Degradation gelingt nur einem Teil des VSV der Eintritt in die Zelle (Matlin, Reggio et al. 1982). Das VSV zeigt einen Tropismus für fast alle menschlichen Zellformen und vermittelt seinen Eintritt in die Zelle über die Anlagerung des G-Proteins an LDL-Rezeptoren (Finkelshtein, Werman et al. 2013). Aufgrund seiner hohen Spontanmutationsrate während des Replikationszyklus ist das VSV ein besonders flexibles und sich an die vorliegenden Gegebenheiten anpassendes Virus (Hastie und Grdzelishvili 2012, Hastie, Cataldi et al. 2013). Nach der Vermehrung in der betroffenen Zelle kommt es zu deren Apoptose und der Freisetzung neuer Virionen (Kopecky, Willingham et al. 2001, Gaddy und Lyles 2005, Gaddy und Lyles 2007).

Das VSV ist ein Typ-I-Interferon-sensibles (Interferon  $\alpha/\beta$ ) Virus (Belkowski und Sen 1987), das bei Tumorzellen den Umstand ausnutzt, dass diese oftmals eine mangelhafte antivirale Typ-I-Interferon-Antwort zeigen (Stojdl, Lichty et al. 2000). Dahingegen besitzen nicht-entartete Zellen meistens eine suffiziente Typ-I-Interferon-Antwort und sind daher resistenter gegenüber einer Infektion durch das VSV (Stojdl, Lichty et al. 2000). In der gleichen Studie wurde gezeigt, dass Mäuse eine VSV-Infektion überstehen können, wenn sie mit Typ-I-Interferonen behandelt werden, was die Empfindlichkeit des VSV gegenüber den Typ-I-Interferonen betont (Stojdl, Lichty et al. 2000). Allerdings gibt es auch einige Tumorzellarten, die einen funktionierenden Typ-I-Interferon-Signalweg besitzen (Moerdyk-Schauwecker, Shah et al. 2013) und dadurch eine Resistenz gegenüber dem VSV besitzen (Hastie und Grdzelishvili 2012). Die stärkste Limitation in der Nutzung des Wt-VSV ist überwiegend dessen starker Neurotropismus, der zur Neurotoxizität führt (Hastie und Grdzelishvili 2012, Hastie, Cataldi et al. 2013). Bereits 1988 wurde in einem Fallbericht ein Junge vorgestellt, der an einer VSV-Enzephalitis litt (Quiroz, Moreno et al. 1988).

#### 2.2.4 Das VSV als onkolytisches Virus

Aufgrund der oben genannten genetischen Flexibilität und der großen Tumorselektivität eignet sich das VSV als onkolytisches Virus. Erste Beobachtungen an Nacktmäusen im Jahr 2000 zeigten, dass das VSV selektiv in humanen Melanom-Xenograft-Zellen repliziert und gesundes Gewebe nicht zerstört (Stojdl, Lichty et al. 2000). Das VSV fungiert aber nicht nur als direkt



tumorlytisches Virus, sondern auch als Mediator einer vielfältig immunvermittelten Antitumorantwort, wie in der zitierten Arbeit zusammengefasst (Melzer, Lopez-Martinez et al. 2017).

Es gibt unterschiedliche Mechanismen der Stimulation einer Antitumor-Immunantwort durch das VSV. Bei einem durch das VSV verursachten Zelltod werden Tumorantigene (Delaunay, Violland et al. 2018) und DAMPs (Danger associated molecular pattern) (Abdullahi, Jakel et al. 2018) freigesetzt. Dendritische Zellen, die im Tumormilieu unreif und immunsuppressiv sind, können potentiell durch die VSV-vermittelte Entzündung heranreifen und zu den Lymphknoten wandern, um dort Tumorantigene zu präsentieren (Melzer, Lopez-Martinez et al. 2017). Auch die Induktion von spezifischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen mit einem Antitumoreffekt wurde beobachtet (Diaz, Galivo et al. 2007). Zudem werden NK-Zellen (Altomonte, Wu et al. 2008) und Neutrophile Granulozyten (Wu, Huang et al. 2008) durch das VSV angelockt, die dann ebenfalls zur Abtötung eines Tumors beitragen können. Aller Wahrscheinlichkeit nach werden diese Zellen aber primär angelockt, um das VSV unschädlich zu machen und haben nur sekundär einen kollateralen, schädlichen Effekt auf Tumorzellen (Melzer, Lopez-Martinez et al. 2017). Ein weiterer immunstimulatorischer Mechanismus ist die Freisetzung von Typ-I-Interferonen durch dendritische Zellen, sobald diese das VSV erkennen (Barchet, Cella et al. 2002). Interessanterweise führen Typ-I-Interferone bei AML-Zellen zur Wiederexpression bzw. Hochregulierung der Expression von HLA-Molekülen, was dazu führt, dass diese besser vom Immunsystem erkannt werden können (Brouwer, van der Heiden et al. 2002).

Es gibt mittlerweile auch einige klinische Studien, bei denen das VSV als onkolytisches Virus eingesetzt wird. Dazu seien folgende Beispiele genannt: eine Studie zur Behandlung von therapierefraktären soliden Tumoren mit dem VSV-IFN $\beta$ -NIS (NCT02923466), zwei Studien zur Behandlung von Endometriumkarzinomen mit dem VSV-IFN $\beta$ -NIS (NCT03120624, NCT03456908), zur Behandlung von refraktärer oder rezidivierter AML, multiplen Myelomen und T-Zell-Lymphomen mit dem VSV-IFN $\beta$ -NIS (NCT03017820), eine Studie zur Kombinationsbehandlung von refraktären Bronchialkarzinomen und hepatozellulären Karzinomen mit VSV-IFN $\beta$ -NIS und Pembrolizumab (NCT03647163).

Im Weiteren wird nun auf die allgemeinen Charakteristika transgener T-Zellen eingegangen, da diese in dieser Arbeit als Transportvehikel für das VSV dienen sollen. Hierbei wird auch auf möglich Schwierigkeiten für eine adoptive T-Zell-Therapie eingegangen.

## 2.3 Transgene T-Zellen

### 2.3.1 Allgemeines zu transgenen T-Zellen

Weitere innovative Tumorthérapeutika stellen transgene T-Zellen, welche mit einem optimierten TZR oder CAR zur Identifizierung von Tumorantigenen ausgestattet sind, für den adoptiven Zelltransfer dar. Zu diesen Thérapeutika gibt es mittlerweile immer mehr klinische Studien (Mo, Du et al. 2017). Momentan wird der überwiegende Teil der Genmodifikationen in T-Zellen mit Hilfe viraler Transduktion bewerkstelligt (O'Reilly, Shipp et al. 2012). Der Vorteil genetisch modifizierter T-Zellen liegt darin, dass man sie relativ einfach in großer Zahl herstellen kann und dass sie eine Langzeit-Antitumorimmunantwort vermitteln (Houot, Schultz et al. 2015). Ein großer Nachteil ist, dass es besonders bei soliden Tumoren sehr schwierig ist, die seltenen Zielantigene zu finden, die idealerweise explizit nur von Tumorzellen exprimiert werden sollten (Zhang, Qin et al. 2016). Eine weitere große Herausforderung in der Anwendung von transgenen T-Zellen ist deren großes und starkes Nebenwirkungspotential, wie etwa die Neurotoxizität und das Cytokine-Release-Syndrom, deren klinisches Management kompliziert ist (Hay, Hanafi et al. 2017, Shimabukuro-Vornhagen, Godel et al. 2018). Diese und andere Nebenwirkungen entstehen unter anderem aufgrund der Kreuzreaktivität der transgenen T-Zellen und der Erkennung von ähnlichen Antigenen in gesunden Geweben (Houot, Schultz et al. 2015, Kamta, Chaar et al. 2017, Mo, Du et al. 2017). Eine weitere Limitation in der Anwendung transgener T-Zellen ist die On-Target-Off-Tumor-Reaktivität, was zur Zerstörung gesunder Zellen führt, die das gleiche Zielantigen wie die Tumorzellen tragen (Johnson, Morgan et al. 2009, Morgan, Yang et al. 2010, Lamers, Sleijfer et al. 2013). Das CRS wird durch die Aktivierung einer großen Anzahl transferierter T-Zellen und die Freisetzung diverser Zytokine bei den Patienten ausgelöst (Shimabukuro-Vornhagen, Godel et al. 2018). Die Freisetzung all dieser Zytokine, wie etwa IFN- $\gamma$ , führt zu Fieber, Hypotonie, neurologischen Ausfällen und Organversagen (Shimabukuro-Vornhagen, Godel et al. 2018). Die nächste Hürde in der T-Zell-Therapie ist, dass Tumoren der Erkennung durch T-Zellen entgehen können, wenn sie ihre Antigenexpression verändern, oder das Antigen komplett verschwindet (Chmielewski, Kopecky et al.

2011, Kaluza, Thompson et al. 2012, Orlando, Han et al. 2018). Weitere Limitationen der T-Zell-Therapie, wie etwa das Vorkommen einer großen Tumormasse, die Anwesenheit von Tregs, MDSC, unreifen dendritischen Zellen und suppressiven Makrophagen, insbesondere bei der AML, sind bereits detailliert im vorhergehenden Text beschrieben. In Abbildung 3 ist die Problematik bei der Tumorbekämpfung durch adoptiv-transferierte T-Zellen illustriert (Melzer, Lopez-Martinez et al. 2017). Die Abbildung wurde so auch bereits in dem zu diesem Projekt gehörenden Review veröffentlicht.

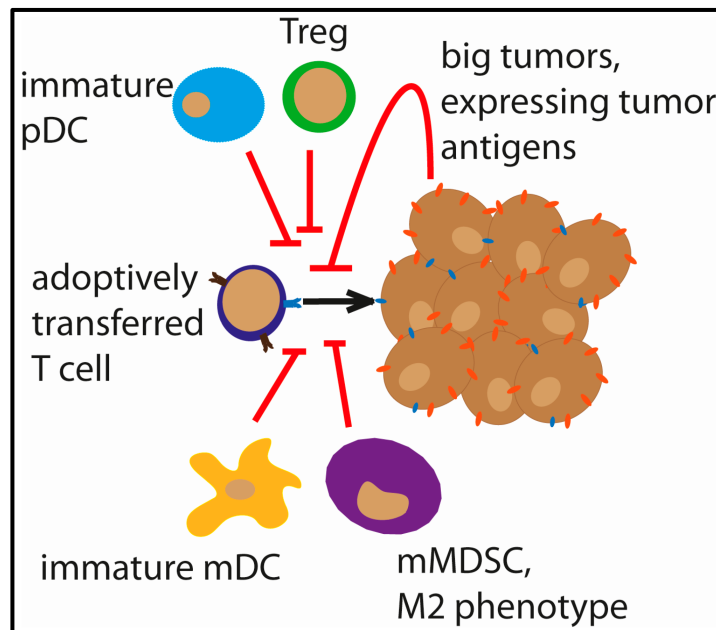


Abbildung 3: Limitationen adoptiver T-Zell-Therapie aus (Melzer, Lopez-Martinez et al. 2017)

Gezeigt werden in dieser Abbildung inhibitorische Effekte und Zellen, die die Funktion von transgenen T-Zellen einschränken. Zum einen scheinen große Tumoren als solche die T-Zell-Funktion einzuschränken. Weitere inhibitorische Zellen, die die Funktion tumorreaktiver T-Zellen einschränken sind unreife mDC, mMDSC, Tregs und unreife pDC. (Melzer, Lopez-Martinez et al. 2017)

Nach der allgemeinen Charakterisierung transgener T-Zellen wird nun noch kurz auf die Besonderheiten und Unterschiede von TZR- und CAR-T-Zellen eingegangen.

### 2.3.2 TZR-T-Zellen

TZR-T-Zellen werden durch die Isolation von T-Zellen, welche im peripheren Blut von Krebspatienten zirkulieren, hergestellt (Houot, Schultz et al. 2015, Kamta, Chaar et al. 2017, Ping, Liu et al. 2018). Um einen tumorspezifischen TZR zu exprimieren, werden sie genetisch modifiziert (Houot, Schultz et al. 2015, Kamta, Chaar et al. 2017). Da manche Tumorzellen die Expression von HLA-Molekülen herunterregulieren können (Kamta, Chaar et al. 2017), ist deren Erkennung durch TZR-T-Zellen, da die TZR-Signalkaskade nur in Abhängigkeit einer HLA-vermittelten Antigenpräsentation funktioniert, mitunter eingeschränkt (Mo, Du et al. 2017). Andererseits erlaubt natürlich die HLA-Restriktion der TZR eine Erkennung von intrazellulären Antigenen, was den CAR-T-Zellen verwehrt ist (Houot, Schultz et al. 2015). Im Rahmen von präklinischen Studien konnte bereits erfolgreich gezeigt werden, dass TZR-T-Zellen mit dem Zielantigen der Myeloperoxidase (MPO<sub>5</sub>), sofern das Peptid auf dem HLA-B\*07:02 präsentiert wird, Reaktivität gegen AML-Zellen sowohl in vitro als auch in vivo zeigen können (Klar, Schober et al. 2014, Mall, Yusufi et al. 2016, Yusufi, Mall et al. 2017). TZR-T-Zellen werden bereits in klinischen Studien für verschiedene Tumorentitäten, wie etwa Melanome, an Patienten untersucht (Ping, Liu et al. 2018).

### 2.3.3 CAR-T-Zellen

Eine Alternative zu TZR-T-Zellen stellen CAR-T-Zellen dar (Houot, Schultz et al. 2015, Kamta, Chaar et al. 2017, Mo, Du et al. 2017). CAR-T-Zellen zeigen bemerkenswerte Erfolge gegen CD19<sup>+</sup>-Tumorentitäten (Lymphome), wohingegen ihre Effekte gegen solide Tumoren noch bescheiden sind (Houot, Schultz et al. 2015). Ein Grund dafür, dass ihre Funktion bei soliden Tumoren abgeschwächt sein könnte, ist das immunsuppressive Tumormilieu (Li und Zhao 2017, Melzer, Lopez-Martinez et al. 2017). Aufgrund ihrer Aktivität gegen das CD19-Antigen zeigen die CAR-T-Zellen gegen CD19<sup>+</sup>-Tumorentitäten auch eine intrinsische Aktivität gegen gesunde B-Zellen (Li und Zhao 2017). Allerdings ist B-Zell-Aplasie behandelbar (Li und Zhao 2017). CAR-T-Zellen sind nicht auf eine HLA-vermittelte Antigenpräsentation angewiesen, da sie, ähnlich einem Antikörper, Strukturen auf der Zelloberfläche erkennen, was aber ihre Nutzbarkeit gegen intrazelluläre Antigene einschränkt (Houot, Schultz et al. 2015, Li und Zhao 2017).

Die Behandlung von Leukämien durch CAR-T-Zellen wird dadurch erschwert, dass viele Tumorzielantigene auch auf normalen myeloischen Zellen exprimiert werden (Hofmann, Schubert et al. 2019). Die Suche nach Zielantigenen ist also deutlich erschwert. Untersucht

werden hierbei CARs mit den Zielantigenen CD123 (Mardiros, Dos Santos et al. 2013), welches auf AML-Zellen verglichen mit gesunden myeloischen Zellen überexprimiert wird (Jordan, Upchurch et al. 2000), CD33 (Wang, Wang et al. 2015), das LeY-Antigen (Ritchie, Neeson et al. 2013), D44v6 (Casucci, Nicolis di Robilant et al. 2013) und weitere Antigene (Isidori, Loscocco et al. 2018, Tasian 2018). Es gibt CAR-T-Zell-Studien zur Behandlung der AML unter anderem mit den Zielantigenen CD33, CD38, CD56, CD117, CD123, LeY, Muc-1, NKG2DL (Tasian 2018). Um Tumor-Immun-Escape-Mechanismen vorzubeugen, wurden auch CAR-T-Zellen mit einem Compound-CAR entwickelt, bei dem T-Zellen simultan CD33 und CD123 erkennen und somit Zellen, die eines oder beide Antigene tragen, abtöten (Petrov, Wada et al. 2018). Zur Beendigung der Therapie und als Sicherheitsmaßnahme gegen die off-Tumor-on-Target Effekte von CAR-T-Zellen können Antikörper, z.B. Alemtuzumab, verwendet werden (Tasian, Kenderian et al. 2017, Petrov, Wada et al. 2018). Für diese Antikörper wurde gezeigt, dass sie in murinen Organismen eine effiziente CAR-T-Zell-Eradizierung herbeiführen (Tasian, Kenderian et al. 2017, Petrov, Wada et al. 2018). Auch der Einbau von Suizid-Genen in die CARs als Sicherheitsmechanismus kann zur Therapiebeendigung führen (Casucci, Nicolis di Robilant et al. 2013).

Im folgenden Absatz werden noch die potentiell synergistischen Effekte von einer Kombination aus transgenen T-Zellen und dem VSV beleuchtet. Hierbei zeigt sich nicht nur, dass das VSV von einem Zellvehikel profitieren könnte, sondern vielmehr auch, dass die transgenen T-Zellen auch andersherum von dem VSV profitieren können, indem sie dessen immunstimulatorische Eigenschaften und dessen direkte onkolytische Tumorverkleinerung ausnutzen können. Eine Übersichtsarbeit hierzu wurde im Rahmen dieses Projektes publiziert (Melzer, Lopez-Martinez et al. 2017). Der Inhalt dieser Arbeit findet sich in abgewandelter Form im folgenden Absatz wieder. Die Überlegungen aus dieser Arbeit sind als Zitat gekennzeichnet. Für Ergebnisse aus publizierten Arbeiten wird die Originalquelle angegeben.

#### 2.3.4 Transgene T-Zellen und das VSV

Das VSV kann Tumoren durch direkte Onkolyse verkleinern, sodass sich transferierte T-Zellen einer kleineren Tumorlast gegenübersehen (Melzer, Lopez-Martinez et al. 2017). In Experimenten mit Lymphomen wurde gezeigt, dass große Tumoren die T-Zell-Funktion vermindern,

wohingegen dieselben Tumoren nach einer verkleinernden Vorbehandlung mit Cyclophosphamid sensibler gegenüber einer T-Zell-Therapie reagieren (Villadangos 2016). Die Rolle des Cyclophosphamids könnte in solch einem Fall das VSV übernehmen (Melzer, Lopez-Martinez et al. 2017). Auch MDSC können von immunsuppressiven Zellen durch das VSV in Zellen mit einem inflammatorischen, immunstimulierenden Phänotyp umgewandelt werden, was einer T-Zell-Therapie zu Gute käme (Eisenstein, Coakley et al. 2013). Es wurde auch beschrieben, dass das rVSV-mIFN- $\beta$  zu einer verminderten Anzahl von Tregs in NSCLC- Tumoren führen kann, was ebenfalls deren immunsuppressiven Charakter auf T-Zell-Therapien vermindern könnte (Patel, Jacobson et al. 2015, Melzer, Lopez-Martinez et al. 2017). Auch die intratumorale Injektion von rVSV-ova in Melanome bei Mäusen führte zu einer verstärkten Aktivierung von transferierten OT-I-T-Zellen im Tumor (Wongthida, Diaz et al. 2011). Das VSV ohne Expression eines Tumorantigens konnte zur verstärkten Aktivierung von systemisch transferierten T-Zellen mit Tumorspezifität führen (Diaz, Galivo et al. 2007). In derselben Studie zeigte sich auch, dass das VSV alleine zu einer CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Antwort gegen ein Tumorantigen führt (Diaz, Galivo et al. 2007). Zudem wurde bereits gezeigt, dass spezifische T-Zellen als Monotherapie nicht immer stark genug sind, um einen Tumor zu eradizieren und von der Simultanbehandlung des Tumors durch das VSV bezüglich ihrer Effektivität profitieren (Wongthida, Diaz et al. 2011). Eine weitere Steigerung der Therapieeffektivität wurde erreicht, als zwei rekombinante VSV, die jeweils ein anderes Tumorantigen exprimieren, in Kombination mit für die jeweiligen Antigene spezifischen T-Zellen behandelt wurden (Rommelfanger, Wongthida et al. 2012). Zu den genannten Studien gilt es, zu bedenken, dass es sich hier um Studien an Melanom-Modellen handelt, bei denen das künstliche ova-Tumorantigen (Ovalbumin), welches von Hühnern stammt und damit eine natürlicherweise hohe Immunogenität in Mäusen besitzt, zum Einsatz kommt (Melzer, Lopez-Martinez et al. 2017). Eine starke Immunantwort gegen ein Antigen einer anderen Art ist daher wenig überraschend (Melzer, Lopez-Martinez et al. 2017). Daher ist die direkt Übertragung der Gültigkeit der Ergebnisse und Prinzipien auf die Behandlung der AML kritisch zu bewerten. In anderen Studien wurde demonstriert, dass die Applikation des VSV bei Gehirntumoren zu einer verstärkten T-Zell-Infiltration in die Tumoren führt (Gao, Whitaker-Dowling et al. 2015). Die Kombination von VSV und T-Zellen hat aber nicht nur für die T-Zellen Vorteile der Art, dass diese eine stärkere Antitumorimmunantwort zeigen können oder schneller zum Tumor finden und diesen abtöten, sondern in vorgenannten Studien wurde auch gezeigt, dass das VSV von der Kombination mit T-Zellen profitieren kann (Melzer,

Lopez-Martinez et al. 2017). Ein Vorteil in dieser Hinsicht ist, dass man spezifische T-Zellen als Transportvehikel für das VSV benutzen kann, um das VSV vor dem Immunsystem und der im Körper stattfindenden Neutralisierung durch Antikörper, angeborenes Immunsystem und unspezifische Aufnahme und Sequestration zu schützen (Russell, Peng et al. 2012). So wurde gezeigt, dass an OT-I-T-Zellen gebundenes VSV an Tumorzellen weitergereicht werden kann und vor Neutralisation durch Antikörper geschützt wird (Qiao, Wang et al. 2008). Auch eine endogene Immunantwort gegen den in dieser Studie untersuchten Melanomtumor konnte verstärkt werden (Qiao, Wang et al. 2008). In weiteren Studien gibt es Hinweise darauf, dass die Kombination aus VSV und T-Zellen, seien sie spezifisch oder unspezifisch, einen Therapie-vorteil gegenüber jeder der Monotherapien darstellt (Qiao, Kottke et al. 2008, VanSeggelen, Tantaló et al. 2015). Zum besseren Verständnis dient die folgende Abbildung (Abbildung 4), welche die potentiell synergistischen Effekte einer Kombination aus transgenen T-Zellen und VSV darstellt und so bereits in dem zu diesem Projekt gehörenden Review publiziert wurde (Melzer, Lopez-Martinez et al. 2017). Trotz dieser beeindruckenden Schilderung der bereits bekannten synergistischen Effekte zur Behandlung von Tumoren muss zur Einordnung der Relevanz dieser Studien bedacht werden, dass sie in murinen Modellen durchgeführt wurden, dass teilweise Modelltumoren (Melanome mit ova-Expression) mit hoher Immunogenität verwendet wurden und dass keine dieser Studien die Behandlung der AML beleuchtet.

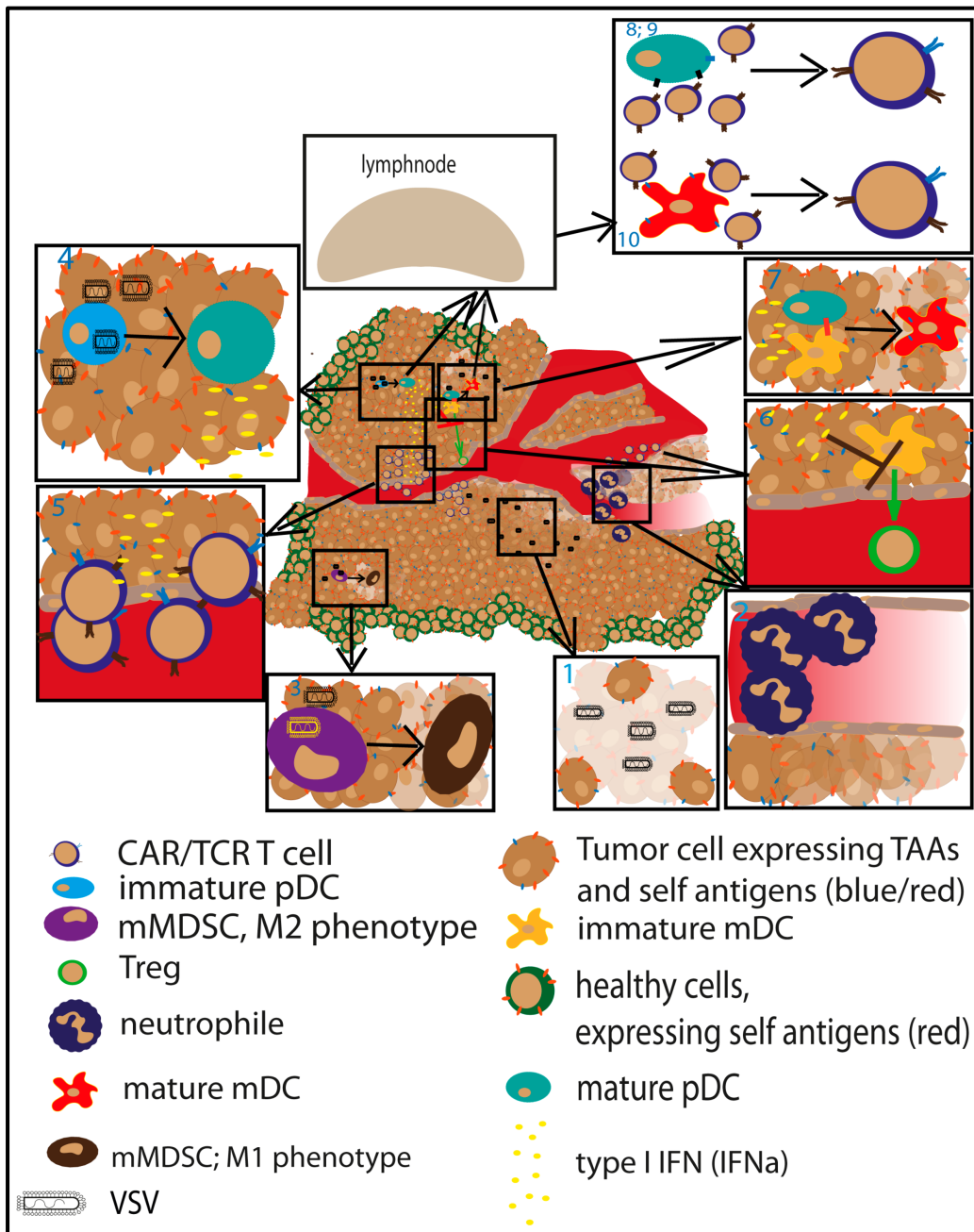


Abbildung 4: Mögliche synergistische Effekte der Kombination aus Viro- und T-Zell-Therapie aus (Melzer, Lopez-Martinez et al. 2017)

Erläuterung der Ziffern, übernommen aus (Melzer, Lopez-Martinez et al. 2017): 1. Das VSV führt zur direkten Lyse von Tumorzellen und verkleinert damit den Tumor. 2. Durch die Rekrutierung von Neutrophilen Granulozyten kommt es zur Okklusion von Tumorgefäßen und damit einhergehend zur Nekrose der stromabwärts gelegenen Tumoranteile. 3. MDSC können durch das VSV von immunsuppressiven Zellen zu proinflammatorischen, immunstimulierenden Zellen heranreifen. 4. Unreife pDC werden durch das VSV zu reifen, Zytokin-sekretorischen Zellen, die



*eine Antitumorimmunantwort unterstützen. 5. Durch die von den pDC freigesetzten Typ-I-Interferone können T-Zellen angelockt werden. 6. Die Typ-I-Interferone unterbinden weiterhin die vermehrte Anlockung und Extravasation von Tregs, die durch unreife mDC rekrutiert werden. 7. Die nun reifen pDC unterstützen die weitere Ausreifung von mDC zu immunstimulierenden Zellen. 8.; 9.; 10. pDC und mDC können nun als reife Zellen zu den Lymphknoten wandern und eine Immunantwort gegen im Tumor aufgenommene Antigene primen. (Melzer, Lopez-Martinez et al. 2017)*

Insgesamt betrachtet ergeben sich Indizien, dass sich das VSV und TZR-T-Zellen gegenseitig in ihrer Aktivität gegen einen Tumor unterstützen können. In dieser Dissertation wird überwiegend auf die Kombination von TZR-T-Zellen und dem VSV eingegangen, um zu untersuchen, ob die TZR-T-Zellen als spezifisches Zellvehikel dienen können und ob sich die beiden Monotherapien zur Behandlung eines Modell-AML-Systems ergänzen können.

### 3 Zielsetzung

Das Ziel der Arbeit ist der Nachweis der Sinnhaftigkeit einer Kombinationstherapie aus humanen TZR-T-Zellen und dem VSV zur Behandlung von Tumoren. Als exemplarische Neoplasie für die Überprüfung des angedachten Konzeptes dient hier die AML-Zelllinie „ML2“.

Hierbei soll zuerst eine Analyse der Interaktion von verschiedenen T-Zell-Populationen mit dem VSV durchgeführt werden. Von besonderem Interesse ist dabei, ob und wie stark sich das VSV in bestimmten T-Zell-Subpopulationen vermehren kann und des Weiteren, ob die Vermehrung des VSV einen signifikanten Einfluss auf die T-Zell-Vitalität und deren Funktion hat. Der nächste Schritt ist dann eine Detailanalyse der Interaktion des VSV mit der am besten erscheinenden T-Zell-Population.

Weiterhin soll in dieser Arbeit in in-vitro-Experimenten darauf eingegangen werden, ob die AML-Zelllinie eine Sensitivität gegenüber dem VSV besitzt, und inwieweit eine Kombination aus TZR-T-Zellen und VSV zur Abtötung von Leukämiezellen führt. Ein besonderes Augenmerk liegt hierbei darauf, inwiefern sich die Kombination bei der Tumorzelleradizierung ergänzt.

Nach Abschluss der in-vitro-Charakterisierung soll die Frage beantwortet werden, ob auch eine in-vivo-Tumorzellabtötung stattfindet. Da es sich um eine Studie mit humanisiertem System handelt, müssen immundepletierte NSG-Mäuse verwendet werden, die humane Zellen nicht abstoßen. Aufgrund dieser genetischen Immunsuppression muss erst eine Dosisfindungsstudie für das VSV in den NSG-Mäusen durchgeführt werden. Das Ziel ist, eine sichere Dosis für das VSV zu finden, wenn dieses als nicht-zellgebundene Form bzw. in Kombination mit T-Zellen appliziert wird.

Sobald eine MTD (Maximal tolerierte Dosis) gefunden ist, soll die Effektivität der Kombinationstherapie aus TZR-T-Zellen und dem VSV mit der Effektivität der einzelnen Monotherapien verglichen werden. Besonders interessante Punkte werden sein, wie sich die virale Anreicherung im Tumorgewebe abspielt und mit welcher Geschwindigkeit die Tumoren abgetötet werden. Auch soll untersucht werden, ob sich die Kombination aus TZR-T-Zellen und dem VSV in vivo ergänzt und somit zu einer schnellen Tumorabtötung führt oder ob sich die beiden Therapieansätze nicht ergänzen. Als abschließender Punkt ist eine Überlebensstudie zur Langzeit-Effektivität der unterschiedlichen Therapieformen anvisiert.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Chemikalien

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien

<b>Chemikalie (Katalogname und ggf. deutsche Übersetzung)</b>	<b>Hersteller, Hauptsitz, Land</b>
1,4 Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
1% wässrige Eosinlösung	Apotheke, Klinikum Rechts der Isar, München, Deutschland
10% Tween 20 Lösung	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
100bp DNA ladder	NEB, Ipswich, MA, USA
1kb DNA ladder	NEB, Ipswich, MA, USA
50x TAE, Tris/Acetic Acid/EDTA	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
7-Aminoactinomycine (7-AAD)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Agarose	Biozym GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Albumin aus bovinem Serum, minimum 98%	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Alkopharm 80	Brüggemann, Heilbronn, Deutschland
Ammoniumchlorid	Fluka/ Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ampicillin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Biocoll Trennlösung	Biochrom /Merck, Berlin, Deutschland
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Complete Protease Inhibitor Mix	Roche, Basel, Schweiz
D-MEM	ATCC, Manassas, VA, USA
D-PBS	Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA
DEPC-H <sub>2</sub> O	Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA
Di-Methyl-Sulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Di-Natriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
EDTA	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethanol (vergällt)	Apotheke, Klinikum Rechts der Isar, München, Deutschland
Ethanol Rotipuran® >99,8%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Formaldehyd	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Fötales bovines Serum (FBS)	Biochrom /Merck, Berlin, Deutschland
G-MEM	Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA
Hämalaunlösung sauer nach Mayer für die Mikroskopie	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
HBSS	Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA
HEPES	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
HEPES	Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA
Immersol™ 518 F	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Isofluran (Forene 100% (v/v))	Abbott Laboratories, Chicago, IL, USA
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Kristall-Violett	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Fluka/ Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Mononatriumsulfat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natrium-bi-carbonat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natrium-Hydroxid-Lösung (2mol/l)	2N Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Nucleic Acid sample buffer, 5x	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
PBS-Puffer	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

peqGOLD Universal Agarose	Peqlab/ VWR Life Science Competence Center, Erlangen, Deutschland
peqGREEN DNA/RNA Dye	Peqlab/ VWR Life Science Competence Center, Erlangen, Deutschland
Pertex®	Medite, Burgdorf, Deutschland
Propanol	Apotheke, Klinikum Rechts der Isar, München, Germany
Red Blood Cell Lysis Solution 10x (Erythrozyten-Lyse-Puffer 10x)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
RNaseOUT	Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA
Roti-Mount FluorCare	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Roti®-Histol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure 5%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Schwefelsäure 2N (1mol/l)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
SDS Solution 10% (w/v)	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Sucrose	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
TransIT Transfection Reagent	Mirus, Madison, WI, USA
Triton X 100	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau	Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA
Xylol (Isomere)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Zitronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland

#### 4.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien und Gegenstände

<b>Gegenstand (Artikelbezeichnung und ggf. deutsche Übersetzung)</b>	<b>Hersteller, Hauptsitz, Land</b>
1.4ml Non coded Tubes, U-bottom	Micronic, Lelystad, Niederlande
10µl Graduated, Filter Tip	Starlab GmbH, Hamburg, Deutschland
200µl Graduated Filter Tip, Refill	Starlab GmbH, Hamburg, Deutschland

20µl Ultra Point Grad. Filter Tip, Refill	Starlab GmbH, Hamburg, Deutschland
CELLSTAR® Röhrchen 15ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
CELLSTAR® Röhrchen 50ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Combitips advanced 5ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Corning® Cell Strainer 40µm (Zellsieb mit 40µm Maschengröße)	Corning, Corning, NY, USA
CryoPure tube (1.6ml) (Gefäß zum Einfrieren von Zellen)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Falcon® 2ml aspirating pipet (Absaugpipette)	Corning, Corning, NY, USA
Falcon® 2ml serological pipet	Corning, Corning, NY, USA
Filter tips (10µl, 200µl, 1000µl) (Pipettenspitzen mit Filter)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Freezing Container	Nunc, Roskilde, Dänemark
Immunoplates	Nunc, Roskilde, Dänemark
Injekt® 10ml	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Injekt® 40 Solo	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Injekt®-Spritze 20ml	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Latexhandschue	Sempermed, Wien, Österreich
MACS LS Cell Separation Columns (Zellaufteilungssäule)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Membran-Adapter	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Microtome Blade S35	Feather Safety Razor, Osaka, Japan
Nitril-Handschuhe	KCL GmbH, Eichenzell, Deutschland
Non-treated 24-well plates (nicht für Zellkultur behandelte 24-Well-Platten)	BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA
Omnifix® 3ml	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Omnifix®-F 1ml	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL, USA
Petri Dishes (Petrischale)	BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA
Pipette 10ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich

Pipette 25ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Pipette 50ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Pipette 5ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Polysine® Slides (Objektträger mit Polylysin)	Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA
Pre-Separation Filter (30µm)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Reaction tubes (0.5ml) (Reagiergefäß für PCR)	Peqlab/ VWR Life Science Competence Center, Erlangen, Deutschland
Reagiergefäß 1,5ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
RPT Tips 10/20µl XL, Grad., Rack (Pipettenspitzen)	Starlab GmbH, Hamburg, G Deutschland
SafeSeal Reagiergefäß 1,5ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
SafeSeal Reagiergefäß 2ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Safety-Multifly® 21G	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Sigma® 75cm <sup>2</sup> Cell Culture Flask, canted neck (Zellkulturflasche)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Sigma® Cell Culture Dish 150mm*25mm (Zellkulturschale)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Sigma® cell culture plate, 12 wells (Zellkulturplatte)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Sigma® cell culture plate, 6 wells	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Sigma® cell culture plate, size 96 wells, flat bottom	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Sigma® cell culture plate, size 96 wells, round bottom	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Sterican® Needles (20, 27, 30G) (Nadeln)	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Superfrost® Slides (Objektträger)	Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA
Thermo Scientific™ Clear Flat-Bottom Immuno Nonsterile 96-Well Plates (nicht-sterile 96-Well-Platte für immunologische Untersuchungen)	Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA

TPP® Spritzenfilter 0,22µm	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
TPP® Spritzenfilter 0,45µm	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
TPP® Zellkulturflasche 25	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
TPP® Zellkulturtestplatte 12	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
TPP® Zellkulturtestplatte 24	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
TPP® Zellkulturtestplatte 48	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
TPP® Zellkulturtestplatte 6	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
TPP® Zellkulturtestplatte 96, Flat Bottom	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
TPP® Zellkulturtestplatte 96, U Bottom	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
VWR Pipet Tips 1000µl	VWR International, Radon, PA, USA
VWR Pipet Tips 200µl	VWR International, Radnor, PA, USA
VWR Reagent Reservoirs	VWR International, Radnor, PA, USA

#### 4.1.3 Kits

Tabelle 4: Kits

<b>Kit (Katalogname und ggf. deutsche Übersetzung)</b>	<b>Hersteller, Hauptsitz, Land</b>
CD4 <sup>+</sup> T Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD8 MicroBeads, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD8 <sup>+</sup> T Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Zweifachluciferasetest)	Promega, Madison, WI, USA



KAPA Probe Fast Universal Master-mix	Peqlab/ VWR Life Science Competence Center, Erlangen, Deutschland
KOD Hot Start Polymerase Kit	Merck, Darmstadt, Deutschland
MagniSort™ Human CD8 Memory T Cell Enrichment Kit	Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA
OptEIA™ Human IFN-γ ELISA Kit	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
OptEIA™ TMB Substrate Reagent Set	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
QIAamp Viral RNA Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland

#### 4.1.4 Durchflusszytometrie-Antikörper

Tabelle 5: Antikörper für die Durchflusszytometrie

<b>Antigen</b>	<b>Fluorochrom</b>	<b>Klon</b>	<b>Hersteller, Hauptsitz, Land</b>
CD3	PE-CF594	SP34-2	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
CD3	APC-Cy7	SK7	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
CD3	PE-Vio615™	REA613	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD4	V450	RPA-T4	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
CD45	V450	HI30	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
CD45RO	PE-Vio770™	UCHL1	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD62L	PE	145/15	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD8	FITC	RPA-T8	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
CD8	PE	RPA-T8	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
CD8	PerCp-Vio700™	BW 135/80	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD8	APC	RPA-T8	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
CD8	VioGreen	BW 135/80	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

#### 4.1.5 Lebend-Tot-Färbungen

Tabelle 6: Lebend-Tot-Färbungen für die Durchflusszytometrie

<b>Färbung</b>	<b>Hersteller, Hauptsitz, Land</b>
7AAD	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
eBioscience™ PI	Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA
Viability™ Dye 405/520	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

#### 4.1.6 Immunfluoreszenz-Antikörper

Tabelle 7: Antikörper für die Immunfluoreszenz

<b>Antigen</b>	<b>Fluorochrom</b>	<b>Klon</b>	<b>Hersteller, Hauptsitz, Land</b>
Fluoroshield Mounting Medium with DAPI	DAPI		Abcam, Cambridge, UK
VSV-G	Cy3	#VSV11-Cy	Alpha Diagnostic International, San Antonio, TX, USA

#### 4.1.7 Geräte

Tabelle 8: Verwendete Geräte

<b>Gerät (Name und ggf. deutsche Übersetzung)</b>	<b>Hersteller, Hauptsitz, Land</b>
Autostainer (automatisches Färbegerät)	Dako/ Agilent, Santa Clara, CA, USA
AxioCam ICM1 (Kamera fürs Mikroskop)	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
AxioCam MRc5 (Kamera fürs Mikroskop)	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
AxioCam MRm (Kamera fürs Mikroskop)	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Analytical Balance 440-35N (Waage)	Denver Instrument, Bohemia, NY, USA
Analytical Balance SI-64	Denver Instrument, Bohemia, NY, USA
BD FACSAria III (Durchflusszytometer)	BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA
Biometra Professional Thermocycler (PCR-Gerät)	Analytik Jena, Jena, Deutschland
Centrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Centrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Centrifuge 5702R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Centrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Corning® Stripettor™ Ultra Pipet Controller	Corning, Corning, NY, USA
Gefrierschrank -20°C	Siemens, München, Deutschland
Gefrierschrank -80°C, Hera freeze	Heraeus, Hanau, Deutschland
Gallios Flow Cytometer	Beckmann Coulter, Brea, CA, USA
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen, Deutschland
Inkubator BBD6220	Heraeus, Hanau, Deutschland
Inkubator Hera Cell 240	Heraeus, Hanau, Deutschland
Laminar Flow (Sterilbank)	BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl, Deutschland
Laminar Flow Hera Safe (Sterilbank)	Kendro/ Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA
Leica ASP300S dehydration machine	Leica, Wetzlar, Deutschland
Leica AT2 Scanner	Leica, Wetzlar, Deutschland
Leica EG1150C, cooling plate	Leica, Wetzlar, Deutschland
Leica EG1150H, paraffin embedding machine	Leica, Wetzlar, Deutschland
MACS MultiStand	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACSmix™ Tube Rotator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Magnetic stirrer (Magnetischer Rührfisch)	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Magnetic stirrer/ hot plate IKA RCT basic (Magnetische Rührplatte)	IKA, Staufen, Deutschland
Megafuge 1.0R (Zentrifuge)	DJB Labcare Ltd, Newport Pagnell, UK
Microm HM 355S Rotary Microtome	Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA
Micropipettes	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Microplate Reader Spark™	TECAN, Männedorf, Schweizer
Microplate Reader Sunrise™	TECAN, Männedorf, Schweiz

Microscope Axio Imager.M2, HBO 100	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Microscope Laxieret 40 CFL, HBO 100	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Microscope Pötsch	Exakt Optech, San Prospero, Italien
Mikrowelle	Siemens, München, Deutschland
MidiMACS™ Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Molecular Imager® Gel Doc™ XR+	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Multichannel Pipette 300	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Multipipette plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Orbital Shaker DUOMAX 1030	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
PCR Cycler peqSTAR	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
pH-Meter	WTW, Weilheim, Deutschland
Pipetboy	INTEGRA Biosciences, Zizers, Schweiz
Power Bac™ Power Supply (Elektrophoresegerät)	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Quartz Spectrophotometer Cell Micro, 16.50-Q-10/8,5mm	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Rotor für Ultrazentrifugation, 70Ti	Beckmann Coulter, Brea, CA, USA
SmartSpec™ Plus Spectorphotometer	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
SONY SH800 Cell Sorter	Sony Biotechnology, San Jose, CA, USA
TGradient Theromcycler (PCR-Gerät)	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Thermomixer Compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Ultracentrifuge Optima XL-100k	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Vortexer	Bender&Hob, Zürich, Schweiz
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Wide Mini-Sub Cell GT Cell	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Axiovert 40C Microscope	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland

#### 4.1.8 Software

Tabelle 9: Verwendete Software

<b>Software</b>	<b>Entwickler, Hauptsitz, Land</b>
Adobe Photoshop CS5	Adobe Systems Inc., San José, CA, USA
Adobe Illustrator CS5	Adobe Systems Inc., San José, CA, USA
AxioVision SE64 Rel. 4.9	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Endnote X7.7.1	Thomson Reuters, Toronto, Canada
FlowJo X 10.0.7r2	FLOWJO, LLC, Ashland, OR, USA
Image Lab 4.1	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Magellan™	Tecan, Männedorf, Schweiz
Microsoft Office 2011	Microsoft, Redmont, WA, USA
Microsoft Office 2016	Microsoft, Redmont, WA, USA
Prism 5 for Mac OS X, Version 5.0f	Grappa Software, La Jolla, CA, USA
Prism 7 for Mac OS X, Version 7.0c	GraphPad Software, La Jolla, CA, USA
SparkControl™	Tecan, Männedorf, Schweiz
ZEN Core	Carl Zeiss, Oberkochen Deutschland

#### 4.1.9 RT-PCR

Tabelle 10: Reverse-Transkriptase PCR

100 mM DTT	Agilent, Santa Clara, CA, USA
10X AffinityScript RT buffer	Agilent, Santa Clara, CA, USA
AffinityScript Multi-Temp RT	Agilent, Santa Clara, CA, USA
dNTP Mix (10 mM)	Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA

#### 4.1.10 Primer-Sequenzen

Tabelle 11: Primer

<b>Primer</b>	<b>Sequenz</b>	
A3-Fwd-Viral-envelope	tgg ccc aga ata att tac cac tcc ccc	Zur Verfügung gestellt von Univ.-Prof. Dr. Angela Krackhardt aus der 3. Medizinischen Klinik des Klinikums rechts der Isar der TUM
A3-Rev-Viral-envelope	act tcgt tga ggt ctg tct gga tag cg	

#### 4.1.11 DNA-Vektoren

Tabelle 12: DNA-Vektoren

<b>Vektorbezeichnung</b>	<b>Enthaltene Gene</b>
pMP71	Plasmid mit dem LTR des MPSV und PRE des Waldmurmeltier-Hepatitis-Virus (Engels, Cam et al. 2003) für den Transfer der TZR-DNA, wie zuvor beschrieben (Mall, Yusufi et al. 2016, Yusufi, Mall et al. 2017) und zur Verfügung gestellt von Univ.-Prof. Dr. Angela Krackhardt aus der 3. Medizinischen Klinik des Klinikums rechts der Isar der TUM

#### 4.1.12 Zellkulturmedien und –zusätze

Tabelle 13: Zellkulturmedien und -zusätze

<b>Medium/Zusatz (Katalogname und ggf. deutsche Übersetzung)</b>	<b>Hersteller, Hauptsitz, Land</b>
Antibiotic/Antimycotic Solution (100x)	PAA Laboratories/ Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
D-PBS ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>	Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA
DMEM	Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA

Sodium-Pyruvate (Natrium-Pyruvat)	Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA
DPBS mit Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
DPBS ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28	Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA
FBS Superior	Biochrom /Merck, Berlin, Deutschland
FCS	Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA
Gibco® OptiPRO™ SFM	Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA
Glasgow's MEM (GMEM)	Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA
Human Serum (von männlichen Spendern der Blutgruppe AB)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
HyClone™ 100 mM Sodium Pyruvate Solution (100mM Natrium-Pyruvat-Lösung)	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
L-Glutamin	Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA
MEM Non-essential Amino Acids Solution 100x (nicht essentielle Aminosäure-Lösung)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Penicillin-Streptomycin 100x	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Penicillin/Streptomycin 100x	Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA
Protamine Sulfate (Protaminsulfat)	MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA
RetroNectin	Takara, Kusatsu, Japan
RPMI 1640	Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA
RPMI 1640 w/L-Glutamine	Biowest, Nuaille, Frankreich
Trypsin 0.05 %/EDTA 0.02 % in PBS ohne Ca und Mg	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Tryptose Phosphate Broth Solution	Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA

#### 4.1.13 Zytokine

Tabelle 14: Zytokine

<b>Zytokin</b>	<b>Hersteller, Hauptsitz, Land</b>
hIL-2	Peprotech, Hamburg, Deutschland
hIL-7, premium grade	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
hIL-15, premium grade	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
hIFN- $\gamma$	PromoKine, Heidelberg, Deutschland

#### 4.1.14 Kulturmedien

Tabelle 15: Zusammensetzung der Kulturmedien

<b>Medium</b>	<b>Zusammensetzung</b>
BHK21-Zellen	G-MEM BHK21 mit 10% hitzeinaktiviertem FBS, 100 IU/ml Penicillin/Streptomycin, 2% Tryptose Phosphate Broth Lösung
Humane T-Zellen	RPMI 1640, mit 5% hitzeinaktiviertem FBS, 5% hitzeinaktiviertem HS (humanes Serum), 100IU/ml Penicillin/Streptomycin, 1mM Natrium-Pyruvat, 10mM nicht essentielle Aminosäuren, 2mM L-Glutamin
Jurkat76-Zellen	RPMI 1640 mit 10% hitzeinaktiviertem FBS, 10mM nicht essentielle Aminosäuren und 100IU/ml Penicillin/Streptomycin, 2mM L-Glutamine, 1mM Natrium-Pyruvat,
Medium zur Kryokonservierung von Zellen	Hitzeinaktiviertes FCS mit 10% DMSO (v/v)
ML2-Leukämiezellen	RPMI 1640 mit 10% hitzeinaktiviertem FBS, 10mM nicht essentielle Aminosäuren und 100IU/ml Penicillin/Streptomycin, 2mM L-Glutamine
RD114-Zellen	DMEM mit 10% hitzeinaktiviertem FBS, 10mM nicht essentielle Aminosäuren, 100IU/ml Penicillin/Streptomycin, 2mM L-Glutamin, 1mM Natrium-Pyruvat



#### 4.1.15 Puffer und Lösungen

Tabelle 16: Zusammensetzung der Puffer

Bezeichnung	Inhaltsstoffe
ELISA Coating-Puffer	100mM NaHCO <sub>3</sub> und 30mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> in ddH <sub>2</sub> O, mit NaOH auf pH=9,5 titriert
ELISA Test-Puffer	PBS mit 10% hitzeinaktiviertem FBS (v/v)
ELISA Wasch-Puffer	PBS mit 0.05% Tween20 (v/v)
Erythrozyten-Lyse-Puffer	10x Puffer von Miltenyi in ddH <sub>2</sub> O verdünnt
FACS Fixierungs-Puffer	PBS mit 1% hitzeinaktiviertem FBS (v/v) und 2mM EDTA, 1% PFA (v/v)
FACS Puffer	PBS mit 1% hitzeinaktiviertem FBS (v/v) und 2mM EDTA
FACS Sorting-Puffer	PBS mit 3% hitzeinaktiviertem FBS (v/v), 100IU/ml P/S, 2.5 mM EDTA
HI-FCS	Hitzeinaktiviertes FCS, 20 min bei 58°C
HI-HS	Hitzeinaktiviertes HS, 20 min bei 58°C
Kristallviolett-Lösung für Plaque-Assays	0,5% Kristallviolett, 0,8% NaCl, 5% Formaldehyd, 50% Ethanol in ddH <sub>2</sub> O
MACS Isolierungs-Puffer	PBS mit 0.5% BSA (w/v) und 2mM EDTA,
PBS-T-Lösung	PBS mit 0,1% Tween20 (v/v)
PFA-Lösung	PBS mit 4% PFA, pH-Adjustierung auf pH=7,4 mit NaOH und HCl
Retronectin-Lösung	PBS mit 12µg/ml RetroNectin (w/v)

#### 4.1.16 Zelllinien

Tabelle 17: Verwendete Zelllinien und primäre Zellen

Name	Verwendung	Transgen	Herkunft
293Vec-RD114 <sup>TM</sup> (RD114)	Produktionszelllinie für die Retroviren zur T-Zell-Transduktion	„gag, pol, env“	BioVec Pharma, Québec, Kanada, freundliche Leihgabe von Univ.-Prof. Dr. Angela Krackhardt aus der 3. Medizinischen Klinik des

			Klinikums rechts der Isar der TUM
BHK-21	Virusproduktion, Titerbestimmungen		ATCC
CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen	Primäre humane T-Zellen, Experimente		Menschliche Spender
CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen	Primäre humane T-Zellen, Experimente		Menschliche Spender
Humane CD8 <sup>+</sup> zentrale Gedächtnis-T-Zellen (CD8 <sup>+</sup> -Tcm)	Primäre humane T-Zellen, Experimente		Menschliche Spender
Jurkat76-Zellen	Humane T-Zell-Leukämie-Zelllinie		überlassen von Univ.-Prof. Dr. Angela Krackhardt aus der 3. Medizinischen Klinik des Klinikums rechts der Isar der TUM
ML2-Zellen (ML2, ML2B7, ML2B15, ML2B7-Fluc, ML2B15-Fluc)	Humane akute Leukämie-Zelllinie, Experimente	HLA-B*07:02, HLA-B15:01, HLA-B*07:02-eGFP, HLA-B15:01-eGFP, HLA-B*07:02-eGFP-Fluc, HLA-B15:01-eGFP-Fluc	überlassen von Univ.-Prof. Dr. Angela Krackhardt aus der 3. Medizinischen Klinik des Klinikums rechts der Isar der TUM
PBMCs/ Pan T-Zellen	Primäre humane T-Zellen, Experimente		Menschliche Spender

#### 4.1.17 Mauslinie

Tabelle 18: Verwendete Mauslinie

NOD. Cg-Prkdc<sup>scid</sup> Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ (NSG)

The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA, freundlicherweise bereitgestellt von Univ.-Prof. Dr. Angela Krackhardt aus der 3. Medizinischen Klinik des Klinikums rechts der Isar der TUM

#### 4.1.18 Anzahl verwendeter Mäuse in jedem Experiment

Tabelle 19: Auflistung der Anzahl verwendeter Mäuse in der MTD-Studie, modifiziert nach (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

Vgl. Abbildung 35-40

Behandlung	Anzahl der verwendeten Mäuse für die MTD	Anzahl der untersuchten Gehirne	Anzahl der untersuchten Lebern	Anzahl der untersuchten Milzen	Anzahl der untersuchten Lungen
10 <sup>4</sup> PFU rVSV-GFP	6	5	5	5	5
3,3*10 <sup>4</sup> PFU rVSV-GFP	6	6	6	6	6
10 <sup>7</sup> CD8 <sup>-</sup> Tcm, MOI 0,01	3	3	3	3	3
10 <sup>7</sup> CD8 <sup>-</sup> Tcm, MOI 0,1	3	3	3	3	3
10 <sup>7</sup> CD8 <sup>-</sup> Tcm, MOI 1	6	5	5	5	5

Tabelle 20: Auflistung der Anzahl der verwendeten Tumoren zur Analyse der T-Zell-Infiltration im ML2B7-Tumor, modifiziert nach (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

Vgl. Abbildung 41

Zeitpunkt	TZR-T-Zellen	Kontroll-T-Zellen	TZR-T-Zellen + MOI 0,1	Kontroll-T-Zellen + MOI 0,1	VSV	PBS
24h	3	2	4	3	5	3
72h	5	5	3	5	4	4
120h	5	3	5	5	5	3

Tabelle 21: Auflistung der Anzahl der verwendeten Tumoren zur Analyse der T-Zell-Infiltration im ML2B15-Tumor

Vgl. Abbildung 42

Zeitpunkt	TZR-T-Zellen	Kontroll-T-Zellen	TZR-T-Zellen + MOI 0,1	Kontroll-T-Zellen + MOI 0,1	VSV	PBS
24h	3	3	6	5	3	2
72h	6	5	3	4	4	4
120h	5	3	5	5	5	3

Tabelle 22: Auflistung der Anzahl der verwendeten Tumoren zur Analyse der viralen Replikation im ML2B7-Tumor, modifiziert nach (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

Vgl. Abbildung 45

Zeitpunkt	TZR-T-Zellen + MOI 0,1	Kontroll-T-Zellen + MOI 0,1	VSV
24h	6	6	5
72h	6	6	4
120h	5	5	5

Tabelle 23: Auflistung der Anzahl der verwendeten Tumoren zur Analyse der viralen Replikation im ML2B15-Tumor

Vgl. Abbildung 46

Zeitpunkt	TZR-T-Zellen + MOI 0,1	Kontroll-T-Zellen + MOI 0,1	VSV
24h	6	6	5
72h	5	5	4
120h	5	5	5

Tabelle 24: Auflistung der Anzahl der verwendeten Tumoren zur Analyse GFP<sup>+</sup>-Zellen im ML2B7-Tumor, modifiziert nach (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

Vgl. Abbildung 47

Zeitpunkt	TZR-T-Zellen	Kontroll-T-Zellen	TZR-T-Zellen + MOI 0,1	Kontroll-T-Zellen + MOI 0,1	VSV	PBS
24h	3	2	4	3	5	3
72h	5	5	3	5	4	4
120h	5	3	5	5	5	3

Tabelle 25: Auflistung der Anzahl der verwendeten Tumoren zur Analyse GFP<sup>+</sup>-Zellen im ML2B15-Tumor

Vgl. Abbildung 48

Zeitpunkt	TZR-T-Zellen	Kontroll-T-Zellen	TZR-T-Zellen + MOI 0,1	Kontroll-T-Zellen + MOI 0,1	VSV	PBS
24h	3	3	6	5	3	2
72h	6	5	3	4	4	4
120h	5	3	5	5	5	3

Tabelle 26: Auflistung der Anzahl der verwendeten Tumoren zur Analyse der Nekrose im ML2B7-Tumor, modifiziert nach (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

Vgl. Abbildung 50

Zeitpunkt	TZR-T-Zellen	Kontroll-T-Zellen	TZR-T-Zellen + MOI 0,1	Kontroll-T-Zellen + MOI 0,1	VSV	PBS
24h	3	3	6	6	5	3
72h	6	5	6	6	4	3
120h	5	3	5	5	5	3

Tabelle 27: Auflistung der Anzahl der verwendeten Tumoren zur Analyse der Nekrose im ML2B15-Tumor

Vgl. Abbildung 51

Zeitpunkt	TZR-T-Zellen	Kontroll-T-Zellen	TZR-T-Zellen + MOI 0,1	Kontroll-T-Zellen + MOI 0,1	VSV	PBS
24h	3	3	6	6	4	2
72h	4	4	3	5	4	4
120h	5	3	5	5	4	3

Tabelle 28: Anzahl aller Mäuse für die Untersuchung des Tumorwachstums bis Tag 10 nach Therapiebeginn, modifiziert nach (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

Vgl. Abbildung 54

Zeitpunkt nach Therapiebeginn	TZR-T-Zellen	Kontroll-T-Zellen	TZR-T-Zellen + MOI 0,1	Kontroll-T-Zellen + MOI 0,1	VSV	PBS
d+10	6	5	5	4	6	5

Tabelle 29: Anzahl der in die Überlebensstudie eingeschlossenen Mäuse, modifiziert nach (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

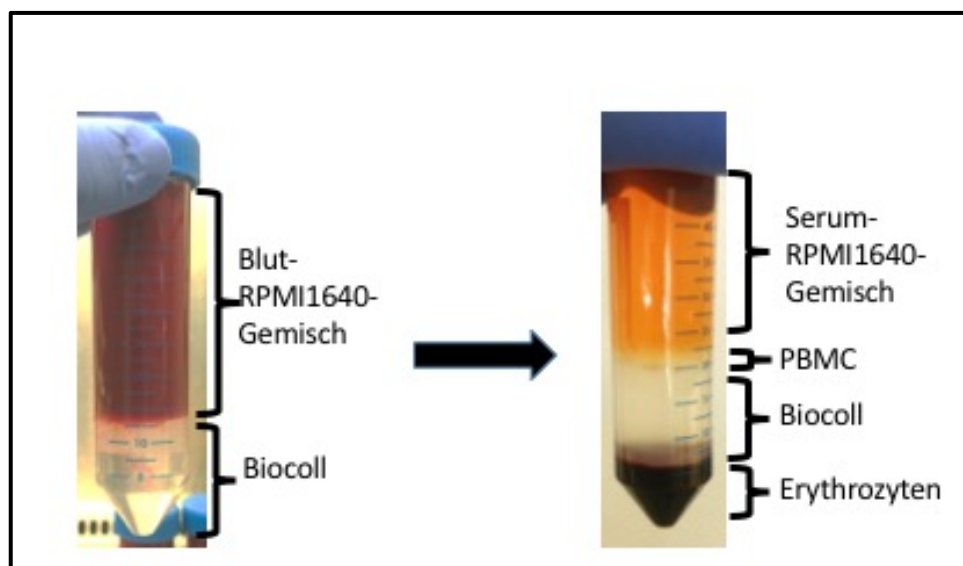
Vgl. Abbildung 55

	TZR-T-Zellen	Kontroll-T-Zellen	TZR-T-Zellen + MOI 0,1	Kontroll-T-Zellen + MOI 0,1	VSV	PBS
Einschluss in Überlebensstudie	6	5	6	6	5	5

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Isolation von humanen T-Zell-Populationen

Zur Isolation von primären, humanen T-Zellen wurde gesunden Probanden Blut abgenommen. Nachdem die gesunden Probanden, der Erklärung von Helsinki und den Bestimmungen des örtlichen Ethikausschusses (Antrag von Univ.-Prof. Dr. Angela Krackhardt, 3. Medizinische Klinik) folgend, ihr schriftliches Einverständnis zur Blutentnahme für Forschungszwecke gegeben hatten (Mall, Yusufi et al. 2016, Yusufi, Mall et al. 2017), wurde ihnen 300ml Blut durch Punktion einer Vene entnommen. Das Blut wurde bei der Entnahme durch Komplexierung des darin enthaltenen Calciums mit EDTA an der Gerinnung gehindert. Die finale Konzentration des EDTA lag bei 1,6mg/ml Blut in den Spritzen. Zur weiteren Verarbeitung wurde das entnommene Vollblut im Verhältnis 1:1 mit dem Kulturmedium RPMI1640, welches L-Glutamin enthält, gemischt. Anschließend wurden 15ml Biocoll in ein Zentrifugationsröhrchen gegeben und 35ml Blut-RPMI-1640-Gemisch vorsichtig darüber pipettiert, ohne dass es zu einer Durchmischung der beiden Flüssigkeiten kam. Der nächste Schritt bestand aus einer 20-minütigen Zentrifugation mit einer Zentrifugengeschwindigkeit von 900g bei Raumtemperatur, wobei die Bremse der Zentrifuge ausgeschaltet war, sodass es am Ende dieses Vorgangs zu einem langsamen Stillstand und nicht zu einem abrupten Stehenbleiben der Zentrifuge kam. Dadurch wurde die Verwirbelung der nun aufgetrennten Blutbestandteile verhindert. Die nun angereicherten PBMC wurden aus der Phase zwischen Serum und Biocoll entnommen (s. Abbildung 5). Die so gewonnenen PBMC wurden noch zweimal in RPMI1640 gelöst und für 5 min bei 500g zentrifugiert, um etwaige Rückstände von Biocoll zu entfernen. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)





### *Abbildung 5: Gewinnung von PBMC mittels Dichtegradientenzentrifugation*

*Gezeigt wird links im Bild das Blut-RPMI1640-Gemisch, welches vorsichtig auf die Schicht aus Biocoll pipettiert worden war. Rechts im Bild wird gezeigt, wie sich das Blut nach der Dichtegradientenzentrifugation aufteilt.*

Die Zellzahlen wurden mithilfe von Trypanblau in der Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop bestimmt. CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen wurden aus den PBMC mithilfe des CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zell Isolations-Kit von Miltenyi gemäß den Herstellerangaben angereichert. Zusammengefasst wurden die gewonnenen PBMC mit einer an Biotin gekoppelten Antikörper-Lösung inkubiert, die Antigene der PBMC, welche nicht auf CD4<sup>+</sup>- bzw. CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (je nach gewünschter Zellpopulation) exprimiert werden, binden. In einem zweiten Schritt wurden nach einem Waschvorgang magnetische Beads an die Biotinanteile der Antikörper gebunden. Nach einem weiteren Waschvorgang wurde die Lösung der nun markierten PBMC durch eine Säule in einem magnetischen Feld aufgetrennt. Die gewünschte Zielpopulation (CD4<sup>+</sup>- bzw. CD8<sup>+</sup>-T-Zellen) war im Durchfluss enthalten. Alle anderen Zellen blieben in der Säule im Magnetfeld haften. Die CD8<sup>+</sup> zentrale Gedächtnis-T-Zellen (CD8<sup>+</sup>-Tcm) wurden isoliert, indem CD8<sup>+</sup>-T-Zellen mit Microbeads für das CD8-Antigen markiert wurden und dann beim Durchlaufen magnetischer Felder im Magnetfeld zurückgehalten wurden. Diese Auftrennung erfolgte mit der MACS-Technologie von Miltenyi gemäß den Herstellerangaben. Alternativ wurden CD8<sup>+</sup>-Gedächtnis-T-Zellen mithilfe des MagniSort™ Human CD8 Memory T cell Enrichment Kit gemäß den Anweisungen des Herstellers angereichert. In beiden Fällen wurden die so gewonnenen Zellen anschließend mit FACS-Antikörpern für die Antigene CD62L und CD45RO angefärbt und die CD8<sup>+</sup>-Tcm anschließend durchflusszytometrisch weiter aufkonzentriert. Eine exemplarische Bild der Sorting-Strategie ist in Abbildung 6 dargestellt. Tote Zellen wurden von der FACS-Sorting-Aufreinigung mittels Propidiumiodid und anhand ihrer Eigenschaften im FSC und SSC ausgeschlossen. Die CD8<sup>+</sup>-Tcm wurden gemäß ihrer Expression von CD62L und CD45RO (Rudiger, Geissinger et al. 2006, Kallies 2008) als zweifach positive Population aus dem Zellgemisch sortiert, sodass es sich am Ende um eine CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T-Zell-Population handelte. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

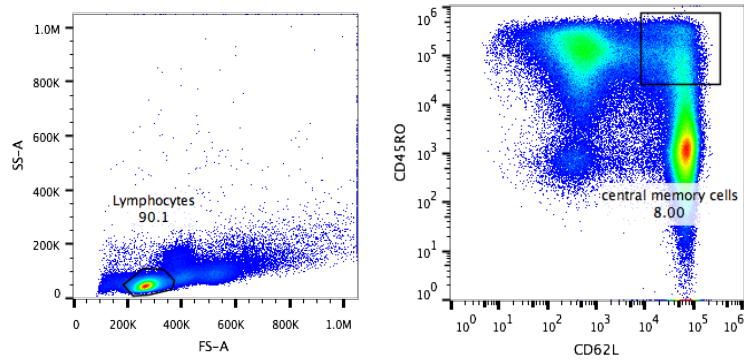


Abbildung 6: Exemplarische Darstellung der FACS-Sorting-Strategie

Sortingstrategie zur Aufreinigung von  $CD8^+$ -Tcm. Links wird das Lymphozyten-Gate gezeigt, welches auf die mithilfe der MACS-Technologie angereicherten T-Zellen angewendet wurde. Hier gezeigt sind ca. 90% Lymphozyten. Nach Ausschluss toter Zellen ergab sich dann für die Lymphozyten die rechts dargestellte Aufschlüsselung der T-Zell-Populationen. Die  $CD8^+$ -Tcm wurden als  $CD62L^+$  und  $CD45RO^+$  Population isoliert. Im Plot sind sie mit einem Rechteck markiert.

#### 4.2.2 Aktivierung und Kultur von T-Zellen

Pan T-Zellen wurde nicht gesondert isoliert, sondern sie wurden aus PBMC gewonnen, indem diese unter nachfolgenden Bedingungen kultiviert wurden, die eine Anreicherung von T-Zellen herbeiführen. Die angereicherten T-Zellen jeder isolierten Population wurden gezählt und in einer Konzentration von  $10^6$  Zellen/ml aktiviert. Dazu wurde das T-Zell-Medium (s. Tabelle 15) mit CD3CD28 Dynabeads und 30 U/ml IL-2 substituiert. Es wurden 25 $\mu$ l Dynabeads pro  $10^6$  T-Zellen verwendet. Vor der Vermischung mit den T-Zellen wurden die Beads in ein Magnetfeld platziert und nachdem zu den 25 $\mu$ l 1 ml PBS dazugegeben worden war, von der Lösung durch vorsichtiges Abpipettieren gereinigt. Hierbei lagerten die Beads sich in der Nähe des Magneten an die Wand des Reagiergefäßes. Nach Entfernen der ursprünglichen Lösung wurden sie in T-Zell-Medium resuspendiert und zu den T-Zellen dazu gegeben, sodass letztlich eine Konzentration von  $10^6$  T-Zellen/ml Medium vorlag. Die Aktivierung der T-Zellen wurde abhängig von deren Proliferation für zwei bis drei Tage durchgeführt. Danach wurden die T-Zellen in T-Zell-Kultivierungsmedium gegeben, welches je 5 U/ml IL-7 und IL-15 enthielt. Alle zwei bis vier Tage wurde das Medium ersetzt. Dazu wurden die T-Zellen zentrifugiert und das alte Medium

verworfen. Das Zellpellet wurde dann in neuem Medium resuspendiert. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

#### 4.2.3 Kultur von Zelllinien

BHK21-Zellen wurden kultiviert wie mehrfach vorbeschrieben (Altomonte, Wu et al. 2009, Munoz-Alvarez, Altomonte et al. 2015). Die BHK21-Zellen wurden in vollständigem GMEM-Medium (s. Tabelle 15) kultiviert. Die Zellen wurden zweimal wöchentlich in neue Zellkulturflaschen überführt. Dazu wurde das alte Medium abgesaugt, anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Nach einer 15-minütigen Inkubation mit Trypsin/EDTA bei 37°C wurde ein Teil der abgelösten Zellen in eine neue Zellkulturflasche überführt und mit neuem Medium bedeckt.

ML2-Leukämie-Zellen (AML) wurden in supplementiertem RPMI1640 (s. Tabelle 15) kultiviert. Diese Suspensionszellen wurden zweimal wöchentlich zentrifugiert und das alte Medium verworfen. Neues Medium wurde dann zur Weiterkultivierung hinzugefügt. Die Konzentration der Zellen belief sich hierbei im Medium auf  $3 \cdot 10^5$ - $2 \cdot 10^6$  Zellen/ml.

RD114-Zellen konnten als semi-adhärente Zellen von der Kulturflasche losgeklopft werden. Ein Teil der Zellen in eine neue Flasche überführt werden. Danach wurden sie mit ausreichend neuem Medium (s. Tabelle 15) überdeckt. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

Jurkat76-Zellen wurden in Jurkat76-Zell-Medium (s. Tabelle 15) kultiviert. Als Suspensionszellen wurden sie zweimal wöchentlich zentrifugiert, vom alten Medium befreit und mit neuem Medium versorgt. Die Konzentration der Zellen belief sich hierbei im Medium auf  $3 \cdot 10^5$ - $2 \cdot 10^6$  Zellen/ml.

Eine Kontamination der Zelllinien durch Mykoplasmen wurde von Seiten des Labors regelmäßig durch eine Standard-PCR zum Nachweis von Mykoplasmen ausgeschlossen.

#### 4.2.4 Trypanblau-Untersuchung

Die Zellen wurden in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop mithilfe von 0,4% Trypanblau-Lösung untersucht. Die Lösung wurde durch Auflösen von Trypanblau in ddH<sub>2</sub>O hergestellt. Die Zellen wurden dann mit Trypanblau-Lösung in einem bestimmten Verhältnis

gemischt. Anschließend wurden Sie unter dem Mikroskop gezählt. Zellen, die Trypanblau aufgenommen hatten, wurden als tot gewertet und nur lebende Zellen, welche als helle Aussparung in der sonst blau gefärbten Zählkammer imponierten, wurden als solche gezählt. Die folgende Formel gibt die Berechnungsweise der Zellkonzentration der jeweiligen Probe:

$$\frac{\text{Zellkonzentration} \cdot \# \text{ lebender Zellen in allen 4 Quadranten der Zählkammer}}{\text{ml} \cdot 4} * 10^4 * \text{Verdünnungsfaktor}$$

#### 4.2.5 Testungen der Zellvitalität

Die Vitalität der CD8<sup>+</sup>-Tcm nach einer Infektion durch das VSV wurde durch eine Trypan-Blau-Testung festgestellt. Die CD8<sup>+</sup>-Tcm wurden mit den angegebenen Mengen des VSV infiziert und zu den entsprechenden Zeitpunkten gezählt. Jedes Experiment wurde in Triplets durchgeführt. Die Werte sind die Mittelwerte der jeweiligen Triplets. Die Zellvitalität wird als Prozentsatz der Zellvitalität zum Zeitpunkt null wiedergegeben. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

Die Vitalität der Pan-, CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen wurde in einer durchflusszytometrischen Untersuchung bestimmt. Analog den CD8<sup>+</sup>-Tcm wurden diese Populationen infiziert und dann fürs FACS gefärbt. Die Lebend-Tot-Färbung wurde mit 7-AAD durchgeführt. Der Prozentsatz 7-AAD<sup>+</sup>-Zellen entspricht hier dem Anteil toter Zellen. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

Die Vitalität der Leukämiezellen wurde durch Verwendung der Luciferase-exprimierenden ML2B7-Fluc- und ML2B15-Fluc-Zellen getestet. Die Zellen wurden mit dem VSV oder mit transduzierten T-Zellen behandelt und zum angegeben Zeitpunkt wurde der Kulturüberstand durch Zentrifugation entfernt. Bereits tote Zellen wurden durch diese Zentrifugation und einen weiteren Waschvorgang durch erneutes Resuspendieren und Zentrifugieren ebenfalls entfernt. Die von ihnen freigesetzte Luciferase war somit entfernt worden, sodass sich bei der späteren Messung kein falsch positiver Effekt auf die Vitalität der ML2-Zellen ergab. Die noch lebenden Zellen wurden dann mit einem Passiven-Lyse-Puffer aus dem Dual-Luciferase-Reporter-Assay Kit aufgelöst, sodass ihre Luciferase sich frei in Lösung befand. Im Lysat wurde dann die Luciferaseaktivität gemessen und dann in Relation zu einer Standard-Kurve gesetzt. Die Standard-Kurve wurde mit mehreren Proben bekannter Zellzahl erstellt. Eine beispielhafte Standardkurve findet sich unten. Dabei ist die RLU gegen die Zellzahl aufgetragen. Es ergibt sich ein linearer Zusammenhang, mit dessen Hilfe die Anzahl der Zellen in der untersuchten Probe

ermittelt werden konnte. Die Vitalität der ML2-Zellen wird in Bezug zur Vitalität der unbehandelten Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt angegeben. Für jedes Experiment wurden die Ergebnisse von Triplets genutzt. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

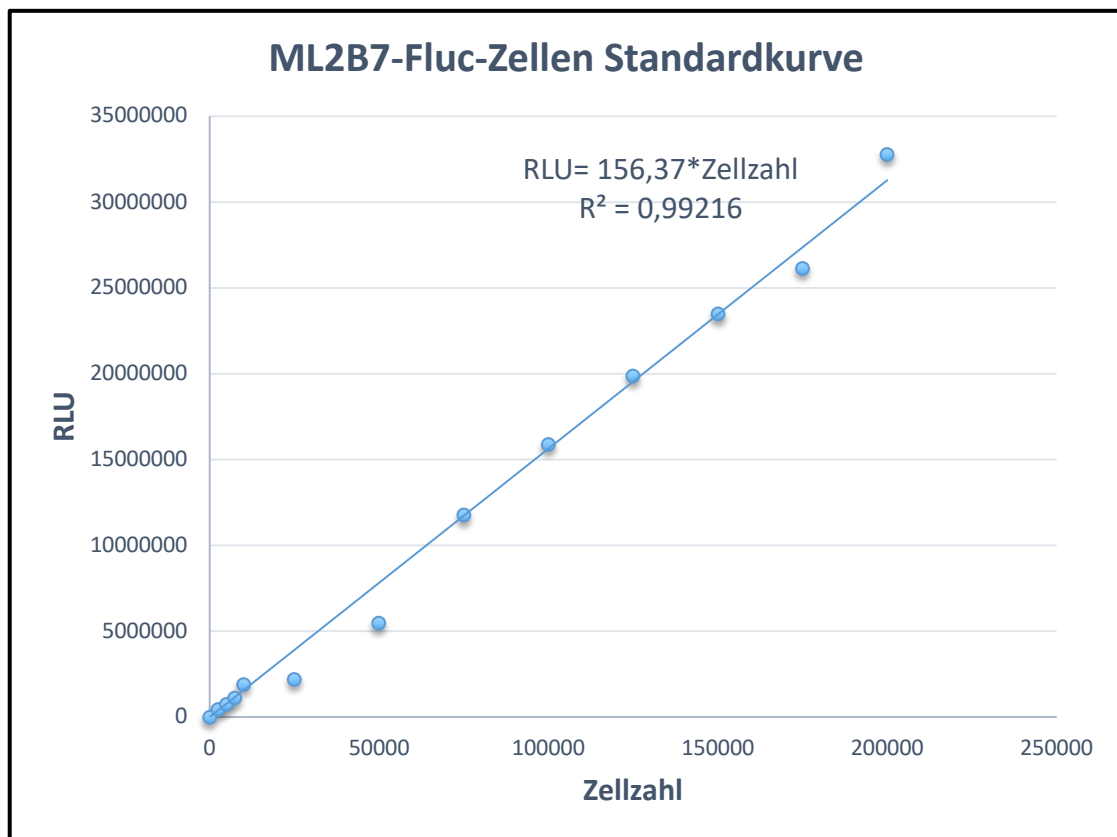


Abbildung 7: Exemplarische Standardkurve der Vitalitätsuntersuchung der ML2-Zellen durch Messung der Luciferase-Aktivität

Gezeigt wird hier eine beispielhafte Standardkurve von ML2B7-Fluc-Zellen. Die Proben bekannter Zellzahl wurden hierfür lysiert und ihre RLU gemessen. Die Zellzahl ist auf der X-Achse aufgetragen. Auf der Y-Achse findet man die gemessenen RLU-Werte. Durch Verbinden der einzelnen Werte ergibt sich eine Gerade, deren Gleichung ebenfalls im Graphen dargestellt ist.

#### 4.2.6 Verwendete rekombinante Vesikuläre Stomatitis Viren

Das rVSV-GFP (Ebert, Shinozaki et al. 2003) und das rVSV-sr39tk (Munoz-Alvarez, Altomonte et al. 2015) wurden wie zuvor beschrieben aus existierenden Beständen hergestellt und vermehrt. Beide Viren wurden in BHK21-Zellen vermehrt. Für die Virusproduktion wurden BHK21-Zellen in 15cm großen Zellkulturschalen ausgesät. Zeigten die Schalen eine rund 85%-Konfluenz der Zellen, wurde das BHK21 Medium entfernt und durch OptiPRO™ SFM Medium

ohne FBS ersetzt. Anschließend wurde das jeweilige Virus in einer MOI von 0,0001 dazugegeben und nach ungefähr 48h, als die Zellen sich, abgetötet vom jeweiligen Virus, von der Schale komplett lösten, wurde der Überstand entnommen und bei 500g 5min lang zentrifugiert. Das Zellpellet wurde verworfen und der Überstand für die weitere Virusaufreinigung verwendet. Diese erfolgte entweder sofort oder der Überstand wurde bei -80°C gelagert und zu einem späteren Zeitpunkt weiterverarbeitet. Zur weiteren Aufreinigung wurde das Virus bei 25.000rpm für 1h bei 4°C in einer BeckmanCoulter-Ultrazentrifuge ultrazentrifugiert. Jetzt wurde der Überstand verworfen und das Pellet für einige Minuten in 1ml PBS aufgelöst. Aus mehreren Zentrifugenröhrchen wurde das Virus zusammengeführt und vorsichtig über einen Sucrose-Gradienten pipettiert. Die Sucrose-Lösung wurde durch das Vermischen und Lösen von einer bestimmten Menge Sucrose in ddH<sub>2</sub>O erreicht. Der Gradient bestand zuunterst aus 7ml 60% (w/v) Sucrose-Lösung, gefolgt von 6ml 30% (w/v) Sucrose-Lösung und 3ml 10% (w/v) Sucrose-Lösung. Nach einer weiteren einstündigen Ultrazentrifugation des beschriebenen Dichtegradienten bei 4°C bei 25.000rpm war das Virus zwischen der 30% und 60% Sucrose-Lösung zu finden. Aus dieser Bande wurde es mit einer Nadel und einer Spritze entnommen. Das aufgereinigte Virus wurde aliquotiert und bei -80°C gelagert.

#### 4.2.7 Virusquantifizierung

Zur Bestimmung des Titers von Virusbeständen wurden Plaque-Assays durchgeführt. Dazu wurden BHK21-Zellen in 6-Well-Platten ausgesät und bei ca. 85% Konfluenz verwendet. Das Medium wurde entfernt und die Zellen mit PBS mit Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> gewaschen. Es wurden Zehnfach-Verdünnungen des Virusbestandes in PBS mit Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> mit jeweils 4ml finalem Volumen einer Verdünnungsstufe angefertigt. Von jeder Zehnfach-Verdünnung wurde jeweils ein 1ml in insgesamt 3 Wells einer 6-Well-Platte gegeben. Die Verdünnungsstufen wurden üblicherweise bis zu einer Verdünnung von 1:10<sup>11</sup> durchgeführt. Die Zellen wurden für insgesamt eine Stunde bei Raumtemperatur infiziert. Danach wurde der Überstand abgesaugt, die Zellen dreimal mit PBS mit Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> gewaschen und anschließend mit einer 1:1 Mischung aus Kulturmedium und 1,8% Agarose überdeckt. Insgesamt wurde so ein 0,9% Agarose-in-Medium-Gemisch erreicht. Bei Raumtemperatur wurde auf das Erstarren der noch flüssigen Mischung gewartet, bevor die Zellen für 48h bei 37°C inkubiert wurden. In dieser Zeit konnte sich das Virus nur lokal in infizierten Zellen vermehren und diese lysieren, da eine Ausbreitung in der

ganzen Kulturschale durch die über den Zellen liegende, erstarrte Agarose verhindert wurde. Dadurch entstanden wie ausgestanzt wirkende, runde Defekte im sonst dichten Zellrasen. Nach der 48-stündigen Inkubation wurde die Agarose entfernt und die Zellen wurden mit Kristallviolett für 15min eingefärbt und gleichzeitig fixiert. Nach Entfernung von überschüssigen Kristallviolett und einem Waschvorgang mit Leitungswasser konnten die Defekte im Zellrasen gezählt werden. In der höchsten Verdünnungsstufe, in der noch Defekte im Zellrasen gezählt werden konnten, wurde die Virustiterbestimmung durchgeführt. Der Durchschnitt der Anzahl aller Defekte im Zellrasen in den drei Wells der höchsten Verdünnungsstufe wurde ermittelt und mit dem Kehrwert dieser Verdünnung multipliziert. Hierbei ergab sich der Titer mit der Einheit PFU/ml (Plaque forming units/ Milliliter).

Die viralen Titer aus Experimenten wurden mithilfe der TCID<sub>50</sub>-Methode bestimmt. Bei Zellkulturversuchen wurden wieder Verdünnungsstufen von 1:10 gebildet. Anschließend wurde die jeweilige Verdünnung in Quadrupels auf die in 96-Well-Platten wachsenden BHK-21-Zellen pipettiert. Nach 48h-72h wurde mithilfe eines Mikroskops festgelegt, in welchen Wells ein CPE zu erkennen war. Der CPE äußerte sich hier dadurch, dass infizierte Zellen sich abrundeten und die Adhärenz zum Plattenboden verloren. Der Titer wurde dann angepasst an die Reed&Muench-Endpunkt-Methode kalkuliert (Reed und Muench 1938). Die Titer werden als TCID<sub>50</sub>/ml angegeben. Für die Untersuchung des Virustiters in murinen Geweben wurden diese nach Entnahme bei -80°C gelagert. Zum Zeitpunkt der Untersuchung wurden die Gewebe gewogen und anschließend mithilfe eines Mörsers in eine Suspension in PBS mit Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> überführt. Die Konzentration der Gewebe in der Lösung lag hier bei 100mg/ml. Die Titer wurden dann aus dieser Lösung analog dem eben beschriebenen Protokoll bestimmt und werden dann als TCID<sub>50</sub>/mg Gewebe angegeben. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

Zur Beschreibung des Verhältnisses von Viren zu Zellen wird für die Experimente jeweils eine MOI angegeben. Diese MOI hat immer die Einheit PFU/Zelle und gibt somit die Anzahl der PFU, die für eine Infektion verwendet wurden, pro Zelle an.

#### 4.2.8 Virusinfektion

Um Suspensionszellen mit dem VSV zu infizieren, wurden diese gezählt, 5min bei 500g zentrifugiert und anschließend in PBS mit Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> bis zu einer Konzentration von 4\*10<sup>6</sup> Zellen/ml resuspendiert. Die jeweils im Experiment benannte Menge an Viren wurde dazugegeben und

insgesamt eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die infizierten Zellen dreimal mit PBS mit  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  gewaschen, um noch freie, nicht zellgebundene Viren zu entfernen. Der Waschvorgang erfolgte durch drei fünfminütige Zentrifugationen bei jeweils 500g und anschließender Resuspendierung. Danach wurden die Zellen für die jeweiligen Experimente benutzt. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

#### 4.2.9 Retrovirale genetische Modifikation von Zellen

Die  $\text{CD8}^+$ -Tcm wurden mittels retroviraler Transduktion dahingehend verändert, dass sie den optimierten, vorbeschriebenen TZR 2.5D6 (Klar, Schober et al. 2014), welcher an ein iRFP gekoppelt war, exprimierten oder als Kontroll-T-Zellen auch nur ein iRFP ohne TZR exprimierten. Die Transduktion wurde analog vorbeschriebener Arbeiten durchgeführt (Klar, Schober et al. 2014, Mall, Yusufi et al. 2016, Yusufi, Mall et al. 2017).

Dazu wurden die Retroviren in der Produktionszelllinie RD114, welche bereits die retroviralen Gene für „gag, pol und env“ genomisch enthalten und damit alle wesentlichen Teile zur Produktion des Retrovirus bereitstellen, hergestellt. Daher mussten diese Zellen nur mit dem Plasmid für das zu exprimierende Zielgen transfiziert werden. Dazu wurden die Zellen in 6-Well-Platten ausgesät und gewartet bis ihre Konfluenz zum Zeitpunkt der Transfektion etwa 60% betrug. Kurz vor der Transfektion wurde das verbrauchte Medium durch neues ersetzt, allerdings ohne die semiadhärenten Zellen dabei von der Kulturschale abzulösen. Für die Transfektion wurde in einem ersten Schritt ein Gemisch aus 200µl DMEM ohne ergänzende Zusätze und 1µl Transit gebildet. Dieses Gemisch wurde für 20min bei Raumtemperatur inkubiert. Für die eigentliche Transfektion wurde 1µg des Plasmids „pMP71“, welches das entsprechende Gen für die spätere Transduktion enthielt, nämlich den TZR 2.5D6-iRFP oder nur das iRFP, zu dem Gemisch dazugegeben. Nach einer vorsichtigen Mischung dieser drei Substanzen wurde unter den gleichen Konditionen für weitere 30min inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde das Transfektionsgemisch vorsichtig zu den RD114-Zellen zugegeben. Diese wurden anschließend für jeweils 48h und 72h bei 37°C kultiviert. Nach dieser Inkubationszeit wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und durch einen Filter mit 0,45µm großen Poren gefiltert, um verbliebene Zellreste zu entfernen. In der gefilterten Lösung befand sich das Retrovirus.



Zur Transduktion der CD8<sup>+</sup>-Tcm wurden 24-Well-Platten, welche explizit nicht für die Verwendung in der Zellkultur vorbehandelt worden waren, verwendet. Diese wurden am Tag vor der eigentlichen Transduktion mit einer PBS-Lösung, welche 12,5µg/ml Retronectin enthielt, bedeckt und über Nacht im Kühlschrank bei 4°C inkubiert. Am Tag der Transduktion wurde die Lösung abgenommen, durch 500µl 2%ige BSA-in-PBS-Lösung ersetzt und die Platten wurden abermals für 30min bei 37°C zur Blockade unspezifischer Bindungsstellen inkubiert. Danach wurde auch diese Lösung abgenommen und die Platten wurden zweimal mit einer HBSS-Lösung gewaschen.

Die CD8<sup>+</sup>-Tcm wurden am Tag vor der Transfektion der RD114-Zellen analog dem weiter oben beschriebenen Protokoll aktiviert. Am Tag der Transduktion wurde das zur Aktivierung benötigte Medium entfernt und durch ein Transduktionsmedium ersetzt. Dieses bestand aus T-Zell-Medium, welches 200U/ml IL-2, 20µl einer 1M HEPES-Lösung und 8µl einer 1mg/ml Protaminsulfat-Lösung enthielt. Die Zellen wurden in einer Konzentration von 10<sup>6</sup>/ml in diesem Transduktionsmedium resuspendiert und jeweils 1ml dieser Suspension in ein Well einer 24-Well-Platte pipettiert. Anschließend wurde 1ml der oben erwähnten Retrovirus enthaltenden Lösung dazugegeben. Dieses Gemisch wurde dann bei 32°C für 90min bei 820g in einer Zentrifuge ohne Bremse zentrifugiert. Danach wurden die Zellen für 24h bei 37°C in den Inkubator gestellt. Am nächsten Tag wurden die Zellen von der Platte abgenommen, zentrifugiert, das alte Medium verworfen, in Transduktionsmedium wieder gelöst und im Verhältnis 1:2 aufgeteilt. Die gleiche Prozedur der Transduktion wurde dann wiederholt. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

ML2-Leukämie-Zellen wurden analog diesem Protokoll mit dem HLA-B\*07:02 oder HLA-B\*15:01, jeweils an ein eGFP gekoppelt oder jeweils an ein eGFP und eine Firefly-Luciferase gekoppelt, wie bereits vorbeschrieben transduziert (Mall, Yusufi et al. 2016, Yusufi, Mall et al. 2017). Die so transduzierten ML2-Zellen wurden freundlicherweise von Univ.-Prof. Dr. med. Angela Krackhardt und ihrer Arbeitsgruppe aus der 3. medizinischen Klinik des Klinikums Rechts der Isar zur Verfügung gestellt.

#### 4.2.10 Überführung der transduzierten Zellen auf Sicherheitsstufe S1

Da die Zellen für die meisten Versuche nur auf der Sicherheitsstufe S1 verwendet werden durften, musste der Nachweis erbracht werden, dass sich nach einer bestimmten Zeit, ca. 10

Tage nach der Transduktion, kein Retrovirus mehr im Überstand befand. Dies geschah mithilfe einer PCR zum Nachweis der RNA für das „env“-Gen aus dem Überstand der transduzierten T-Zellen. Ein Kulturüberstand vom Zeitpunkt nach der Transfektion diente als Positiv-Kontrolle. Transduzierte ML2-Zellen wurden bereits von Univ.-Prof. Dr. med. Angela Krackhardt und ihrer Arbeitsgruppe aus der 3. medizinischen Klinik des Klinikums Rechts der Isar auf die Sicherheitsstufe S1 überführt.

Die retrovirale RNA wurde aus dem Zellkulturüberstand mithilfe des QiAmp Viral RNA Mini Kits von Qiagen gemäß den Herstellerangaben isoliert.

Anschließend wurde cDNA aus der RNA synthetisiert. Dazu wurde die AffinityScript Multiple Temperature Reverse Transkriptase verwendet.

9µl isolierter RNA-Lösung wurden mit 2µl A3-Rev-Viral-envelope Primer (10pM) und 1µl dNTPs (10mM) gemischt. Eine Inkubation für 5min bei 65°C und danach für 10min bei Raumtemperatur folgten. Sowohl 4µl Affinity Script Puffer als auch 2µl 100mM DTT wurden dazugegeben. Eine weitere Inkubation fand für 2min bei 42°C statt. Anschließend wurden 1µl AffinityScript Reverse Transkriptase und 1µl dNTPs (10mM) hinzugefügt. Die Reverse Transkription wurde dann für 1h bei 47,5°C durchgeführt und für 1min bei 70°C. Die so entstandenen cDNA-Proben wurden nun bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C gelagert.

Zum Nachweis der viralen Gene wurde nun eine PCR mit nachfolgenden Reagenzien und Zyklen durchgeführt.

Tabelle 30: Auflistung des Pipettieransatzes für die RT-PCR

Volumen	Reagenz
1,5µl	A3-Rev-Viral-envelope Primer (10pM)
1,5µl	A3-Fwd-Viral-envelope Primer (10pM)
5µl	dNTPs (2mM)
5µl	10x KOD Puffer
3µl	MgSO <sub>4</sub> (25mM)
2µl	cDNA
1µl	KOD Polymerase
31µl	DEPC-H <sub>2</sub> O

Die PCR wurde in einem Biometra Thermocycler mit folgenden Schritten durchgeführt.

Tabelle 31: Zeitliche Abfolge der PCR-Schritte

Zeit	Temperatur	Anzahl der Zyklen
2 min	94°C	1x
30sec	94°C	38x
30sec	56°C	
1 min	72°C	
10 min	72°C	1x
∞	16°C	

Die PCR Produkte wurden mit sechsfach DNA Loading Dye gemischt und in die Vorrichtungen eines 1% w/v Agarose in TAE-Gels pipettiert. Es wurde eine Spannung von 120V für 30min angelegt. Anschließend wurden die Gele im Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ mit zugehöriger Software fotografiert. Positivkontrolle war eine Probe von dem Zeitpunkt kurz nach der Transfektion. Negativ-Kontrolle war DEPC-H<sub>2</sub>O. Ein Beispiel für das Überführen der Zellen von Sicherheitsstufe S2 zu S1 ist in der folgenden Abbildung gegeben.

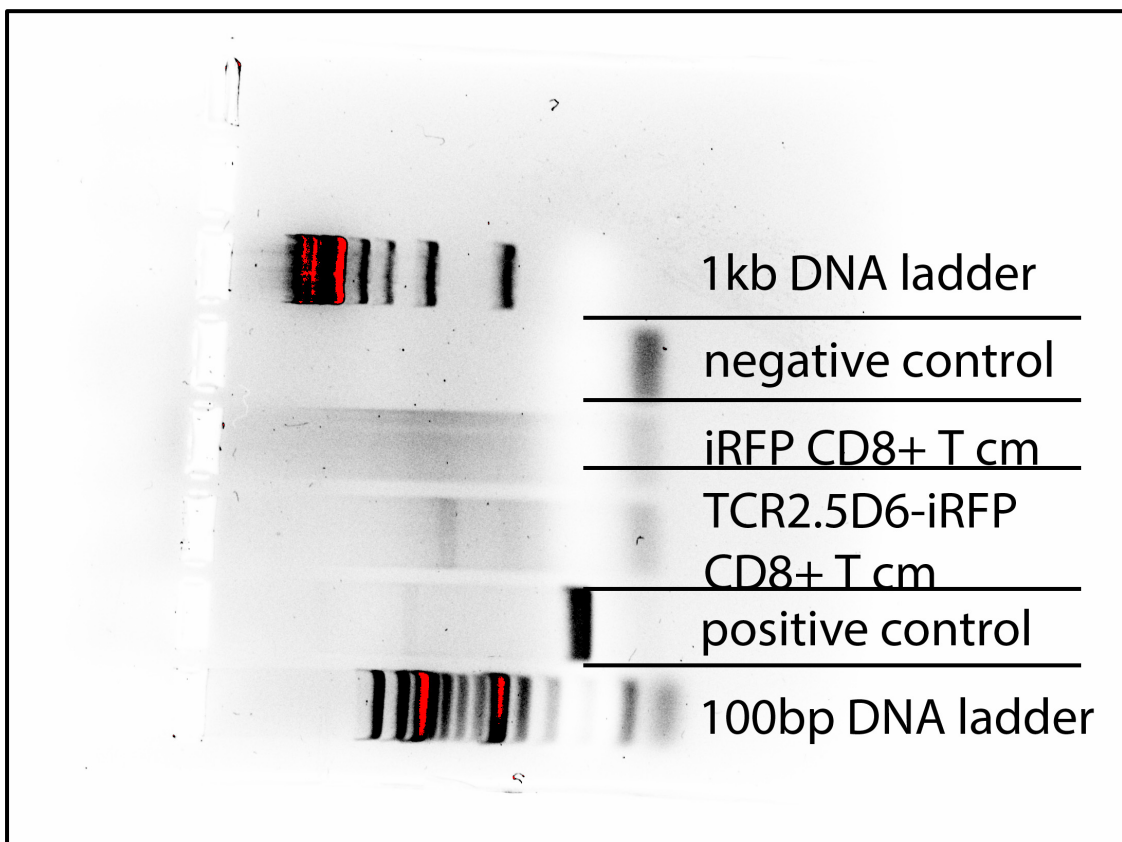


Abbildung 8: Exemplarische Darstellung einer Gelelektrophorese eines erfolgreichen Downgradings transduzierter T-Zellen

*Gezeigt wird das Bild eines Agarose-Gels nach Anlegen der Spannung von 120V für 30min. Von oben nach unten ergeben sich dabei folgende Banden: 1kb DNA-Standard, Negativkontrolle aus DEPC-H<sub>2</sub>O, der Überstand mit dem iRFP transduzierter CD8<sup>+</sup>-Tcm, Überstand mit dem TZR 2.5D6-iRFP transduzierter CD8<sup>+</sup>-Tcm, Positivkontrolle aus retroviraler RNA, 100bp DNA-Standard.*

#### 4.2.11 Durchflusszytometrie/FACS

Im Folgenden werden für die unterschiedlichen Anwendungsgebiete der Durchflusszytometrie die Protokolle angegeben.

##### In-vitro-Experimente:

Für in-vitro-Experimente wurden in der Regel  $10^5$ - $2 \cdot 10^6$  Zellen für die FACS-Färbung pro Probe verwendet. Das Kulturmedium der Zellen wurde in einem Zentrifugationsschritt entfernt. Die Zellen wurden dann in FACS Puffer einmal gewaschen, bevor eine FcR-Blockade mithilfe von humanem Serum durchgeführt wurde. Dabei wurden die FcR durch die im humanen Serum vorhandenen Antikörper blockiert, sodass die FcR bei der eigentlichen Färbung die Fluoreszenz-Antikörper nicht unspezifisch binden konnten. Dieser Schritt wurde für 15min auf Eis durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen wieder durch Zentrifugation für 5min bei 500g gewaschen und dann in 100µl FACS Puffer resuspendiert. Eine geeignete Menge Antikörper (in der Regel 1,5µl-5µl) und 7-AAD, Viability™ Dye 405/520 oder alternativ PI (Menge gemäß Herstellerangaben) zur Lebend-Tot-Diskrimination wurden hinzugefügt. Die Zellsuspension wurde durch Pipettieren gemischt. Eine Inkubation von 30min auf Eis erfolgte im Dunklen. Dann wurden die Zellen durch Zentrifugation und Resuspendierung dreimal gewaschen. Anschließend wurden sie mit einer 4% PFA-Lösung für 10min auf Eis im Dunklen fixiert und dann nochmals gewaschen. Jetzt wurden sie für die Analyse im FACS-Gallios-Gerät verwendet. Zellen wurden nur fixiert, wenn sie zuvor in die Sicherheitskategorie S2 eingestuft worden waren. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

##### Sorting/ Isolation von CD8<sup>+</sup>-Tcm:

Zellen, die für die durchflusszytometrische Anreicherung vorgesehen waren, wurden direkt nach der MACS-Anreicherung mit den Antikörpern für CD62L, CD45RO und 7-AAD wie gerade beschrieben gefärbt. Nach der Färbung wurden sie in Sorting-Puffer gegeben. Dieser enthielt

3% FBS, 1% P/S und 2,5mM EDTA. Das Sorting wurde an einem FACS-Aria-Gerät oder einem Sony-SH800-Sorter durchgeführt.

In-vivo-Experimente:

Nachdem die Mäuse euthanasiert worden waren, wurden ihnen die Milz, Lunge und Tumoren entnommen. Die Organe wurden dann in Kulturschalen mit FACS-Puffer überdeckt und auf Eis bis zur weiteren Verwendung gelagert. Vor der Färbung wurden sie durch einen 40µm Nylon Strainer mithilfe eines Spritzenkolbens durchgepresst. Dabei entstand eine Suspension aus Einzelzellen. Diese wurden zentrifugiert und einmal gewaschen. Danach wurden sie in einem Lysepuffer für Erythrozyten (Miltenyi, gemäß Herstellerangaben) für 10min inkubiert und wieder gewaschen. Anschließend wurde die FcR-Blockade durchgeführt. Hierbei wurde wieder humanes Serum verwendet. Zur Blockade der Maus-FcR wurde ein kommerzielles FcR-Reagenz von Miltenyi gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet. Die weitere Färbung erfolgte analog der oben beschriebenen für die in-vitro-Versuche (Antikörpermengen wieder analog den Herstellerangaben für die geeignete Zellmenge). (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

#### 4.2.12 Immunfluoreszenz

Der Prozentsatz infizierter CD8<sup>+</sup>-Tcm direkt nach der Infektion mit dem VSV wurde mithilfe von Immunfluoreszenz-Färbungen errechnet. Die CD8<sup>+</sup>-Tcm wurden wie oben beschrieben mit dem VSV infiziert. Direkt nach der Infektion wurden sie auf Objektträger, welche mit PLL beschichtet waren, getropft und gewartet, bis die Flüssigkeit der Zellsuspension verdunstet war. Dann wurden sie für 10min bei RT mit einer 4% PFA-Lösung fixiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden die Zellen mit einer PBS-Lösung, welche 0,25% Triton-X (v/v) enthielt, für 5min bei Raumtemperatur permeabilisiert. Nach einem weiteren Waschvorgang wurden unspezifische Bindungsstellen mithilfe einer 1% BSA in PBS-T-Lösung (w/v) für 30min bei RT blockiert. Danach wurden die Zellen mit dem VSV-G-Cy3-Antikörper in vorgeschlagener Konzentration in einer Lösung aus PBS-T gefärbt. Die Färbung wurde über Nacht bei 4°C durchgeführt. Die Zellen wurden nach der Färbung wieder dreimalig gewaschen und anschließend mit dem Fluoroshield Mounting Medium mit DAPI bedeckt, welches gleichzeitig die Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI erlaubte. Nach dem Abdecken des Objektträgers mit einem Deckglas wurden sie im Dunklen gelagert. Mikroskopiert und fotografiert wurde dann mit einem Axio

Imager.M2 Mikroskop und einer AxioCam MRc5 Kamera. Die Bilder wurden in Adobe Photoshop importiert und dort weiterverarbeitet. Die Zellen, die ein Signal für die Färbung mit dem VSV-G-Cy3-Antikörper aufwiesen, wurden ins Verhältnis zu allen angefärbten Zellen gesetzt. Mikroskopiert wurden die Zellen bei insgesamt 400facher Vergrößerung. Pro Probe wurden drei Gesichtsfelder dieser Vergrößerung untersucht.

#### 4.2.13 ELISA

Ein IFN- $\gamma$ -ELISA wurde gemäß den Herstellerangaben mit dem BD OptEIA™ Human IFN- $\gamma$  ELISA Kit durchgeführt. Kurz zusammengefasst: Die Immunoplates wurden über Nacht bei 4°C mit 100 $\mu$ l Capture-Antikörper-Lösung beschichtet. Am nächsten Morgen wurde die Lösung abgenommen und die Platten wurden dreimal mit dem ELISA Wasch-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Platten mit 200 $\mu$ l ELISA Test-Puffer für eine Stunde bei RT geblockt. Nach einem weiteren dreischrittigen Waschvorgang wurden schließlich 100 $\mu$ l Probe in jedes Well für zwei Stunden bei Raumtemperatur gegeben. Nach einem fünfschrittigen Waschvorgang wurden die Wells mit 100 $\mu$ l Working-Detektions-Lösung des Kits für eine Stunde bei RT inkubiert. Nach sieben weiteren Waschvorgängen wurden 100 $\mu$ l Substrat-Lösung aus dem Kit hinzugegeben. Eine Inkubation für 30 min im Dunklen folgte. Anschließend wurden 50 $\mu$ l Stopp-Lösung hinzugegeben und die Absorption wie unten angegeben gemessen.

Transduzierte CD8<sup>+</sup>-Tcm und ML2-Zellen wurden in Mischkulturen kultiviert. Der Überstand wurde dann zu den angegebenen Zeitpunkten für den IFN- $\gamma$ -ELISA verwendet. Die Kulturüberstände wurden bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Basierend auf einer Standardkurve wurde dann die IFN- $\gamma$ -Konzentration im Überstand der verschiedenen experimentellen Bedingungen gemessen. Die Absorption der einzelnen Proben wurden dann in einem TECAN Sunrise® Plattenlesegerät bei 450nm und 570nm gemessen. Die Absorption bei 570nm wurde als Hintergrundabsorption von derjenigen bei 450nm abgezogen. Jedes Experiment wurde in Triplets durchgeführt. Negativkontrollen wurden mit den Überständen unbehandelter Tumorzellen durchgeführt. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

#### 4.2.14 Tierversuche

Alle Tierversuche wurden mit NSG- (NOD. Cg-Prkdc<sup>scid</sup> Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ; The Jackson Laboratory) Mäusen durchgeführt. Die Versuche wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt (Tierversuchsantrag 55.2-1-54-2532-52-14, Erweiterung) und gemäß den Vorschriften des Klinikums durchgeführt. Die Mäuse wurden in speziellen pathogen-freien Räumen gehalten und gezüchtet. Sie wurden jeden Tag von erfahrenen Tierpflegern auf Krankheitszeichen untersucht.

Für die Toxizitätsstudie bekamen die Mäuse unterschiedliche Dosen des VSV, entweder als alleiniges VSV direkt oder als an CD8<sup>+</sup>-Tcm gebundenes VSV. Es wurden dann 10<sup>7</sup> infizierte CD8<sup>+</sup>-Tcm mit entsprechender Virusdosis bzw. nicht zellgebundenes Virus angegebener Dosis in die Schwanzvene injiziert. Zur Toxizitätsmessung wurden die Mäuse für drei Wochen beobachtet und bei Krankheitszeichen euthanasiert. Für alle Toxizitätsexperimente wurde das rVSV-GFP verwendet. Die Dosisfindung wurde analog der „3+3 Fibonacci-Sequenz“ durchgeführt (Le Tourneau, Lee et al. 2009). Initial waren in jeder Dosisgruppe drei Mäuse. Zeigte sich innerhalb von 14 Tagen Beobachtungsdauer kein toxisches Ereignis, so wurde die nächst höhere Dosis an weiteren drei Mäusen getestet. Bei nur einem toxischen Ereignis innerhalb einer 14-tägigen Beobachtungsdauer wurden drei weitere Mäuse zur Gruppe hinzugefügt. Wenn dann kein weiteres toxisches Ereignis beobachtet wurde, dann wurde diese Dosis als sichere Dosis für 14 Tage definiert. Bei zwei oder mehr toxischen Ereignissen innerhalb der ersten 14 Tage nach Beobachtungsbeginn wurde die Dosis als toxisch gewertet. Insgesamt wurden die Mäuse in der Dosisfindungsstudie für 21 Tage beobachtet. Zum Zeitpunkt des Todes der Mäuse wurden Ihnen Leber, Milz, Lunge und Gehirn entnommen und mittels TCID<sub>50</sub>-Methode auf die Anwesenheit des VSV untersucht. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

Zur Untersuchung der In-Vivo-Effektivität der Therapie von Tumoren wurden den Mäusen ML2B7- und ML2B15- Zellen subkutan in die Flanken gespritzt (Mall, Yusufi et al. 2016, Yusufi, Mall et al. 2017). 10<sup>7</sup> ML2B7-Zellen wurden in die rechte Flanke gespritzt, 10<sup>7</sup> ML2B15-Zellen wurden in die linke Flanke derselben Maus gespritzt. Für die Therapie-Kinetik Studien wurden die Zellen elf Tage vor der eigentlichen Therapie implantiert. Die Mäuse wurden jeweils nach 24h, 72h und 120h zur Analyse unterschiedlicher Zeitpunkte nach Therapiebeginn getötet und untersucht. Die Therapien wurden jeweils über die Schwanzvene appliziert. Jede Maus, die T-Zellen erhielt, erhielt 10<sup>7</sup> T-Zellen in Kombination mit und ohne VSV und zusätzlich wurde 1µg IL-15 intraperitoneal einmal pro Woche verabreicht. Zur Untersuchung der Tumorabstoßung und des Gesamtüberlebens wurden die Tumorzellen 10 Tage vor der Therapie implantiert.

Alle Mäuse wurden getötet, wenn sie ernsthafte Krankheitszeichen zeigten oder die Tumoren größer wurden als im TVA vorgesehen und genehmigt. Die Tumorgöße wurde mit einem Messschieber gemessen. In der untenstehenden Abbildung ist der Versuchsaufbau skizziert. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

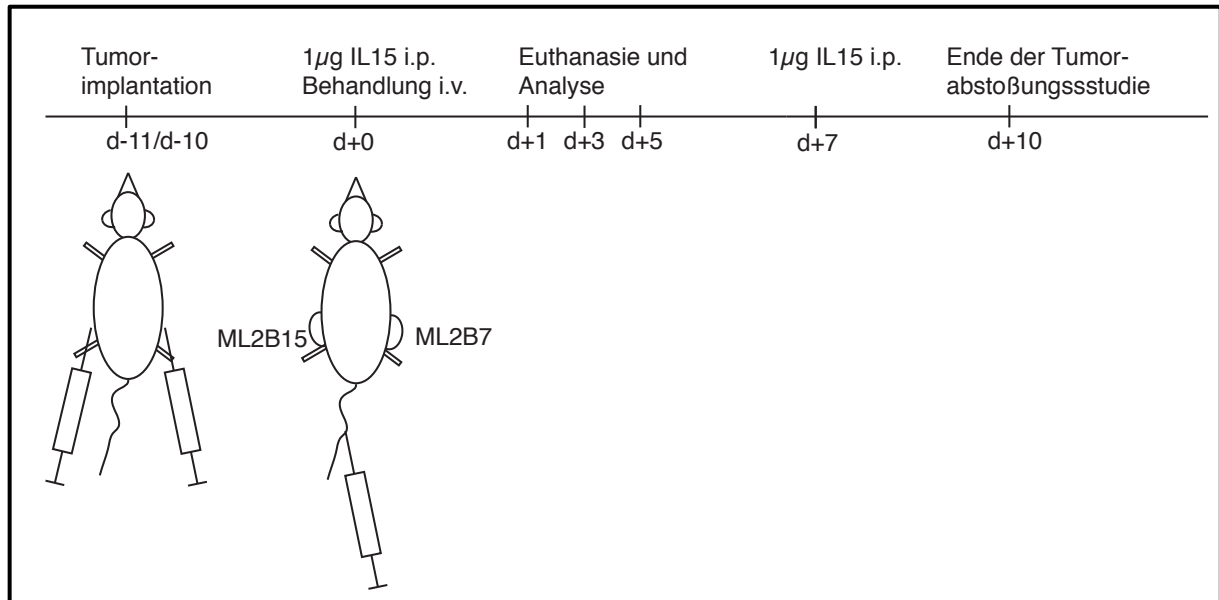


Abbildung 9: Murines Modellsystem, modifiziert nach (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

Gezeigt wird der Ablauf von Mausversuchen. Zu Beginn wurden den Mäusen Leukämiezellen subkutan gespritzt. Nach 10 bzw. 11 Tagen wurde den Mäusen eine Therapie über die Schwanzvene verabreicht. Nach 1,3,5 Tagen wurden die Mäuse euthanasiert. Zum Zeitpunkt 0 und 7 Tage nach Therapiebeginn wurde IL-15 i.p. appliziert. Die weiteren Zeitpunkte der IL-15-Injektion alle 7 Tage sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht eingezeichnet. Nach 10 Tagen wurde die Tumorabstoßungsstudie beendet. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

Zu Analysezwecken wurden die Tumoren, sofern groß genug, in drei Stücke geschnitten. Ein Stück wurde für eine durchflusszytometrische Analyse, wie oben beschrieben, verwendet. Ein weiteres für die Bestimmung des Virustiters im Tumor mit der TCID<sub>50</sub>-Methode und das letzte Stück wurde für eine histologische Untersuchung verwendet.

#### 4.2.15 Histologie, Immunhistologie, Nekrosequantifizierung



Die Tumorstücke wurden für mindestens 18h bei 4°C in einer 4% PFA Lösung fixiert. Anschließend wurden sie in einer Leica ASP300S Maschine dehydriert, mit einer Leica EG1150H Maschine in Paraffin eingebettet und dann bei -20°C eingefroren. Schließlich wurden sie in 2µm dünne Scheiben mit dem HM 355S Rotary Mikrotoms geschnitten und auf Objektträger aufgebracht. Mindestens drei Schnitte pro Tumor wurden nach einem Standardprotokoll mit H&E eingefärbt. Dazu wurden die Schnitte zweimal für jeweils fünf Minuten in einem Xylol-Bad entparaffiniert. Anschließend wurden sie über jeweils zweiminütige Bäder in 96%, 80%, 70% und 60% Ethanol und schließlich ddH<sub>2</sub>O gewässert, bevor sie für 5min in einer Mayer-Hämalaun-Lösung gefärbt wurden. Nach einem zwölfminütigen Spülvorgang mit Leitungswasser wurden sie erneut für 5min in Eosin gefärbt. Gewaschen wurden sie dann für 5min in ddH<sub>2</sub>O. Eine Dehydratation erfolgte dann für 1min in 80% Ethanol, gefolgt von jeweils 2min in zweimal 96% Ethanol, 2min Isopropanol, und zweimal 5min in Xylol. Anschließend wurden die Schnitte mit Pertex® und Deckgläsern bedeckt. Die Objektträger wurden dann an einem Leica AT2 Scanner eingescannt. Drei Schnitte pro Tumor mit mindestens 150µm Abstand zueinander wurden dann auf ihren jeweiligen Nekrosegrad mittels der Aperio Imagescope Software von Leica untersucht. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

Die Immunhistologie wurde auch an 2µm dicken Schnitten durchgeführt. Die Proben wurden dazu in die zentrale Histologieeinheit des Sonderforschungsbereiches 824 gegeben und dort nach einem Standardprotokoll für humanes CD3 in einem DAKO Autostainer gefärbt. Die Methode wurde zuvor beschrieben (Mall, Yusufi et al. 2016, Yusufi, Mall et al. 2017). (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

#### 4.2.16 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der Graphpad Prism 7 Software. Die Errechnung von Standardkurven erfolgte mit Microsoft Excel. In den einzelnen Abbildungen wird angegeben, welcher Test zur Auswertung verwendet wurde. Wenn angegeben wird, dass es sich um Triplets handelt, so sind biologische Triplets gemeint.

## 5 Ergebnisse

Ein Teil der folgenden Ergebnisse wurde bereits in (Melzer, Zeitlinger et al. 2019) publiziert. Die Abbildungen sowie die Beschreibungen im Text, welche Teile der Ergebnisse aus der Publikation beinhalten, sind als solche mit einem Zitat gekennzeichnet. Befindet sich das Zitat am Ende eines Absatzes nach einem Punkt, so bezieht es sich auf den gesamten vorhergehenden Absatz.

### 5.1 Identifizierung der als Shuttle für das VSV am besten geeigneten T-Zell-Population

Das erste Ziel der Arbeit war es, diejenige T-Zell-Population zu finden, die sich am besten für den Transport des VSV eignet. Grundsätzliche Überlegungen dafür waren, dass die Population möglichst viel VSV transportieren sollte, ohne darunter selbst zugrunde zu gehen. Daher wurde untersucht, welche Reaktionen pan-T-Zellen, CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in Hinblick auf Zellvitalität nach der Beladung bzw. Infektion mit dem VSV zeigten. Zudem wurde geprüft, ob und wie viel VSV die T-Zellen produzieren können, also ob das Virus in den Zellen repliziert oder das VSV die Zellen nur als Vehikel benutzt, indem es sich lediglich an deren Oberfläche lagert.

#### 5.1.1 T-Zell-Vitalität und virale Genexpression nach VSV-Infektion

Zunächst wurde die Vitalität der einzelnen, oben genannten Populationen nach einer Beladung mit dem VSV untersucht. Dazu wurden die T-Zellen wie ausführlich im Methodenteil beschrieben exemplarisch mit einer MOI von 1 mit dem rVSV-GFP infiziert und anschließend für 24h kultiviert. Nach der 24-stündigen Inkubation wurden die Zellen durch eine FACS-Analyse untersucht. Dazu wurden sie mit 7-AAD zur Diskrimination zwischen lebenden und toten T-Zellen gefärbt. In einem ersten Schritt wurden nur die lebenden Zellen, nach Ausschluss der mit 7-AAD angefärbten, toten Zellen untersucht. Hierbei wurde der Prozentsatz der GFP exprimierenden T-Zellen in den verschiedenen Populationen verglichen. Da die T-Zellen von sich aus keine GFP-Expression zeigen, handelte es sich hier um das viral transduzierte GFP und gibt somit eine Näherung an die Anzahl der T-Zellen, die eine virale Genexpression unterstützen. Es stellte sich dabei heraus, dass in allen Populationen virale Genexpression auf einem relativ niedrigen Niveau stattfand. So zeigten die Pan- und CD4<sup>+</sup>-T-Zellen eine Expression im Mittel

von etwa 10-15% und die CD8<sup>+</sup>-T-Zellen eine leicht niedrigere Genexpression von etwa 8%. Dabei wurde aber eine starke Streuung der Werte festgestellt, welche vom Spender der T-Zellen abhängig war. Insgesamt zeigte sich ein Trend, dass CD8<sup>+</sup>-T-Zellen weniger virale Genexpression zuließen als die beiden anderen untersuchten Populationen, allerdings konnte keine Signifikanz der Ergebnisse nachgewiesen werden. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

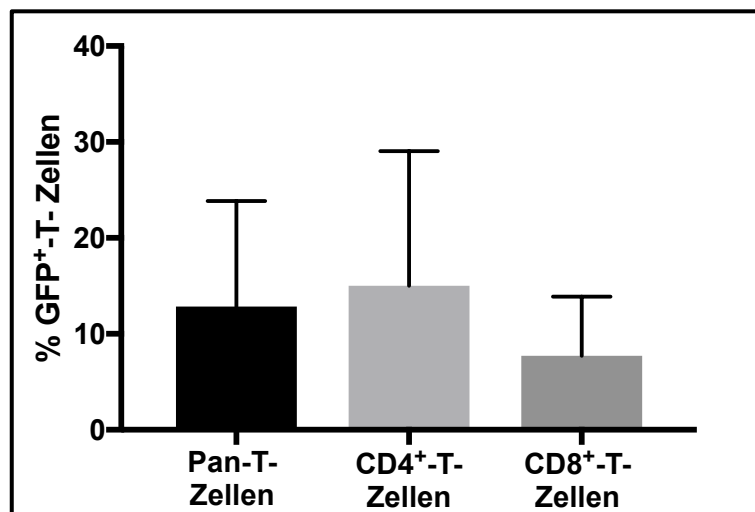


Abbildung 10: Virale GFP-Expression in unterschiedlichen T-Zell-Populationen nach 24h, modifiziert nach (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

Gezeigt werden MW und SD der GFP-Expression in unterschiedlichen T-Zell-Populationen von 4 unterschiedlichen T-Zell-Donoren 24h nach der Infektion mit der MOI von 1 des rVSV-GFP. Im T-Test konnte keine Signifikanz nachgewiesen werden. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

Zur qualitativen Kontrolle der FACS-Ergebnisse wurden die infizierten T-Zellen 24h nach der Infektion mit dem rVSV-GFP, bevor sie für die FACS-Analyse aufbereitet wurden, zusätzlich mithilfe der Fluoreszenz-Mikroskopie untersucht. Dabei bestätigte sich, dass tatsächlich etliche Zellen GFP exprimierten. Des Weiteren wurde dabei klar, dass vor allem proliferierende Zellen, welche sich zusammenballen, die virale Genexpression unterstützen. Dies ist sehr gut in den repräsentativen Bildern der Fluoreszenz-Mikroskopie zu erkennen. Dort sieht man die Expression des viralen GFP tatsächlich überwiegend in den Proliferationsclustern der unterschiedlichen T-Zell-Populationen. Dieses Resultat passt sehr gut zu den Erkenntnissen von Oliere et al., dass zur Replikation des VSV in T-Zellen ein Eintritt in den Zellzyklus notwendig ist (Oliere, Arguello et al. 2008).

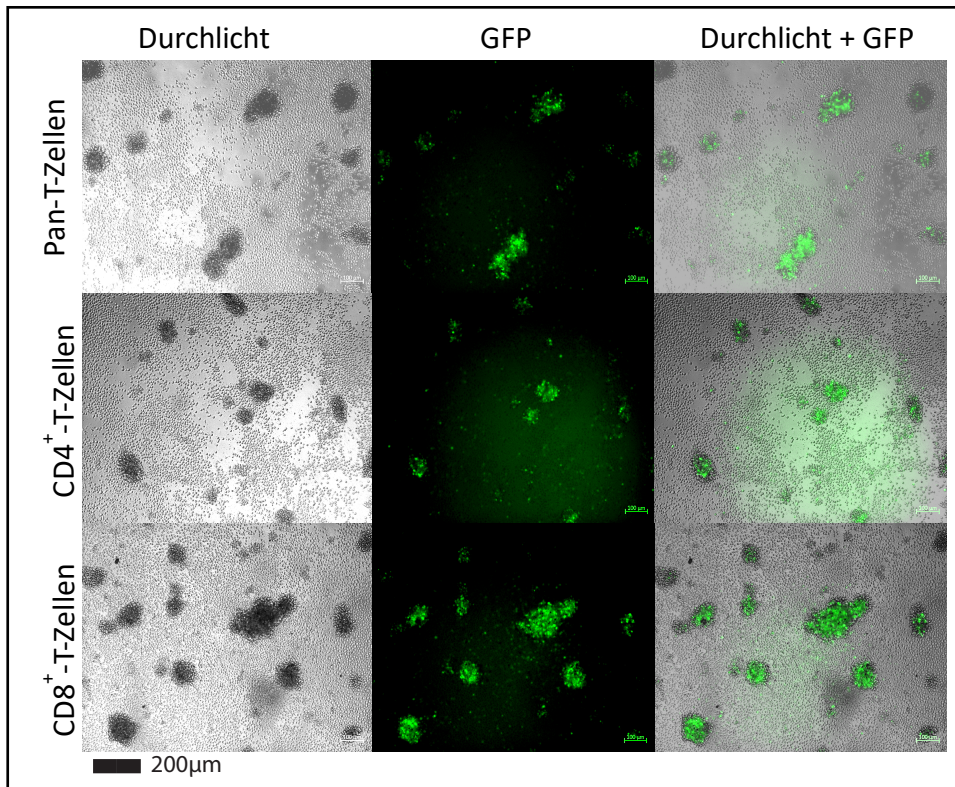


Abbildung 11: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der viralen Genexpression in verschiedenen T-Zell-Populationen nach 24h

Repräsentative Bilder von fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen werden gezeigt. Die Bilder wurden 24h nach der Infektion der T-Zellen mit dem rVSV-GFP angefertigt. Das erste Bild einer Spalte ist immer das durchlichtmikroskopische Bild ohne Fluoreszenz-Filter. Das zweite Bild ist das Bild mit GFP-Filter und das dritte Bild zeigt das Übereinanderlegen der beiden ersten Bilder. Von oben nach unten zu sehen sind: Pan-T-Zellen, CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, CD8<sup>+</sup>-T-Zellen. Der Balken gibt für jedes Bild 200µm an.

Die Untersuchung der T-Zell-Vitalität als solche fand ebenfalls in der FACS-Analyse statt. Dazu wurden sie für 24h mit einer MOI von 1 mit dem rVSV-GFP infiziert. Dann wurden sie wie beschrieben mit 7-AAD gefärbt und nachdem im FACS ein Lymphozyten-Gate angewendet wurde, wurde der Prozentsatz der 7-AAD aufnehmenden Zellen als Korrelat für tote Zellen untersucht. Gezeigt werden dabei wieder Ergebnisse von vier unterschiedlichen Experimenten. Entgegen der Annahme, dass das VSV eigentlich nur in Tumorzellen replizieren und diese töten sollte, findet sich überraschenderweise ein nicht unerheblicher Prozentsatz toter T-Zellen nach 24h. Ähnlich den Ergebnissen der GFP-Analyse zeigen sich hier die meisten toten Zellen bei den Pan-T-Zellen und CD4<sup>+</sup>-T-Zellen mit im Mittel 25-30% toten Zellen nach 24h.

Der Prozentsatz toter CD8<sup>+</sup>-T-Zellen ist dagegen deutlich niedriger. Er liegt bei 10-15%. Analog den Ergebnissen der Untersuchung der GFP-Expression ließ sich auch hier keine Signifikanz für die Unterschiede zeigen, da es auch hier eine gewisse donorabhängige Streuung der Ergebnisse gab.

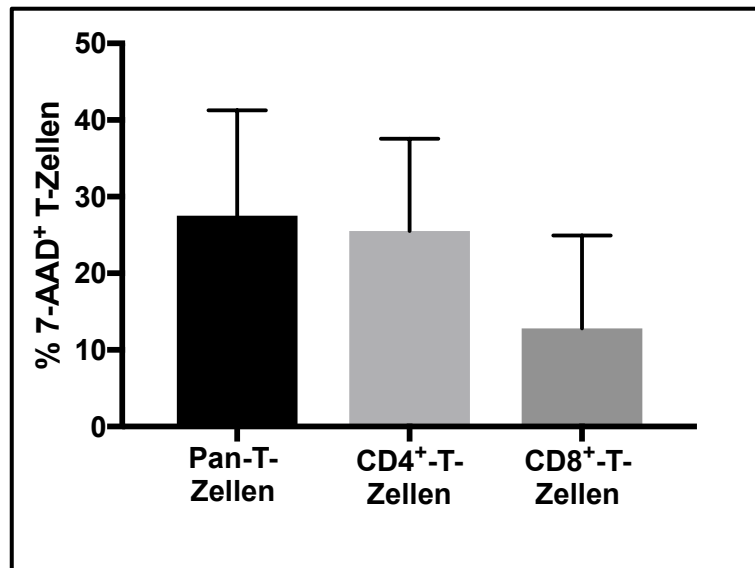


Abbildung 12: Anteil toter T-Zellen in verschiedenen T-Zell-Populationen 24h nach der Infektion mit dem rVSV-GFP

Gezeigt wird jeweils der MW und die SD des Prozentsatzes der 7-AAD<sup>+</sup> T-Zellen als Korrelat für die Anzahl der toten T-Zellen 24h nach der Infektion mit der MOI 1 des rVSV-GFP. Zur Analyse wurden die Zellen mit 7-AAD angefärbt.

### 5.1.2 Virustiter in verschiedenen T-Zell-Populationen

Um herauszufinden, ob das VSV die T-Zellen nur tötet oder auch in ihnen repliziert, wurden die Titer des rVSV-GFP aus den Zellkultur-Überständen oben durchgeführter Experimente bestimmt. Dabei zeigte sich, dass das rVSV-GFP bereits innerhalb von 24h in den unterschiedlichen T-Zell-Populationen repliziert und im Mittel zu hohen viralen Titern führt, die sich im Bereich von  $10^7$ - $10^8$  TCID<sub>50</sub>/ml befinden. Die Virustiterbestimmung wurde aus den Kulturüberständen von T-Zellen sechs verschiedener Spender durchgeführt. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

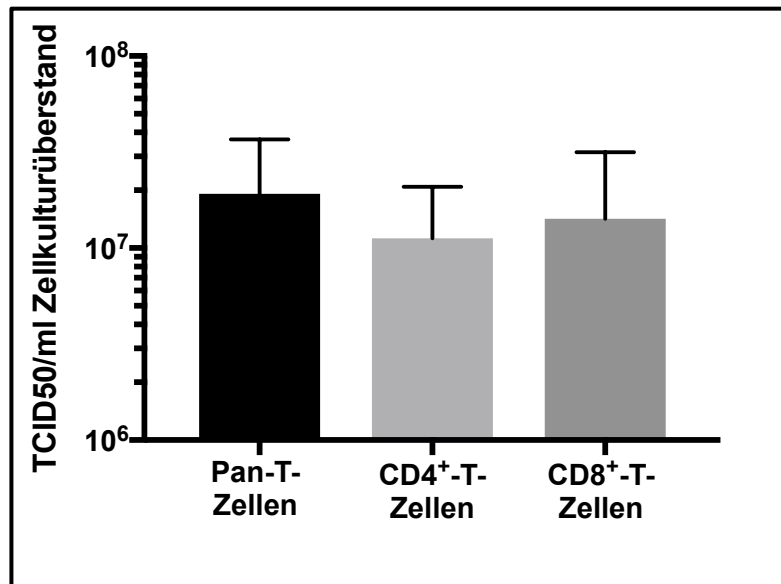


Abbildung 13: Virale Titer 24h nach Infektion unterschiedlicher T-Zell-Populationen mit einer MOI von 1, modifiziert nach (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

Gezeigt werden jeweils die MW und SD der viralen Titer von in T-Zellen produziertem rVSV-GFP als TCID<sub>50</sub>/ml von sechs unterschiedlichen Experimenten 24h nach der Infektion der T-Zell-Populationen mit der MOI 1 des rVSV-GFP. Signifikanz besteht keine. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

### 5.1.3 Kinetik der viralen Genexpression und Replikation in T-Zellen

Zur Untersuchung, ob sich die Prozentsätze der toten T-Zellen über einen gewissen Zeitraum verändern, wurden die T-Zell-Populationen mit der MOI von 1 des rVSV-GFP infiziert. Nach 16h, 24h, 36h und 48h wurden dann die Prozentsätze der 7-AAD gefärbten Zellen im FACS untersucht. Dabei zeigt sich ein nahezu linearer Anstieg der toten Zellen mit fortschreitender Inkubationszeit. Dennoch scheint es auch hier einen kleinen Trend dazu zu geben, dass die CD8<sup>+</sup>-T-Zellen etwas resistenter sind als die Pan-T-Zellen und CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und länger überleben.

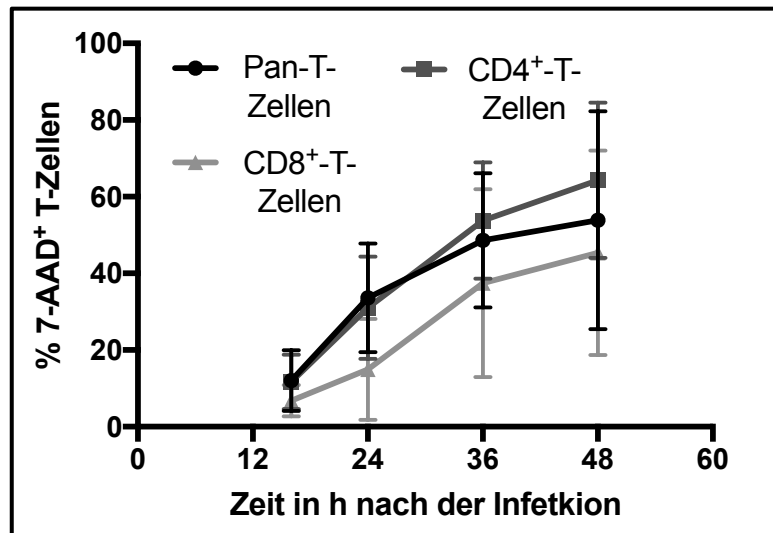


Abbildung 14: Kinetik der Abtötung unterschiedlicher T-Zell-Populationen durch das rVSV-GFP

Gezeigt werden die MW und SD der einzelnen mit der MOI von 1 des rVSV-GFP infizierten toten, 7-AAD<sup>+</sup> T-Zell-Populationen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion. Das Experiment wurde mit den T-Zellen von vier unterschiedlichen Donoren durchgeführt.

Auch die virale Replikation wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen. Dazu wurde der Titer aus dem Überstand des Zellkulturmediums unterschiedlicher T-Zell-Populationen zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Infektion der T-Zellen mit der MOI von 1 des rVSV-GFP mithilfe der TCID<sub>50</sub>-Methode bestimmt. Ein Peak in der Virusproduktion fand sich schon nach 24h. Danach fielen die Titer dann wieder leicht ab. Das ist vermutlich dadurch zu erklären, dass das Virus im Laufe der Zeit instabil wird und sich auch durch die Einwirkung der relativ hohen Temperaturen von 37°C im Inkubationsschrank zersetzt. Auch hier fanden sich minimale Unterschiede, wenn man die CD8<sup>+</sup>-T-Zellen mit den Pan-T-Zellen und CD4<sup>+</sup>-T-Zellen vergleicht. Dabei zeigte sich auch hier eine leicht verzögerte Produktion des VSV, die erst nach 36h einen Peak erreicht. Vermutlich sind zu früheren Zeitpunkten noch nicht so viele CD8<sup>+</sup>-T-Zellen infiziert und abgetötet worden waren, wie im vorherigen Bild beschrieben. Aus all diesen Untersuchungen ergab sich, dass CD8<sup>+</sup>-T-Zellen am geeignetsten scheinen, um das VSV im Organismus zum Tumor zu bringen. Überlegungen dazu waren, dass die CD8<sup>+</sup>-T-Zellen ähnlich viel Virus produzieren können wie die anderen Populationen, aber dennoch etwas resistenter erscheinen. Zudem sind CD8<sup>+</sup>-T-Zellen bekanntermaßen die direkt-zytotoxischen Zellen, so dass transduzierte CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, welche ein bestimmtes Tumorantigen erkennen können, einen eigenen, zusätzlichen zytotoxischen Effekt auf Tumorzellen ausüben können. So ergibt

sich ein hypothetischer Synergismus als Virus-Shuttle und als Tumorkiller. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

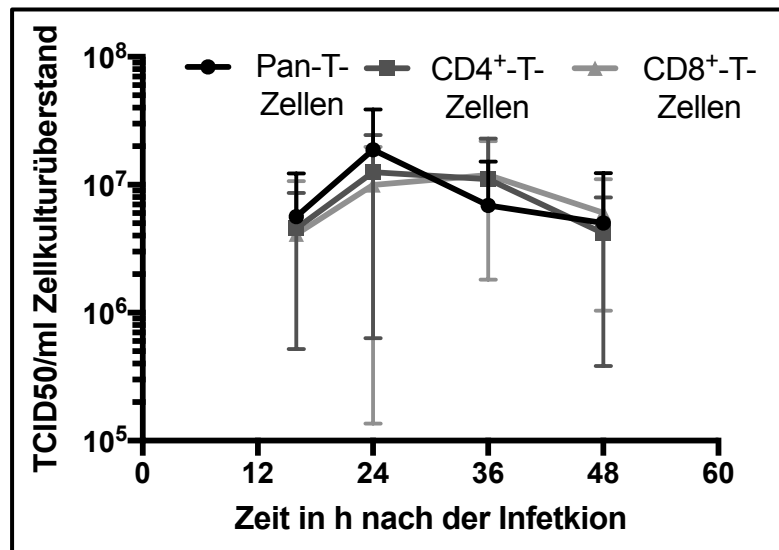


Abbildung 15: Kinetik der viralen Replikation in unterschiedlichen T-Zell-Populationen, modifiziert nach (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

Zu sehen sind die MW und SD aus vier verschiedenen Experimenten mit der MOI von 1 des rVSV-GFP infizierten T-Zell-Populationen zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Die Zellkulturüberstände wurden mittels TCID<sub>50</sub>-Methode untersucht. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

#### 5.1.4 Kinetik der Replikation des VSV in J76-Zellen

Bis zu diesem Punkt sind die Ergebnisse insofern überraschend, als das VSV überhaupt in primären T-Zellen replizieren kann. Um zu sehen, ob es doch Unterschiede in der Replikationskinetik zu Tumorzellen gibt, wurde die Replikation und Genexpression des VSV in einer T-Zell-Tumor-Zelllinie untersucht. Dafür wurden J76-Zellen genommen. Diese Zellen wurden mit unterschiedlichen MOIs des VSV infiziert. Nach 24h und 48h wurden die Zellen dann im FACS auf die Expression von viralem GFP und auf die Aufnahme von 7-AAD als Korrelat für tote Zellen untersucht. Dabei zeigte sich bereits mit der kleinsten Infektionsdosis (MOI 0,003) eine nahezu vollständige GFP-Expression in den J76-Zellen nach nur 24h. Als erstes hierzu wird ein repräsentativer FACS Dotplot gezeigt. In diesem sind rund 80% der aufgezeichneten Ereignisse in der FACS-Analyse im Bereich des 7-AAD<sup>-</sup>(also lebenden)-GFP<sup>+</sup>-Sektors zu finden. Dies deutet



darauf hin, dass nach 24h noch viele J76-Zellen leben und zugleich die virale Genexpression unterstützen.

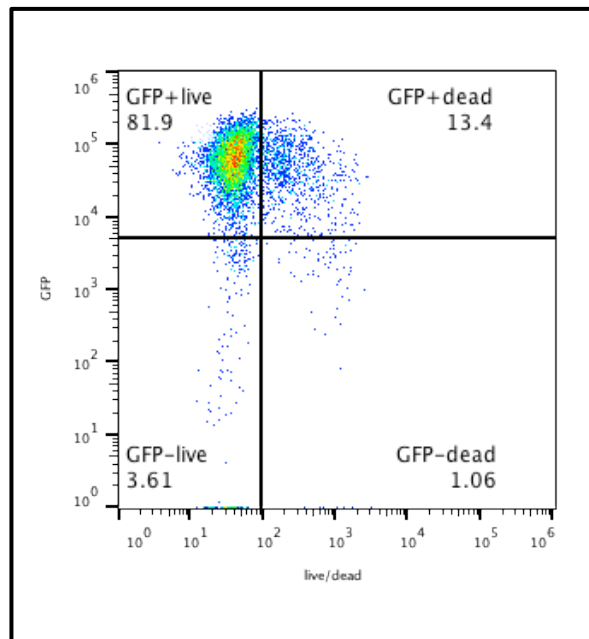


Abbildung 16: Repräsentativer FACS-Dotplot der GFP-Expression in J76-Zellen 24h nach der Infektion mit dem rVSV-GFP

Gezeigt wird ein repräsentativer FACS Dotplot der J76 Zellen nach Infektion mit der MOI von 0,003 des rVSV-GFP. Der Zeitpunkt der Messung liegt bei 24h nach der Infektion.

Die simultane Analyse des GFP und 7-AAD 48h nach der Infektion der J76-Zellen in Abhängigkeit der MOI zeigte, dass es fast ausschließlich tote Zellen zu diesem Zeitpunkt gab. 24h nach der Infektion gab es dahingegen noch lebende Zellen mit GFP-Expression. Interessanterweise reichte die MOI von 0,003 aus, um eine sehr hohe GFP-Expression bereits nach 24h zu erreichen. Bei einer höheren MOI waren bei diesem Zeitpunkt bereits die meisten Zellen tot. All dies deutet auf eine sehr hohe Sensitivität der T-Zelllinie gegenüber dem VSV hin.

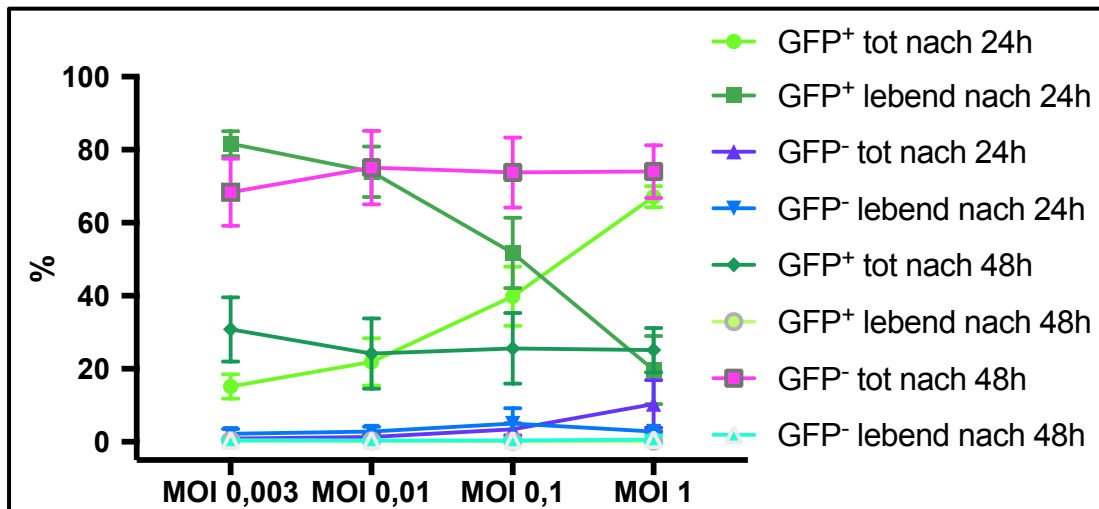


Abbildung 17: Dosisabhängige virale Genexpression in J76-Zellen

Gezeigt wird der Prozentsatz der MW und SD 24h und 48h nach der Infektion der J76-Zellen mit der jeweils angegebenen MOI des rVSV-GFP. Es wurde ein Experiment in Triplets durchgeführt.

Die Untersuchung der Zellkulturüberstände auf replikationskompetente Viren zeigte, dass das rVSV-GFP sehr schnell in den J76-Zellen replizierte und dabei sehr hohe Titer erreichte. Ein Peak war dabei nach 24h zu beobachten und interessanterweise am höchsten für die MOI von 0,1 und nicht für die höchste MOI von 1. Die Titer befanden sich nach 24h in einem Bereich von  $10^8$ - $10^9$  TCID<sub>50</sub>/ml, also etwa eine Logarithmusstufe über den Titern der untersuchten primären T-Zell-Populationen. Nach 48h fielen die Titer dann wieder für alle MOIs, was vermutlich wieder an der hitzebedingten Degradation in den Zellkulturinkubatoren lag, zumal zu diesem Zeitpunkt nachweislich die allermeisten J76-Zellen bereits tot waren und eine weitere Virusvermehrung nicht mehr unterstützen konnten.

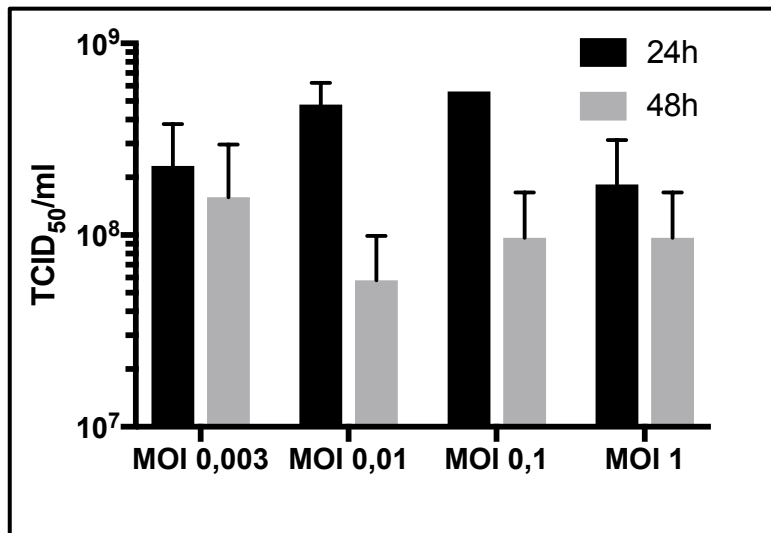


Abbildung 18: Dosisabhängige virale Replikation in J76-Zellen

Gezeigt werden die MW und SD der viralen Titer des rVSV-GFP zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Infektion der J76-Zellen. Hierbei handelt es sich um ein Experiment, welches in Triplets durchgeführt wurde.

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen der J76-Zellen im Vergleich zu den Ergebnissen mit den drei verschiedenen untersuchten T-Zell-Populationen legen nahe, dass das VSV zwar in T-Zellen effizient replizieren kann, diese aber bei weitem nicht so anfällig sind wie ihre Tumorzellpendants. Mit diesem Experiment ist gezeigt, dass primäre T-Zellen eine relativ hohe Resistenz gegen das VSV haben, obwohl sie dennoch dessen Replikation in für dieses Projekt ausreichendem Maße unterstützen. Aufgrund der vorbeschriebenen Voraussetzung des Zellzykluseintritts (Oliere, Arguello et al. 2008) für die VSV-Replikation lässt sich hier sogar annehmen, dass es sich um eine artifizielle Situation hinsichtlich der viralen Replikation in den T-Zell-Populationen handelt, da diese stark aktiviert wurden, um in Kultur zu proliferieren.

Für alle weiteren Experimente wurden dann CD8<sup>+</sup>-T-Zellen aufgrund der oben beschriebenen Eigenschaften und deren bekannter zytotoxischer Aktivität verwendet.

## 5.2 Interaktion von VSV mit CD8<sup>+</sup>-Tcm

### 5.2.1 Vitalität der CD8<sup>+</sup>-Tcm nach VSV-Infektion

In weiteren Experimenten wurden CD8<sup>+</sup>-Tcm verwendet, da beschrieben wurde, dass sie in vivo anderen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen-Populationen überlegen sind, was deren Persistenz und Effizienz im murinen System angeht (Sommermeyer, Hudecek et al. 2016).

Vor der in-vivo-Testung der Kombinations-Therapie aus CD8<sup>+</sup>-Tcm und dem rVSV wurde erst die Interaktion des VSV mit CD8<sup>+</sup>-Tcm in vitro sorgfältig überprüft.

In einem ersten Schritt wurde die Resistenz der CD8<sup>+</sup>-Tcm gegenüber einer Infektion mit dem rVSV untersucht. Dazu wurden CD8<sup>+</sup>-Tcm mit unterschiedlichen MOIs des rVSV-GFP infiziert und dann nach 24h, 48h und 72h auf deren Vitalität untersucht. Dazu wurden die Zellen in jedem Versuch zum Zeitpunkt null und zu den weiteren Zeitpunkten gezählt. Schließlich wurde der Prozentsatz lebender CD8<sup>+</sup>-Tcm im Vergleich zum Zeitpunkt null gebildet. Dabei stellte sich heraus, dass CD8<sup>+</sup>-Tcm relativ resistent gegenüber der Infektion durch das rVSV waren. Es zeigte sich 24h nach der Infektion zwar eine leichte Reduktion der Gesamtzellzahl bei den CD8<sup>+</sup>-Tcm, die mit dem VSV infiziert worden waren, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant verglichen mit den nicht infizierten CD8<sup>+</sup>-Tcm. Erst nach 48h und 72h zeigte sich dann eine signifikante Reduktion der Zellzahlen durch das VSV. Die Zellzahlreduktion war dabei abhängig von der Infektionsdosis. So waren 24h nach der Infektion in der Gruppe der Zellen mit der niedrigsten Infektionsdosis (MOI 0,1) praktisch keine Unterschiede zur nicht infizierten Kontrollgruppe sichtbar. Trotz der signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe zu späteren Zeitpunkten zeigten sich auch zu diesen Zeitpunkten relativ hohe Prozentsätze lebender CD8<sup>+</sup>-Tcm. Dieser Prozentsatz lag nach 72h immer noch bei ca. 50%, was eine relativ starke Resistenz der CD8<sup>+</sup>-Tcm gegenüber der Infektion durch das VSV beweist. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

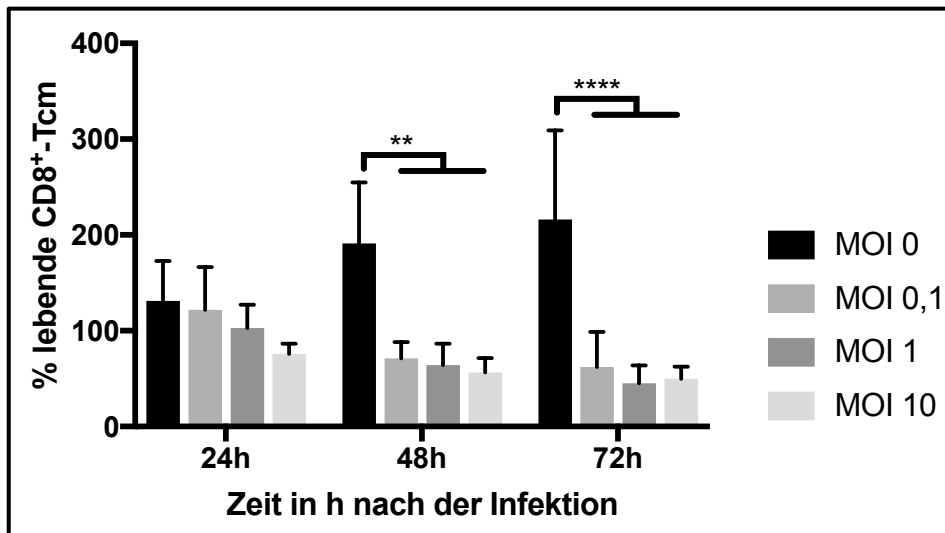


Abbildung 19: Vitalität der CD8<sup>+</sup>-Tcm nach einer Infektion durch das VSV, modifiziert nach (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

Gezeigt werden die MW und SD der Prozentsätze lebender CD8<sup>+</sup>-Tcm aus drei Experimenten, die jeweils in Triplets pro Experiment durchgeführt wurden, zu den angegebenen Zeitpunkten. Die Prozentsätze der lebenden CD8<sup>+</sup>-Tcm wurden durch Normalisierung der jeweiligen untersuchten Kondition gegenüber der Anzahl lebender Zellen zum Zeitpunkt 0h errechnet. Zur Ermittlung der Signifikanz wurde ein Two-Way-ANOVA-Test mit Bonferroni-Post-Test durchgeführt,  $p < 0,01 = **$ ,  $p < 0,0001 = ****$ . (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

### 5.2.2 Replikation des VSV in CD8<sup>+</sup>-Tcm

Im nächsten Schritt wurden die Replikationsfähigkeit des VSV in den CD8<sup>+</sup>-Tcm quantifiziert. Dazu wurden die Zellkulturüberstände der mit verschiedenen MOIs des VSV infizierten CD8<sup>+</sup>-Tcm mithilfe der TCID<sub>50</sub>-Methode nach 0h, 4h, 6h, 16h, 24h, 48h und 72h untersucht. Dabei zeigt sich ein infektionsdosisabhängiger relativ schneller Titeranstieg, welcher sein Maximum nach 24h für die MOI 1 und MOI 10 und nach 48h für die MOI 0,1 erreicht. Die Maximaltiter liegen im Bereich von 10<sup>7</sup>-10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>/ml. Interessanterweise zeigt sich 4h nach der initialen Infektion der CD8<sup>+</sup>-Tcm ein kleiner Rückgang in der gemessenen Virustiterhöhe. Allerdings ist dieser gering und wohl darauf zurückzuführen, dass anfangs freies oder lose mit den Zellen assoziiertes VSV noch internalisiert wird und dann entsprechend nicht mehr mit der TCID<sub>50</sub>-Methode gemessen werden kann. Dass sich ein Titeranstieg bereits 6h nach Infektion zeigt, beweist, dass das VSV in den CD8<sup>+</sup>-Tcm einen kurzen Lebenszyklus von ca. 6h hat, da ja dann

bereits neue Viren produziert wurden. Bemerkenswert ist außerdem, dass der direkt nach der Infektion gemessene Virustiter sehr niedrig ist. Da eine Million Zellen infiziert wurden, überrascht es, dass bei jeder MOI nur etwa 1% der Infektionsdosis als TCID<sub>50</sub>/ml messbar war. So würde man bspw. bei einer MOI von 10 bei einer Million Zellen einen initialen Titer von ungefähr 10<sup>7</sup> TCID<sub>50</sub>/ml erwarten. Ein Grund mag sein, dass die Infektionseffizienz des VSV bei CD8<sup>+</sup>-Tcm sehr gering ist. Alternativ könnten die Viren zum Zeitpunkt null schon überwiegend endozytiert sein und somit lagen sie als freie RNA in den T-Zellen vor, was dazu führen würde, dass nur der Teil messbar ist, der noch nicht im Zellinneren ist. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

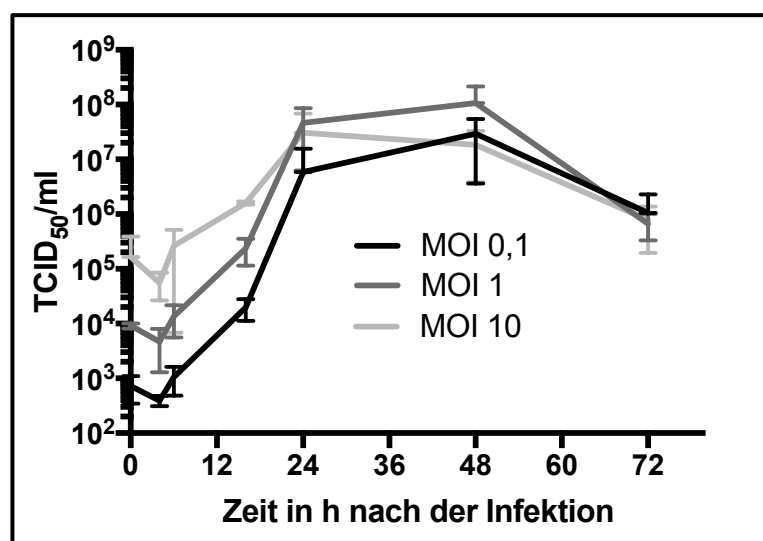


Abbildung 20: Produktion von VSV durch CD8<sup>+</sup>-Tcm, modifiziert nach (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

Gezeigt werden die MW und SD des von den CD8<sup>+</sup>-Tcm produzierten VSV als TCID<sub>50</sub>/ml aus 3 Experimenten, welche jeweils in Triplets zu den angegebenen Zeitpunkten ausgeführt wurden. Der Two-Way-ANOVA-Test mit Bonferroni-Post-Test zeigte eine Signifikanz nach 48h zwischen der Infektionsdosis MOI 0,1 und MOI 1, sowie zwischen MOI 1 und MOI 10. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

Da in diesem Experiment nicht klar ersichtlich wurde, warum es zu so einer schwachen Infektionseffizienz kam, wurde in weiteren Experimenten untersucht, wo genau das nicht nachweisbare Virus abgeblieben war.

### 5.2.3 Infektionseffizienz bei CD8<sup>+</sup>-Tcm

Um herauszufinden wie viele der CD8<sup>+</sup>-Tcm wirklich mit dem VSV infiziert wurden, wurden hierzu zwei Untersuchungsansätze verfolgt. Der erste Ansatz bestand darin, die T-Zellen mit unterschiedlichen Dosen des rVSV-GFP zu infizieren. Direkt nach der Infektion wurden die T-Zellen wie im Protokoll angegeben gewaschen und auf PLL-Objektträger getropft. Danach wurden sie in einer Immunfluoreszenz-Untersuchung auf die Anwesenheit des VSV-G-Antigens untersucht. Es wurde schließlich der Prozentsatz der Zellen, die mit dem Antikörper gegen das VSV-G-Antigen markiert wurden, gegenüber allen mit DAPI angefärbten Zellen gebildet. Daraus ergibt sich dann der Prozentsatz infizierter CD8<sup>+</sup>-Tcm. Zellen, die mehr als ein VSV-G-Signal aufwiesen, wurden als einmal infiziert gewertet, auch wenn sie vermutlich von mehreren Viren befallen waren. Ein repräsentatives Bild zeigt die Immunfluoreszenz Bilder für die Negativkontrolle der nicht infizierten Zellen und für die maximale Infektionsdosis MOI 10.

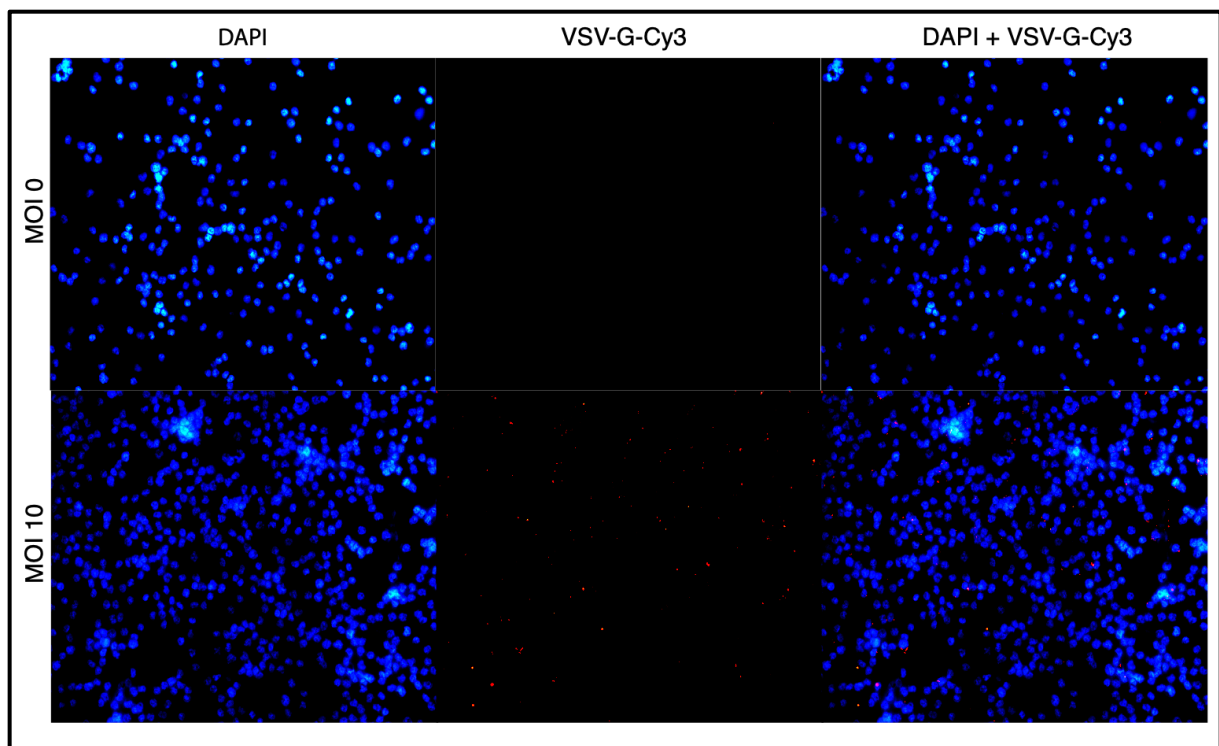


Abbildung 21: Immunfluoreszenzmikroskopie infizierter CD8<sup>+</sup>-Tcm

Repräsentatives Bild der Immunfluoreszenz von CD8<sup>+</sup>-Tcm. Gezeigt werden Bilder, die fluoreszenzmikroskopisch mit einem Filter für DAPI und einem anderen Filter für Cy3 untersucht wurden. Zudem wurden die beiden Bilder übereinander gelegt. Die erste Reihe zeigt die Negativkontrolle, die zweite Reihe die mit der MOI von 10 infizierten CD8<sup>+</sup>-Tcm. In der ersten Spalte ist

der DAPI-Filter zu sehen, in der zweiten der Cy3-Filter und in der dritten die übereinander gelagerten Bilder.

Die quantitative Auswertung der Immunfluoreszenz-Daten ergab, dass es abhängig von der Infektionsdosis einen ansteigenden Prozentsatz von, teilweise mehrfach, infizierten CD8<sup>+</sup>-Tcm. Das Hintergrund-Signal in der Negativkontrolle war dabei mit 0,07% infizierten CD8<sup>+</sup>-Tcm überschaubar klein. Der Mittelwert der infizierten CD8<sup>+</sup>-Tcm für die MOI von 0,1 war 0,42%, für die MOI von 1 5,36% und für die MOI von 10 15,93%. Der nicht lineare Anstieg der infizierten CD8<sup>+</sup>-Tcm lässt sich vermutlich dadurch erklären, dass bei einer MOI von 10 relativ viele Zellen mit mehreren Viren infiziert wurden und daher die Anzahl infizierter Zellen niedriger ist, als vielleicht zu erwarten wäre. Insgesamt fällt die extrem geringe Infektionseffizienz auf. So würde man bei einer MOI 1 annähernd 100% infizierte Zellen erwarten. Oben angesprochene Ergebnisse zeigen, dass die CD8<sup>+</sup>-Tcm relativ resistent gegenüber einer Infektion durch das VSV sind. Zudem würde es erklären, wieso sich 24h nach Infektion noch kaum Unterschiede in der Zellvitalität verglichen mit der Negativkontrolle zeigen. Insgesamt ist das Ergebnis dahingehend sehr überraschend, dass die Infektionseffizienz unabhängig von der Infektionsdosis nur im einstelligen Prozentbereich von etwa 1%-5% liegt.

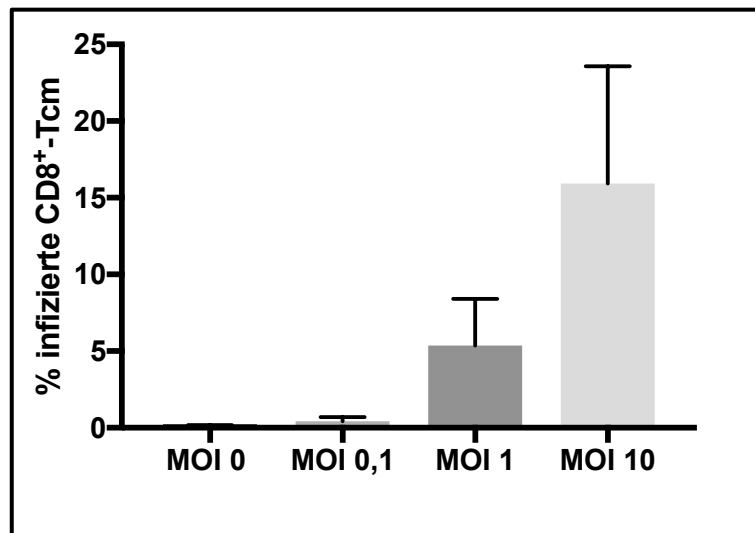


Abbildung 22: Infektionseffizienz des VSV bei CD8<sup>+</sup>-Tcm

Gezeigt werden die MW und SD der immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen infizierter CD8<sup>+</sup>-Tcm direkt nach der Infektion aus drei verschiedenen Experimenten, in welchen jeweils Triplets untersucht wurden.



#### 5.2.4 Übertragung von infektiösen Virionen von CD8<sup>+</sup>-Tcm an andere Zellen

Um weiter zu untersuchen, ob das Virus nur lose an der Zelloberfläche haftet, oder ob es tatsächlich in die Zellen eintritt und in diesen repliziert, wurde in der Arbeit untersucht, ob man direkt nach der Virusinfektion replikationsfähige Viren an der Oberfläche der T-Zellen finden konnte. Dazu wurden die CD8<sup>+</sup>-Tcm analog oben beschriebenen Experimenten mit rVSV-GFP infiziert und direkt nach der Infektion zu BHK-21-Zellen dazugegeben. 6h nach Beginn dieser Inkubation im Zellkulturinkubator wurden die BHK-21-Zellen dann von der Zellkulturschale abgelöst und in der FACS-Analyse auf die Expression von viralem GFP untersucht. Der dahinterstehende Gedankengang war, dass nur lose mit den T-Zellen assoziiertes Virus die BHK-21-Zellen innerhalb von 6h infizieren würde und in diesen aufgrund der Eigenschaften des VSV, dass frühestens zwischen 4h und 8h virale Genexpression nachweisbar ist (Balachandran, Porosnicu et al. 2001), nach 6h nicht vollständig replizieren würde, aber trotzdem bereits virale Genexpression stattfinden würde. Das Virus, das in den T-Zellen wäre, würde zwar auch mit der Replikation beginnen, aber nicht schnell genug, um nach Lyse der T-Zellen noch zu einer signifikanten Expression von viralem GFP in den BHK-21-Zellen beizutragen. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

Um die Validität der Methode zu überprüfen, wurden allerdings vor Durchführung der Kokultur aus T-Zellen und BHK-21-Zellen nachgewiesen, dass man bei einer bestimmten viralen Infektionsdosis ein linear korrelierendes Signal von GFP-Expression im FACS 6h nach der Infektion zuordnen konnte. Daher wurden BHK-21-Zellen mit den MOIs von 0; 0,1; 1; 10 des rVSV-GFP infiziert und 6h nach der Infektion in der FACS-Analyse auf die Expression von GFP untersucht. Tote Zellen wurden aus der Analyse ausgeschlossen. Und tatsächlich zeigen sich in repräsentativen FACS-Dotplots proportionale Prozentsätze von GFP<sup>+</sup>-BHK-21-Zellen zur Infektionsdosis. In den Bildern unten sind für die MOI von 0,1 8,89% GFP<sup>+</sup>-Zellen zu sehen. Für die MOI von 1 sind 88,9% zu sehen und für die MOI von 10 95,2%. Dass mit der MOI von 1 und 10 nicht 100% virale Genexpression erreicht werden liegt vermutlich daran, dass die Infektion von Zellen einem stochastischen System unterliegt und daher manche Zellen mehrmals infiziert werden, wohingegen andere Zellen dann gar nicht infiziert werden. Interessanterweise zeigt sich bei Betrachtung der MFI des GFP (entsprechend der Stärke des GFP-Signales) bei der

MOI von 10 ein Shift nach rechts gegenüber der MOI von 1. Das bestärkt die Annahme, dass manche Zellen mehrfach infiziert wurden und daher eine höhere Fluoreszenzintensität aufweisen.

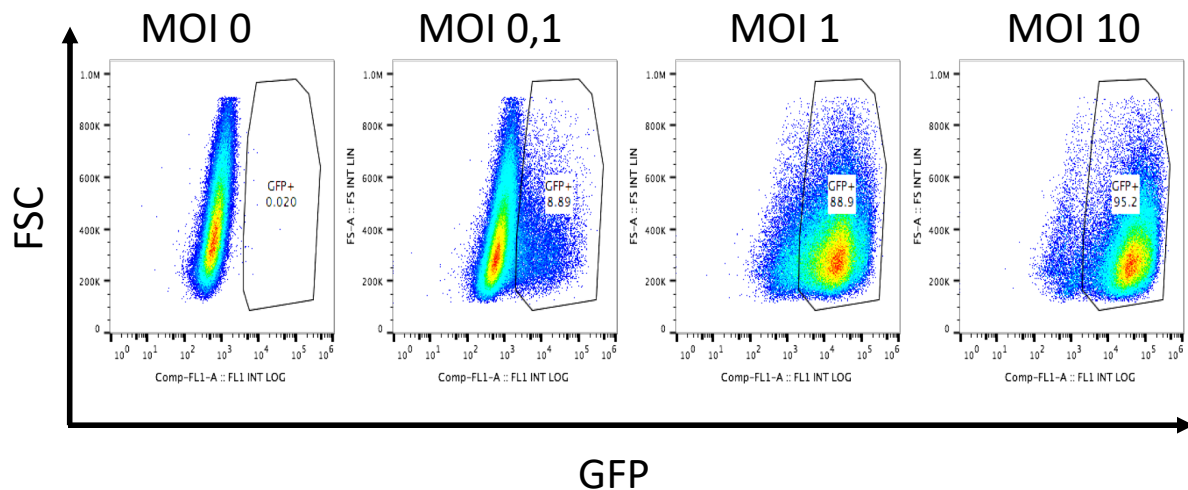


Abbildung 23: Nachweis des Zusammenhanges zwischen viraler Genexpression und initialer Infektionsdosis bei BHK21-Zellen

Gezeigt werden repräsentative FACS-Dotplots der mit unterschiedlichen MOIs infizierten BHK-21-Zellen. Von links nach rechts findet sich ein Infektionsdosisanstieg: MOI 0; 0,1; 1; 10. Auf der X-Achse ist das GFP jeweils aufgetragen, auf der Y-Achse der FSC. Die GFP<sup>+</sup> Zellen finden sich im markierten Gate.

Nachdem im vorhergehenden Versuch gezeigt wurde, dass es prinzipiell möglich ist, die Dosis übertragener Viren mit dem GFP-Signal in der FACS-Analyse von infizierten BHK-21-Zellen zu korrelieren, wurde nun ein ähnlicher Ansatz für die Bestimmung der infektiösen Dosis des VSV, das mit T-Zellen assoziiert ist, verfolgt. Hierzu wurden CD8<sup>+</sup>-Tcm mit den in der Abbildung angegebenen MOIs von 0; 0,1; 1; 10 infiziert. Direkt nach der Infektion und dem Entfernen nicht zellgebundenen Virus durch Waschvorgänge wurden die nun infizierten CD8<sup>+</sup>-Tcm in einer Relation von 1:10 zu BHK-21-Zellen dazugegeben. Die Kokultur wurde für 6h durchgeführt. Der Gedanke war hierbei, dass in diesem Zeitraum frei verfügbares VSV von den T-Zellen direkt zu den BHK-21-Zellen überführt wird und in innerhalb dieser ersten 6h nach Beginn der Kokultur zu einer signifikanten viralen GFP-Expression in den BHK-21-Zellen führen würde. Nach der Inkubationszeit wurde das Medium abgesaugt, die BHK-21-Zellen mit PBS gespült und dann

abgelöst. Zum weiteren Ausschluss von eventuell noch vorhandenen T-Zellen wurden die abgelösten BHK-21-Zellen noch mit einem CD3-Antikörper gefärbt. Im FACS wurden dann nur Zellen berücksichtigt, die CD3<sup>-</sup> und lebendig waren. Dabei zeigte sich nach Abzug des Hintergrundsignals, dass auch hier wie in den immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen nur relativ wenig VSV übertragen werden konnte. Nach der Kalkulation von GFP-exprimierenden BHK-21-Zellen zurück zu übertragenen Viren und damit Virus tragenden T-Zellen ergab sich hier für die initiale MOI von 0,1 des rVSV-GFP bei den T-Zellen eine mittlere Infektionseffizienz der CD8<sup>+</sup>-Tcm von 0,42%. Bei einer MOI von 1 waren es 5,06% und bei einer MOI von 10 65,93%. Die Werte für die MOIs von 0,1 und 1 ähneln denen aus der Analyse der fluoreszenzmikroskopisch untersuchten Proben stark. Dass es einen Unterschied bei der MOI von 10 zwischen der FACS-Analyse der Kokultur und der immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der CD8<sup>+</sup>-Tcm gibt, ist wieder damit zu erklären, dass vermutlich mehrere Viren eine T-Zelle befallen haben. Wo also eine mehrfach infizierte Zelle in der mikroskopischen Untersuchung nur einmal gezählt wurde, ergab sich hier wahrscheinlich, dass eine mehrfach infizierte Zelle auch mehrfach gezählt wurde. Insgesamt zeigt sich aber auch hier eine relativ niedrige Infektionseffizienz verglichen mit der initialen Infektionsdosis. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

Da hier ein dosisabhängiger Zusammenhang zwischen der Infektionsdosis und den von den T-Zellen übertragbaren Viren zu bestehen scheint, wurde mithilfe von Excel die beste passende Gleichung dazu berechnet. Die am besten passende Funktion war dann folgende:

$$\text{Infektiöse Viren}/100 \text{ CD8}^+\text{-Tcm} = 5,2051 * \text{MOI}^{1,0969}$$

$$R^2 = 0,9992$$

(Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

Mit infektiösen viralen Partikeln sind hier diejenigen Viren beschrieben, die direkt nach der Infektion von CD8<sup>+</sup>-Tcm an andere Zellen weitergegeben werden können. Bei der MOI in der Gleichung handelt es sich hier um jede beliebige initiale Infektionsdosis der CD8<sup>+</sup>-Tcm. Anders ausgedrückt lautet die Gleichung:

$$\% \text{ infizierter CD8}^+\text{-Tcm} = 5,2051 * \text{MOI}^{1,0969}$$

(Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

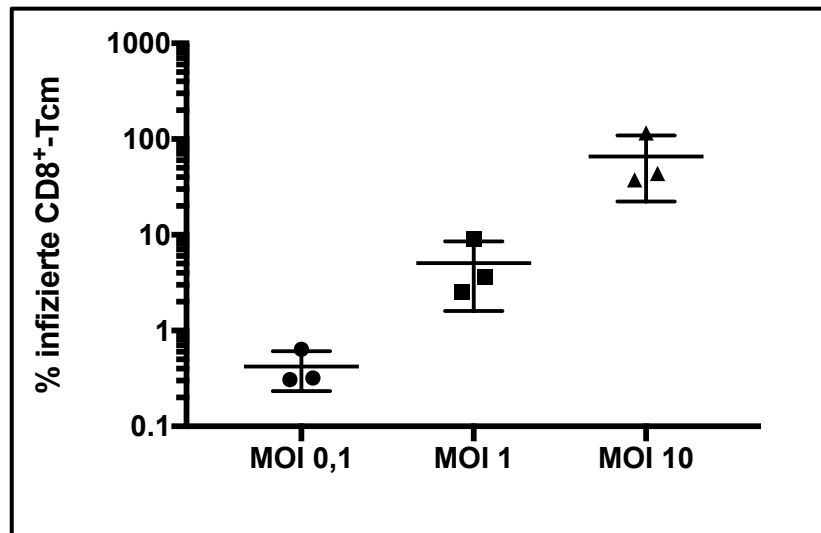


Abbildung 24: Von CD8<sup>+</sup>-Tcm überführbare infektiöse VSV, modifiziert nach (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

Gezeigt werden die MW und SD sowie die einzelnen Werte der infektiösen viralen Partikel/100 CD8<sup>+</sup>-Tcm basierend auf der initialen Infektionsdosis aus 3 Experimenten, welche jeweils in Triplets durchgeführt wurden. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

Aus diesen Daten ergibt sich der Schluss, dass CD8<sup>+</sup>-Tcm sowohl an ihrer Oberfläche infektiöse Viren haben, die sie erfolgreich an andere Zellen weitergeben können, als auch rVSV internalisieren und produzieren können, ohne dabei selbst allzu stark in ihrer Vitalität und Proliferation eingeschränkt zu sein. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

### 5.3 Behandlung von ML2-Leukämie-Zellen in vitro

Die folgenden Untersuchungen behandeln die Frage, wie sich ML2-Leukämie-Zellen verhalten, wenn sie mit dem VSV oder transgenen T-Zellen behandelt werden. Eine hervorragende Charakterisierung dieses Modellsystems erfolgte bereits zuvor (Klar, Schober et al. 2014, Mall, Yusufi et al. 2016, Yusufi, Mall et al. 2017), weswegen auf eine intensive Untersuchung der Interaktion von transduzierten T-Zellen und ML2-Zellen hier verzichtet wird und direkt die Kombination aus transgenen T-Zellen und dem VSV zur Behandlung der ML2-Zellen ausgetestet wird. In den weiteren Experimenten werden transduzierte CD8<sup>+</sup>-Tcm verwendet. Diese

wurden, wie im Methodenteil beschrieben, entweder mit dem TZR2.5D6-iRFP oder nur mit dem iRFP transduziert. Die mit dem TZR2.5D6-iRFP transduzierten CD8<sup>+</sup>-Tcm werden aus Gründen der Vereinfachung im Weiteren nur noch TZR-T-Zellen genannt und die mit iRFP transduzierten CD8<sup>+</sup>-Tcm nur noch iRFP-T-Zellen. Bei den ML2-Leukämie-Zellen handelt es sich ebenfalls um genetisch modifizierte Zellen. Diese wurden entweder, wie ebenfalls im Methodenteil beschrieben, mit dem HLA-B07:02 oder dem HLA-B15:01 jeweils an ein eGFP gekoppelt transduziert. Der Vereinfachung wegen werden diese Zellen im folgenden dann ML2B7-Zellen respektive ML2B15-Zellen genannt.

### 5.3.1 Abtötung von ML2-Zellen durch das VSV

In einem ersten Schritt wurde die Empfindlichkeit der ML2-Zellen gegenüber dem VSV analysiert. Da alle verwendeten ML2-Zellen mit einem GFP transduziert waren, wurde in den Experimenten, die Tumorzellen enthalten, nur noch das rVSV-sr39tk verwendet, damit es zu keiner Überlagerung der viralen GFP-Expression mit dem intrinsischen GFP der ML2-Zellen kam. Für das Screening der Sensitivität von ML2-Zellen gegenüber dem VSV wurden die ML2B7-Fluc-Zellen, die zusätzlich zum HLA-B07:02 und dem eGFP noch eine Firefly-Luciferase exprimierten, verwendet. Diese wurden zum Zeitpunkt 0h mit der im Graphen angegebenen MOI infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde dann der Prozentsatz lebender Leukämie-Zellen anhand der Luciferase-Aktivität bestimmt. Dazu wurden die noch lebenden Zellen nach 24h, 48h und 72h lysiert und die Luciferase-Aktivität im Lysat mit einer Standardkurve abgeglichen. Die Werte zu den späteren Zeitpunkten wurden dann in Relation zu den Werten zum Zeitpunkt 0h gesetzt. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

Dabei zeigte sich eine rasante und dosisabhängige Reduktion der Zellzahlen. Bereits nach 24h erreichte der Unterschied zwischen der Negativkontrolle und den Proben die mit einer MOI von 0,01 oder mehr infiziert wurden ein Signifikanzniveau. Lediglich die MOI von 0,001 des rVSV-sr39tk zeigte einen zeitlich verzögerten zytotoxischen Effekt. Aber auch bei dieser MOI erreichte der Unterschied zur Negativkontrolle bereits nach 48h Signifikanz. Interessant dabei ist, dass bereits nach 24h in den Proben die mit einer MOI von 0,1 oder mehr infiziert wurden, praktisch keine Tumorzellen anhand ihrer Luciferaseaktivität mehr nachweisbar sind. Das ist ein deutlicher Hinweis auf die Sensitivität der ML2-Leukämie-Zellen gegenüber dem VSV. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

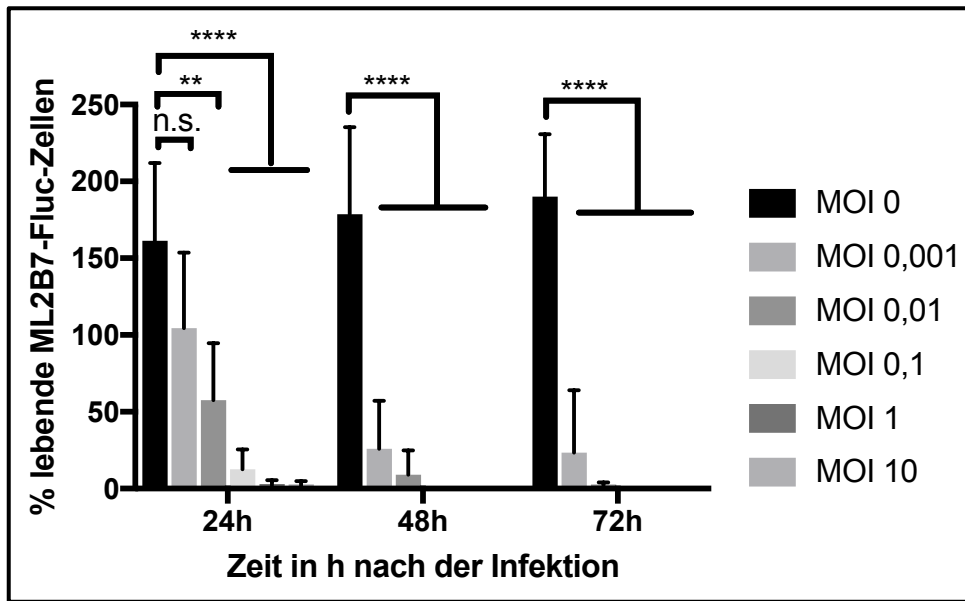


Abbildung 25: Kinetik der Abtötung von ML2-Zellen durch das VSV, modifiziert nach (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

Gezeigt sind die MW und SD des Prozentsatzes der lebenden Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Infektion mit den angegebenen MOIs aus drei verschiedenen Experimenten, welche jeweils als Triplets durchgeführt wurden. Der Prozentsatz lebender Zellen wurde immer in Bezug zum Zeitpunkt 0h nach Infektion gebildet. Die Signifikanzniveaus wurden mit einem Two-Way-ANOVA-Test mit Bonferroni-Post-Test errechnet:  $p < 0,001 = ***$ ,  $p < 0,0001 = ****$ . (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

### 5.3.2 Produktion von VSV durch ML2-Zellen

Nach dem Beweis für die Sensitivität der Tumorzellen gegenüber dem VSV wurde untersucht, ob bei der Tumorzelllyse auch Viren freigesetzt wurden. Dazu wurde eine virale Replikationskinetik mithilfe der TCID<sub>50</sub>-Methode angefertigt. Die ML2B7-Fluc-Zellen wurden dazu mit den unten angegebenen MOIs infiziert. Dann wurde aus dem Zellkulturmedium der virale Titer zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt. Interessanterweise konnte ähnlich der Kinetik in den T-Zellen bereits zum Zeitpunkt null ein geringer, aber vorhandener Titer detektiert werden. Vermutlich lag diese Tatsache auch hier daran, dass das VSV einfach noch nicht in alle Zellen aufgenommen worden war und deswegen direkt nach der Infektion ein kleiner Virusanteil direkt die BHK-21-Zellen befallen konnte. Bereits nach 4h zeigte sich ein leichter Anstieg

des Virustiters bei allen MOIs über 0,01 um ungefähr eine halbe Zehnerpotenz und verzehnfacht (MOI von 0,01) bis ver Hundertfachte (MOI von 10) sich bereits nach 6h. Lediglich die MOI von 0,001 war etwas langsamer und zeigte einen initialen Titerabfall. Insgesamt deutet dies auf eine sehr schnelle Replikation in den Leukämie-Zellen hin. Bereits nach 16h war ein Maximum erreicht, welches das 100-fache (MOI 10) bis  $10^5$ -fache (MOI 0,001) des zum Zeitpunkt 0h gemessenen Titers betrug. Insgesamt erreichten die Titer bei einer Zellausgangskonzentration von  $10^6$ /ml einen Wert von  $10^7$ - $10^8$  TCID<sub>50</sub>/ml Tumorzellmedium. Zu späteren Zeitpunkten fielen die Titer wieder ab. Vermutlich liegt das daran, dass wie im vorherigen Bild gezeigt die Zellen zu diesen Zeitpunkten bereits tot sind und die Replikation des VSV nicht mehr aktiv unterstützen können, sodass das Virus sich nicht mehr vermehren kann und im Laufe der Zeit bei 37°C im Inkubator degradiert. Zusammengefasst zeigt auch dieses Experiment die Sensitivität der Tumorzellen gegenüber dem VSV. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

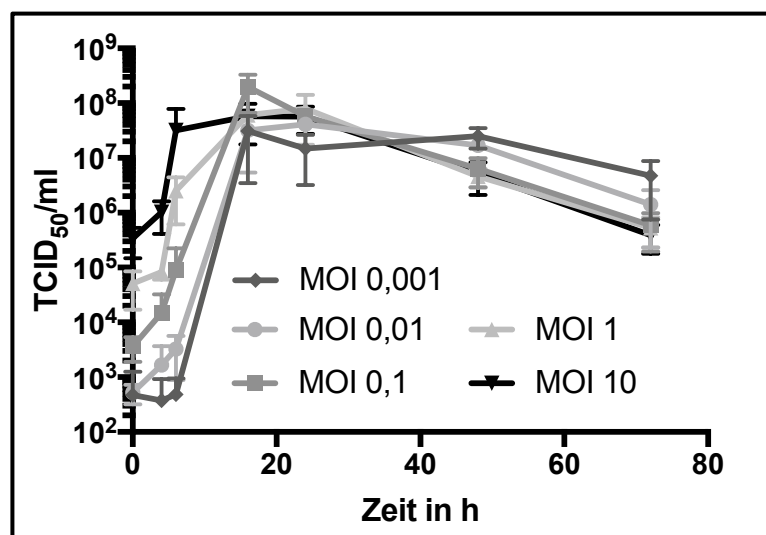


Abbildung 26: Replikation des VSV in ML2-Zellen, modifiziert nach (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

Gezeigt werden die MW und SD des von den ML2-Zellen produzierten rVSV-sr39tk zu den genannten Zeitpunkten nach der Infektion mit der angegebenen MOI aus drei unterschiedlichen Experimenten, welche jeweils in Tripletts durchgeführt wurden. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

### 5.3.3 Therapie von ML2-Zellen durch eine Kombination aus TZR-T-Zellen und VSV

Da bereits in früheren Arbeiten die Funktionalität von den hier verwendeten transduzierten T-Zellen gegenüber den ML2B7-Zellen gezeigt und charakterisiert wurde (Mall, Yusufi et al. 2016, Yusufi, Mall et al. 2017), wird im Folgenden nicht mehr gesondert untersucht, wie die ML2-Zellen im Speziellen mit antigenspezifischen T-Zellen interagieren.

Stattdessen wird vielmehr untersucht, wie sich eine Kombination aus dem VSV und transduzierten T-Zellen gegenüber den ML2B7-Zellen verhält. Diese Kombination wurde dann mit der Effektivität der transduzierten T-Zellen als Monotherapie verglichen. Dazu wurden die TZR-T-Zellen und die iRFP-T-Zellen, direkt bevor sie im Verhältnis von 1:20 zu den ML2B7-Fluc-Zellen (E:T-Ratio: 1:20) gegeben wurden, mit den MOIs von 0,1; 1; 10 des rVSV-sr39tk infiziert. Nach 24h wurde das Kulturmedium von den Zellen abzentrifugiert und für weitere Analysen bei -80°C gelagert. Die Zellpellets, aus denen die toten Zellen durch Zentrifugation entfernt worden waren, wurden lysiert und die Luciferase-Aktivität der zuvor noch lebenden Leukämie-Zellen wurde gemessen. Da die T-Zellen kein Luciferase-Gen besitzen, wurden sie bei der Analyse nicht miterfasst, sodass einzig die Vitalität der ML2-Zellen gemessen wurde. Die Luciferaseaktivität wurde dann als Prozentsatz der unbehandelten Kontrollprobe angegeben. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden die Signifikanzniveaus im Fließtext angegeben und nicht alle im Graphen eingezeichnet. Im Graphen werden nur noch einmal die wichtigsten Signifikanzniveaus hervorgehoben. Dabei ergaben sich folgende Ergebnisse: Die unbehandelte Kontrollprobe wies den gleichen Prozentsatz lebender ML2-Zellen wie die mit einer iRFP-T-Zell-Monotherapie behandelten Zellen auf. Der Unterschied bezüglich der Vitalität gegenüber allen anderen Proben war signifikant (\*\*\*\*). Die Tumorzellen, die mit TZR-T-Zellen behandelt wurden, wiesen mit steigender initialer Infektionsdosis der T-Zellen immer weniger lebende Tumorzellen auf. Dabei zeigt sich bei TZR-T-Zellen ohne VSV nach 24h eine Vitalität der ML2B7-Fluc-Zellen von im Mittel ca. 30%, bei TZR-T-Zellen mit einer MOI von 0,1 ca. 20%, bei einer MOI von 1 ca. 15% und bei einer MOI von 10 zeigten sich praktisch keine lebendigen Tumorzellen mehr. Interessanterweise zeigte sich aber nur statistische Signifikanz zwischen nicht infizierten TZR-T-Zellen und maximal infizierten TZR-T-Zellen (\*\*). Auch zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den iRFP-T-Zellen, welche mit einer MOI von 1 und 10 beladen wurden, gegenüber den TZR-T-Zellen (\* bzw. \*\*). Bei den iRFP-T-Zellen stieg mit der initialen MOI der Prozentsatz toter Leukämie-Zellen. Interessanterweise wurden allerdings bei den iRFP-T-Zellen, welche mit einer initialen MOI von 0,1 des rVSV-sr39tk infiziert



wurden, nur etwa 50% der Tumorzellen abgetötet. Damit ergab sich hier ein statistisch signifikanter Unterschied zu den TZR-T-Zellen, welche mit der gleichen MOI des rVSV-sr39tk beladen wurden(\*). Auch bei den TZR-T-Zellen, welche mit der MOI von 1 und 10 vorinfiziert wurden, ergab sich gegenüber den iRFP-T-Zellen mit einer initialen Infektionsdosis von MOI von 0,1 jeweils ein signifikanter Vorteil in der Therapie (\*\* bzw. \*\*\*\*). Vergleich man die mit einer MOI von 0,1 infizierten iRFP-T-Zellen mit den mit einer MOI von 1 bzw. 10 infizierten iRFP-T-Zellen, so waren auch diese signifikant (\*\*\*\*). Weitere signifikante Unterschiede bestanden in dieser Abbildung nicht. Damit ergeben sich folgende Erkenntnisse: Bei einer initialen MOI von 1 oder mehr, spielt es keine Rolle mehr, um welche T-Zellen es sich handelt, da so viele Viren in die Tumorzellkultur kommen, dass diese ausreichen, die Tumorzellen nach 24h fast vollständig abzutöten. Bei einer niedrigen MOI von 0,1 zeigt die Kombination von TZR-T-Zellen und VSV einen klaren Vorteil gegenüber den iRFP-T-Zellen in Kombination mit dem VSV, was indiziert, dass die TZR-T-Zellen einen synergistischen tumorabtötenden Effekt zusätzlich zum rVSV-sr39tk haben, wenn es sich um eine relativ geringe initiale Virusdosis handelt, die auf die Tumorzellen von den T-Zellen übertragen werden kann. Zudem sieht man einen Vorteil der Kombinationstherapien gegenüber einer Therapie mit TZR-T-Zellen alleine. Man sieht hier auch bereits bei kleinen MOIs einen Vorteil der Kombination gegenüber der Monotherapie, auch wenn dieser noch nicht statistisch signifikant ist. Die statistische Signifikanz ergibt sich dann mit steigender MOI. Hier ist aber die Sinnhaftigkeit einer Kombinationstherapie fragwürdig, da es keinen Unterschied mehr zu den Kontroll-T-Zellen mit dem VSV in selber Infektionsdosis gibt, sodass es an sich keine spezifischen T-Zellen mehr bräuchte. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

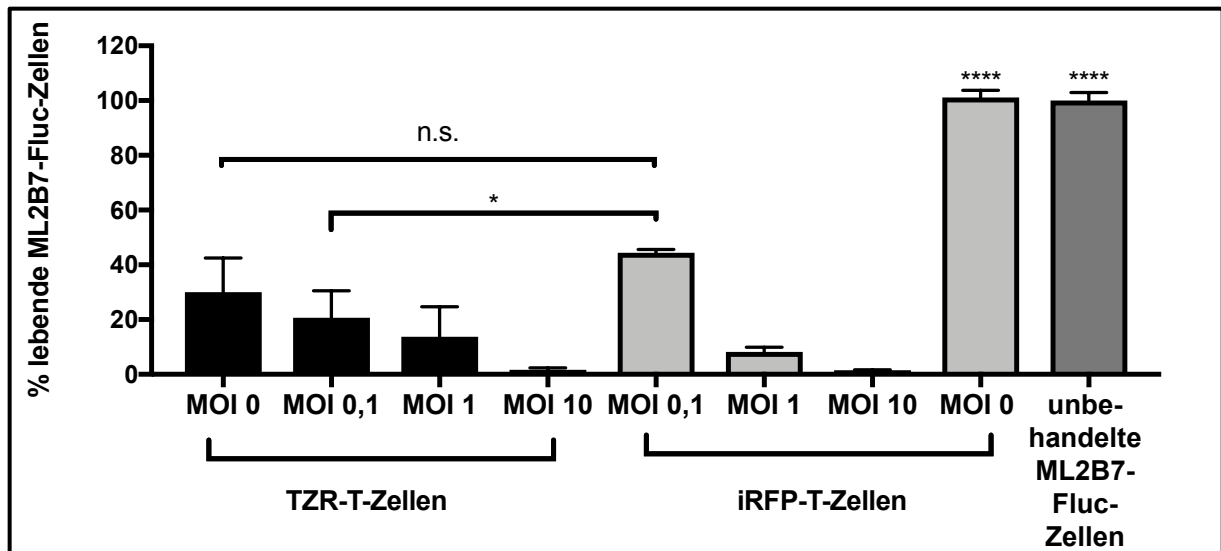


Abbildung 27: Effizienz einer Kombinationstherapie aus T-Zellen und VSV zur Abtötung von ML2B7-Fluc-Zellen 24h nach Beginn der Therapie, modifiziert nach (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

Gezeigt werden die MW und SD des % lebender ML2B7-Fluc-Zellen 24h nach Beginn mit der jeweils angegeben Therapie in einer E:T-Ratio von 1:20. Die Werte wurden gegenüber der unbehandelten Kontrollprobe normalisiert. Signifikanz wurde mit einem One-Way-ANOVA- und einem Bonferroni-Post-Test ermittelt:  $p < 0,05 = *$ ,  $p < 0,01 = **$ ,  $p < 0,001 = ***$ ,  $p < 0,0001 = ****$ . Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden die meisten Signifikanzniveaus im Fließtext beschrieben und nur die aussagekräftigsten hier im Graphen gezeigt. Die beiden letzten Säulen sind untereinander nicht signifikant unterschiedlich. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

Die Zellvitalität der ML2B7-Fluc-Zellen wurde des Weiteren auch nach 48h in denselben Kulturbedingungen wie oben gemessen. Dabei ergab sich für alle Tumorzellproben, die mit einer Kombination aus TZR-T-Zellen oder iRFP-T-Zellen und dem VSV behandelt wurden, dass es praktisch keinen Nachweis für lebende ML2-Zellen mehr gab. Interessant ist hierbei, dass es bei der TZR-T-Zell-Monotherapie so scheint, als wäre bei den T-Zellen zumindest eines T-Zell-Spenders nach 48h noch nicht genügend Zeit vergangen, um alle Tumorzellen abzutöten. Die Therapieeffektivität zwischen Kontroll-T-Zell-Monotherapie und unbehandelten ML2B7-Fluc-Zellen war nicht signifikant unterschiedlich zueinander.

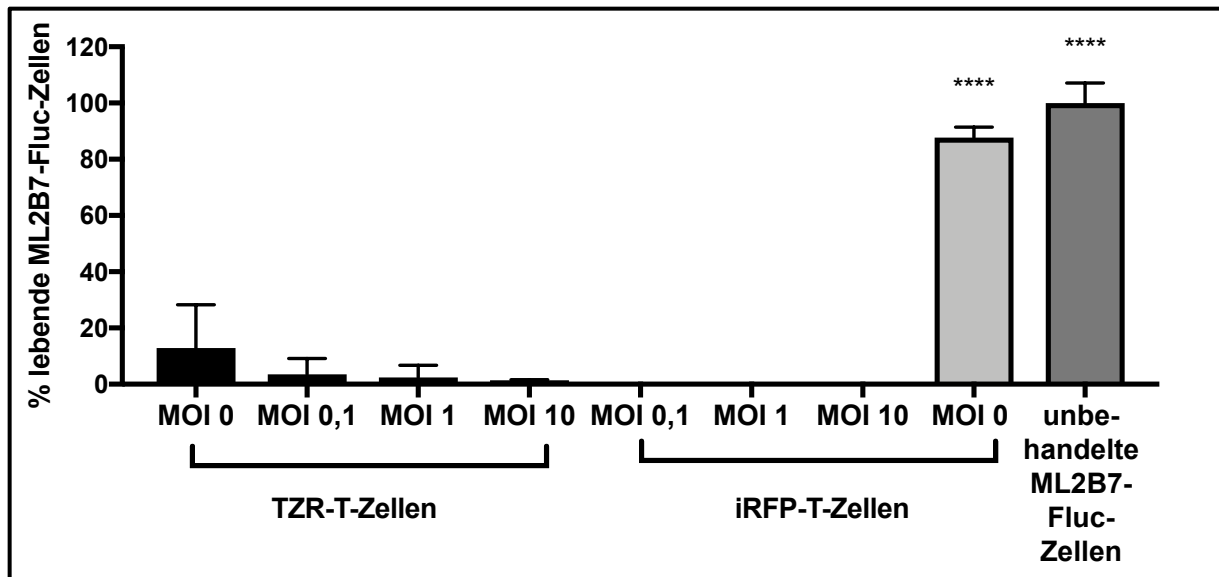


Abbildung 28: Effizienz einer Kombinationstherapie aus T-Zellen und VSV zur Abtötung von ML2B7-Fluc-Zellen 48h nach Beginn der Therapie

Gezeigt werden die MW und SD des % lebender ML2B7-Fluc Zellen 48h nach Beginn mit der jeweils angegebenen Therapie in einer E:T-Ratio von 1:20. Die Werte wurden gegenüber der unbehandelten Kontrollprobe normalisiert. Signifikanz wurde mit einem One-Way-ANOVA- und einem Bonferroni-Post-Test ermittelt:  $p < 0,0001 = ****$ . Hier zeigte sich nur ein signifikanter Unterschied zwischen der iRFP-T-Zell-Monotherapie und den unbehandelten Zellen verglichen mit allen anderen, tatsächlich behandelten, Zellen. Zwischen unbehandelter Kontrollprobe und der iRFP-T-Zell-Monotherapie bestand kein signifikanter Unterschied.

Als weitere Kontrollen wurden ML2B15-Fluc-Zellen verwendet, die mit einem anderen HLA transduziert waren und dadurch der Erkennung durch die mit dem TCR2.5D6-iRFP transduzierten TZR-T-Zellen entgehen (Yusufi, Mall et al. 2017). Hier zeigt sich ein ganz ähnliches Ergebnis wie bei den ML2B7-Fluc Zellen die mit iRFP-T-Zellen behandelt werden. Wenn die T-Zellen nicht mit Virus beladen wurden, dann waren die Ergebnisse der Leukämie-Zell-Vitalität nach 24h nicht wesentlich unterschiedlich zu denen der unbehandelten Kontrollprobe. Mit steigender initialer MOI der T-Zellen wurden dann aber auch die ML2B15-Fluc-Zellen abgetötet. Interessanterweise schienen diese aber ein wenig resistenter gegenüber dem VSV zu sein, da bei den ML2B15-Fluc-Zellen nach 24h in den Proben die mit T-Zellen, welche mit einer MOI von 0,1 des rVSV-sr39tk infiziert waren, noch rund 70% lebende Zellen und mit MOI 1 noch

rund 20% lebendige Tumorzellen zu finden waren. Diese Unterschiede verschwanden dann aber nach 48h. Nach 48h waren dann nahezu alle Leukämie-Zellen tot, wenn sie mit präinfi-zierten T-Zellen behandelt wurden. Als Ergebnisse für die Kokultur ergeben sich nach 24h: Bei der ML2B15-Fluc-Zell-Kultur sind die Unterschiede bei der Abtötung der ML2B15-Zellen zwischen den eingesetzten TZR-T-Zellen, den iRFP-T-Zellen und Nicht-Behandlung marginal und nicht signifikant. Mit einer MOI von 0,1 vorinfizierte TZR-T-Zellen und iRFP-T-Zellen sind in ihrer Effizienz gleich. Gegenüber der TZR-T-Zell-Monotherapie und der iRFP-T-Zell Monotherapie sind sie nicht signifikant unterschiedlich. Gegenüber den unbehandelten Tumorzellen zeigen sie beide einen kleinen, aber signifikanten Vorteil in der Tumorzellabtötung (\*\*). Der Effekt der Tumorzellreduktion liegt hier bei den mit einer MOI von 0,1 vorinfizierten T-Zellen bei ca. 30%. Bei einer MOI von 1 liegt er bei beiden T-Zell-Therapien bei ca. 70%-80%. Es gibt hier aber praktisch wieder keinen Unterschied zwischen TZR-T-Zellen und iRFP-Zellen, wenn sie mit einer MOI von 1 infiziert wurden. Beide mit der MOI von 1 infizierten T-Zell-Therapeutika sind signifikant unterschiedlich zu den nicht infizierten T-Zell-Monotherapien, zu den mit der MOI von 0,1 infizierten T-Zell-Therapeutika sowie zu der unbehandelten Tumorzellprobe (\*\*\*\*). Gegenüber den T-Zell-Kombinationstherapien, welche mit einer MOI von 10 infiziert wurden, besteht hingegen kein signifikanter Unterschied. Bei einer Beladung der T-Zellen mit einer MOI von 10 des rVSV-sr39tk reduziert sich der Prozentsatz lebender ML2B15-Fluc-Zellen auf fast 0%. Beide mit der MOI von 10 infizierten T-Zell-Therapeutika sind in allen noch nicht genannten Vergleichen statistisch signifikant unterschiedlich zu allen anderen Gruppen (\*\*\*\*). Hingegen gibt es beim Vergleich von mit einer MOI von 10 infizierten TZR-T-Zellen und iRFP-T-Zellen keinen Unterschied.

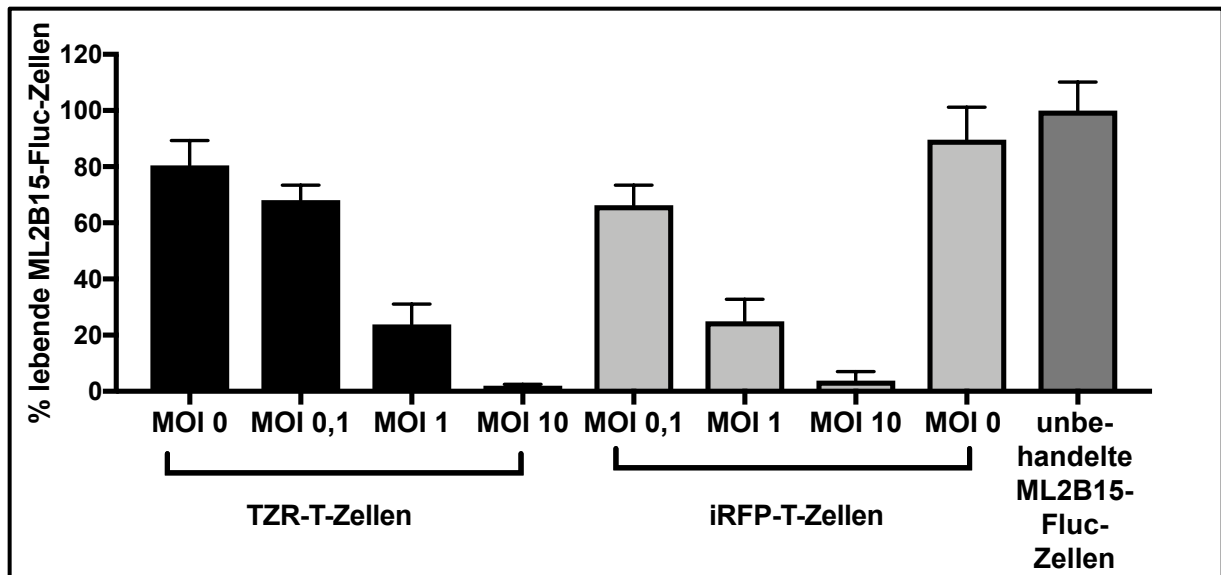


Abbildung 29: Effizienz einer Kombinationstherapie aus T-Zellen und VSV zur Abtötung von ML2B15-Fluc-Zellen 24h nach Beginn der Therapie

Gezeigt werden die MW und SD des % lebender ML2B15-Fluc Zellen 24h nach Beginn mit der jeweils angegebenen Therapie in einer E:T-Ratio von 1:20. Die Werte wurden gegenüber der unbehandelten Kontrollprobe normalisiert. Signifikanz wurde mit einem One-Way-ANOVA- und einem Bonferroni-Post-Test ermittelt:  $p < 0,01 = **$ ,  $p < 0,0001 = ****$ . Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden die Signifikanzniveaus im Fließtext beschrieben.

Nach 48h sieht man bereits, dass der Prozentsatz lebender ML2B15-Fluc-Zellen, in den Proben, die mit einer Kombinationstherapie aus dem VSV, egal welcher initialen Infektionsdosis und T-Zellen behandelt wurden gegen 0% geht. Hingegen zeigt sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen TZR-T-Zell-Monotherapie, iRFP-T-Zell-Monotherapie und der unbehandelten Kontrollprobe. Der Unterschied zwischen TZR-T-Zell-Monotherapie und allen Kombinationstherapien ist statistisch signifikant (\*\*). Ein signifikanter Unterschied im Vergleich zwischen allen Kombinationstherapie, unabhängig von der initialen Virusdosis, besteht nicht. Der Unterschied zwischen den Kombinationstherapien und den iRFP-T-Zellen als Monotherapie sowie der unbehandelten Kontrollprobe ist immer signifikant (\*\*-\*\*\*\*).

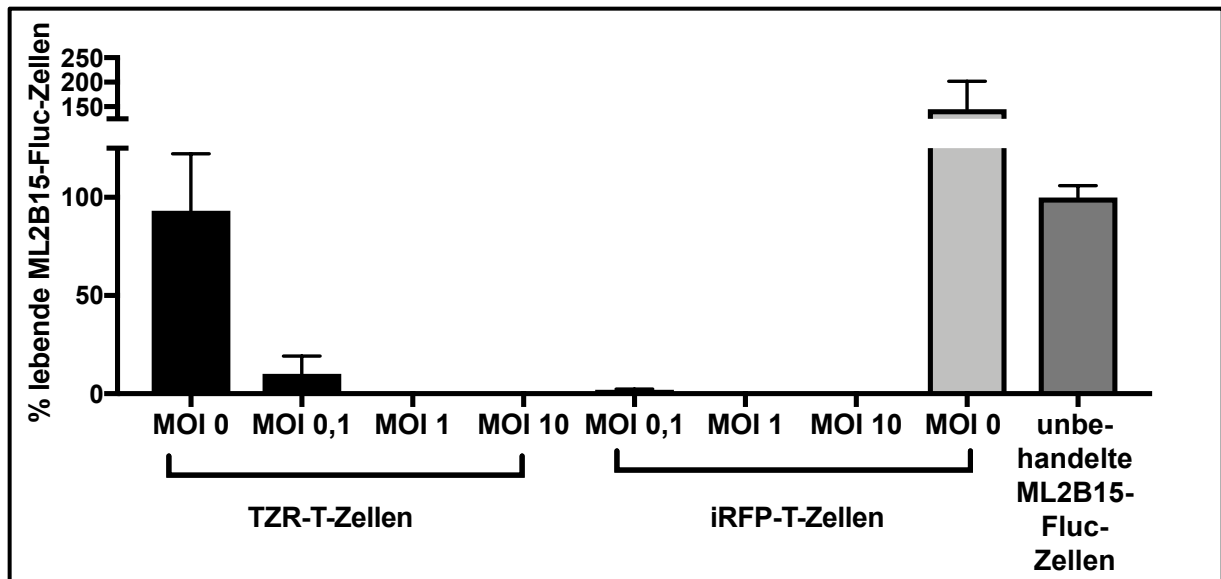


Abbildung 30: Effizienz einer Kombinationstherapie aus T-Zellen und VSV zur Abtötung von ML2B15-Fluc-Zellen 48h nach Beginn der Therapie

Gezeigt werden die MW und SD des % lebender ML2B15-Fluc Zellen 48h nach Beginn mit der jeweils angegeben Therapie in einer E:T-Ratio von 1:20. Die Werte wurden gegenüber der unbehandelten Kontrollprobe normalisiert. Signifikanz wurde mit einem One-Way-ANOVA- und einem Bonferroni-Post-Test ermittelt:  $p < 0,01 = **$ ,  $p < 0,001 = ***$ ,  $p < 0,0001 = ****$ . Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden die Signifikanzniveaus im Fließtext beschrieben.

Anhand der bis hierhin durchgeführten Experimente, sieht man, dass bereits TZR-T-Zellen ohne VSV einen starken zytotoxischen Effekt auf die ML2B7-Zellen haben. Bei den ML2B15 Tumorzellen ist dies wie erwartet und vorbeschrieben (Yusufi, Mall et al. 2017) nicht der Fall. Der antileukämische Effekt kann durch die Kombination mit dem VSV verstärkt werden. Der Zusatzeffekt des VSV ist dabei abhängig von der Initialdosis, mit der die T-Zellen infiziert werden. Wenig überraschend zeigen auch die iRFP-T-Zellen, sofern sie mit dem VSV beladen sind, einen antileukämischen Effekt in der Kokultur. Die nicht infizierten Kontroll-T-Zellen haben hingegen den gleichen Effekt wie eine Nicht-Behandlung. Für die MOIs 1 und 10 konnte kein Unterschied zwischen iRFP-T-Zellen und TZR-T-Zellen mehr festgestellt werden, da hier wohl die initiale Virusdosis so hoch war, dass der Effekt der T-Zellen nicht mehr ins Gewicht fällt. Interessanterweise ist aber gerade bei der MOI 0,1 ein deutlicher, sogar signifikanter Unter-

schied 24h nach Start der Therapie in der Kokultur aus T-Zellen und ML2B7-Zellen zu beobachten. Dabei zeigt sich, dass die Kombination aus spezifischen T-Zellen und VSV der Kombination aus Kontroll-T-Zellen und VSV überlegen ist. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

Weiterhin ist zu beobachten, dass bereits nach 48h praktisch sämtliche ML2B7-Zellen mit Ausnahme der unbehandelten oder nur mit iRFP-T-Zellen behandelten Zellen tot sind. Auch die nur mit TZR-T-Zellen behandelten ML2B7-Zellen sind zu diesem Zeitpunkt überwiegend tot. Daher kann gefolgert werden, dass sowohl TZR-T-Zellen als auch die Kombinationstherapie effektiv gegenüber den ML2-Leukämie-Zellen sind, aber dass insbesondere zu frühen Zeitpunkten die Kombination von VSV und TZR-T-Zellen einen Vorteil bezüglich der antileukämischen Wirkung hat. Daher ergibt sich, dass die Kombination aus spezifischen T-Zellen und VSV besonders einen zeitlichen Vorteil in der Leukämie-Zell-Abtötung aufweist.

Wenn man Leukämie-Zellen mit einem irrelevanten HLA-Molekül, wie die ML2B15-Zellen, betrachtet, dann stellt man fest, dass 1. diese, wenn sie mit TZR-T-Zellen behandelt werden, überwiegend so reagieren wie ML2B7-Leukämie-Zellen, wenn diese mit Kontroll-T-Zellen behandelt werden. 2. Die ML2B15-Zellen werden von der Kombination aus T-Zellen und VSV effizient abgetötet, auch wenn es hier so scheint, als wären die ML2B15-Zellen insbesondere gegenüber einer Kombination aus T-Zellen und einer initial geringen Virusdosis etwas resistenter.

Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass TZR-T-Zellen ihr zugehöriges Antigen spezifisch erkennen und dass ein synergistischer Effekt durch die Addition des VSV zur T-Zell-Therapie erreicht wird.

#### 5.3.4 Erhaltene T-Zell-Funktionalität in einer Kombinationstherapie

Im nächsten Schritt wurde dann die T-Zell-Funktion untersucht. Dabei wurde untersucht, ob die Addition des VSV zur T-Zell-Monotherapie die T-Zell-Funktion vermindert oder verändert. Als Parameter für die T-Zell-Funktion wurde die produzierte Menge an IFN- $\gamma$  mittels ELISA gemessen. Dieser Test wurde für die Zeitpunkte 24h und 48h nach Beginn der Kokultur durchgeführt. In diesem Experiment wurde deutlich gezeigt, dass die produzierten IFN- $\gamma$ -Titer unabhängig von der Infektion der T-Zellen durch das VSV waren. So zeigte sich eine starke Aktivierung der TZR-T-Zellen in der Kokultur mit den ML2B7-Fluc-Zellen. Dies traf auch dann zu, wenn die T-Zellen mit dem VSV beladen waren. Daraus wird geschlussfolgert, dass die T-Zell-

Funktion, gemessen an der sezernierten Menge von IFN- $\gamma$ , nicht durch das VSV beeinträchtigt oder verändert wird. In allen anderen Kontrollgruppen fand keine nennenswerte IFN- $\gamma$ -Sekretion statt, sodass klar wird, dass es auch nicht zur unspezifischen Aktivierung von T-Zellen durch das VSV kommt. Insgesamt scheint die T-Zell-Funktion unbeeinträchtigt von der Infektion durch das VSV zu sein. Die Unterschiede bei der IFN- $\gamma$ -Produktion in den Kulturbedingungen, bei denen spezifische TZR-T-Zellen mit und ohne VSV gegen ML2B7-Zellen eingesetzt wurden, gegenüber allen Kulturbedingungen waren dabei signifikant. Keine Signifikanz bestand zwischen allen TZR-T-Zell-Therapeutika untereinander, die zur Behandlung der ML2B7-Zellen eingesetzt wurden. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

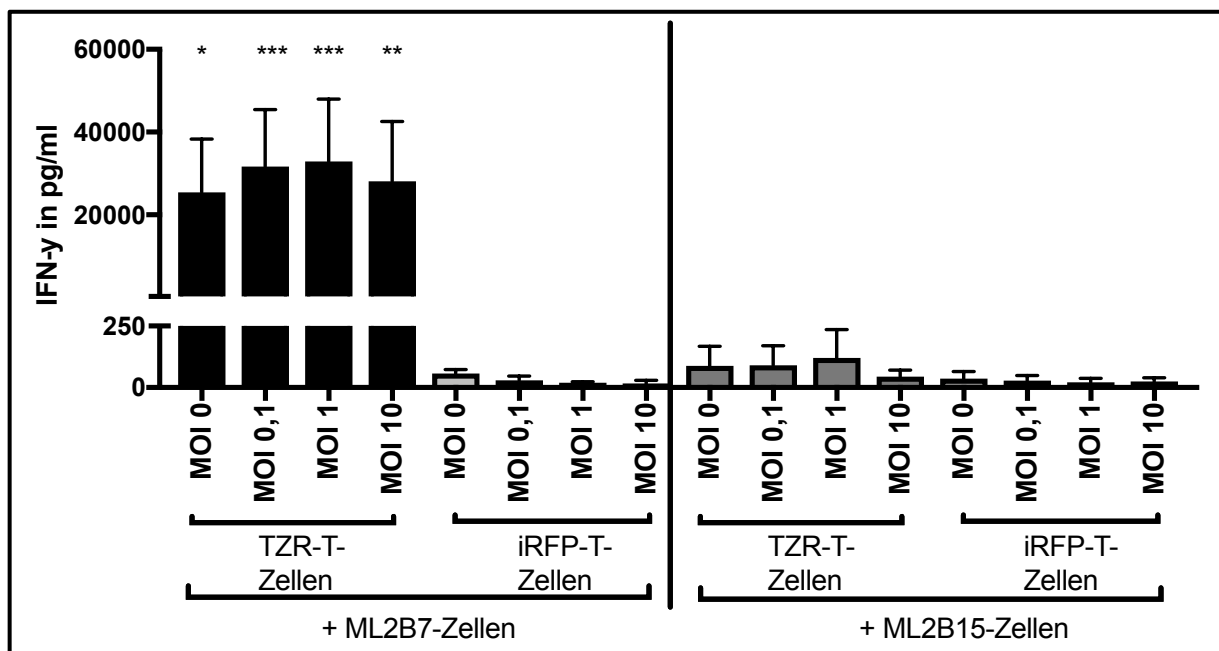


Abbildung 31: IFN- $\gamma$ -Produktion in der Mischkultur aus ML2-Zellen und infizierten T-Zellen nach 24h, modifiziert nach (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

Gezeigt werden die MW und SD der IFN- $\gamma$ -Produktion für die jeweiligen Kokulturbedingungen nach 24h aus drei Experimenten, welche jeweils in Triplets durchgeführt wurden. Der Titer von IFN- $\gamma$  ist in pg/ml Zellkulturüberstand angegeben. Der Zellkulturüberstand wurde 24h nach Kokultur eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt mittels ELISA auf den IFN- $\gamma$ -Titer untersucht. Signifikanz wurde mit einem One-Way-ANOVA- und einem Bonferroni-Post-Test ermittelt:  $p < 0,05 = *$ ,  $p < 0,01 = **$ ,  $p < 0,001 = ***$ . Die ersten vier Säulen waren zueinander nicht signifikant unterschiedlich. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)



Nach 48h zeigten sich ähnliche Ergebnisse bei der IFN- $\gamma$ -Produktion wie nach 24h. Allerdings ist davon auszugehen, dass zu diesem Zeitpunkt bereits kein neues IFN- $\gamma$  mehr produziert wurde, da die meisten Leukämie-Zellen bereits tot waren. Am ehesten handelt es sich hier also um eine Messung des noch vorhandenen IFN- $\gamma$ . Die Standardabweichungen sind zu diesem Zeitpunkt bereits wesentlich größer, sodass sich keine statistische Signifikanz mehr ergab.

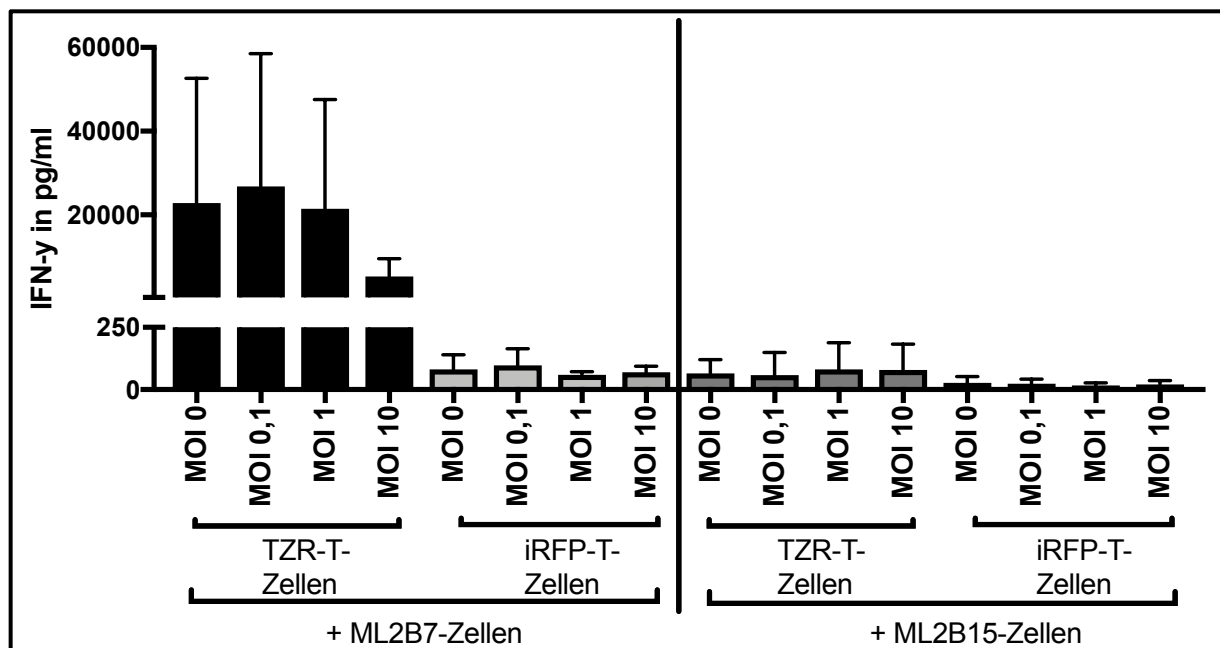


Abbildung 32: IFN- $\gamma$ -Produktion in der Mischkultur aus ML2-Zellen und infizierten T-Zellen nach 48h

Gezeigt werden die MW und SD der IFN- $\gamma$ -Produktion für die jeweiligen Kokulturbedingungen nach 48h aus drei Experimenten, welche jeweils in Triplets durchgeführt wurden. Der Titer von IFN- $\gamma$  ist in pg/ml Zellkulturüberstand angegeben. Der Zellkulturüberstand wurde 48h nach Kokultur eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt auf den IFN- $\gamma$ -Titer untersucht. Signifikanz wurde mit einem One-Way-ANOVA- und einem Bonferroni-Post-Test untersucht.

### 5.3.5 Erhaltene virale Replikation in einer Kombinationstherapie

Nachdem nun gezeigt wurde, dass das VSV die T-Zell-Funktion nicht einschränkt, ist als weiterer Schritt zu überprüfen, ob im Umkehrschluss die T-Zellen in irgendeiner Weise die Virusvermehrung beeinflussen. Dazu wurden aus den gleichen Zellkulturüberständen mittels TCID<sub>50</sub>-Methode die Titer des rVSV-sr39tk gemessen. Dies wurde jeweils für die Zeitpunkte 24h und

48h nach Beginn der Kokultur durchgeführt. Dabei zeigte sich sehr überraschend, dass in den Kulturbedingungen, in denen mit dem VSV beladene TZR-T-Zellen auf ML2B7-Zellen trafen, sehr viel niedrigere Titer erreicht wurden als in allen anderen Kulturbedingungen, wo es zu keiner T-Zell-Aktivierung, gemessen am Grad der IFN- $\gamma$ -Ausschüttung, kam. Zwar gab es hier einen dosisabhängigen Effekt, der zu höheren Titern in der Kokultur bei höherer initialer T-Zell-Beladungsdosis führte, doch wurden in den Kulturen, in denen eine spezifische T-Zell-Aktivierung stattfand, nur Titer im Bereich von  $10^4$ - $10^5$  TCID<sub>50</sub>/ml nach 24h gemessen. In den anderen Mischkulturen lagen die Titer nach 24h im Bereich von  $10^6$  bis  $10^8$  TCID<sub>50</sub>/ml. Interessant ist hier auch, dass in den Kokulturen, in denen T-Zellen, unabhängig von ihrem Transduktionsstatus bezüglich des TZR oder des iRFP, mit ML2B15-Zellen kultiviert wurden, die Titer fast eine Logarithmusstufe niedriger waren, als dort, wo Kontroll-T-Zellen auf ML2B7-Zellen trafen. Dies könnte ein weiterer Hinweis auf eine, wie oben bereits angesprochen, leicht höhere Resistenz der ML2B15-Zellen gegenüber dem VSV sein. Ein weiterer nennenswerter Punkt ist, dass es nach 24h eine scheinbare Dosisabhängigkeit der Virusproduktion von der initialen T-Zell-Infektionsdosis gibt. So finden sich die niedrigsten Titer jeweils bei der initial niedrigsten MOI von 0,1 und die höchsten entsprechend bei einer MOI von 10. Nach 48h kehrt sich dieser Zusammenhang ins Gegenteil. Hier sind die höchsten Titer bei der niedrigsten initialen Dosis zu finden. Dies mag daran liegen, dass bei den höheren MOIs bereits nach 24h fast alle Tumorzellen tot sind, und das bis dahin produzierte Virus wieder degradiert, wie bei vorigen Experimenten erwähnt. Dazu würde passen, dass die absolute Titerhöhe leicht abfällt. Bei der niedrigen MOI von 0,1 waren nach 24h noch lebendige ML2-Zellen vorhanden, sodass hier noch bis zum Zeitpunkt 48h nach Beginn der Kokultur eine weitere Virusproduktion stattfinden kann, was erklärt, wieso dort der Titer ansteigt. Nach 48h ist der Virustiter auch in den Proben höher, in denen eine T-Zell-Aktivierung stattgefunden hat. Dass der Titer in den Proben mit TZR-T-Zellen und ML2B7-Zellen insgesamt trotzdem niedriger ist, mag daran liegen, dass die T-Zellen, wie bereits gezeigt, selbst effizient an der Tumorzellabtötung beteiligt sind, und daher der Nährboden, auf dem sich das Virus normalerweise vermehrt, nur spärlicher vorhanden ist, was zu weniger produziertem Virus führt. Eine weitere Erklärung könnte auch sein, dass die IFN- $\gamma$ -Sekretion einen gewissen antiviralen Effekt auf das VSV hat, auch wenn das VSV eigentlich gegenüber den Typ-I-IFNs und nicht so sehr den Typ-II-IFNs sensibel ist. In einer anderen Arbeit wurde allerdings vorbeschrieben, dass auch IFN- $\gamma$  einen gewissen repressiven Effekt auf das VSV hat (Tan, Derrick et al. 2005). Letzten Endes ist es aber auch nicht

Ziel dieser Arbeit, eine möglichst gute Kondition zu finden, bei der viel Virus produziert wird, sondern eine, in der die Tumorzellen effizient abgetötet werden. Das Abtöten von Leukämie-Zellen ist der Kombinationstherapie aus TZR-T-Zellen und dem VSV sehr gut gelungen, sodass die niedrigen Virustiter sogar als Vorteil hinsichtlich möglicher toxischer Nebenwirkungen gesehen werden können. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

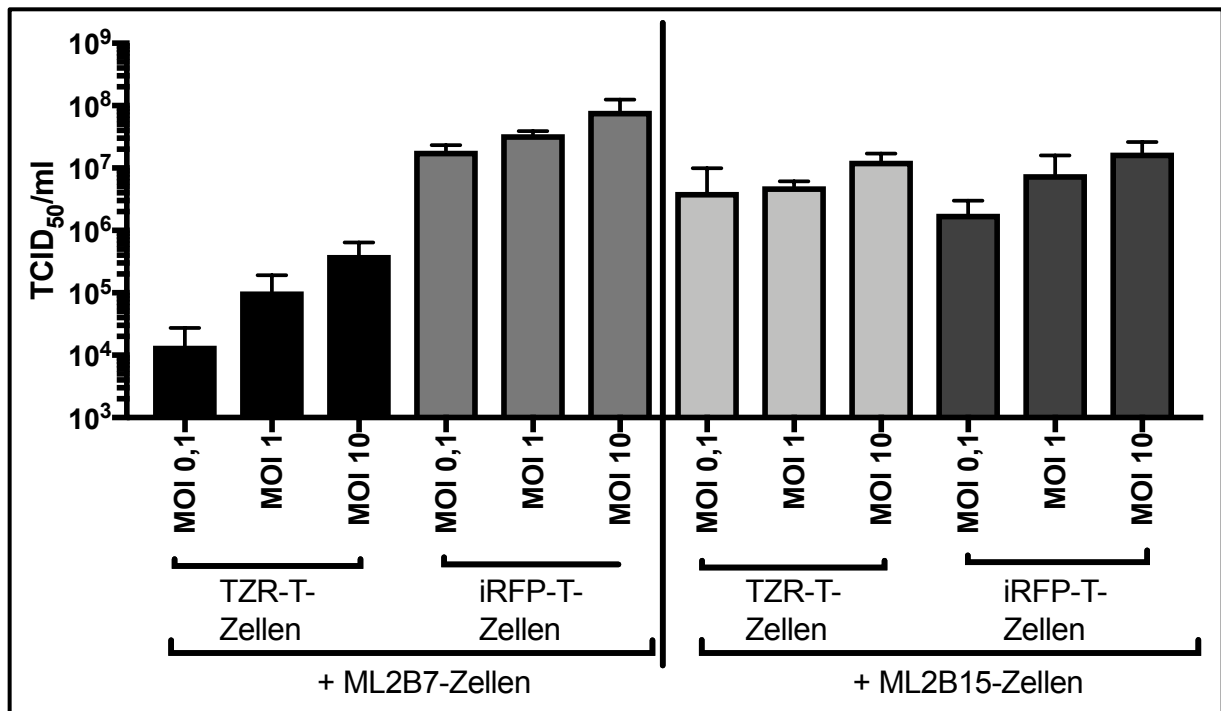


Abbildung 33: Produktion des VSV 24h nach Beginn der Mischkultur aus ML2-Zellen und infizierten T-Zellen, modifiziert nach (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

Gezeigt werden die MW und SD der Virustiter 24h nach Beginn der Kokultur aus drei unterschiedlichen Experimenten, welche jeweils in Triplets durchgeführt wurden. Der Titer des VSV wird in TCID<sub>50</sub>/ml Zellkulturüberstand angegeben. Der Zellkulturüberstand wurde 24h nach Kokultur eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt gemessen. Auf eine statistische Analyse wird aufgrund der logarithmischen Verteilung der Werte verzichtet. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

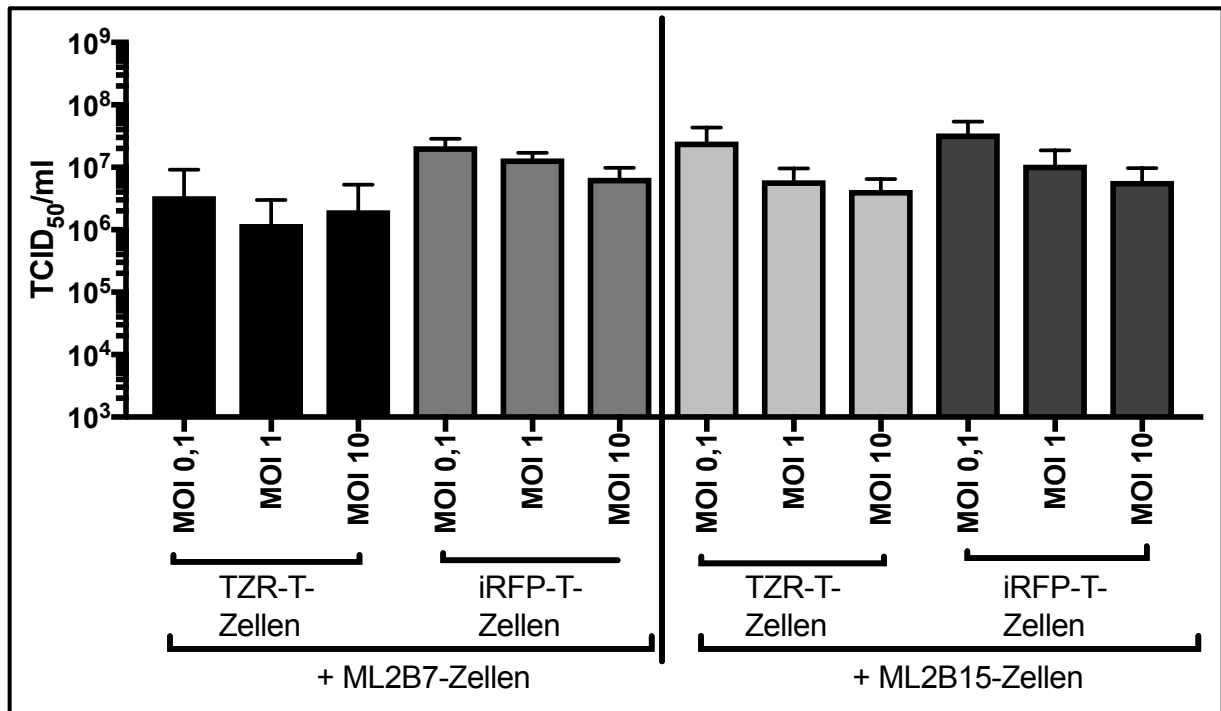


Abbildung 34: Produktion des VSV 48h nach Beginn der Mischkultur aus ML2-Zellen und infizierten T-Zellen

Gezeigt werden die MW und SD der Virustiter 48h nach Beginn der Kokultur aus drei unterschiedlichen Experimenten, welche jeweils in Triplets durchgeführt wurden. Der Titer des VSV wird in TCID<sub>50</sub>/ml Zellkulturüberstand angegeben. Der Zellkulturüberstand wurde 48h nach Kokultur eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt gemessen. Auf eine statistische Analyse wird aufgrund der logarithmischen Verteilung der Werte verzichtet.

Aus all diesen Experimenten kann geschlossen werden, dass TZR-T-Zellen in Kombination mit dem VSV, insbesondere bei einer MOI von 0,1, einen Vorteil gegenüber einer Monotherapie aus TZR-T-Zellen oder einer Kombinationstherapie aus unspezifischen T-Zellen und dem VSV besitzen. Des Weiteren scheint schon jede der Monotherapieformen für sich alleine ein sehr effektives Mittel zur Anwendung gegen ML2-Leukämie-Zellen zu sein.

## 5.4 In vivo: Toxizitätstudie

### 5.4.1 Testung unterschiedlicher Virusdosen im Mausmodell

Nach Beendigung der in-vitro-Analysen wurde im kommenden Abschnitt der Arbeit untersucht, in welcher Dosis das VSV bzw. eine Kombinationstherapie aus T-Zellen und VSV immunsupprimierten NSG-Mäusen verabreicht werden kann. Bevor die Behandlung von ML2-Tumoren in vivo untersucht wurde, wurde diese Toxizitätsstudie durchgeführt. Als limitierende Toxizität wurde die bekannte Neurotoxizität des VSV antizipiert (Quiroz, Moreno et al. 1988, Hastie, Cataldi et al. 2013). Da von vorneherein nicht klar war, ob sich die Toxizität unterscheidet, wenn das VSV an T-Zellen gebunden ist, wurden NSG-Mäuse sowohl mit VSV alleine als auch in Kombination mit T-Zellen behandelt. Zur Ermittlung der mit den T-Zellen verabreichten Anzahl an Viren wurde die Formel aus Abbildung 24 verwendet. Da alle späteren Tumorthherapie-Experimente in den Mäusen mit jeweils einer einmaligen Verabreichung von  $10^7$  T-Zellen durchgeführt werden sollte, wurde bereits in der Dosisfindungsstudie diese Anzahl von  $CD8^+$ -Tcm verwendet. Die mit den  $CD8^+$ -Tcm verabreichte Virusdosis wurde dann aus Gründen der Vergleichbarkeit mit der oben genannten Formel so umgerechnet, dass eine Aussage über die frei verfügbare Menge des VSV zwischen der Dosis der Kombinationstherapie und der Dosis des als Monotherapie verabreichten VSV getroffen werden konnte. In der Dosisfindungsstudie wurde das rVSV-GFP verwendet. Die zu untersuchende Virusdosis wurde den Mäusen dann in die Schwanzvene injiziert. Anschließend wurden die Mäuse für einen Zeitraum von 21 Tagen beobachtet. Die Mäuse wurden dafür täglich klinisch untersucht und gewogen. Nach 21 Tagen wurde der Versuch beendet. Wenn die Mäuse eines der im TVA definierten Abbruchkriterien erreichten, wie etwa Gewichtsverlust oder offensichtliche Krankheitszeichen, wurden sie euthanasiert. Bei den Mäusen, die Neurotoxizität zeigten, wurden unter anderem Krampfanfälle und Lähmungen beobachtet. Die  $CD8^+$ -Tcm wurden mit den MOIs von 0,01; 0,1 und 1 des rVSV-GFP infiziert. Das VSV alleine wurde in Dosen von  $10^4$  PFU und  $3,3 \cdot 10^4$  PFU getestet. Die einzelnen verabreichten Dosen mit und ohne T-Zellen sind in der untenstehenden Tabelle angegeben. Eine Versuchsgruppe enthielt initial drei Mäuse. Wenn nur ein toxisches Ereignis innerhalb der ersten 14 Tage der 21-tägigen Beobachtungsdauer auftrat, dann wurden weitere drei Mäuse zur Gruppe hinzugefügt. Trat hierbei kein erneutes toxisches Ereignis auf, so wurde diese applizierte Virusdosis als sicher erachtet. Gesucht wurde in diesen Experimenten die sichere Dosis für 14 Tage, da abzusehen war, dass die

immunsupprimierten NSG-Mäuse zwangsläufig irgendwann an der VSV-Infektion sterben würden. Die untenstehende Tabelle listet die applizierten Dosen und die toxischen Ereignisse pro Gruppe auf. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

Tabelle 32: Toxische Ereignisse in unterschiedlichen Gruppen während der MTD-Studie, modifiziert nach (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

<b>Behandlung</b>	<b>Entspricht</b>	<b>Toxische Ereignisse in 21 Tagen, gemessen an allen Mäusen der Gruppe</b>
10 <sup>4</sup> PFU VSV-GFP	10 <sup>4</sup> PFU	3/6
3,3*10 <sup>4</sup> PFU VSV-GFP	3,3*10 <sup>4</sup> PFU	4/6
10 <sup>7</sup> CD8 <sup>+</sup> -Tcm, MOI 0,01	3,3*10 <sup>3</sup> PFU	0/3
10 <sup>7</sup> CD8 <sup>+</sup> -Tcm, MOI 0,1	4,2*10 <sup>4</sup> PFU	0/3
10 <sup>7</sup> CD8 <sup>+</sup> -Tcm, MOI 1	5,2*10 <sup>5</sup> PFU	4/6

*Genannt sind die unterschiedlichen getesteten Dosen von frei verfügbarem VSV als auch die zellgebundenen Dosen des VSV, sowie die korrespondierende Dosis an infektiösen Viren und die Anzahl der Mäuse pro Gruppe, so wie die toxischen Ereignisse in jeder Gruppe. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)*

In dieser Tabelle sieht man deutlich, dass es bei der Applikation des VSV ohne T-Zellen bei niedrigeren Dosen bereits zu einer höheren Toxizität kommt. Interessant ist hierbei, dass man bis zu 4,2\*10<sup>4</sup> PFU infektiöse Viren, sofern sie an T-Zellen gebunden sind, verabreichen kann, ohne auch nur ein einzelnes toxisches Ereignis in der dreiwöchigen Beobachtungsdauer zu sehen. Wird das VSV in freier Form bereits in der geringeren Dosis von 10<sup>4</sup> PFU verabreicht, dann ergibt sich bereits eine Toxizitätsrate von 50% in den drei Wochen. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

#### 5.4.2 Bestimmung einer sicheren Dosis für das VSV in NSG-Mäusen

In einer Kaplan-Meier-Überlebenskurve bestätigten sich diese Ergebnisse. Aus dieser Kurve, wurde dann letzten Endes auch die MTD für 14 Tage herausgelesen. In der Kurve zeigt sich ein rapider Todeseintritt bei den Mäusen, die mit dem VSV behandelt wurden. Lediglich bei den Mäusen, die mit  $10^4$  PFU rVSV-GFP behandelt wurden, konnte eine sichere Dosis für 14 Tage definiert werden. Doch auch in dieser Gruppe gab es bereits ein toxisches Ereignis in den ersten 14 Tagen. Bei den T-Zell-gebundenen Viren hingegen konnte erst bei einer Beladungsdosis von einer MOI von 1, was einer Inkubation der T-Zellen mit initial  $10^7$  PFU während des Infektionsprozesses entspricht und umgerechnet  $5,2 \cdot 10^5$  PFU an sofort übertragbaren, infektiösen Viren entspricht, toxische Ereignisse beobachtet werden. Bei dieser Dosis zeigte sich aber, dass 2 der untersuchten 6 Mäuse innerhalb der ersten 14 Tage starben. Bei einer Infektions-MOI von 0,1 zeigte sich hingegen kein einziges toxisches Ereignis in den 21 Tagen. Daher wurden für die weiteren Versuche die sicheren Dosen für 14 Tage wie folgt definiert: 1. Für freies, nicht zellgebundenes VSV wurde eine Dosis von  $10^4$  PFU als sicher gewertet. 2. Für an  $10^7$  CD8<sup>+</sup>-Tcm gebundenes VSV wurde die Beladungsdosis der MOI von 0,1, was  $4,2 \cdot 10^4$  PFU entspricht, als sicher angesehen. Diese sicheren Dosen wurden dann in allen weiteren Mausexperimenten verwendet. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

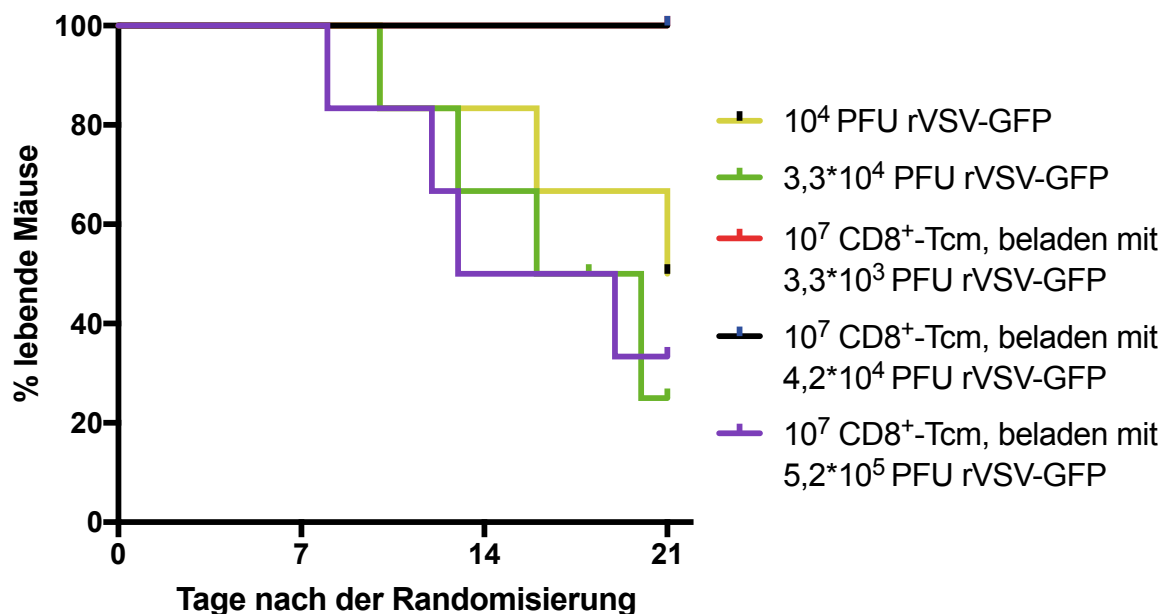


Abbildung 35: Überlebenszeitkurve der MTD-Studie, modifiziert nach (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

*Gezeigt wird eine Kaplan-Meier-Kurve der Toxizitätstudie. Jeder Abbruch bedeutet den Tod einer Maus. Nach 21 Tagen wurden die noch lebenden Mäuse zensiert. Die rote Kurve ist von der schwarzen überdeckt, da sich bei beiden Gruppen keine Toxizität zeigte. Für die Anzahl der Mäuse pro Gruppe vgl. Tabelle 19. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)*

Das Interessante an diesen Ergebnissen ist, dass keine Maus, die mit der Kombination aus  $10^7$  CD8<sup>+</sup>-Tcm und  $4,2 \cdot 10^4$  PFU des rVSV-GFP oder weniger behandelt wurden, Toxizitätszeichen aufweist, obwohl die Dosis an übertragbaren Viren höher ist als die zwei niedrigeren, getesteten Dosen von nicht-zellgebundenem rVSV-GFP. Es scheint, dass das VSV in Kombination mit T-Zellen weniger toxisch als freies Virus ist. (Melzer, Lopez-Martinez et al. 2017)

#### 5.4.3 Nachweis von VSV in bestimmten Organen der Mäuse

In einem nächsten Schritt wurden bestimmte Organe der Mäuse untersucht. Die Organe wurden dazu gewogen, mit einem Mörser homogenisiert, in einer bestimmten Konzentration in Lösung gebracht und anschließend der virale Titer in ihnen gemessen. Dazu wurden das Gehirn, die Leber, die Milz und die Lunge einer Maus untersucht, da das VSV für seinen Neurotropismus und seine Hepatotoxizität (Shinozaki, Ebert et al. 2005, LeBlanc, Naik et al. 2013) bekannt ist. Milz und Lunge wurden deswegen untersucht, weil in einer früheren Arbeit am selben Modell beschrieben wurde, dass humane T-Zellen ein starkes Homing in die Milz und Lunge der NSG-Mäuse zeigen (Mall, Yusufi et al. 2016). Die Organe wurden zum Zeitpunkt der Tötung der Maus asserviert und später untersucht. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

Im Gehirn der Mäuse, die früh unter Neurotoxizität litten, fand sich wenig überraschend ein hoher Titer von replizierenden rVSV-GFP in der TCID<sub>50</sub>-Untersuchung pro Gramm Gewebe. Interessanterweise zeigte sich aber auch in manchen Gehirnen von Mäusen, die an Tag 21 zensiert wurden, ein geringerer viraler Titer. Eine sehr auffällige Besonderheit ist weiterhin, dass sich in den Mäusen die mit CD8<sup>+</sup>-Tcm und der niedrigsten Dosis des VSV beladen wurden, überhaupt kein viraler Titer im Gehirn zeigte. Zudem zeigten sich auch bei den Mäusen, die nur mit dem VSV behandelt wurden, höhere viraler Titer als bei den Mäusen, die mit T-Zellen und dem VSV behandelt wurden. Hierbei war die initiale Beladungsdosis der T-Zellen unerheblich für diesen Unterschied. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)



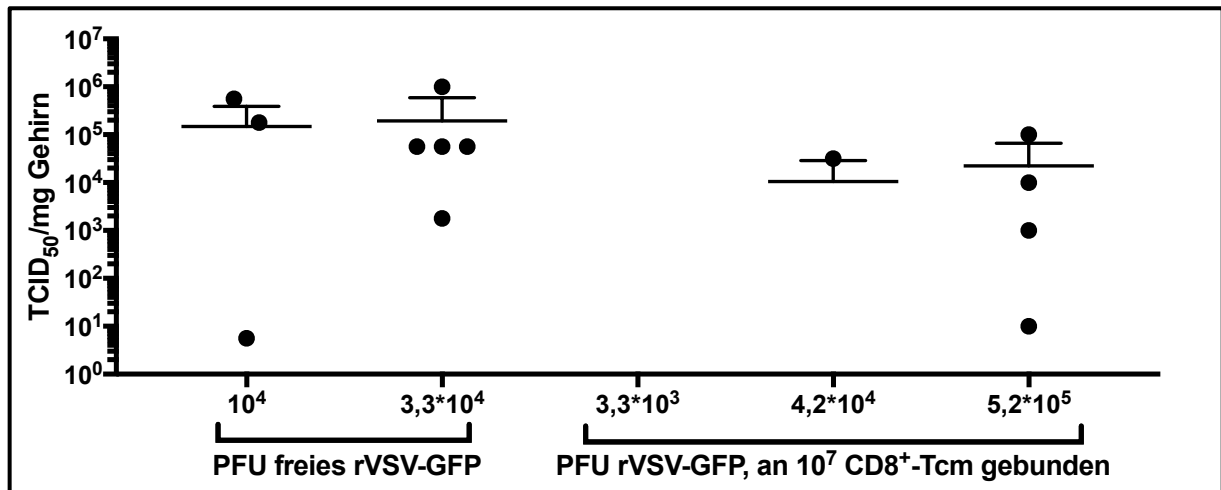


Abbildung 36: Quantitativer Virusnachweis im Gehirn von Mäusen aus der MTD-Studie, modifiziert nach (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

Gezeigt werden die MW, SD und Einzelwerte für die im Gehirn der Mäuse gemessenen Titer zum Zeitpunkt des Todes der jeweiligen Maus. Dargestellt sind die unterschiedlichen Therapiegruppen. Gemessen wurde der Titer als TCID<sub>50</sub>/mg Gehirn. Für die Anzahl der Mäuse pro Gruppe vgl. Tabelle 19. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

Insgesamt zeigte sich ein höherer Prozentsatz von Mäusen mit replizierenden rVSV-GFP im Gehirn in den Therapiegruppen, die mit freiem rVSV-GFP behandelt wurden. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

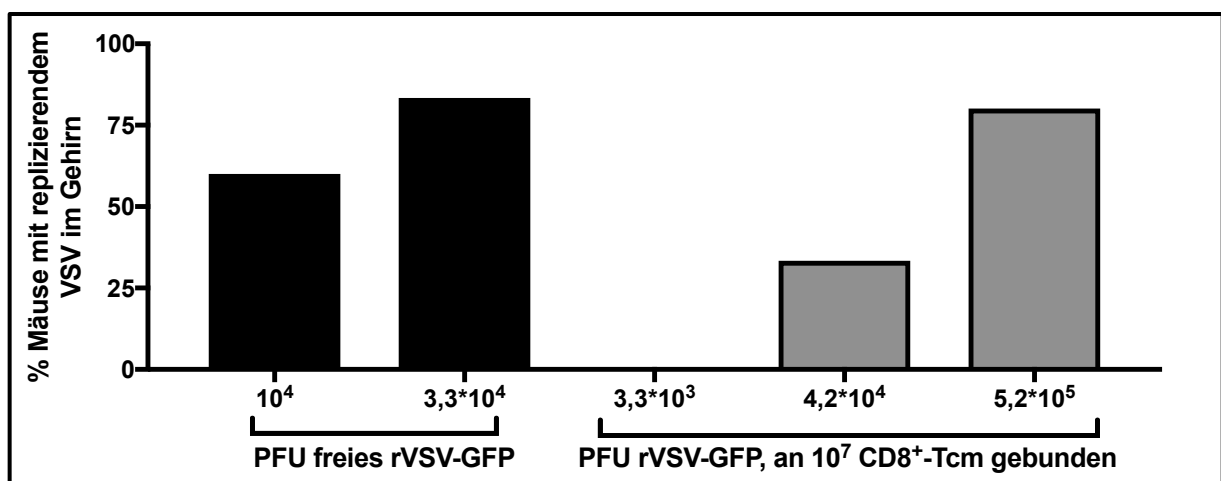


Abbildung 37: Prozentsatz der Mäuse einer Gruppe mit nachgewiesenem Virus im Gehirn während der MTD-Studie, modifiziert nach (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

Gezeigt wird der Prozentsatz der Mäuse einer Behandlungsgruppe, die einen positiven Nachweis von replizierendem VSV mittels der TCID<sub>50</sub>-Methode im Gehirn hatten. Für die Anzahl der Mäuse pro Gruppe vgl. Tabelle 19. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

In der Leber, der Milz und den Lungen der untersuchten Mäuse wurde bei insgesamt weniger Mäusen replizierendes VSV nachgewiesen. Auch die Höhe der Titer war niedriger als im Gehirn. Interessant ist, dass in den Lungen und der Milz, welche für ein T-Zell-Homing prädestiniert sind (Mall, Yusufi et al. 2016), nur gleich hohe oder sogar niedrigere Titer in den Mäusen, die mit einer Kombinationstherapie aus T-Zellen und dem VSV therapiert wurden, als in denen, die nur das VSV bekommen hatten, gemessen wurden. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

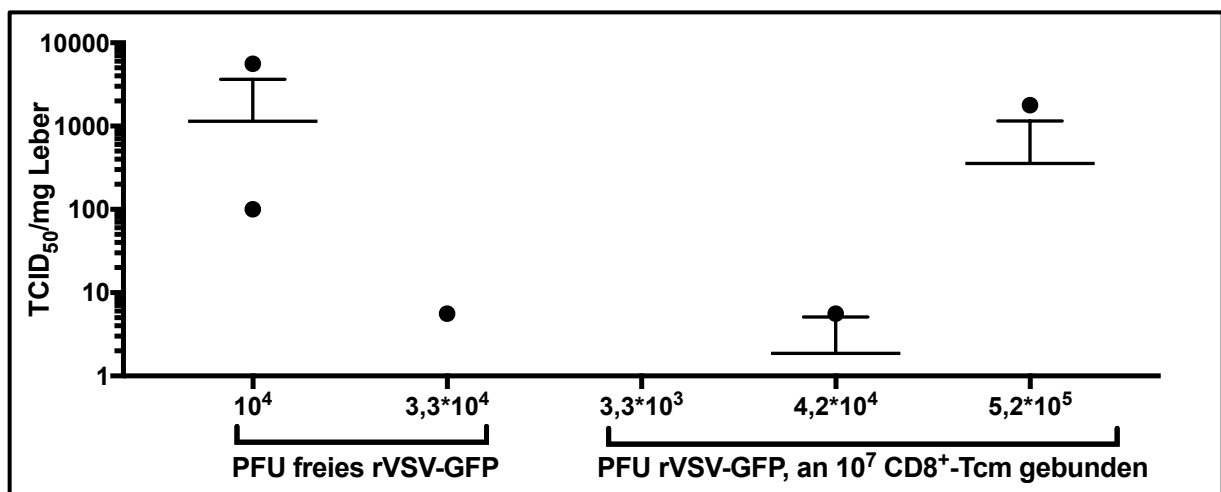


Abbildung 38: Quantitativer Virusnachweis in der Leber von Mäusen aus der MTD-Studie, modifiziert nach (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

Gezeigt werden die MW, SD und einzelnen Werte der in der Leber als TCID<sub>50</sub>/mg gemessenen Virustiter des rVSV-GFP. Für die Anzahl der Mäuse pro Gruppe vgl. Tabelle 19. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

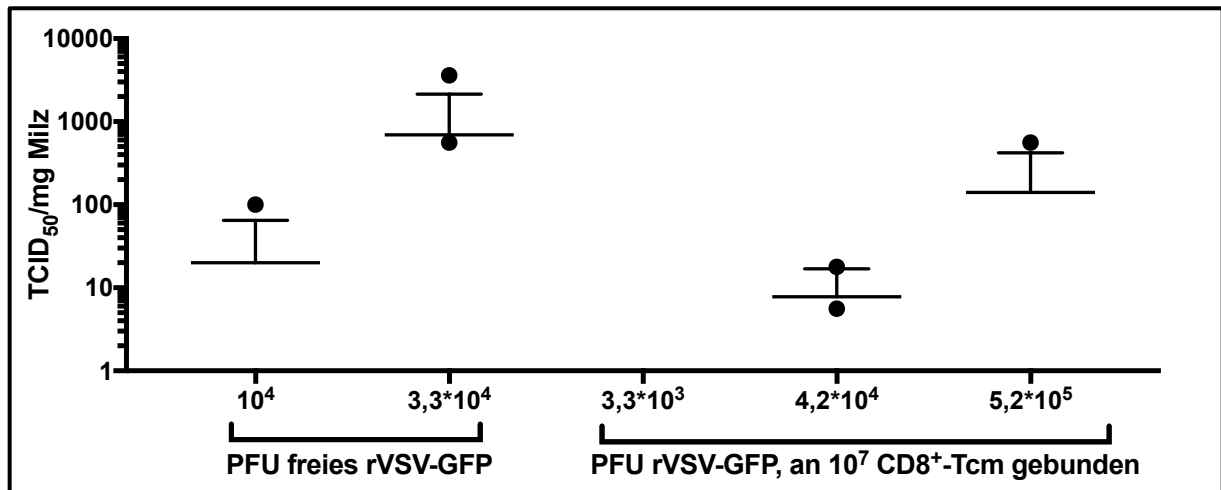


Abbildung 39: Quantitativer Virusnachweis in der Milz von Mäusen aus der MTD-Studie, modifiziert nach (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

Gezeigt werden die MW, SD und einzelnen Werte der in der Milz als TCID<sub>50</sub>/mg gemessenen Virustiter des rVSV-GFP. Für die Anzahl der Mäuse pro Gruppe vgl. Tabelle 19. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

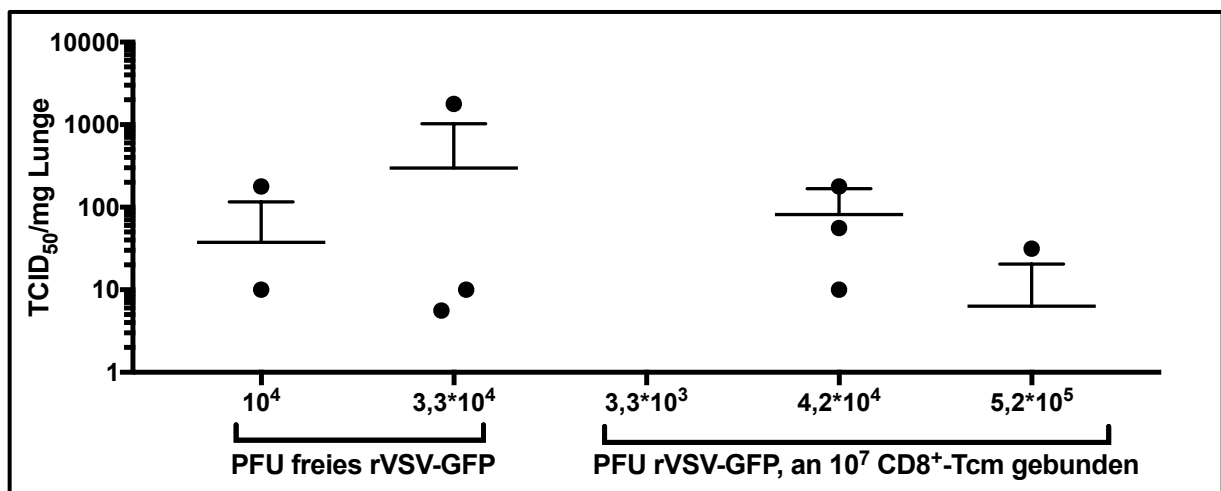


Abbildung 40: Quantitativer Virusnachweis in der Lunge von Mäusen aus der MTD-Studie, modifiziert nach (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

Gezeigt werden die MW, SD und einzelnen Werte der in der Lunge als TCID<sub>50</sub>/mg gemessenen Virustiter des rVSV-GFP. Für die Anzahl der Mäuse pro Gruppe vgl. Tabelle 19. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

## 5.5 Behandlung von NSG-Mäusen mit ML2-Tumoren

In weiteren Experimenten wurde nun untersucht, wie Tumoren, welche aus ML2-Leukämie-Zellen bestehen, auf eine Behandlung mit zuvor beschriebenen Behandlungsstrategien ansprechen. Eine erwähnenswerte Tatsache dabei ist, dass die ML2-Zellen bei einer subkutanen Injektion solide Tumoren ausbilden. Dazu wurden jeder Maus in die rechte Flanke subkutan  $10^7$  ML2B7-Zellen gespritzt und in die linke Flanke jeder Maus wurden subkutan  $10^7$  ML2B15-Zellen gespritzt. Nach 10- bzw. 11-tägigem Tumorwachstum wurden die Mäuse dann mittels Schwanzveneninjektion behandelt. Den Mäusen, die mit einer T-Zell-Therapie behandelt wurden, wurde einmal wöchentlich  $1\mu\text{g}$  IL-15 intraperitoneal verabreicht. Zu Beginn wurde die Kinetik der T-Zell- und Virusdistribution in den Mäusen untersucht. Dazu wurden die Mäuse 24h, 72h oder 120h nach Beginn der Therapie getötet und ihre Tumoren für bestimmte Analysezwecke entnommen. Da die ML2B7- und ML2B15-Zellen auch das GFP exprimieren, wurde in den folgenden Experimenten das rVSV-sr39tk verwendet. So wurde verhindert, dass es eine Interferenz zwischen viralem GFP und dem GFP der ML2-Zellen gab. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

### 5.5.1 Bestimmung der T-Zell-Akkumulation in den ML2-Tumoren

Eine erste Methode zur Auswertung der Tumoren war die FACS-Analyse. Hier wurde zu den genannten Zeitpunkten der Prozentsatz tumorinfiltrierender  $\text{CD8}^+$ -Tcm ermittelt. Dazu wurden die Tumoren wie im Methodenteil beschrieben homogenisiert und dann anschließend mit einem Antikörper gegen das humane CD8 gefärbt. Nach Ausschluss der toten Zellen mit Viability™ Dye 405/520 zeigte sich, dass zu den Zeitpunkten 24h und 72h nach Beginn der Behandlung weder im ML2B15-Tumor noch im ML2B7-Zieltumor eine signifikant erkennbare Anzahl von T-Zellen zu finden war. Dieses Erkenntnis war unabhängig davon, ob TZR-T-Zellen, die eigentlich zum ML2B7-Tumor wandern sollten, oder Kontroll-T-Zellen verwendet wurden. So zeigte sich bei allen Therapiegruppen, also bei Therapie mit PBS als Kontrolle,  $10^7$  Kontroll-T-Zellen,  $10^7$  TZR-T-Zellen,  $10^4$  PFU des freien rVSV-sr39tk,  $10^7$  Kontroll-T-Zellen und  $10^7$  TZR-T-Zellen, wobei die beiden letztgenannten jeweils mit einer MOI von 0,1 des rVSV-sr39tk, also der in der MTD-Studie bestimmten sicheren Dosis, vorinfiziert wurden, in den ersten 72h keine wesentliche Akkumulation von  $\text{CD8}^+$ -T-Zellen im Tumor. Nach 120h jedoch zeigten sich in den

ML2B7-Tumoren der Mäuse, die mit TZR-T-Zellen behandelt wurden, verglichen mit den Tumoren der Mäuse, die nicht mit TZR-T-Zellen behandelt wurden, ein signifikanter Anstieg von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen im Tumor. Die Mäuse die mit der Kombination aus TZR-T-Zellen und dem rVSV-sr39tk behandelt wurden, zeigten auch einen deutlichen Anstieg gegenüber früheren Zeitpunkt und anderen Therapiegruppen, allerdings war dieser nicht signifikant unterschiedlich zu den Kontrollgruppen des Zeitpunktes 120h. Dies mag daran liegen, dass zu diesem Zeitpunkt bereits der größte Teil des ML2B7-Tumors tot war, wie in späteren Experimenten ausführlich gezeigt wird, sodass es dort auch keine lebenden T-Zellen mehr nachzuweisen gab. Eine Ursache dafür könnten die hohen Virustiter in den Tumoren sein, die später dargestellt werden, welche auch die T-Zellen abgetötet haben, oder aber der Verlust von lebenden Tumorzellen mit Zielantigen, sodass einfach keine weitere T-Zell-Anreicherung im Tumor mehr stattfand. Alle anderen Therapie-Gruppen, welche nicht TZR-T-Zellen enthielten, zeigten auch nach 120h keine wesentliche Anreicherung von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen im Tumor. Damit ist deutlich gezeigt, dass es eine langsame, aber sehr spezifische Akkumulation von TZR-T-Zellen im Zieltumor gibt. Kontroll-T-Zellen werden also nicht vom Tumor angezogen. Ob es sich hierbei insgesamt aber um ein spezifisches Homing der TZR-T-Zellen oder lediglich um einen stochastischen Vorgang handelt, bei dem die wenigen T-Zellen, die bereits zu früheren Zeitpunkten nachgewiesen werden, im Tumor verbleiben und sich dort vermehren, kann in diesem Experiment nicht sicher differenziert werden. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

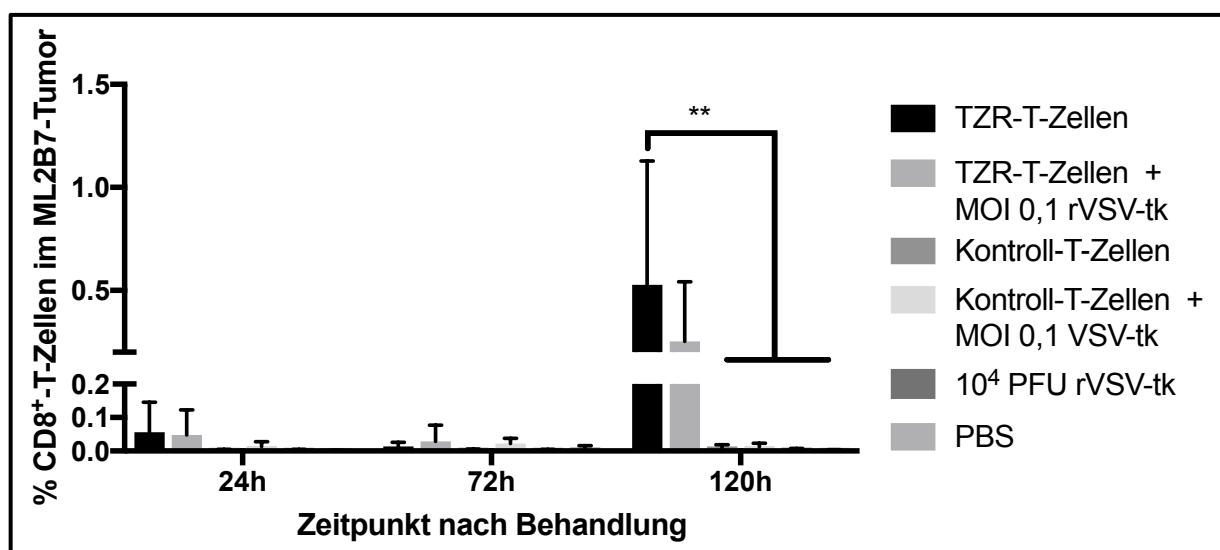


Abbildung 41: T-Zell-Akkumulation im ML2B7-Tumor, modifiziert nach (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

Gezeigt werden die MW und SD der Prozentsätze CD8<sup>+</sup>-T-Zellen im ML2B7-Tumor zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Two-Way-ANOVA-Test mit Bonferroni-Post-Test.  $p < 0,01 = **$ . Der Anstieg der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in der TZR-T-Zell-Monotherapie über die Zeit hinweg ist signifikant (\*\*). Für die Anzahl der Mäuse pro Gruppe vgl. Tabelle 20. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

Auch die ML2B15-Tumoren der kontralateralen Flanken der Mäuse wurden auf die Infiltration mit CD8<sup>+</sup>-T-Zellen untersucht. Dabei zeigte sich wenig überraschend, dass es in diesen Tumoren keine spezifische T-Zell-Infiltration gab. So zeigte sich hier in keinem der Tumoren eine nennenswerte Anzahl von T-Zellen, unabhängig davon ob die Mäuse mit T-Zellen oder nur mit dem rVSV-sr39tk bzw. der Negativkontrolle PBS behandelt wurde. Ein ganz kleiner Prozentsatz von 0,05% CD8<sup>+</sup>-T-Zellen im ML2B15-Tumor zeigt sich lediglich bei den Mäusen, die mit TZR-T-Zellen ohne das rVSV-sr39tk behandelt wurden, 24h nach Beginn der Behandlung. Dieser fällt aber bereits nach 72h gegen null ab. Daher findet im ML2B15-Tumor weder ein Homing noch eine Proliferation der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen statt.

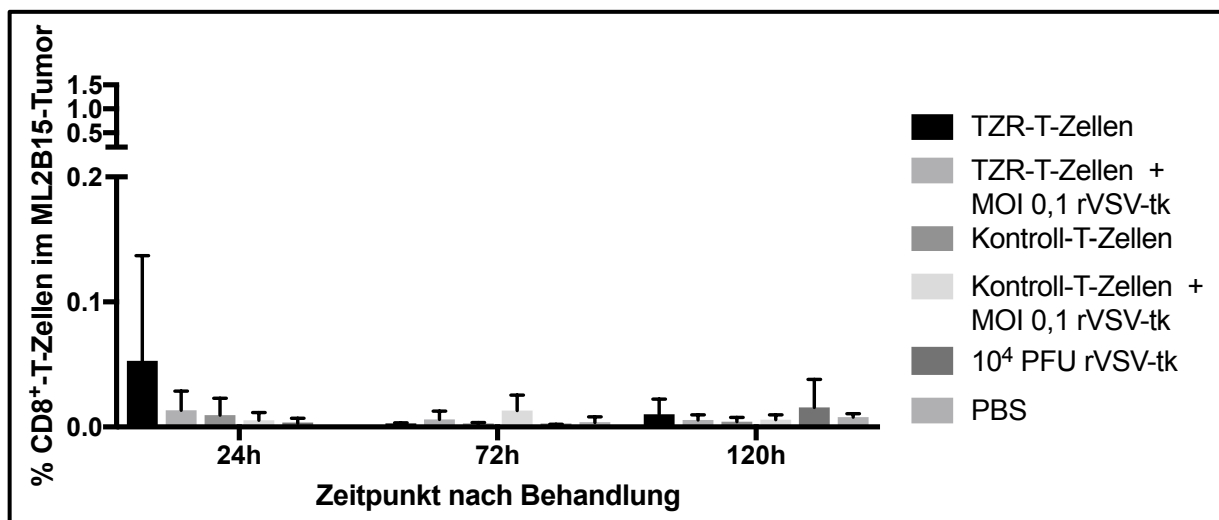


Abbildung 42: T-Zell-Akkumulation im ML2B15-Tumor

Gezeigt werden die MW und SD der Prozentsätze CD8<sup>+</sup>-T-Zellen im ML2B15-Tumor zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Für die Anzahl der Mäuse pro Gruppe vgl. Tabelle 21.

Aus der FACS Untersuchung ergibt sich also, dass es nur im Tumor, der das Ziel-HLA exprimiert zur Anreicherung von TZR-T-Zellen kommt. Dabei gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen TZR-T-Zellen, die als Carrier-Zellen für das rVSV-sr39tk verwendet werden und solchen,

die nur als Monotherapie verabreicht werden, was dafürspricht, dass die Beladung der TZR-T-Zellen mit dem rVSV-sr39tk nicht zu einer veränderten Tumorinfiltrations- oder Tumoranreicherungskinetik führt. Andererseits lässt sich auch kein signifikanter Unterschied zwischen TZR-T-Zellen in Kombination mit dem VSV-sr39tk und den Kontrollgruppen im ML2B7-Tumor feststellen, was vermutlich an den zuvor genannten Argumenten liegt, dass der Tumor bereits zu großen Teilen nur noch aus toten Zellen besteht. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

Die Anwesenheit der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in den ML2B7-Tumoren wurde mithilfe von immunhistochemischen Untersuchungen an Gewebeschnitten verifiziert. Dazu wurden die ML2B7-Tumoren mit einem CD3-Antikörper gegen den Pan-T-Zell-Marker CD3 immunhistochemisch gefärbt. Tatsächlich zeigt sich nur in den ML2B7-Tumoren der Mäuse, die mit TZR-T-Zellen als Mono- oder Kombinationstherapie behandelt wurden, eine Anreicherung von CD3<sup>+</sup>-T-Zellen. Da nur CD8<sup>+</sup>-Tcm, die alle auch CD3<sup>+</sup> sind, für die Experimente verwendet wurden, ist die Information aus den Gewebeschnitten eine ähnliche wie die aus der FACS-Auswertung. Tatsächlich werden hier nur Ausschnitte der Tumoren gezeigt, die aber qualitativ repräsentativ darstellen, ob T-Zellen im Tumor anwesend sind. Interessant war dabei die Entdeckung, dass die infiltrierenden T-Zellen sich meistens in Nestern zusammenfanden. Andere Tumorteile der mit den TZR-T-Zellen behandelten Mäuse wiesen teilweise gar keine T-Zellen auf. So zeigt sich also eine sehr heterogene Verteilung der T-Zellen im Tumor. Das ließe darauf schließen, dass es sich hier eher um proliferierende T-Zellen handelt, die von wenigen infiltrierenden T-Zellen abstammen. Diese These spräche für die Hypothese, dass es sich bei der T-Zell-Anreicherung eher um einen stochastischen Prozess handelt, bei dem vereinzelte T-Zellen einfach in der Tumorstrombahn verbleiben, die Gefäße verlassen und sich dann vermehren, als dass ein gezieltes Homing stattfindet, bei dem viele der injizierten T-Zellen zielgerichtet zum Tumor wandern. Mäuse, die keine TZR-T-Zellen erhielten, sondern Kontroll-T-Zellen in Kombination mit und ohne VSV, VSV in freier Form oder PBS, wiesen keine erkennbare T-Zell-Infiltration auf. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

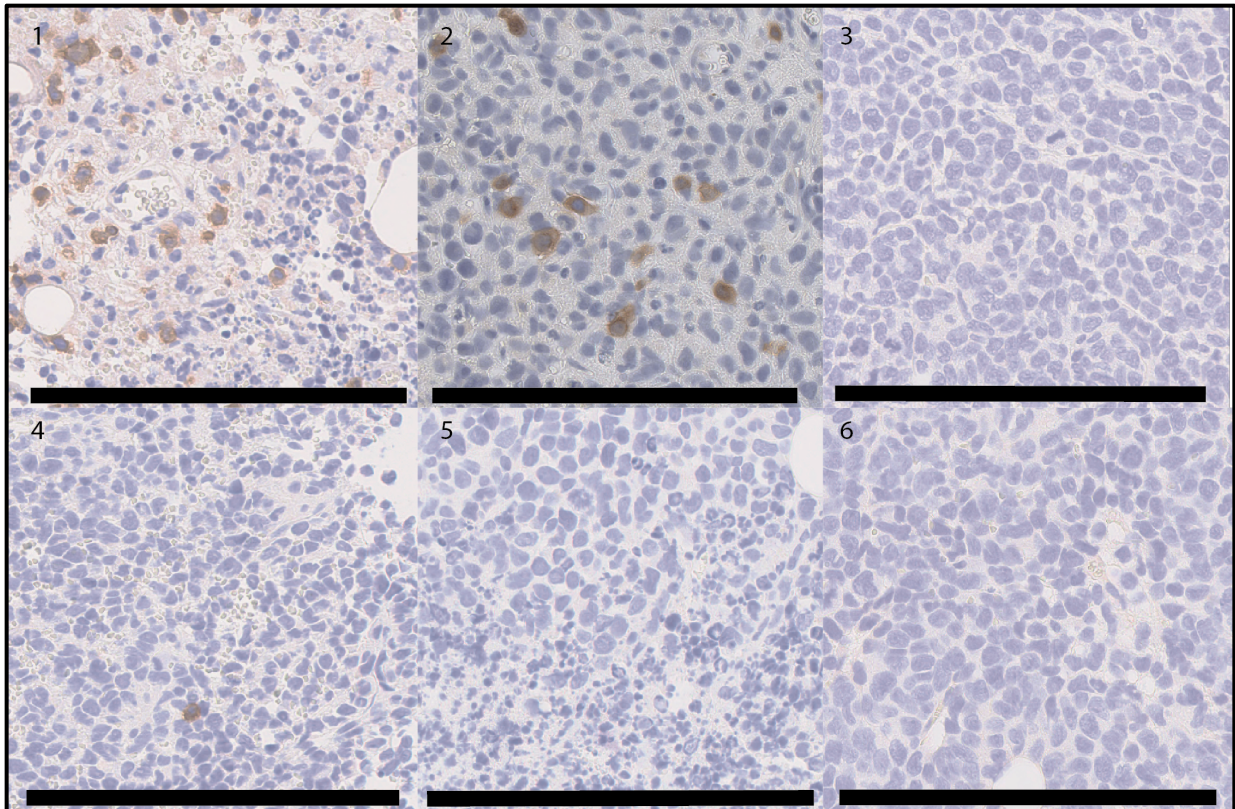
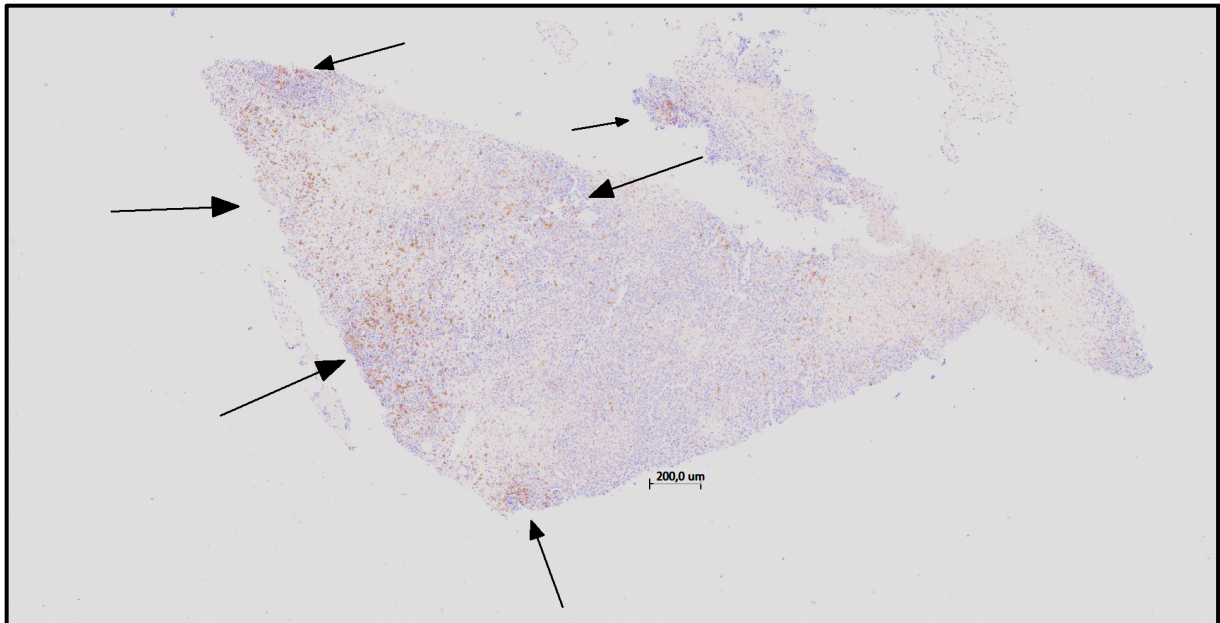


Abbildung 43: Immunhistochemischer Nachweis infiltrierender CD3<sup>+</sup>-T-Zellen im ML2B7-Tumor, modifiziert nach (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

Gezeigt werden repräsentative Ausschnitte der ML2B7-Tumoren. Die Tumoren wurden mithilfe eines CD3-Antikörpers immunhistochemisch gefärbt. Es wurden 2µm dicke Tumorschnitte der Tumoren, die 120h nach Beginn der Therapie untersucht wurden, gefärbt. 1= TZR-T-Zellen, 2= TZR-T-Zellen, vorinfiziert mit der MOI von 0,1 des rVSV-sr39tk, 3= 10<sup>4</sup> PFU rVSV-sr39tk, in freier Form, 4= Kontroll-T-Zellen, 5= Kontroll-T-Zellen, vorinfiziert mit der MOI von 0,1 des rVSV-sr39tk, 6= PBS. Die schwarzen Balken in den einzelnen Bildern zeigen 200µm an. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)





*Abbildung 44: Immunhistochemischer Nachweis von T-Zell-Nestern im ML2B7-Tumor*  
*Gezeigt wird hier ein repräsentativer ML2B7-Tumor einer Maus die 120h nach der Therapie mit TZR-T-Zellen getötet wurde. Es wurde eine CD3-IHC durchgeführt. Die Pfeile zeigen auf die weiter oben angesprochenen Nester von CD3<sup>+</sup>-T-Zellen. Der Balken gibt 200μm an.*

### 5.5.2 Replikation des VSV in ML2-Tumoren

Im nächsten Schritt wurde der Virustiter in den Tumoren bestimmt. Dazu wurden die Tumoren homogenisiert und in PBS mit Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> in Lösung gebracht, sodass sich eine Konzentration von 100mg Tumor/ml PBS ergab. Der Titer wurde dann mittels TCID<sub>50</sub>-Methode gemessen. Zunächst wurde der ML2B7-Tumor der Mäuse untersucht. Hierbei zeigte sich bei allen Mäusen, die mit einer Kombinationstherapie aus T-Zellen und dem VSV oder dem VSV alleine behandelt wurden, bereits nach 24h ein relativ hoher Titer des VSV in den ML2B7-Tumoren. Die VSV-Titer erreichten zu diesem Zeitpunkt für alle drei Virustherapiegruppen einen Wert von im Mittel 10<sup>4</sup>-10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub>/mg ML2B7-Tumor. Zwar war zwischen den drei Gruppen nach 24h keine Signifikanz zu erkennen, jedoch waren die Titer der Tumoren der Mäuse, die mit einer Kombination aus dem VSV und T-Zellen, unabhängig davon, ob diese den TZR exprimierten, behandelt wurden, etwa eine halbe Zehnerpotenz höher. Bereits 72h nach Beginn der Behandlung befanden sich die Titer in den Tumoren der Mäuse, die mit T-Zellen behandelt wurden, im Bereich von 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> TCID<sub>50</sub>/mg ML2B7-Tumor. Der Titer der Tumoren der Mäuse, die

nur mit dem VSV behandelt wurden, waren im Mittel etwa 1,5 Zehnerpotenzen niedriger. Dieser Unterschied war signifikant für den Vergleich mit der Kontroll-T-Zell-Probe in Kombination mit dem VSV. Nach 120h befanden sich die Titer in den ML2B7-Tumoren aller Mäuse im Bereich von etwa  $10^5$ - $10^6$  TCID<sub>50</sub>/mg. Hier waren keine signifikanten Unterschiede mehr zu erkennen. Bei genauerer Betrachtung erscheint es allerdings, als wären die Titer in den Tumoren der Mäuse, die nur mit Kontroll-T-Zellen und dem VSV und nicht mit TZR-T-Zellen und dem VSV behandelt wurden, etwas höher als die Titer der Tumoren, in denen TZR-T-Zellen und VSV für die Therapie eingesetzt wurden. Eine Erklärung dafür könnte analog derjenigen sein, die bereits für die in-vitro-Kokultur-Experimente gegolten hat. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

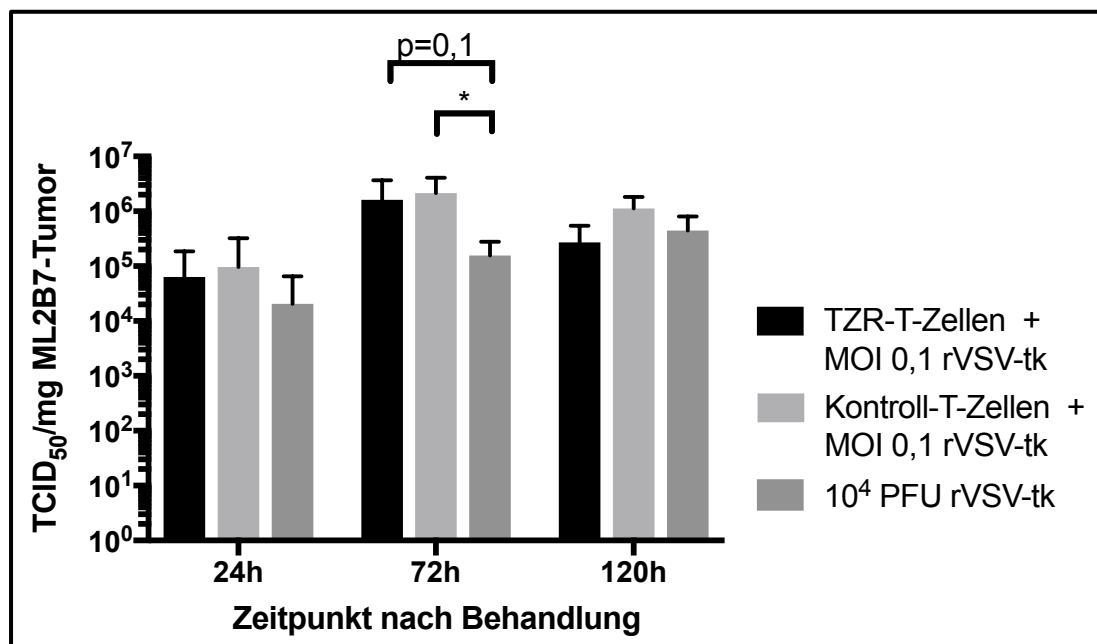


Abbildung 45: Titer des VSV in den ML2B7-Tumoren zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Beginn der Therapie, modifiziert nach (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

Gezeigt werden die MW und SD der als TCID<sub>50</sub>/mg gemessenen viralen Titer zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Beginn der Behandlung für die angegebenen Therapiegruppen. Signifikanz wurde nach 72 erreicht. Two-Way-ANOVA, Bonferroni-Post-Test,  $p < 0,05 = *$ . Für die Anzahl der Mäuse pro Gruppe vgl. Tabelle 22. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

In einem nächsten Schritt wurden nun die Titer in den ML2B15-Tumoren der Mäuse untersucht. Hierbei zeigten sich nach 24h in allen Therapiegruppen ähnliche Titer, die allerdings niedriger lagen als im ML2B7-Tumor. Sie lagen im Bereich von etwa  $10^3$ - $10^4$  TCID<sub>50</sub>/mg ML2B15-Tumor. Nach 72h war auch hier ein Maximum erreicht, wobei wieder in den Tumoren

der Mäuse, die mit T-Zellen und dem VSV behandelt worden waren, signifikant höhere Titer erreicht wurden als in den Tumoren der Mäuse, die nur mit der VSV-Monotherapie behandelt worden waren. Die Titer lagen insgesamt im Bereich von  $10^6$ - $10^7$  TCID<sub>50</sub>/mg für die Kombinationstherapie und im Bereich von  $10^5$ - $10^6$  TCID<sub>50</sub>/mg für das freie VSV. Nach 120h glichen sich die Titer aller drei Therapieformen, die das VSV enthielten, wieder an und lagen im Bereich von  $10^5$ - $10^6$  TCID<sub>50</sub>/mg ML2B15-Tumor.

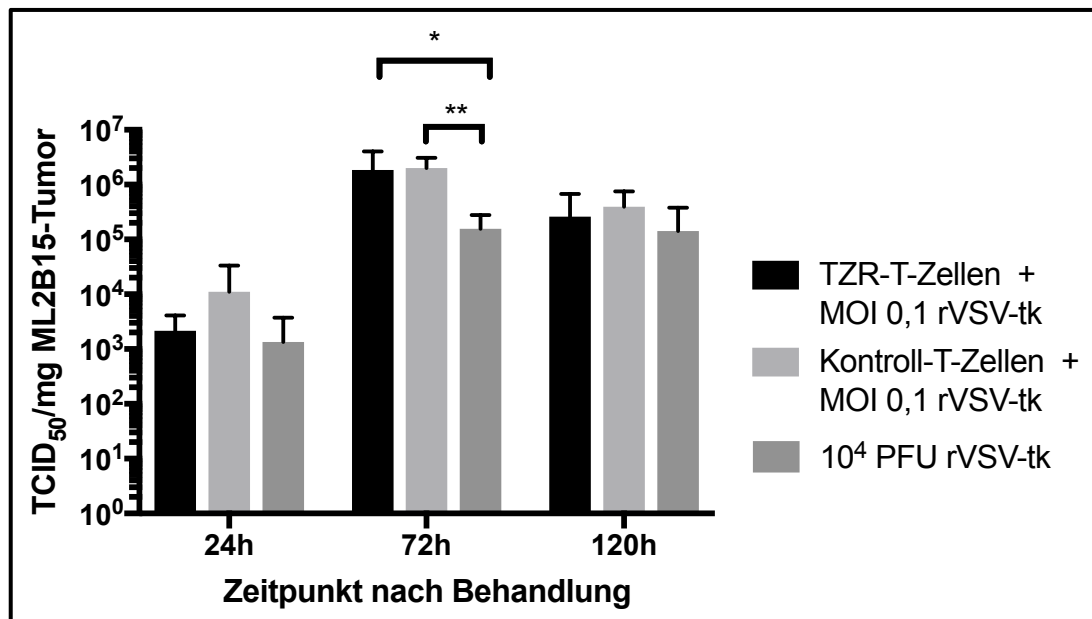


Abbildung 46: Titer des VSV in den ML2B15-Tumoren zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Beginn der Therapie

Gezeigt werden die MW und SD der als TCID<sub>50</sub>/mg gemessenen viralen Titer zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Beginn der Behandlung für die angegebenen Therapiegruppen. Signifikanz wurde nach 72 erreicht. Two-Way-ANOVA, Bonferroni-Post-Test,  $p < 0,05 = *$ ;  $p < 0,01 = **$ . Für die Anzahl der Mäuse pro Gruppe vgl. Tabelle 23.

Wenn man beide Abbildungen zu den Viurstitern in den Tumoren vergleicht, fällt folgendes auf:

1. Die Titer in den ersten 24h im ML2B15-Tumor liegen niedriger als im ML2B7-Tumor. Der Unterschied beträgt ca. eine Zehnerpotenz. Das ist eine Beobachtung, die schon in den Kokultur-Experimenten gemacht wurde. Dieses Ergebnis hier dürfte die These unterstützen, dass die ML2B15-Zellen evtl. ein wenig resistenter gegenüber dem VSV sind.

2. Es fällt auf, dass die Titer in beiden Tumoren höher sind, wenn die Mäuse mit einer Kombination aus T-Zellen und VSV behandelt wurden. Dabei scheint es keine Rolle zu spielen, ob die T-Zellen ein spezifisches Ziel haben oder ob es sich nur um Kontroll-T-Zellen handelt. Ein Erklärungsansatz ist, dass initial in beiden Tumoren wenige T-Zellen anwesend sind. Diese reichen aber offenbar aus, um genügend Virus auf die Tumorzellen zu übertragen, damit dieser sich schnell vermehrt und hohe intratumorale Titer erreicht.

(Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

### 5.5.3 Effektivität der Tumorabtötung in den NSG-Mäusen

Ein weiterer essenzieller Bestandteil der Untersuchungen war, ob es Unterschiede in der Effektivität der unterschiedlichen Therapieansätze gibt. So sind zwar die Erkenntnisse in der T-Zell- und Viruskinetik interessant, aber ein Therapieerfolg kann letztlich nur an anderen Parametern gemessen werden. Einer davon ist, wie effektiv die Tumoren abgetötet wurden. Es wurden zwei unterschiedliche Methoden verwendet, um die Tumurvitalitätsreduktion zu untersuchen. Zunächst wurden die Tumoren im FACS dahingehend untersucht, welcher Anteil aller Zellen nach Ausschluss der toten Zellen noch GFP exprimiert. Dieser Prozentsatz stellt ein Parameter für den Anteil der lebendigen Tumorzellen an allen Zellen im Tumor dar. Als erstes werden die Daten der ML2B7-Tumoren dargelegt. Je kleiner der Prozentsatz im Tumor anwesender GFP<sup>+</sup>-Zellen war, desto weniger lebende Tumorzellen waren im Tumor vorzufinden. Im ML2B7-Tumor ergaben sich dafür folgende Ergebnisse: Nach 24h zeigen sich erste leichte Tendenzen zu verminderter Vitalität im ML2B7-Tumor bei den Mäusen, die eine Therapie erhielten, die das VSV beinhaltet. Nach 72h verstärkt sich diese Tendenz und zeigt deutliche, wenn auch nicht signifikante Unterschiede zu anderen Therapiegruppen. Zum gleichen Zeitpunkt sieht man nun auch eine etwas verstärkte Tumorabtötung in den Mäusen, die mit TZR-T-Zellen als Monotherapie behandelt wurden. Nach 120h stellen sich nun signifikante Unterschiede in der Therapieeffizienz ein. Dabei zeigen sich in den Therapiegruppen, die das VSV enthalten, im Mittel die größten und deutlichsten Unterschiede verglichen mit den beiden Kontrollgruppen PBS und den Kontroll-T-Zellen. Auch die TZR-T-Zellen erreichen eine relativ starke Tumorabtötung von im Mittel rund 40%, auch wenn diese keine Signifikanz gegenüber anderen Therapiegruppen erreicht. Interessant ist vor allem, dass in den Mäusen, deren Tumor mit dem

VSV alleine behandelt wurden, sehr große Standardabweichungen festzustellen sind. Das deutet darauf hin, dass die Verlässlichkeit der Therapieeffektivität bei einer Behandlung mit VSV geringer und insgesamt zufälliger ist als bei der Behandlung mit TZR- oder Kontroll-T-Zellen in Kombination mit dem VSV, bei denen die Standardabweichungen wesentlich geringer sind. Das bedeutet, dass der Effekt der Kombinationstherapien verlässlicher ist als der einer VSV-Monotherapie. Da die TZR-T-Zellen vermittelte Zytotoxizität augenscheinlich später beginnt als die der Kombinationstherapie, ist davon auszugehen, dass die TZR-T-Zellen erst relativ spät einen Beitrag zur Tumorabtötung leisten, der in den ersten 120h bei einer Kombinationstherapie nur wenig ins Gewicht fällt, da die Kombinationstherapie unabhängig von der Expression eines transgenen TZR sehr effektiv die Tumorzellen reduziert. Obwohl hier keine Signifikanz für die TZR-T-Zell-Therapie zu erreichen ist, zeigt sich trotzdem eine Tendenz zu einem verstärkten Abtöten der Tumorzellen verglichen mit den Kontrollgruppen. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

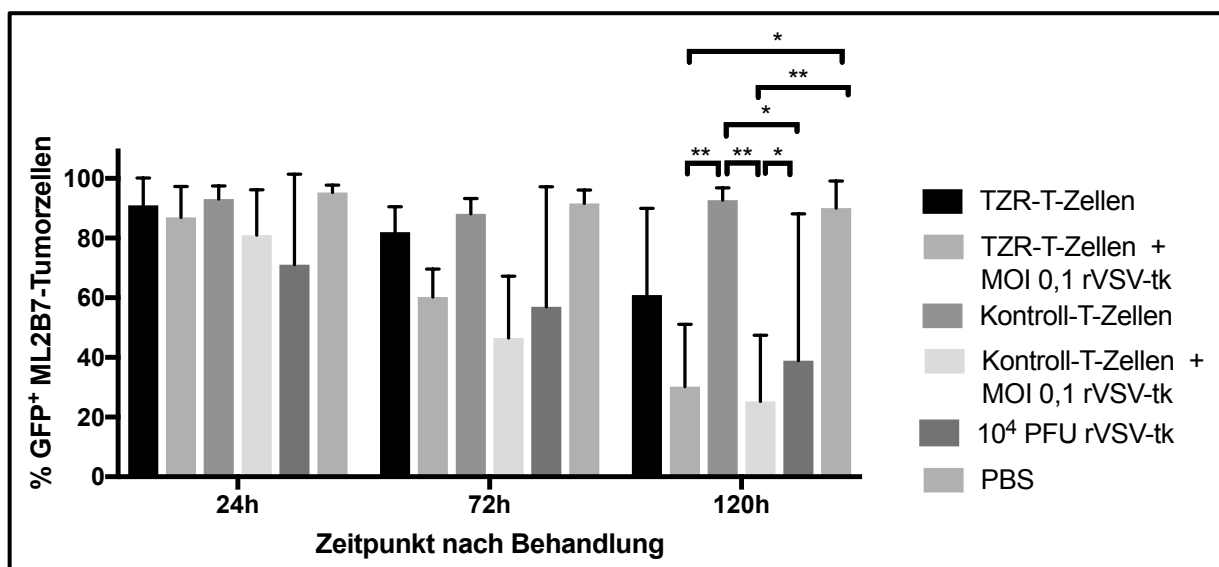


Abbildung 47: Reduktion der GFP<sup>+</sup>-Zellen im ML2B7-Tumor zu unterschiedlichen Zeitpunkten, modifiziert nach (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

Gezeigt werden die MW und SD der Prozentsätze GFP<sup>+</sup>-Zellen im ML2B7-Tumor zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Behandlung durch unterschiedliche therapeutische Ansätze. Two-Way-ANOVA-Test mit Bonferroni-Post-Test.  $p < 0,05 = *$ ;  $p < 0,01 = **$ .  $p = 0,0565$  für den Vergleich zwischen rVSV-sr39tk und PBS nach 120h. Für die Anzahl der Mäuse pro Gruppe vgl. Tabelle 24. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

Bei der Untersuchung der ML2B15-Tumoren durch die gleiche Methode zeigt sich wenig überraschend, dass weder TZR-T-Zellen, noch Kontroll-T-Zellen oder PBS im Zeitraum von 120h zu einer wesentlichen Verminderung der Vitalität der Tumorzellen im ML2B15-Tumor, gemessen am Expressionsgrad des GFP, führen. Hingegen verhalten sich hier alle Therapieansätze, die das VSV enthalten, sehr ähnlich wie im ML2B7-Tumor und töten effizient die meisten Tumorzellen in den ersten 120h nach Behandlung ab. Auch hier zeigt sich für die Monotherapie durch das VSV verglichen mit den Kombinationstherapien wieder eine deutlich erhöhte Standardabweichung, was wieder auf eine große Zufälligkeit der Ergebnisse in dieser Therapiegruppe hinweist. Allerdings reduzieren alle drei Therapiegruppen, die das VSV enthielten, die Tumoralität deutlich um im Mittel ca. 50%-60%. Auch dadurch, dass die ML2B15-Tumoren so effizient getötet werden, bestätigt sich der Verdacht, dass die TZR-T-Zellen in den ersten fünf Tagen keinen wesentlich beschleunigenden Effekt auf die Abtötung des ML2B7-Tumors haben können. Interessanterweise zeigen sich bei den ML2B15-Tumoren keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Therapiegruppen. Insgesamt betrachtet gibt es aber deutliche Tendenzen dazu, dass die das VSV-enthaltenden Therapieansätze sehr effektiv zur Tumorbeseitigung beitragen.

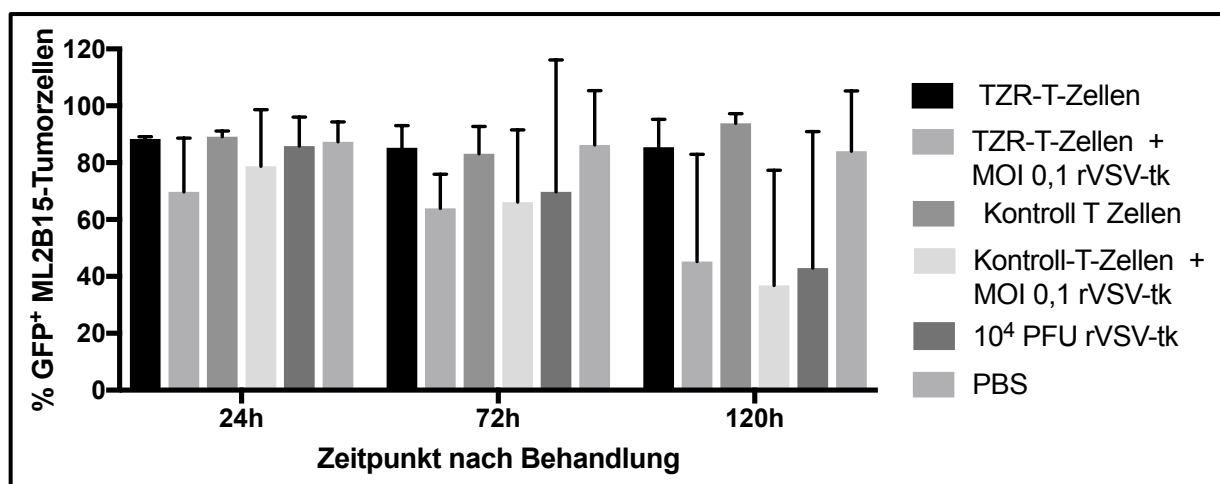


Abbildung 48: Reduktion der GFP<sup>+</sup>-Zellen im ML2B15-Tumor zu unterschiedlichen Zeitpunkten

Gezeigt werden die MW und SD der Prozentsätze GFP<sup>+</sup>-Zellen im ML2B15-Tumor zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Behandlung durch unterschiedliche therapeutische Ansätze. Two-Way-ANOVA-Test mit Bonferroni-Post-Test. Ein Signifikanzniveau wurde nicht erreicht. Für die Anzahl der Mäuse pro Gruppe vgl. Tabelle 25.

Die zweite Methode zur Feststellung der Therapieeffektivität war die Untersuchung histologische Schnitte auf deren Anteil an nekrotischem Tumorgewebe. Dazu wurden jeweils drei Schnitte pro Tumor aus unterschiedlichen Tumorarealen mit H&E gefärbt, eingescannt, mithilfe der ImageScope-Software die Tumoren umrandet und deren Fläche berechnet. Danach erfolgte die Kennzeichnung aller nekrotischen Areale im Tumor und die Addition all dieser Flächen. Anschließend wurde der Prozentsatz des nekrotischen Anteils am gesamten Tumorschnitt gebildet. Aus den drei unterschiedlichen Tumorschnitten eines Tumors wurde ein Mittelwert für den Prozentsatz der intratumoralen Nekrose gebildet. Ein repräsentatives Bild dieses Vorgehens ist untenstehend abgebildet. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)



Abbildung 49: Histologischer Schnitt zur Analyse des Anteils der Nekrose im Tumor

Gezeigt wird ein Schnitt mit markierten Nekroseanteilen und umrandetem Gesamttumor. Der Gesamttumor ist in schwarz markiert, die nekrotischen Areale in blau. Hier handelt es sich um einen Tumor mit hohem Nekrosegrad. Das Rechteck unten rechts in der Ecke gibt 2mm Länge an.

In der quantitativen Analyse der Ausprägung der Nekrose im ML2B7-Tumor ergeben sich folgende Ergebnisse: Nach 24h zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollgruppen und Therapiegruppen. Jedoch ist ein etwas höherer Nekrosegrad in den Tumoren der Mäuse, die mit TZR-T-Zellen als Mono- und Kombinationstherapie mit dem VSV oder auch Kontroll-T-Zellen als Kombinationstherapie behandelt wurden, erkennbar. Der Nekrosegrad liegt hierbei im Mittel bei etwa 15% nach 24h. Bei den anderen Therapiegruppen liegt der Nekrosegrad im ML2B7 Tumor nach 24h im Mittel bei unter 10%. Die Ergebnisse nach 72h sind in dieser Hinsicht bereits eindeutiger. Zwar unterscheiden sich TZR-T-Zellen nicht von Kontroll-T-Zellen oder PBS in ihrer Effektivität zu diesem Zeitpunkt und weisen einen relativ niedrigen Nekrosegrad auf, der bei den TZR-T-Zellen als Monotherapie bei unter 10% liegt, bei den Kontroll-T-Zellen bei etwa 10% und bei PBS überraschenderweise bei über 20%, aber hier zeigt die Kombination aus Kontroll-T-Zellen und dem VSV einen deutlichen Vorteil in der Therapieeffektivität gegenüber Kontroll-T-Zellen und TZR-T-Zellen als Monotherapien. Bei dieser Therapiegruppe liegt der Nekrosegrad im Mittel bei ca. 50% im ML2B7-Tumor. Der Nekrosegrad der TZR-T-Zell-Kombinationstherapie liegt zu diesem Zeitpunkt ebenfalls recht hoch bei etwa 40%. Der Nekrosegrad 72h nach Therapiebeginn in der VSV-Monotherapiegruppe liegt bei ungefähr 30% und zeigt keine signifikanten Unterschiede zu anderen Therapiegruppen. Nach 120h zeigen sich klar erkennbare Unterschiede. So erreichen die TZR-T-Zellen eine Therapieeffizienz und Nekrosegrad von im Mittel ca. 40%. Die Kontroll-T-Zellen liegen bei ca. 15% Nekroseinduktion und PBS bei ca. 10%. Die TZR-T-Zellen in Kombination mit dem VSV erreichen einen Nekrosegrad von im Mittel ca. 70%. Das ist signifikant unterschiedlich gegenüber den Kontroll-T-Zellen und PBS. Bei den Kontroll-T-Zellen mit VSV liegt der Prozentsatz sogar etwas höher, nämlich bei ungefähr 80%. Das ist dann auch signifikant unterschiedlich zu TZR-T-Zellen und Kontroll-T-Zellen als Monotherapie und PBS. Das VSV alleine erreicht einen mittleren Nekrosegrad im ML2B7-Tumor von etwas über 60%. Damit ist die Therapie mit dem VSV alleine signifikant besser als die Therapie mit PBS. Allerdings zeigt sich bei der VSV-Monotherapie, ähnlich den Daten aus der FACS Analyse, eine sehr hohe Variabilität der Ergebnisse. Das bedeutet wieder, dass es sich hier um einen recht hohen zufälligen Therapieerfolg handelt, verglichen mit den Kombinationstherapien. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

Dass PBS nach 72h einen so hohen Nekrosegrad erreicht, ist wohl Zufall und mausabhängig. Am ehesten handelt es sich hier um ein Analyseartefakt, wo zufälligerweise Tumorschnitte mit überdurchschnittlich hohen Nekroseanteilen untersucht wurden. Interessant ist hier, dass



die TZR-T-Zellen nicht signifikant von der Kombinationstherapie aus TZR-T-Zellen und VSV zu unterscheiden sind, obwohl die mittleren Nekrosewert um fast 30% auseinanderliegen. Es entspricht allerdings den Daten aus der FACS-Analyse. Ein weiterer erwähnenswerter Punkt in dieser Untersuchung ist die starke Effizienz der Kontroll-T-Zellen in Kombination mit dem VSV. Der Unterschied gegenüber der Kombinationstherapie aus TZR-T-Zellen und dem VSV liegt im Mittel bei fast 10%. Zudem ist die Kombination aus Kontroll-T-Zellen und dem VSV signifikant unterschiedlich von den TZR-T-Zellen als Monotherapie. Die Unterschiede hier und auch die Erklärung für die etwas schwächere Abtötung durch die TZR-T-Zellen in Kombination mit dem VSV mag daran liegen, dass das VSV und die T-Zellen hier in Konkurrenz bei der Tumolyse treten. Durch die weiter oben erwähnten Mechanismen könnte es dazu kommen, dass die Tumorzellen durch die TZR-T-Zellen abgetötet werden und das VSV dann kein Substrat für die Vermehrung mehr vorfindet. Andererseits kann es sein, dass das VSV die T-Zellen im Tumor abtötet und funktionsunfähig macht bzw. die Tumorzellen abtötet und deswegen weniger T-Zellen im Tumor verbleiben. Insgesamt zeigt sich eine sehr effiziente Tumortötung durch die Kombinationstherapien und durch die VSV-Monotherapie. Auch die TZR-T-Zell Monotherapie ist effektiv, allerdings nicht so sehr wie die drei gerade genannten Therapien. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

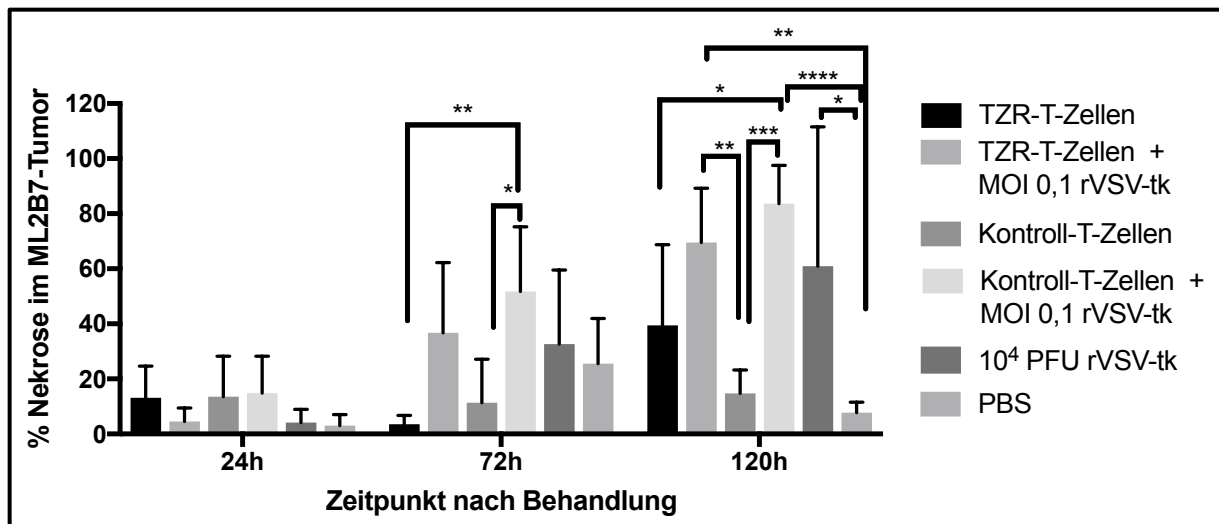


Abbildung 50: Nekroseinduktion im ML2B7-Tumor zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Therapiebeginn, modifiziert nach (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

Gezeigt werden die MW und SD der Prozentsätze der Nekrose im ML2B7-Tumor zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Beginn der Therapie. Two-Way-ANOVA mit Bonferroni-Post-

Test.  $p < 0,05 = *$ ;  $p < 0,01 = **$ ;  $p < 0,001 = ***$ ;  $p < 0,0001 = ****$ .  $p = 0,051$  für den Vergleich von Kontroll-T-Zellen mit dem VSV als Monotherapie nach 120h. Für die Anzahl der Mäuse pro Gruppe vgl. Tabelle 26. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

Nach der Nekroseanalyse der ML2B7-Tumoren wurden noch die ML2B15-Tumoren auf deren Nekrosegrad untersucht. 24h nach Beginn der Behandlung sind die Ergebnisse denen der Analyse des ML2B7-Tumors sehr ähnlich. Es gibt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Therapieformen und lediglich die Kombination aus TZR-T-Zellen und dem VSV erreicht einen mittleren Nekrosewert von mehr als 20%. Nach 72h kristallisieren sich erste Unterschiede heraus, jedoch keine signifikanten. So erreichen alle Therapiegruppen mit dem VSV höhere Werte als die Gruppen ohne das VSV. Nach 120h sind die Unterschiede dann sehr deutlich. So erreichen im ML2B15-Tumor die TZR-T-Zellen, Kontroll-T-Zellen und PBS Nekrosewerte von weniger als 20%. Die Kombinationstherapien erreichen hingegen beide mittlere Nekrosewerte von etwa 50-60% des ML2B15-Tumors. Hierbei zeigt sich allerdings eine große Varianz der Ergebnisse. Die Kombinationstherapie aus TZR-T-Zellen und dem VSV ist gegenüber der Monotherapie aus TZR-T-Zellen und Kontroll-T-Zellen signifikant besser. Die Kontroll-T-Zell-Therapie in Kombination mit dem VSV erreicht hier keine Signifikanz. Die VSV-Monotherapie erreicht hier Nekrosewerte im Bereich von etwa 40% nach 120h. Auch hier zeigt sich eine große Varianz der Ergebnisse. Insgesamt zeigten alle Therapien, die VSV enthalten, eine starke Induktion von Nekrose im Tumor, wohingegen die anderen Gruppen lediglich als Kontrollen fungierten.

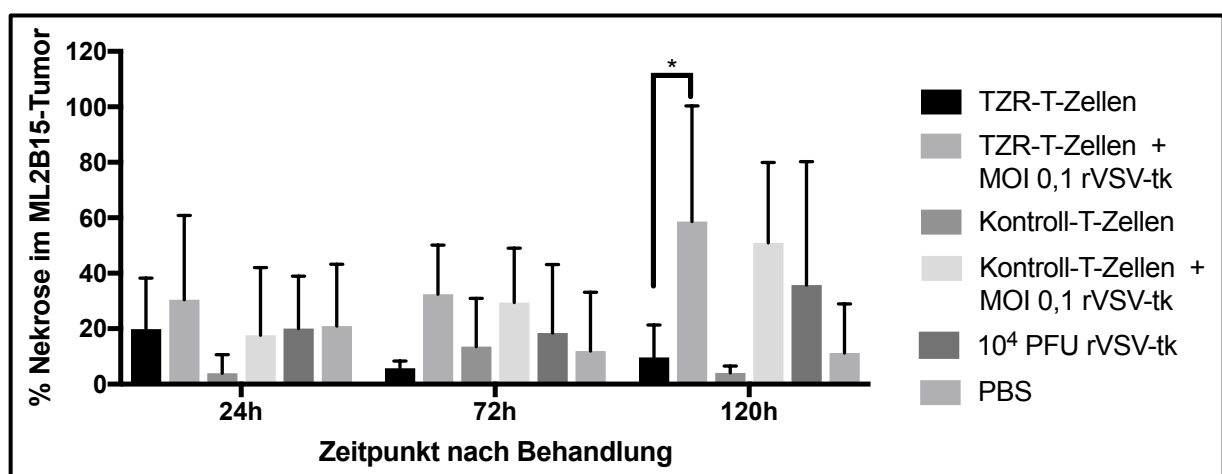


Abbildung 51: Nekroseinduktion im ML2B15-Tumor zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Therapiebeginn

Gezeigt werden die MW und SD der Prozentsätze der Nekrose im ML2B15-Tumor zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Beginn der Therapie. Two-Way-ANOVA mit Bonferroni-Post-Test.  $p < 0,05 = *$ . Für die Anzahl der Mäuse pro Gruppe vgl. Tabelle 27.

In den nächsten beiden Abbildungen werden zur qualitativen Verifizierung der quantitativen Ergebnisse der Nekroseanalyse vergrößerte, repräsentative Tumoranteile gezeigt. Die Abbildungen wurden von Schnitten aus den Tumoren angefertigt, die zum Zeitpunkt 120h nach Therapiebeginn untersucht wurden. Hier zeigt sich vitales Tumorgewebe im ML2B7-Tumor bei der Behandlung mit Kontroll-T-Zellen und PBS. Bei den anderen Therapiegruppen werden repräsentative nekrotische Areale dargestellt. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

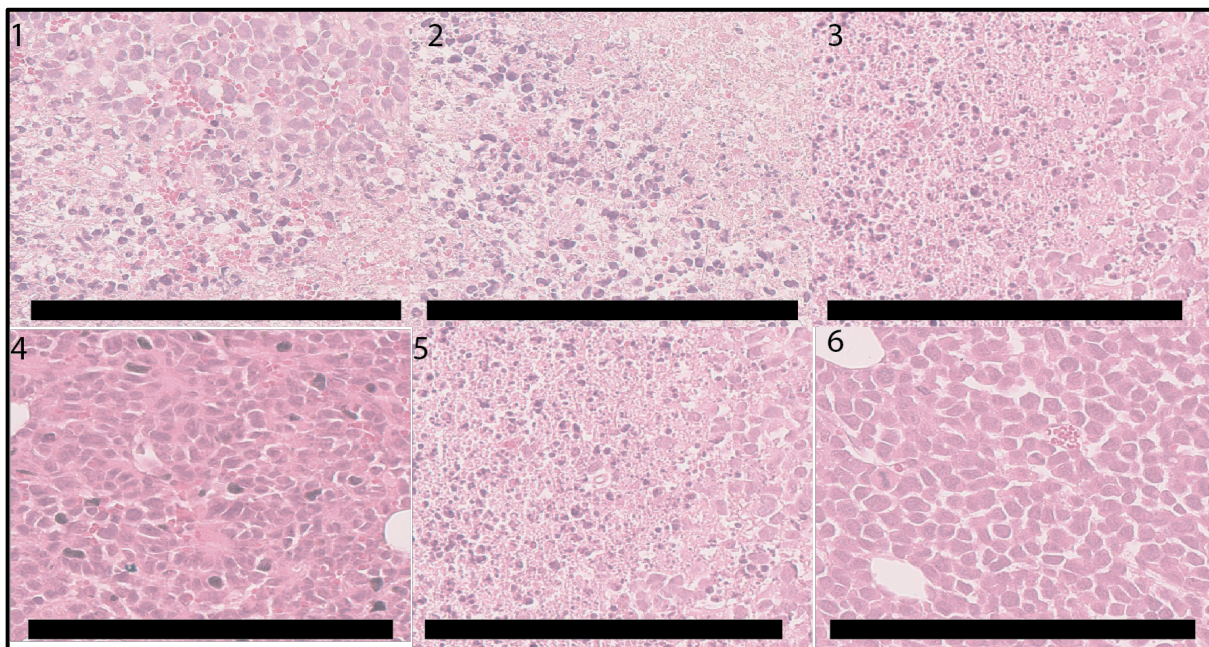


Abbildung 52: Histologische Nachweis von Nekrose im ML2B7-Tumor 120h nach Therapiebeginn, modifiziert nach (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

Gezeigt werden repräsentative Schnitte aus den ML2B7-Tumoren 120h nach Beginn der Therapie. Die Schnitte wurden mit H&E gefärbt. 1=  $10^7$  TZR-T-Zellen als Monotherapie; 2=  $10^7$  TZR-T-Zellen in Kombination mit dem rVSV-sr39tk (MOI 0,1); 3=  $10^4$  PFU rVSVsr39tk-Monotherapie; 4=  $10^7$  Kontroll-T-Zellen; 5=  $10^7$  Kontroll-T-Zellen in Kombination mit dem rVSV-sr39tk (MOI 0,1); 6= PBS. Der schwarze Balken gibt 200µm an. In 1 ist ein repräsentatives Areal mit nekrotischen Arealen und Arealen mit intakter Tumorchitektur dargestellt. 2 zeigt eine fast durchgehende Nekroseinduktion in einem repräsentativen Ausschnitt. 3 zeigt überwiegend nekrotische Areale mit noch tlw. intakter Struktur des Tumors am rechten Bildrand. 4 stellt einen

nicht-nekrotischen Tumor dar. 5 zeigt vergleichbar nekrotische Areale zu 2 und 3. 6 zeigt, ebenso wie 2, eine intakte Tumorarchitektur. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

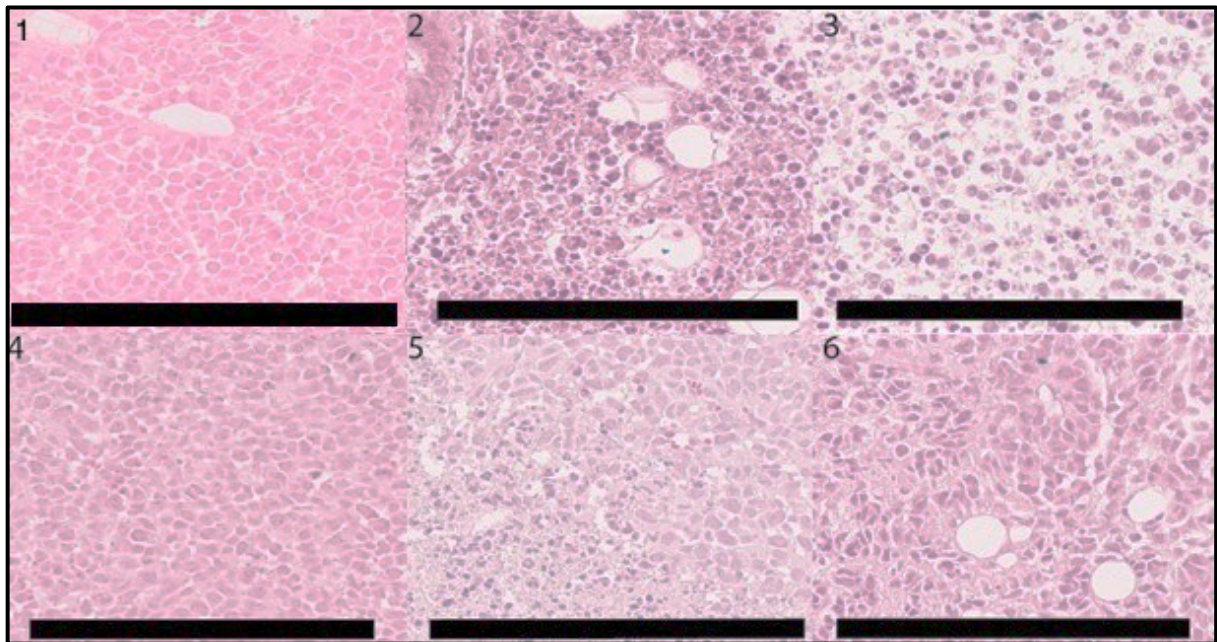


Abbildung 53: Histologischer Nachweis von Nekrose im ML2B15-Tumor 120h nach Therapiebeginn

Gezeigt werden repräsentative Schnitte aus den ML2B15-Tumoren 120h nach Beginn der Therapie. Die Schnitte wurden mit H&E gefärbt. 1=  $10^7$  TZR-T-Zellen als Monotherapie; 2=  $10^7$  TZR-T-Zellen in Kombination mit dem rVSV-sr39tk (MOI 0,1); 3=  $10^4$  PFU rVSVsr39tk-Monotherapie; 4=  $10^7$  Kontroll-T-Zellen; 5=  $10^7$  Kontroll-T-Zellen in Kombination mit dem rVSV-sr39tk (MOI 0,1); 6= PBS. In 1, 4 und 6 zeigt sich eine nicht-nekrotische Tumorarchitektur. 2, 3 und 5 zeigen stark nekrotische Areale aus repräsentativen Tumorschnitten. Bei 5 finden sich, überwiegend rechts im Bild, noch vitale Tumoranteile. Der schwarze Balken gibt 200µm an.

## 5.6 Gesamtüberleben und Tumorwachstum

### 5.6.1 Tumorwachstum

Im folgenden Experiment wurde das Tumorwachstum untersucht. Hierbei wurde nur das Wachstum der ML2B7-Tumoren untersucht. Dazu wurden die Mäuse mit den oben genannten

Therapien 10 Tage nach Tumorimplantation behandelt. Einen Tag vor bis zehn Tage nach Therapiebeginn wurden täglich die Durchmesser der Tumoren mit einem Messschieber gemessen und die Querschnittsfläche der Tumoren wurde dann berechnet. Dabei wurde die vereinfachende Annahme zugrunde gelegt, dass die Tumoren kreisförmig bzw. ellipsenförmig wachsen. Interessanterweise zeigte sich hier bereits 3 Tage nach Beginn der Therapie ein sistierendes Tumorwachstum bei den Mäusen die mit TZR-T-Zellen als Mono- oder Kombinationstherapie und Kontroll-T-Zellen als Kombinationstherapie mit dem VSV behandelt wurden. Die schnellste Tumorverkleinerung war dabei überraschenderweise bei der TZR-T-Zell-Monotherapie zu beobachten. So waren die Tumoren dieser Mäuse bereits 8-9 Tage nach Beginn der Therapie nicht mehr tastbar. Damit wurde ein klarer, signifikanter Therapievorteil gegenüber der VSV-Monotherapie und den beiden Kontrollgruppen erreicht. Bei den beiden Kombinationstherapien verschwanden die Tumoren zwar innerhalb der elftägigen Beobachtungsdauer nicht komplett, allerdings sistierte das Tumorwachstum ebenfalls 3-4 Tage nach Beginn der Therapie. Es stellt sich hier ein stabiler Zustand ein. Die mittlere Querschnittsfläche der Tumoren bei beiden Kombinationstherapiegruppen war schließlich bei ca.  $40 \text{ mm}^2$  (bei den Kontroll-T-Zellen) bzw. ca.  $29 \text{ mm}^2$  (bei den TZR-T-Zellen). Die Mäuse die mit einer VSV-Monotherapie behandelt wurden, zeigten zwar gegenüber den beiden Kontrollgruppen, bestehend aus PBS und Kontroll-T-Zellen, ein verlangsamtes Tumorwachstum, allerdings keinen vollständigen Stillstand. Die Unterschiede zu den beiden Kombinationstherapien waren dabei zehn Tage nach Therapiebeginn signifikant unterschiedlich. Die Tumoren der VSV-Monotherapiegruppe erreichten dabei eine mittlere Fläche von ca.  $122 \text{ mm}^2$ . In den beiden Kontrolltherapiegruppen zeigte sich kein sistierendes Tumorwachstum. Diese Tumoren wuchsen stetig bis zum Tag zehn nach Therapiebeginn weiter und erreichten eine mittlere Fläche von ca.  $208 \text{ mm}^2$  (PBS) bzw.  $223 \text{ mm}^2$  (Kontroll-T-Zellen). Beide waren damit signifikant schlechter in der Therapieeffizienz als alle anderen Gruppen. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

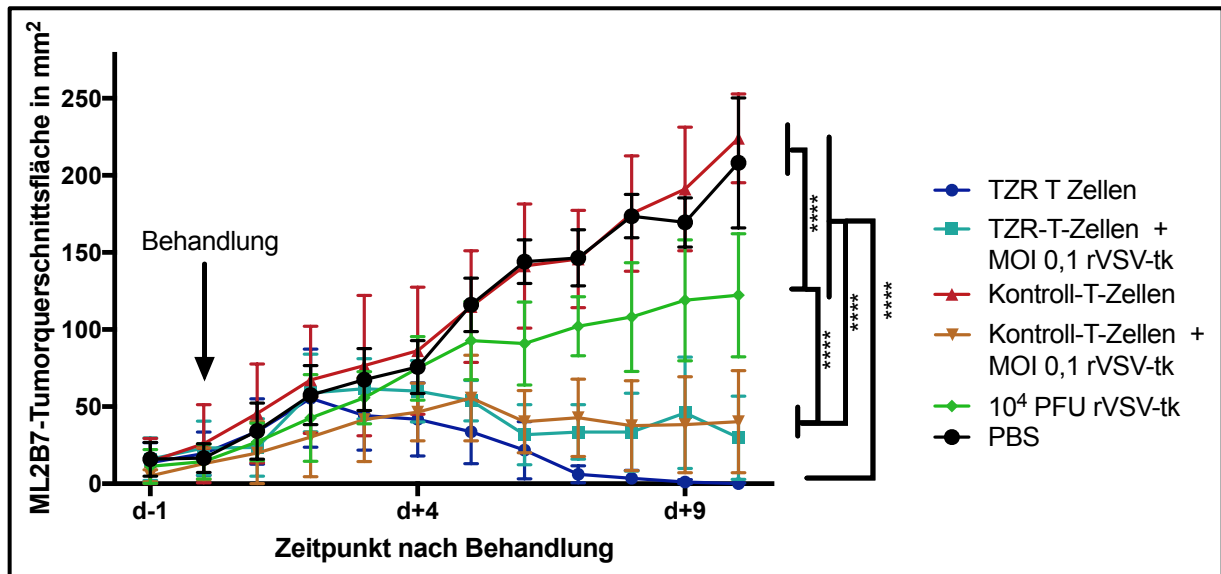


Abbildung 54: Tumorwachstum der ML2B7-Tumoren nach Beginn der Behandlung, modifiziert nach (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

Gezeigt werden die MW und SD der Querschnittsfläche der ML2B7-Tumoren zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Therapiebeginn. *d* steht auf der x-Achse für Tag. Die Messungen wurden an Tag -1 vor Beginn der Therapie begonnen. Two-Way-ANOVA mit Bonferroni-Post-Test.  $p < 0,0001 = ****$ . Für die Anzahl der Mäuse pro Gruppe vgl. Tabelle 28. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

### 5.6.2 Gesamtüberleben und Tumorrelapse nach Therapie

Als Goldstandard für die Therapieeffektivität wurde das Gesamtüberleben der NSG-Mäuse untersucht. Dazu wurden den Mäusen jeweils nur ML2B7-Tumorzellen in die rechte Flanke implantiert und nach 10-tägigem Wachstum wurden die Mäuse dann analog den vorigen Experimenten behandelt. Anschließend wurden die Mäuse solange beobachtet, bis sie starben oder getötet werden mussten, weil entweder die Tumoren zu groß wurden oder eine VSV-vermittelte Toxizität. Weitere Abbruchkriterien waren deutliche Krankheitszeichen oder gravierender Gewichtsverlust. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

Die Mäuse aus den Kontrollgruppen, die mit PBS und der Kontroll-T-Zell-Monotherapie behandelt wurden, mussten allesamt innerhalb der ersten 2,5 Wochen nach Therapiebeginn getötet werden, da die Tumoren eine kritische Größe erreichten. Dabei gab es ein relativ enges

Zeitfenster, in dem diese Tumorgroße erreicht wurde. Es gab also nur eine sehr geringe Varianz, was den Todeszeitpunkt der Kontrollmäuse angeht. Das mediane Überleben betrug für Kontroll-T-Zell-behandelte Mäuse 11 Tage, für PBS behandelte Mäuse 13 Tage nach Therapiebeginn. Interessanterweise starben die Mäuse, die mit einer Kombinationstherapie aus TZR-T-Zellen oder Kontroll-T-Zellen und dem VSV (medianes Überleben 14 bzw. 19 Tage nach Therapiebeginn: TZR-T-Zellen VSV bzw. Kontroll-T-Zellen + VSV) behandelt wurden, nicht an der Tumormasse, sondern allesamt an VSV-vermittelter Neurotoxizität. Der Überlebensvorteil war gegenüber den Kontrollgruppen nur klein und nicht signifikant. Auch wenn einige der Mäuse, die mit der Kombination aus Kontroll-T-Zellen und dem VSV behandelt wurden, ein wenig länger lebten als die Mäuse, die mit TZR-T-Zellen und VSV behandelt wurden, war dieser Unterschied doch nicht signifikant. Auch eine VSV-Monotherapie führte nicht zu einem signifikant verlängertem Überleben (medianes Überleben nach Therapiebeginn: 18 Tage). Die Überlebenszeiten hier waren ähnlich der Kombinationstherapie aus Kontroll-T-Zellen und VSV. Interessanterweise musste in dieser Therapiegruppe eine Maus getötet werden, da ihr Tumor zu groß wurde und er die Haut durchbrach. Die anderen Mäuse dieser Therapiegruppe starben schließlich an Neurotoxizität. Einzig die Mäuse, die mit einer Monotherapie aus TZR-T-Zellen führte bei den ML2B7-Tumor tragenden Mäusen zu einem signifikant verlängertem Überleben (medianes Überleben: 77 Tage nach Therapiebeginn) gegenüber allen anderen Therapiegruppen. Interessanterweise verschwanden alle Tumoren bei diesen Mäusen zunächst, jedoch gab es schlussendlich nur eine einzige Maus, die nicht unter einem Tumorreizidiv litt. Die Maus wurde dann 90 Tage nach Beginn der Therapie getötet. Die erste Maus, die einen Rezidiv-Tumor zeigte, verstarb schnell daran, und bei der Analyse des Tumors im FACS zeigte sich, dass es sich noch immer um GFP<sup>+</sup>-Tumorzellen handelte. Hierbei handelte es sich also um ein Versagen der T-Zellen, die nicht in der Lage waren, die Antigen-präsentierenden Tumorzellen abzutöten. Bei den anderen Mäusen mit Tumorrückfall wurden nach deren Tod die ML2B7-Tumoren in der FACS-Analyse untersucht. Ein repräsentativer Dotplot ist unten angegeben. Die homogenisierten Tumoren wurden unter anderem mit einem CD45-Antikörper zur Erkennung humaner Zellen im Tumor angefärbt. Tatsächlich waren die meisten Zellen in den Rezidiv-Tumoren mit dem Antikörper gegen humanes CD45 anfärbbar, also human. Auffällig war, dass alle Rezidiv-Tumoren, bis auf den ersten, keine Expression von GFP mehr zeigten. Sie hatten also das HLA-B07:02 verloren und exprimierten damit die MPO nicht mehr erkenntlich für die TZR-T-Zellen. So kam es also zu einem Immunescape-Mechanismus. Der Tumor der

am längsten überlebenden Maus konnte nicht untersucht werden, da er zum Zeitpunkt der Beendigung der Überlebensstudie bei der Autopsie der Maus nicht mehr aufzufinden war. Da der erste Rezidiv-Tumor noch GFP exprimierte, wurde jedoch ein erneuter Therapieversuch bei allen Mäusen am Tag 52 nach Beginn der ersten Therapie versucht. Dazu wurden den Mäusen nochmals  $10^7$  TZR-T-Zellen verabreicht. Wie sich aber zeigte, war dieser zweite Therapie nicht erfolgreich. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

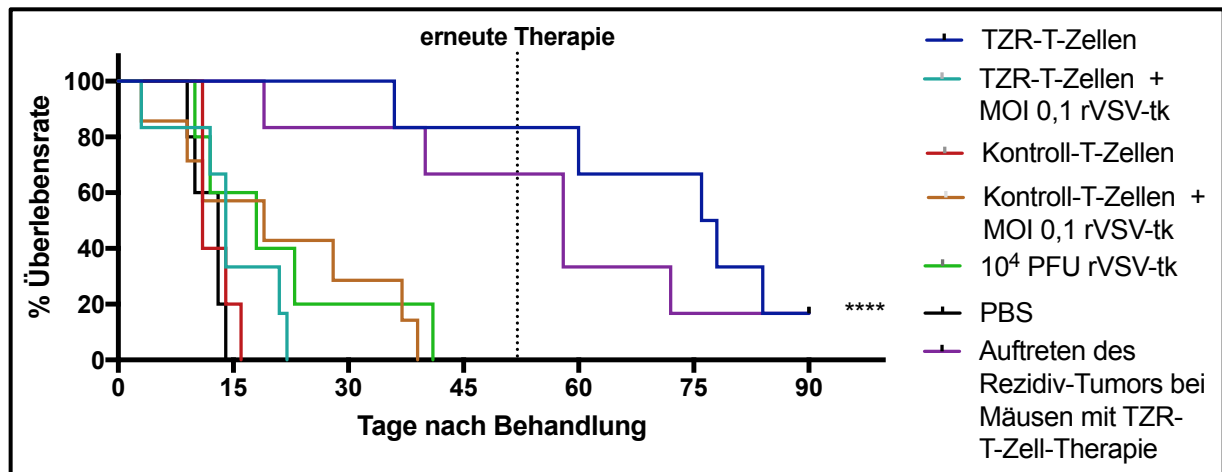


Abbildung 55: Überlebenskurve der NSG-Mäuse mit ML2B7-Tumor nach Therapie, modifiziert nach (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

Gezeigt wird die Überlebenskurve der Mäuse nach Behandlungsbeginn für die unterschiedlichen Therapiegruppen. Die lilafarbene Linie gibt den Zeitpunkt des Wiederauftretens der ML2B7-Tumoren bei den NSG-Mäusen an, die mit der TZR-T-Zell-Monotherapie behandelt wurden. Sie gibt also nicht den Zeitpunkt des Ablebens einer Maus an. Log-Rank-Test:  $p < 0,0001 = ****$ . Für die Anzahl der Mäuse pro Gruppe vgl. Tabelle 29. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)



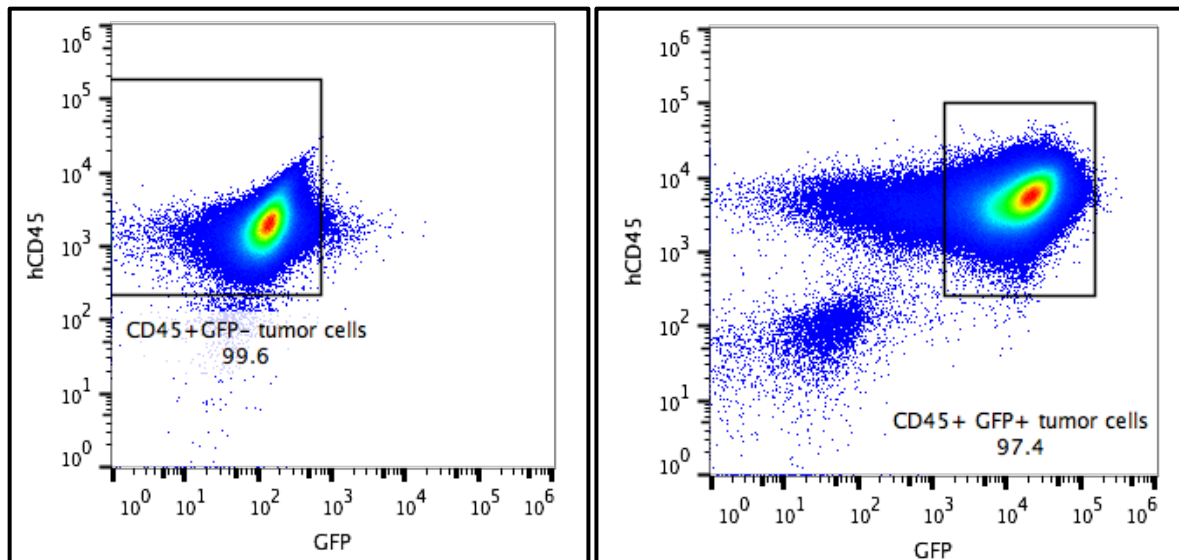


Abbildung 56: HLA-B07:02-Verlust bei ML2B7-Tumoren *in vivo*, modifiziert nach (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

Repräsentative FACS Dotplots der Tumoren von Mäusen, die in der Überlebensstudie mit TZR-T-Zellen behandelt wurden. Links ein Dotplot eines Tumors mit GFP-Verlust. Rechts eine Positiv-Kontrolle eines Tumors mit erhaltener GFP-Expression. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

## 6 Diskussion

### 6.1 Identifizierung der am besten geeigneten T Zell Population für VSV Transport

In den ersten Experimenten wurde untersucht, welche Interaktionen zwischen VSV und unterschiedlichen T-Zell-Populationen stattfinden. Als T-Zellen wurden dabei Pan-T-Zellen, CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen untersucht. Ein interessantes Ergebnis war, dass die unterschiedlichen T-Zellen eine donorabhängige virale Genexpression zeigten. So war bei der Untersuchung der Expression des viralen GFP eine große Streuung zu erkennen. Ein Paradoxon an diesen Ergebnissen stellt die Tatsache dar, dass das VSV überhaupt in den primären, humanen T-Zellen replizieren konnte, da zu Beginn dargelegt wurde, dass das VSV als onkolytisches Virus vornehmlich in Tumorzellen repliziert. Dass das VSV trotzdem in den T-Zellen replizierte und zur viralen Genexpression führte, ist wahrscheinlich tatsächlich auf die Eigenschaft des VSV zurückzuführen, in proliferierenden T-Zellen zu replizieren (Oliere, Arguello et al. 2008), wobei in der zitierten Arbeit ausdrücklich darauf hingewiesen wird, dass die T-Zellen sich im Zellzyklus befinden müssen, um eine Replikation des VSV zu unterstützen. Die qualitative Untersuchung der GFP-Expression in der Fluoreszenzmikroskopie bestätigte hier die These von Oliere et al. Hier zeigte sich, wie im Ergebnisteil beschrieben, die GFP-Expression in den proliferierenden Clustern der T-Zellen. Auch wenn also zu erklären war, dass das VSV in den primären T-Zellen replizieren kann, so fand dies auf einem relativ niedrigen Niveau statt. Die durchschnittlichen Werte der viralen GFP-Expression nach 24h lagen über alle T-Zell-Populationen hinweg bei lediglich ca. 10%-15%, was nur einen Bruchteil der viralen Replikation in der T-Zell-Zelllinie J76 darstellt. Das bestätigt die Tatsache, dass das VSV bevorzugt in Tumorzellen repliziert. Erwähnenswert ist hier auch, dass die virale Genexpression in CD8<sup>+</sup>-T-Zellen im Mittel etwas niedriger war als in CD4<sup>+</sup>- und Pan-T-Zellen, auch wenn dieses Ergebnis kein Signifikanzniveau erreichte. Eine Hypothese zur Erklärung dieser Unterschiede könnte die Tatsache sein, dass CD8<sup>+</sup>-T-Zellen bekanntermaßen als zytotoxische T-Zellen virusinfizierte Körperzellen beseitigen (Koszinowski, Reddehase et al. 1991) und dadurch möglicherweise einen intrinsischen Schutz gegenüber einer viralen Replikation besitzen, der hier dazu führt, dass sie minimal resistenter erscheinen. Diese Unterschiede zeigen sich nicht nur bei der Untersuchung der viralen Genexpression, sondern auch bei der Zellvitalität nach einer VSV-Infektion. Hier finden sich 24h nach der Infektion der unterschiedlichen T-Zell-Populationen ca. 10% mehr lebendige

Zellen bei den CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, was einen deutlichen Unterschied darstellt. Insgesamt scheinen also die CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, wie zuvor erwähnt, etwas resistenter gegenüber einer Infektion mit dem VSV zu sein. Überraschend ist, dass die Virusproduktion durch die verschiedenen T-Zellen annähernd gleich ausfällt. So zeigen sich hier bei allen Populationen Virustiter im Bereich von ca. 10<sup>7</sup> TCID<sub>50</sub>/ml nach 24h. Das ist insoweit verwunderlich, als man aus den Ergebnisse der vorhergehenden Experimente schließen könnte, dass weniger CD8<sup>+</sup>-T-Zellen sterben und deswegen weniger neu synthetisiertes VSV freisetzen können. Allerdings sollte beachtet werden, dass die Virustiter mit einer Methode erfasst werden, die Ergebnisse liefert, welche sich im Bereich von Zehnerpotenzen befinden. Daher ergibt sich bei der Virustiterbestimmung mit der TCID<sub>50</sub>-Methode kein ganz exakter Wert. Der absolute Fehler bei dieser Bestimmung wird umso größer, je höher die Titer insgesamt ausfallen. Da wir hier bereits im Bereich von 10<sup>7</sup> TCID<sub>50</sub>/ml und mehr nach 24h Inkubation liegen, fallen einige Millionen TCID<sub>50</sub>/ml nicht mehr so sehr ins Gewicht. Man sieht also nur wenige Unterschiede bei den viralen Titern. Deswegen kann man aus den geringen Unterschieden bei der Titerbestimmung nur den Schluss ziehen, dass das Virus überraschenderweise in allen T-Zell-Populationen in ähnlichem, quantitativem Umfang repliziert. Ebenfalls erklärt sich so, wieso 10% mehr lebende Zellen und damit weniger potentielle Virusproduktion und -freisetzung bei dieser Art der Virustiterbestimmung nicht so sehr ins Gewicht fallen. Es könnte aber natürlich auch sein, dass CD8<sup>+</sup>-T-Zellen tatsächlich resistenter gegenüber dem VSV sind und zugleich mehr Virus produzieren. Da sich die CD8<sup>+</sup>-T-Zellen auch über einen längeren Zeitpunkt etwas resistenter gegenüber dem VSV als die beiden anderen T-Zell-Populationen zeigten, wurden sie für weitere Experimente und Detailanalysen verwendet. Ihr Ziel sollte es in späteren Experimenten sein, möglichst viel VSV zu einem Tumor zu bringen, ohne dabei selbst ihr Funktion zu verlieren. Da CD8<sup>+</sup>-T-Zellen als zytotoxische T-Zellen Tumorzellen abtöten können, schienen sie ohnehin gut als synergistischer Kombinationspartner für die onkolytische Virotherapie geeignet. Die Untersuchung der Sensitivität der J76-T-Zell-Zelllinie gegenüber dem VSV bestätigte, dass die primären, humanen T-Zellen, egal welcher Population, im Vergleich zu einer Tumorzelllinie relativ resistent sind. Bei dem hier durchgeführten Screening zeigen sich also die CD8<sup>+</sup>-T-Zellen als wenigstens nicht unterlegen, was ihre Verwendung als möglichen Zell-Carrier angeht. Natürlich sind noch weitergehende Studien notwendig, um abschließend alle Mechanismen zu klären und signifikant zu zeigen, dass die CD8<sup>+</sup>-T-Zellen auch überlegen sind, wenn man sie als Zell-Carrier für das VSV nutzen will. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

In weiteren Untersuchungen wurden CD8<sup>+</sup>-Tcm aus den in der Einleitung genannten Gründen weiterverwendet.

## 6.2 Interaktion des VSV mit CD8<sup>+</sup>-Tcm

Bei der Untersuchung der Interaktion des VSV mit CD8<sup>+</sup>-Tcm zeigten sich interessante Ergebnisse. Hier war erstaunlich, dass sich 24h nach der Infektion der CD8<sup>+</sup>-Tcm, auch mit hohen MOIs des rVSV-GFP, noch kein signifikanter Unterschied zu nicht infizierten CD8<sup>+</sup>-Tcm bei Betrachtung der Vitalität der Zellen zeigte. Auch wenn diese Unterschiede kein Signifikanzniveau erreichten, zeigten sich trotzdem vor allem bei der MOI von 10 klare Tendenzen in Richtung verminderter Zellvitalität zu diesem Zeitpunkt. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass auch CD8<sup>+</sup>-Tcm eine gewisse Resistenz gegenüber dem VSV besitzen. Vor allem, dass nach 72h überhaupt noch lebende CD8<sup>+</sup>-Tcm nachzuweisen waren, weist auf diese Resistenz hin. Folglich scheint es auch in vitro einen Resistenzmechanismus gegenüber einer viralen Infektion zu geben. Umso überraschender war es, dass bereits nach 24h bei den MOIs von 1 und 10 und etwas später bei der MOI von 0,1 ein Plateau der produzierten Virustiter erreicht worden war. Aus den Beobachtungen der Vitalität und der Virusproduktion lässt sich der Schluss ziehen, dass ein kleiner Anteil virusproduzierender CD8<sup>+</sup>-Tcm in der Lage ist, viel Virus in kurzer Zeit zu produzieren. Dazu lässt sich die Überlegung anstellen, ob es innerhalb der CD8<sup>+</sup>-Tcm auf der einen Seite eine anfällige Subpopulation gibt, die die Virusproduktion unterstützt und auf der anderen Seite eine sehr resistente Population, die gegenüber dem VSV komplett resistent ist und über längere Zeit in einem Kulturmedium mit hohen Virustitern überleben kann. Dass zu Beginn der Messungen des Virustiters, also zum Zeitpunkt null, bereits replikationskompetentes VSV vorlag, ließ den Verdacht aufkommen, dass nicht das komplette Virus in die T-Zellen eintritt, sondern evtl. auch einfach nur an deren Oberfläche angelagert wird. Eine Erklärung könnte sein, dass das VSV tatsächlich nicht in alle T-Zellen endozytiert werden kann und an deren Oberfläche haften würde, bis das VSV einen besseren Wirt findet. Ein alternativer Erklärungsansatz ist, dass das VSV einfach eine gewisse Zeit und Temperatur braucht um in die Zellen zu gelangen. Der leicht abfallende Virustiter in der T-Zell-Kultur nach 4h würde für den zweiten Erklärungsansatz sprechen, da das Virus dann noch Zeit hat, unter günstigeren Bedingungen die T-Zellen zu infizieren. Dass bereits 6h nach der Infektion wieder ein Titeranstieg stattfindet, deutet darauf hin, dass bereits innerhalb der ersten 6h nach Infektion eine

erste Virusproduktion in den T-Zellen stattfindet. Diese Beobachtung ist vereinbar mit der bekannten Replikationszyklusdauer des VSV von 6-8h. Zur Festlegung wie viele Zellen tatsächlich vom VSV nach der einstündigen Inkubationszeit befallen waren, wurden noch zwei Methoden zur Anwendung gebracht. Bei der immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung zeigte sich, dass offenbar nicht eine komplett gleichmäßige Verteilung der Viren auf die Zellen vorhanden war, da bei manchen Zellen mehrere Signale vorhanden waren. Am ehesten ist dies als Hinweis dafür zu werten, dass manche T-Zellen von mehreren Viren befallen wurde. Wenig überraschend hierbei ist, dass es zu einem dosisabhängigen Anstieg der Anzahl infizierter Zellen kommt. Bestätigend für die Behauptung, dass mehrere Viren an einer Zelle anhaften, ist, dass es keinen linearen Anstieg der infizierten Zellen gibt. Vielmehr zeigt sich hier ein verlangsamter Anstieg. Des Weiteren fällt auf, dass der Prozentsatz von infizierten Zellen sehr klein ausfällt, wenn man ihn mit der Menge des VSV vergleicht, die man ursprünglich zu den T-Zellen gegeben hatte. Da die immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung auch nur eine gewisse Sensitivität zur Detektion viraler Partikel besitzt, wurde dann die FACS-Analyse zur Berechnung der infizierten T-Zellen durchgeführt. Auch in der FACS-Untersuchung zeigt, sich ein eher kleiner Anteil virustragender T-Zellen. Hierbei gibt es allerdings einen nahezu verzehnfachten Anstieg der infizierten bzw. virustragenden T-Zellen bei verzehnfachter MOI. Eine Mehrfachinfektion bestimmter Zellen würde die Diskrepanzen zu den Ergebnissen aus der immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung erklären. Die Formel zur Berechnung infizierter CD8<sup>+</sup>-Tcm wurde dann mithilfe von Excel errechnet. Hierbei wurde die am besten passende Formel automatisch in Excel bestimmt. Bei drei Wertepaaren muss man die Validität der Formel für MOIs, die über oder unter dem untersuchten Bereich liegen, sicherlich hinterfragen, aber da in den folgenden Experimenten überwiegend mit den MOIs von 0,1 bis 10 gearbeitet wurde, kann angenommen werden, dass die Formel für diesen Wertebereich durchaus zur Anwendung kommen darf, um die Anzahl infizierter T-Zellen bei einer bestimmten initialen MOI zu bestimmen. Eine Erklärung für die schlechte Infektionseffizienz der T-Zellen könnte sein, dass die T-Zellen nicht besonders empfänglich für die Infektion durch das VSV sind. Möglicherweise besitzen sie nicht das optimale Expressionsniveau an LDL-Rezeptoren, die für die Virusinfektion notwendig sind. Alternativ könnten sie Abwehrmechanismen besitzen. Allerdings war es nicht das Ziel der Arbeit herauszufinden, wie der mechanistische Ansatz für die Resistenz von CD8<sup>+</sup>-Tcm gegenüber dem VSV ist, sondern es war eher von Bedeutung wie die Zellen mit dem VSV interagieren. Hierbei war ein Schwerpunkt auf der T-Zell-Vitalität und der

Produktion des VSV durch die CD8<sup>+</sup>-Tcm. Insgesamt zeigen die CD8<sup>+</sup> Tcm also ein sehr interessantes Verhalten gegenüber dem VSV und scheinen als Kombinationspartner für die Virotherapie aufgrund ihrer Resistenz geeignet. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

### 6.3 Behandlung von ML2-Leukämie-Zellen in vitro

In den ersten beiden Experimenten zur Behandlung von ML2-Leukämie -Zellen zeigte sich eine enorme Sensitivität der ML2-Zellen gegenüber dem VSV. Allerdings zeigten sich hier 4h nach der Infektion nicht erst abfallende Virustiter, sondern bereits ansteigende Virustiter, was darauf hinweisen könnte, dass der Replikationszyklus in dieser Zelllinie etwas kürzer sein könnte als eingangs erwähnt und bei den T-Zellen demonstriert.

Die Behandlung der HLA-B07:02 transduzierten ML2-Zellen zeigte, dass die TZR-T-Zellen als Monotherapie einen effektiven Ansatz darstellen. Interessant war hier, dass ein gewisser Therapievorteil durch die Kombination mit dem VSV zu erkennen war. Hierbei beziehe ich mich auf die MOI von 0,1. Dieser Therapievorteil war zwar nicht signifikant, dennoch konnte eine Tendenz zu einer besseren ML2-Zell-Abtötung demonstriert werden. Die Unterschiede zu Kombinationstherapien, bei denen die TZR-T-Zellen mit den MOIs von 1 und 10 des rVSV-tk infiziert wurden, bevor sie zu den Leukämie-Zellen gegeben wurden, waren zwar signifikant, allerdings zeigte sich das auch bei Kombinationen aus Kontroll-T-Zellen und dem VSV in den gleichen Dosierungen. Daher ist wohl kaum von einem synergistischen Effekt auszugehen, sondern vielmehr davon, dass einfach das VSV in so hoher Dosierung vorlag, dass es unabhängig von den T-Zellen sehr effektiv zur Tumorzellabtötung führte. Ganz besonders erwähnenswert ist hier aber, dass TZR-T-Zellen in Kombination mit einer MOI von 0,1 gegenüber Kontroll-T-Zellen in Kombination mit einer MOI von 0,1 des rVSV-tk einen signifikanten Therapievorteil bringen. Daraus kann geschlossen werden, dass bei einer niedrigeren Infektionsdosis der T-Zellen, die Expression eines spezifischen TZR in einer Kombinationstherapie zu einem klaren Therapievorteil führt. Dieser Vorteil besteht abzüglich des VSV in dieser Therapiegruppe in der Expression des spezifischen TZR. Folglich unterstützen in diesem Versuch die TZR-T-Zellen das VSV bei der Abtötung der ML2-Zellen. Bei höheren initialen MOIs des VSV geht dieser synergistische Effekt wieder verloren, da zu viel Virus dazu führt, dass es einer Ergänzung der The-

rapie durch spezifische T-Zellen nicht mehr bedarf. Auch wenn es hier keine signifikanten Unterschiede zwischen der TZR-T-Zell-Monotherapie und der Kombination aus TZR-T-Zellen und einer MOI von 0,1 gibt, erkennt man trotzdem einen Trend in die Richtung, dass der Synergismus auch anders herum funktioniert und das VSV die TZR-T-Zellen unterstützt. Betrachtet man nun einmal die absoluten Zahlen, so sieht man, dass hier 100.000 ML2-Zellen durch 5000 T-Zellen abgetötet werden. Errechnet man nun für die MOI von 0,1 mithilfe der Formel, die bei der Charakterisierung der CD8<sup>+</sup>-Tcm ermittelt worden war, die Dosis an Virus, die sofort an andere Zellen weitergegeben werden kann, so erkennt man, dass es sich hier lediglich um ca. 21 PFU handelt. Setzt man diese 21 PFU ins Verhältnis zu den ML2-Zellen so ergibt sich eine MOI von 0,00021. Diese MOI entspricht nur einem Fünftel der MOI, die die niedrigste MOI bei der alleinigen Behandlung der ML2-Zellen durch das VSV war. Dennoch wird bei dieser niedrigen MOI, vergleicht man den Graphen der Kombinationstherapie mit dem der Monotherapie zur Behandlung der ML2B7-Fluc-Zellen, ein besseres Therapieergebnis erreicht. Auch wenn es sich hier um zwei unterschiedliche Experimente handelt und vermutlich auch noch Virus durch die T-Zellen produziert wird, sodass die Berechnung der Virusdosis nicht zu 100% korrekt ist, so lässt sich bei diesem einfachen Vergleich in gewissen Grenzen ein weiteres Mal der Synergismus der Kombinationstherapie gegenüber der VSV-Monotherapie erkennen. Bei der Untersuchung der HLA-B15:01 transduzierten ML2-Zellen ergab sich ein ganz ähnliches Bild wie bei der Behandlung von ML2B7-Zellen durch Kontroll-T-Zellen. Lediglich die durch das VSV vermittelten zytotoxischen Effekte führten hier zur dosisabhängigen Tumorabtötung. Hier schienen die ML2B15-Zellen allerdings ein wenig resistenter zu sein, als bei den ML2B7-Zellen. Dies mag daran liegen, dass sich die Zellkulturzelllinien marginal unterscheiden, weil sie nicht zum gleichen Zeitpunkt mit dem jeweiligen HLA transduziert wurden, sondern unabhängig voneinander. So kann es durchaus sein, dass eine der Zelllinien insgesamt länger in Zellkultur waren und sich ihr Phäno- und Genotyp durch genetische Modifizierung geringgradig verändert hat. Letztlich handelt es sich hier aber nur um kleine Unterschiede in der Sensitivität gegenüber dem VSV, sodass auf eine eingehende Untersuchung verzichtet wurde, zumal in dieser Arbeit nicht die Sensitivität der ML2-Zelllinie gegenüber dem VSV in allen Einzelheiten untersucht werden sollte, sondern die Kombinationstherapie zur spezifischen Behandlung von ML2-Zellen mit Zielantigenen analysiert werden sollte. Die ML2B15-Zellen dienen hier vielmehr als zusätzliche Kontrolle. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

Zur Überprüfung, ob die TZR-T-Zellen durch die Kombination mit dem VSV in ihrer Aktivität gegenüber den ML2-Zellen kompromittiert wurden, wurde die Produktion von IFN- $\gamma$  als Surrogatparameter für funktionierende T-Zellen genommen. In der Analyse ergab sich im IFN- $\gamma$ -ELISA keine Veränderung der T-Zell-Funktion durch das VSV. Ähnlich hohe IFN- $\gamma$ -Werte konnten hier in der Mischkultur aus TZR-T-Zellen und ML2B7-Fluc Zellen nachgewiesen werden. 24h nach Beginn des Experimentes waren diese signifikant höher als in allen Kontrollgruppen. Dass die Signifikanz nach 48h wieder verloren geht, liegt an den hohen Standardabweichungen der produzierten IFN- $\gamma$ -Titer durch die TZR-T-Zellen. Dass es zu so hohen Standardabweichung allgemein kommt, liegt vermutlich daran, dass es sich hier um T-Zellen von unterschiedlichen Spendern handelt, die jeweils eine individuelle Menge an IFN- $\gamma$  produzieren. Da bereits nach 24h nahezu alle ML2-Zellen tot waren, ist es zudem unwahrscheinlich, dass zwischen den beiden Zeitpunkten 24h und 48h nach Beginn der Experimente weiteres IFN- $\gamma$  produziert wurde. Vielmehr dürfte es sich hier um noch nicht abgebautes IFN- $\gamma$  handeln, sodass die für die Behauptung, die T-Zell-Funktion sei durch das VSV nicht verändert worden, die Werte der IFN- $\gamma$ -Produktion nach 24h relevant sind. Insgesamt ergibt sich hieraus, dass die T-Zellen auch in einer Kombinationstherapie ihre eigene Funktion in sehr potenter Weise gegenüber den Leukämiezellen ausüben können. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

In den weiteren Untersuchungen wurde dann die gegenteilige Beeinflussung der Therapiepartner untersucht. Bei der Untersuchung der produzierten Virustiter zeigte sich, dass bei Aktivierung von TZR-T-Zellen eine deutlich reduzierte Virusproduktion stattfand. Mögliche Erklärungen sind bereits im Ergebnisteil angeklungen. Weiter oben wurde bereits diskutiert, dass die TZR-T-Zellen insbesondere, aber wahrscheinlich nicht nur bei der niedrigsten untersuchten Infektionsdosis, nämlich der MOI von 0,1, bereits einen großen Beitrag zur Abtötung von ML2B7-Zellen leisten. Dadurch stehen dann weniger ML2-Zellen für eine maximale Virusproduktion zur Verfügung. Es erscheint also wahrscheinlich, dass die TZR-T-Zellen das Substrat für eine starke Virusvermehrung zerstören. Daher erscheint es logisch, dass es nur zu einer geringeren Produktion kommen kann. Ein weiterer Erklärungsansatz wäre, dass das VSV sensibel gegenüber IFN- $\gamma$  (Tan, Derrick et al. 2005) reagiert und seine Replikation durch diese Sensitivität eingeschränkt wird. Interessant ist aber dann, dass sich die Titer nach ca. 48h nahezu angleichen. Da aber bereits nach 24h kaum mehr Tumorzellen vorhanden sind, stellt sich die Frage, wie es zu dieser Vermehrung kommt. Eine Erklärung dafür wäre, dass das VSV nun die T-Zellen zur Replikation nutzt. Insgesamt betrachtet sehe ich die niedrigeren Titer nicht als



Nachteil, sondern sogar als Vorteil einer Kombinationstherapie. Das Ziel der Arbeit ist nicht die Optimierung der Virusproduktion durch ML2-Zellen, sondern deren Abtötung. Mit der Kombinationstherapie werden die Zellen schnell zerstört. Hierbei wird aber keine überschießende Menge an freien Viren produziert, wie man es bei den Kontrollgruppen beobachten kann. In Hinblick auf die Neurotoxizität des VSV erscheint es sinnvoll, wenn nur eine begrenzte Menge freier Viren bei zugleich suffizienter Tumorabtötung entsteht. Nach dieser umfassenden *in vitro* Untersuchung der Kombinationstherapie ist der nächste logische Schritt nun die Testung dieser Therapie *in vivo*. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

#### 6.4 MTD

Bei der Studie zur Findung der maximal tolerierten Dosis des VSV bei den NSG-Mäusen zeigte sich, dass es für freies VSV im Prinzip keine sichere Dosis gibt, deren Applikation die Mäuse dauerhaft überleben. Das ist eine Schwäche im Modell, da so keine Untersuchungen über andauernde Therapieeffekte möglich sind. Da aber humane T- und Leukämie-Zellen *in vivo* verwendet werden, lässt sich am Modellsystem nicht viel ändern, da es immunsupprimierter Mäuse bedarf, um humane Zellen *in vivo* bei Mäusen zu verwenden. Da bereits in Vorarbeiten gezeigt wurde, dass dieses Modell mit diesen spezifischen T- und Leukämie-Zellen bei NSG-Mäusen erfolgreich funktioniert, wurde in dieser Doktorarbeit mit NSG-Mäusen gearbeitet, um zu gewährleisten, dass das Immuntherapiemodell funktioniert. Der Vorteil dieser immundepletierten NSG-Mäuse besteht darin, dass humane Zellen im Detail *in vivo* untersucht werden können, was zu einem näheren Bezug zu einer klinischen Anwendung führt als ein komplett murines Modell. Ein Novum dieser Arbeit ist, dass es nach ausführlichen Recherchen zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit noch keine publizierten Arbeiten zur *in-vivo*-Untersuchung im humanisierten Mausmodell zu dieser speziellen Kombinationsstrategie gibt. Lediglich *in vitro* Untersuchungen sind für das VSV und seine Interaktionen mit humanen T-Zellen publiziert (VanSeggelen, Tantaló et al. 2015). Zudem gibt es bereits Vorarbeiten zur Kombination aus murinen T-Zellen und VSV *in vivo* (Qiao, Wang et al. 2008). Insgesamt stellt das verwendete System also einen Kompromiss der Durchführbarkeit von Untersuchungen an humanen T-Zellen in Kombination mit dem VSV *in vivo* dar. In weiteren Studien wäre es wünschenswert die Interaktionen des VSV mit einem kompletten humanen Immunsystem zu analysieren. Hierzu könnten in Zukunft Mäuse mit humanem Immunsystem verwendet werden.

Da das Modell naturgemäß keine große Toleranz gegenüber dem VSV haben kann, ist es wenig verwunderlich, dass die MTD für freies VSV über einen Zeitraum von 14 Tagen bei lediglich  $10^4$  PFU rVSV-GFP liegt. Schon bei einer Verdreifachung dieser Dosis treten dann so viele toxische Effekte innerhalb der ersten 14 Tage auf, dass es unmöglich wird, noch eine sichere Dosis für diesen Zeitraum zu definieren. Überraschend hingegen ist, dass zellgebundenes VSV in höherer Dosis als freies VSV als sicher angesehen werden kann. Erklärungen dazu verbleiben in dieser Arbeit hypothetischer Natur. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die T-Zellen das an ihre Oberfläche gebundene VSV in vivo noch endozytieren, weil sie aber einen so großen Unterschied zu ihren sonstigen Zellkulturbedingungen vorfinden, die Proliferation weitgehend einstellen und damit eine Virusreplikation minimieren. Eine ähnliche Erklärung könnte lauten, dass viele T-Zellen bei Eintritt in das murine System sterben, weil sie dort keine optimalen Kulturbedingungen vorfinden. Wenn sie dabei durch Apoptose zugrunde gehen, so wäre denkbar, dass sie kein VSV freisetzen können. Alternativ kann es auch sein, dass die T-Zellen, wie zuvor beschrieben, in Lunge und Milz akkumulieren (Mall, Yusufi et al. 2016). Dort können sie das VSV zwar freisetzen bzw. an die dort ansässigen Zellen weitergeben, aber denkbar wäre, dass das VSV dort auf Zellen trifft, die eine starke Replikation nicht unterstützen. Auf der anderen Seite kann es sein, dass freies VSV evtl. eher direkt ins Gehirn kommt und dort zur Neurotoxizität führt. Für letztere Hypothese würde sprechen, dass sich bei mehr Mäusen, die mit nicht-zellgebundenem VSV behandelt wurden, ein replikationskompetentes Virus im Gehirn fand als bei den Mäusen, die mit einer Kombination therapiert wurden. Damit verglichen wurden insgesamt gesehen nur bei relativ wenigen Mäusen überhaupt replikationskompetentes VSV in der Milz gefunden. Das würde dafürsprechen, dass es sich hier um ein eher resistentes Gewebe handelt. Verglichen mit den Gehirnen wurde auch insgesamt in weniger Lungen ein replizierendes VSV gefunden. Dass im Gehirn überhaupt replizierendes Virus gefunden wurde, zeigt erneut, dass das Modell nicht ideal für Untersuchungen mit replikationskompetentem VSV ist. Auch zeigt sich dadurch, dass man keine MTD für längere Studien definieren kann. Insgesamt betrachtet ist es aber dennoch erstaunlich, dass die Kombinationstherapie aus T-Zellen und VSV besser verträglich ist als die Verabreichung freien VSVs. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

## 6.5 Kinetik in den ML2-Tumoren

Dass TZR-T-Zellen in diesem Modell im Zieltumor akkumulieren, ist wenig überraschend und konkordant mit vorbeschriebenen Ergebnissen (Mall, Yusufi et al. 2016, Yusufi, Mall et al. 2017). Ein wenig überraschender ist hingegen, dass es erst nach 5 Tagen zu einer signifikanten Akkumulation der T-Zellen kommt. Das würde, wie im Ergebnisteil kurz erwähnt, dafür sprechen, dass es sich hier weniger um ein spezifisches Homing als vielmehr um eine zufällige Akkumulation der in der Kapillarstrombahn des Tumors schwimmender T-Zellen mit anschließender Proliferation handelt. Ein weiteres Indiz für diese Hypothese ist, dass in der IHC Nester von T-Zellen in bestimmten Tumorteilen auffallen und in anderen Teilen nur wenige T-Zellen zu finden sind. Der Schluss, der sich aus diesen inhomogen verteilten Nestern ergibt, ist, dass eine T-Zelle ihr Zielantigen erkennt und anfängt, dort zu proliferieren. Die fehlende Signifikanz des Prozentsatzes der im ML2B7-Tumor akkumulierten TZR-T-Zellen der Kombinationstherapie gegenüber den anderen Therapien, obwohl im Mittel deutlich mehr T-Zellen im Tumor nachweisbar sind, kann möglicherweise darauf zurückgeführt werden, dass manche Tumoren bereits so stark nekrotisch waren, dass es schwer möglich war, überhaupt lebende Zellen nachzuweisen. Bei diesen Tumoren ist anzunehmen, dass sich dort entweder keine T-Zellen mehr aufhalten oder alle T-Zellen bereits tot sind. Es folgt der Schluss, dass der mittlere Prozentsatz der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen im Tumor bei dieser Therapieform geringer ist als bei der Monotherapie aus TZR-T-Zellen. Weiterhin zeigt sich keine Signifikanz gegenüber den Kontrollen, da in manchen Tumoren keine lebenden T-Zellen mehr zu finden waren, sodass sich manche Werte nicht von denen der Kontrollgruppen unterscheiden und deswegen keine Signifikanz erreicht wird. Die nicht nachweisbare Akkumulation von T-Zellen im ML2B15-Tumor ist wenig überraschend, da der ML2B15-Tumor das Zielantigen „MPO<sub>5</sub>“ nicht auf dem richtigen HLA-Molekül präsentiert. Bei der Untersuchung der viralen Titer im ML2B7-Tumor und im ML2B15-Tumor ergaben sich bereits 24h nach Injektion der Therapien recht hohe Titer bei allen drei Therapiegruppen, die VSV erhielten. Die Titer in den Tumoren der Mäuse, die eine Kombinationstherapie erhielten, schienen dabei tendenziell etwas höher zu sein. Nach 72h erreichte dieser Unterschied bis auf die ML2B7-Tumoren, die mit einer Kombinationstherapie aus TZR-T-Zellen und VSV behandelt worden waren, eine Signifikanz. Allerdings gibt es auch bei dieser Bedingung einen Trend gegenüber der Monotherapie mit dem VSV zu einem höheren intra-

tumoralen Titer. Insoweit sind die Ergebnisse paradox, als man höhere Titer bei der Kombination aus TZR-T-Zellen und VSV erwarten würde, da man dort das spezifische Homing erwartet. Aber wie oben genannt scheint es sich eher um ein stochastisches Ereignis zu handeln, bei dem die Tumoren eher zufällig von T-Zellen erreicht werden, die dann das VSV an Tumorzellen abgeben können. Nach 120h fallen die Titer in beiden ML2-Tumoren der Mäuse, die mit einer Kombinationstherapie aus T-Zellen und VSV behandelt wurden, dann wieder ab. Vermutlich liegt dies daran, dass es sich hier bereits überwiegend um nekrotisches, nicht mehr virusproduzierendes Tumorgewebe handelt und die Viren vom Blutstrom fortgetragen werden. Dass der Titer in den Tumoren der Mäuse, die mit freiem VSV behandelt wurden, noch ansteigt, weist darauf hin, dass hier noch vitales Tumorgewebe für die Virusproduktion vorhanden ist. Insgesamt zeigt sich hier also ein paradoxes Ergebnis, wenn man die der Arbeit zugrundeliegende Hypothese betrachtet, dass TZR-T-Zellen das Homing des VSV zum Tumor spezifisch verbessern sollten. Vielmehr scheint es für den Virustransport irrelevant, ob die T-Zellen einen spezifischen TZR haben oder nicht. Auch dass die Tumorstabilität sehr schnell und reproduzierbar schwindet, wenn ML2B7- oder auch ML2B15-Tumoren mit einer systemischen Kombinationstherapie aus T-Zellen, egal ob transduziert oder nicht und dem VSV behandelt werden, weist daraufhin, dass es hier keine Rolle spielt, ob es sich um spezifische oder unspezifische T-Zellen handelt, da die ML2B15-Tumoren das Zielantigen nicht für die TZR-T-Zellen erkennbar präsentieren und trotzdem suffizient abgetötet werden. Vielmehr scheint die Kombination aus unspezifischen T-Zellen und VSV sogar einen kleinen Therapievorteil bezüglich der produzierten Virustiter und der induzierten Nekrose gegenüber der Kombination aus TZR-T-Zellen und VSV im ML2B7-Tumor zu haben. Möglicherweise ist dies auf die Tatsache, dass die TZR-T-Zellen, die im Tumor akkumulieren, bereits eine signifikante Anzahl an Tumorzellen abgetötet haben und so dem Virus das Substrat für die Vermehrung entziehen, zurückzuführen. Insgesamt scheinen die Kombinationstherapien im ML2B7-Tumor effektiver zu sein als eine Monotherapie aus TZR-T-Zellen oder VSV. Für das tendenziell bessere Therapieansprechen gemessen an der Nekroseinduktion scheint primär das VSV verantwortlich zu sein. Andererseits ist das VSV als Monotherapie zwar effektiv, aber die Varianz der Ergebnisse gestaltet sich bei dieser Therapieform deutlich größer als bei den Kombinationstherapien, sodass die Zweifel an der Reproduzierbarkeit der Tumorabtötung durch diese Therapieform bei jeder Maus angebracht sind, wenn es bei einer Maus funktioniert und bei der nächsten nicht mehr. Anschei-

nend verhelfen also die T-Zellen, seien sie spezifisch oder unspezifisch, auch dem VSV zu einem Vorteil, indem sie dessen zytotoxische Effekte auf den Tumor reproduzierbarer machen. Dass es sich bei der Untersuchung des Therapieansprechens nicht um ein Analyseartefakt handelt, wird durch die simultane Untersuchung der Tumoren durch zwei unterschiedliche Methoden bewiesen. Hierbei besteht eine inverse Korrelation zwischen dem Anteil nekrotischen Tumorgewebes und dem Prozentsatz GFP<sup>+</sup> Tumorzellen in den Tumoren. Insgesamt wird also gezeigt, dass die Tumoren durch eine Kombinationstherapie, seien es dabei TZR- oder Kontroll-T-Zellen, schnell und reproduzierbar abgetötet werden. Abschließend bleibt hier der in-vivo-Beweis aus, dass eine Kombination aus VSV und spezifischen T-Zellen am effizientesten zur Tumorzellabtötung führt. Gezeigt werden kann hier nur, dass T-Zellen und VSV zu einem guten Therapieansprechen führen, leider unabhängig von der Transduktion der T-Zellen. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

## 6.6 Tumorwachstum

Bei der Beobachtung des Tumorwachstums nach Einleitung der Therapie zeigt sich wenig überraschend ein stetes Wachstum in den Kontrollgruppen. Die wohl interessantesten Punkte sind, dass durch eine Kombinationstherapie aus spezifischen oder unspezifischen T-Zellen und VSV das Tumorwachstum effizienter gebremst wird als bei einer Monotherapie mit VSV. Interessant ist hier auch, dass die Tumoren der Mäuse, die mit einer Monotherapie aus VSV behandelt wurden, überhaupt noch wuchsen, anstatt zu stagnieren, wie die mit einer Kombinationstherapie behandelten Tumoren. Dies bedeutet, dass es bei diesen Mäusen noch vitale Tumorzellen gab. Am überraschendsten ist hier aber wohl, dass die TZR-T-Zellen als Monotherapie vollkommen ausreichen, um den Tumor bereits nach kurzer Zeit komplett verschwinden zu lassen. Dies widerspricht eigentlich den Ergebnissen aus der Abtötungskinetik der Tumoren. Hier wäre ja zu erwarten, dass die Kombinationstherapien am effektivsten wären, den Tumor abzuräumen, da sie am schnellsten und reproduzierbarsten zu einem signifikanten Anstieg an totem Tumorgewebe führen. Allerdings mag dies mit dem Sterbemechanismus einzelner Tumorzellen zusammenhängen. Evtl. können hier nur die von den T-Zellen getöteten Tumoren abgeräumt werden, und die durch das VSV getöteten Tumoren verbleiben einfach als Narbengewebe dort bestehen. Dazu würde passen, dass bei der Autopsie der Mäuse, die gleichzeitig im Überlebensexperiment verwendet wurden, beobachtet werden konnte, dass

die verbliebenen Tumorreste weißlich und nicht durchblutet erschienen. Dies würde bedeuten, dass es sich um totes Gewebe handelt, das nicht abgeräumt werden kann. Dass es nicht abgeräumt werden kann, ist bei den NSG-Mäusen nach weiteren Überlegungen nur bedingt verwunderlich, da diese über praktisch kein eigenes Immunsystem verfügen, das diese Aufgabe ausführen könnte. An diesen Beobachtungen ist festzumachen, dass in diesem Tumormodell nicht die Tumorgröße als einziges Erfolgskriterium gewertet werden sollte. Zudem ist stark davon auszugehen, dass die Tumoren tot sind, da man in den Kinetikexperimenten bereits gesehen hat, wie schnell sie durch die Kombinationstherapien abgetötet werden. In weiteren Projekten wäre es sicher interessant zu untersuchen, inwieweit sich die Todesart der Tumorzellen in Abhängigkeit von der Therapie unterscheidet und inwieweit dies auf die Tumorgröße Einfluss hat. Insgesamt kann aus diesen Ergebnissen der Schluss gezogen werden, dass die Kombinationstherapien zu einer stabilen Tumorkontrolle führen und einer Monotherapie mit dem VSV deutlich überlegen sind. Es scheint hier so, als wäre die TZR-T-Zell-Monotherapie am effizientesten bezüglich der Tumorreduktion. In der statistischen Analyse ergibt sich hier aber auch keine signifikante Überlegenheit gegenüber der Kombinationstherapie. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

## 6.7 Überleben

Ein großer Kritikpunkt an der gesamten Studie ist bereits weiter oben angeklungen. Dabei handelt es sich um das fehlende Immunsystem der NSG-Mäuse, das die Findung einer MTD unmöglich macht. Daher war die Hoffnung bei der Durchführung des Überlebensexperimentes, bei dem nur ML2B7-Tumoren implantiert worden waren, dass sich bereits innerhalb der ersten 14 Tage, für die eine sichere Dosis für das VSV definiert werden konnte, gravierende Unterschiede zeigen. Leider war es aber so, dass besonders bei den Kombinationstherapien eine rasch einsetzende Neurotoxizität zur Beendigung des Überlebensexperimentes führte, obwohl die Tumoren in ihrer Größe stagnierten. So fand sich bei allen mit dem VSV behandelten Mäusen insgesamt kein großer Unterschied im Gesamtüberleben gegenüber den Kontrollgruppen. Dass hier die eigentlich sichereren Kombinationstherapien auch keinen Unterschied gegenüber der Monotherapie mit VSV zeigten, mag darauf zurückzuführen sein, dass im ML2B7-Tumor große Mengen an Virus produziert wurden, die dann auch systemisch zur Verfügung standen und schnell ins Gehirn gelangten und dort die Neurotoxizität verursachten.

Am effektivsten war hier die TZR-T-Zell-Monotherapie. Sie führte zu einem signifikanten Gesamtüberlebensvorteil. Allerdings ist bei dieser Therapiegruppe interessant, dass alle bis auf eine Maus ein Tumorrezidiv erlitten, das therapierefraktär war, da es die Expression des HLA-B07:02 verloren hatte, und so keinen Angriffspunkt für die TZR-T-Zellen mehr bot. Da das VSV auch für seine immunstimulatorischen Wirkungen bekannt ist (Melzer, Lopez-Martinez et al. 2017), ist hier zu hoffen, dass das VSV in einem anderen, immunkompetenten Modell eine polyklonale Immunantwort hervorrufen würde, sodass der Verlust eines einzigen Zielmoleküls nicht so sehr ins Gewicht fällt. Ein weiterer spekulativer Effekt in einem immunkompetenten Modell wäre, dass das VSV alle Tumorzellen, unabhängig von deren Antigen- oder HLA-Expression, abtötet und so die eventuelle Lücke, die die TZR-T-Zellen nicht abdecken, schließen kann. Aber diese Hypothesen müssten in einem anderen Modell überprüft werden. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)

## 7 Fazit und Ausblick

In dieser Doktorarbeit konnte eindrucksvoll gezeigt werden, wie humane T-Zellen mit dem VSV interagieren und dessen Replikation unterstützen. Auch wenn es bereits zuvor Studien gab, die die Behandlung von Tumoren mit einer Kombinationstherapie aus transgenen T-Zellen und onkolytischen Viren untersucht hatten, so war das Novum dieser Studie die Behandlung von humanen Leukämie-Zellen mit einer Kombinationstherapie aus humanen T-Zellen und dem VSV *in vivo*, wobei der Fokus hier auf dem Humanen *in vivo* lag. Zwar waren letzten Endes die Limitationen des humanisierten Mausmodells sehr groß, aber es konnte doch gezeigt werden, dass die Therapie von ML2-Tumoren mit einer Kombinationstherapie aus T-Zellen und VSV zu einer raschen Tumorabtötung führt. Dass hierbei auch nicht-spezifische T-Zellen den Effekt des VSV unterstützen konnten, war überraschend. In dieser Proof-of-Principle-Studie wurde aber klar, dass die Kombination aus humanen TZR-T-Zellen und VSV zumindest *in vitro* Sinn macht. Die *in vivo* Daten müssten in weiterführenden Studien in einem humanisierten Mausmodell mit etabliertem humanen Immunsystem validiert werden, um zu zeigen, dass auch tatsächlich eine Abschirmung der VSV durch die TZR-T-Zellen vor dem Immunsystem stattfindet. Auf der anderen Seite könnte dann auch untersucht werden, inwiefern das VSV die Funktion der TZR-T-Zellen bei einem immunsuppressiven Tumormilieu verstärkt bzw. den TZR-T-Zellen hilft, sich diesem Milieu zu widersetzen. Zu Bedenken gilt es auch, dass besonders Patienten mit einer akuten Leukämie stark immunsupprimiert sind und die hier untersuchte Therapie bei ihnen evtl. in ähnlichem Maße zu einer Toxizität führt wie bei den NSG-Mäusen. Andererseits gibt es andere Tumorentitäten, bei denen die Anwendung einer Kombinationstherapie wahrscheinlich effektiv wäre, ohne dass es dabei zu so toxischen Nebenwirkungen kommt. Insgesamt betrachtet sind die Untersuchungen in dieser Doktorarbeit also als gelungener Proof-of-Principle einer Kombinationstherapie zur Behandlung von Neoplasien zu sehen, aber keineswegs als direkte Therapieempfehlung für die AML. Weiterführende Studien bei anderen Tumorentitäten, in anderen Tiermodellen und in Modellen mit funktionierendem Immunsystem sind daher obligat zur weiteren Evaluation einer solchen Kombinationstherapie. (Melzer, Zeitlinger et al. 2019)



## 8 Literaturverzeichnis

Abdullahi, S., M. Jakel, S. J. Behrend, K. Steiger, G. Topping, T. Krabbe, A. Colombo, V. Sandig, T. S. Schiergens, W. E. Thasler, J. Werner, S. F. Lichtenthaler, R. M. Schmid, O. Ebert und J. Altomonte (2018). "A Novel Chimeric Oncolytic Virus Vector for Improved Safety und Efficacy as a Platform for the Treatment of Hepatocellular Carcinoma." J Virol **92**(23).

Al-Matary, Y. S., L. Botezatu, B. Opalka, J. M. Hones, R. F. Lams, A. Thivakaran, J. Schutte, R. Koster, K. Lennartz, T. Schroeder, R. Haas, U. Duhrsen und C. Khandanpour (2016). "Acute myeloid leukemia cells polarize macrophages towards a leukemia supporting state in a Growth factor independence 1 dependent manner." Haematologica **101**(10): 1216-1227.

Altomonte, J., L. Wu, L. Chen, M. Meseck, O. Ebert, A. Garcia-Sastre, J. Fallon und S. L. Woo (2008). "Exponential enhancement of oncolytic vesicular stomatitis virus potency by vector-mediated suppression of inflammatory responses in vivo." Mol Ther **16**(1): 146-153.

Altomonte, J., L. Wu, M. Meseck, L. Chen, O. Ebert, A. Garcia-Sastre, J. Fallon, J. Mandeli und S. L. Woo (2009). "Enhanced oncolytic potency of vesicular stomatitis virus through vector-mediated inhibition of NK und NKT cells." Cancer Gene Ther **16**(3): 266-278.

Andtbacka, R. H., H. L. Kaufman, F. Collichio, T. Amatruda, N. Senzer, J. Chesney, K. A. Delman, L. E. Spitler, I. Puzanov, S. S. Agarwala, M. Milhem, L. Cranmer, B. Curti, K. Lewis, M. Ross, T. Guthrie, G. P. Linette, G. A. Daniels, K. Harrington, M. R. Middleton, W. H. Miller, Jr., J. S. Zager, Y. Ye, B. Yao, A. Li, S. Doleman, A. VanderWalde, J. Gansert und R. S. Coffin (2015). "Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma." J Clin Oncol **33**(25): 2780-2788.

Anguille, S., A. L. Van de Velde, E. L. Smits, V. F. Van Tendeloo, G. Juliusson, N. Cools, G. Nijs, B. Stein, E. Lion, A. Van Driessche, I. Vandenbosch, A. Verlinden, A. P. Gadisseur, W. A. Schroyens, L. Muylle, K. Vermeulen, M. B. Maes, K. Deiteren, R. Malfait, E. Gostick, M. Lammens, M. M. Couttenye, P. Jorens, H. Goossens, D. A. Price, K. Ladell, Y. Oka, F. Fujiki, Y. Oji, H. Sugiyama und Z. N. Berneman (2017). "Dendritic cell vaccination as postremission treatment to prevent or delay relapse in acute myeloid leukemia." Blood **130**(15): 1713-1721.

Arber, D. A., A. Orazi, R. Hasserjian, J. Thiele, M. J. Borowitz, M. M. Le Beau, C. D. Bloomfield, M. Cazzola und J. W. Vardiman (2016). "The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms und acute leukemia." Blood **127**(20): 2391-2405.

Baessler, T., M. Krusch, B. J. Schmiedel, M. Kloss, K. M. Baltz, A. Wacker, H. M. Schmetzer und H. R. Salih (2009). "Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-related protein ligand subverts immunosurveillance of acute myeloid leukemia in humans." Cancer Res **69**(3): 1037-1045.

Balachandran, S., M. Porosnicu und G. N. Barber (2001). "Oncolytic activity of vesicular stomatitis virus is effective against tumors exhibiting aberrant p53, Ras, or myc function und involves the induction of apoptosis." J Virol **75**(7): 3474-3479.

Banerjee, A. K. (1987). "Transcription und replication of rhabdoviruses." Microbiol Rev **51**(1): 66-87.

- Barchet, W., M. Cella, B. Odermatt, C. Asselin-Paturel, M. Colonna und U. Kalinke (2002). "Virus-induced interferon alpha production by a dendritic cell subset in the absence of feedback signaling in vivo." J Exp Med **195**(4): 507-516.
- Batenchuk, C., F. Le Boeuf, L. Stubbert, T. Falls, H. L. Atkins, J. C. Bell und D. P. Conrad (2013). "Non-replicating rhabdovirus-derived particles (NRRPs) eradicate acute leukemia by direct cytolysis und induction of antitumor immunity." Blood Cancer J **3**: e123.
- Belkowsky, L. S. und G. C. Sen (1987). "Inhibition of vesicular stomatitis viral mRNA synthesis by interferons." J Virol **61**(3): 653-660.
- Bennett, J. M., D. Catovsky, M. T. Daniel, G. Flandrin, D. A. Galton, H. R. Gralnick und C. Sultan (1976). "Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group." Br J Haematol **33**(4): 451-458.
- Brandwein, J. M., N. Zhu, R. Kumar, B. Leber, M. Sabloff, I. Sandhu, J. Kassis, H. J. Olney, M. Elemetry und A. C. Schuh (2017). "Treatment of older patients with acute myeloid leukemia (AML): revised Canadian consensus guidelines." Am J Blood Res **7**(4): 30-40.
- Brayer, J., J. E. Lancet, J. Powers, A. List, L. Balducci, R. Komrokji und J. Pinilla-Ibarz (2015). "WT1 vaccination in AML und MDS: A pilot trial with synthetic analog peptides." Am J Hematol **90**(7): 602-607.
- Brouwer, R. E., P. van der Heiden, G. M. Schreuder, A. Mulder, G. Datema, J. D. Anholts, R. Willemze, F. H. Claas und J. H. Falkenburg (2002). "Loss or downregulation of HLA class I expression at the allelic level in acute leukemia is infrequent but functionally relevant, und can be restored by interferon." Hum Immunol **63**(3): 200-210.
- Buggins, A. G., D. Milojkovic, M. J. Arno, N. C. Lea, G. J. Mufti, N. S. Thomas und W. J. Hirst (2001). "Microenvironment produced by acute myeloid leukemia cells prevents T cell activation und proliferation by inhibition of NF-kappaB, c-Myc, und pRb pathways." J Immunol **167**(10): 6021-6030.
- Candoni, A., C. Papayannidis, G. Martinelli, E. Simeone, M. Gottardi, I. Iacobucci, F. Gherlinzoni, G. Visani, M. Bacarani und R. Fanin (2018). "Flai (fludarabine, cytarabine, idarubicin) plus low-dose Gemtuzumab Ozogamicin as induction therapy in CD33-positive AML: Final results und long term outcome of a phase II multicenter clinical trial." Am J Hematol **93**(5): 655-663.
- Casucci, M., B. Nicolis di Robilant, L. Falcone, B. Camisa, M. Norelli, P. Genovese, B. Gentner, F. Gullotta, M. Ponzoni, M. Bernardi, M. Marcatti, A. Saudemont, C. Bordignon, B. Savoldo, F. Ciceri, L. Naldini, G. Dotti, C. Bonini und A. Bondanza (2013). "CD44v6-targeted T cells mediate potent antitumor effects against acute myeloid leukemia und multiple myeloma." Blood **122**(20): 3461-3472.
- Chen, Y., Y. Pan, Y. Guo, W. Zhao, W. T. Ho, J. Wang, M. Xu, F. C. Yang und Z. J. Zhao (2017). "Tyrosine kinase inhibitors targeting FLT3 in the treatment of acute myeloid leukemia." Stem Cell Investig **4**: 48.

Chmielewski, M., C. Kopecky, A. A. Hombach und H. Abken (2011). "IL-12 release by engineered T cells expressing chimeric antigen receptors can effectively Muster an antigen-independent macrophage response on tumor cells that have shut down tumor antigen expression." Cancer Res **71**(17): 5697-5706.

Chow, T. L., F. H. Chow und R. P. Hanson (1954). "Morphology of vesicular stomatitis virus." J Bacteriol **68**(6): 724-726.

Coffin, R. (2016). "Interview with Robert Coffin, inventor of T-VEC: the first oncolytic immunotherapy approved for the treatment of cancer." Immunotherapy **8**(2): 103-106.

Colovic, M., N. Colovic, M. Radojkovic, D. Stanisavljevic, N. Kraguljac, G. Jankovic, D. Tomin, N. Suvajdzic, A. Vidovic und H. D. Atkinson (2012). "Induction chemotherapy versus palliative treatment for acute myeloid leukemia in a consecutive cohort of elderly patients." Ann Hematol **91**(9): 1363-1370.

Creutzig, U., C. Rossig, M. Dworzak, J. Stary, A. von Stackelberg, W. Wossmann, M. Zimmermann und D. Reinhardt (2016). "Exchange Transfusion und Leukapheresis in Pediatric Patients with AML With High Risk of Early Death by Bleeding und Leukostasis." Pediatr Blood Cancer **63**(4): 640-645.

Cureton, D. K., R. H. Massol, S. P. Whelan und T. Kirchhausen (2010). "The length of vesicular stomatitis virus particles dictates a need for actin assembly during clathrin-dependent endocytosis." PLoS Pathog **6**(9): e1001127.

Curti, A., L. Ruggeri, A. D'Addio, A. Bontadini, E. Dan, M. R. Motta, S. Trabanelli, V. Giudice, E. Urbani, G. Martinelli, S. Paolini, F. Fruet, A. Isidori, S. Parisi, G. Bandini, M. Baccarani, A. Velardi und R. M. Lemoli (2011). "Successful transfer of alloreactive haploidentical KIR ligand-mismatched natural killer cells after infusion in elderly high risk acute myeloid leukemia patients." Blood **118**(12): 3273-3279.

Curti, A., L. Ruggeri, S. Parisi, A. Bontadini, E. Dan, M. R. Motta, S. Rizzi, S. Trabanelli, D. Ocadlikova, M. Lecciso, V. Giudice, F. Fruet, E. Urbani, C. Papayannidis, G. Martinelli, G. Bandini, F. Bonifazi, R. E. Lewis, M. Cavo, A. Velardi und R. M. Lemoli (2016). "Larger Size of Donor Alloreactive NK Cell Repertoire Correlates with Better Response to NK Cell Immunotherapy in Elderly Acute Myeloid Leukemia Patients." Clin Cancer Res **22**(8): 1914-1921.

Daver, N., G. Garcia-Manero, S. Basu, P. C. Boddu, M. Alfayez, J. E. Cortes, M. Konopleva, F. Ravandi-Kashani, E. Jabbour, T. Kadia, G. M. Nogueras-Gonzalez, J. Ning, N. Pemmaraju, C. D. DiNardo, M. Andreeff, S. A. Pierce, T. Gordon, S. M. Kornblau, W. Flores, Z. Alhamal, C. Bueso-Ramos, J. L. Jorgensen, K. P. Patel, J. Blando, J. P. Allison, P. Sharma und H. Kantarjian (2019). "Efficacy, Safety, und Biomarkers of Response to Azacitidine und Nivolumab in Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia: A Nonrandomized, Open-Label, Phase II Study." Cancer Discov **9**(3): 370-383.

Delaunay, T., M. Violland, N. Boisgerault, S. Dutoit, V. Vignard, C. Munz, M. Gannage, B. Dreno, K. Vaivode, D. Pjanova, N. Labarriere, Y. Wang, E. A. Chiocca, F. L. Boeuf, J. C. Bell, P. Erbs, F. Tangy, M. Gregoire und J. F. Fonteneau (2018). "Oncolytic viruses sensitize human

tumor cells for NY-ESO-1 tumor antigen recognition by CD4+ effector T cells." Oncoimmunology **7**(3): e1407897.

Diaz, R. M., F. Galivo, T. Kottke, P. Wongthida, J. Qiao, J. Thompson, M. Valdes, G. Barber und R. G. Vile (2007). "Oncolytic immunovirotherapy for melanoma using vesicular stomatitis virus." Cancer Res **67**(6): 2840-2848.

Dohner, H., E. Estey, D. Grimwade, S. Amadori, F. R. Appelbaum, T. Buchner, H. Dombret, B. L. Ebert, P. Fenaux, R. A. Larson, R. L. Levine, F. Lo-Coco, T. Naoe, D. Niederwieser, G. J. Ossenkoppele, M. Sanz, J. Sierra, M. S. Tallman, H. F. Tien, A. H. Wei, B. Lowenberg und C. D. Bloomfield (2017). "Diagnosis und management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel." Blood **129**(4): 424-447.

Dohner, H., D. J. Weisdorf und C. D. Bloomfield (2015). "Acute Myeloid Leukemia." N Engl J Med **373**(12): 1136-1152.

Driss, V., B. Quesnel und C. Brinster (2015). "Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1/CCL2) contributes to thymus atrophy in acute myeloid leukemia." Eur J Immunol **45**(2): 396-406.

Ebert, O., K. Shinozaki, T. G. Huang, M. J. Savontaus, A. Garcia-Sastre und S. L. Woo (2003). "Oncolytic vesicular stomatitis virus for treatment of orthotopic hepatocellular carcinoma in immune-competent rats." Cancer Res **63**(13): 3605-3611.

Eisenstein, S., B. A. Coakley, K. Briley-Saebo, G. Ma, H. M. Chen, M. Meseck, S. Ward, C. Divino, S. Woo, S. H. Chen und P. Y. Pan (2013). "Myeloid-derived suppressor cells as a vehicle for tumor-specific oncolytic viral therapy." Cancer Res **73**(16): 5003-5015.

Ersvaer, E., K. Liseth, J. Skavland, B. T. Gjertsen und O. Bruserud (2010). "Intensive chemotherapy for acute myeloid leukemia differentially affects circulating TC1, TH1, TH17 und TREG cells." BMC Immunol **11**: 38.

Finkelshtein, D., A. Werman, D. Novick, S. Barak und M. Rubinstein (2013). "LDL receptor und its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(18): 7306-7311.

Folgiero, V., B. M. Goffredo, P. Filippini, R. Masetti, G. Bonanno, R. Caruso, V. Bertaina, A. Mastronuzzi, S. Gaspari, M. Zecca, G. F. Torelli, A. M. Testi, A. Pession, F. Locatelli und S. Rutella (2014). "Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) activity in leukemia blasts correlates with poor outcome in childhood acute myeloid leukemia." Oncotarget **5**(8): 2052-2064.

Gaddy, D. F. und D. S. Lyles (2005). "Vesicular stomatitis viruses expressing wild-type or mutant M proteins activate apoptosis through distinct pathways." J Virol **79**(7): 4170-4179.

Gaddy, D. F. und D. S. Lyles (2007). "Oncolytic vesicular stomatitis virus induces apoptosis via signaling through PKR, Fas, und Daxx." J Virol **81**(6): 2792-2804.

Gao, Y., P. Whitaker-Dowling, M. A. Barmada, P. H. Basse und I. Bergman (2015). "Viral infection of implanted meningeal tumors induces antitumor memory T-cells to travel to the brain und eliminate established tumors." Neuro-Oncology **17**(4): 536-544.

Gomes-Silva, D., E. Atilla, P. A. Atilla, F. Mo, H. Tashiro, M. Srinivasan, P. Lulla, R. H. Rouce, J. M. S. Cabral, C. A. Ramos, M. K. Brenner und M. Mamonkin (2019). "CD7 CAR T Cells for the Therapy of Acute Myeloid Leukemia." Mol Ther **27**(1): 272-280.

Hall, K., K. J. Scott, A. Rose, M. Desborough, K. Harrington, H. Pandha, C. Parrish, R. Vile, M. Coffey, D. Bowen, F. Errington-Mais und A. A. Melcher (2012). "Reovirus-mediated cytotoxicity und enhancement of innate immune responses against acute myeloid leukemia." Biores Open Access **1**(1): 3-15.

Hastie, E., M. Cataldi, I. Marriott und V. Z. Grdzlishvili (2013). "Understanding und altering cell tropism of vesicular stomatitis virus." Virus Res **176**(1-2): 16-32.

Hastie, E. und V. Z. Grdzlishvili (2012). "Vesicular stomatitis virus as a flexible platform for oncolytic virotherapy against cancer." J Gen Virol **93**(Pt 12): 2529-2545.

Hay, K. A., L. A. Hanafi, D. Li, J. Gust, W. C. Liles, M. M. Wurfel, J. A. Lopez, J. Chen, D. Chung, S. Harju-Baker, S. Cherian, X. Chen, S. R. Riddell, D. G. Maloney und C. J. Turtle (2017). "Kinetics und biomarkers of severe cytokine release syndrome after CD19 chimeric antigen receptor-modified T-cell therapy." Blood **130**(21): 2295-2306.

He, S. Z., S. Busfield, D. S. Ritchie, M. S. Hertzberg, S. Durrant, I. D. Lewis, P. Marlton, A. J. McLachlan, I. Kerridge, K. F. Bradstock, G. Kennedy, A. W. Boyd, T. M. Yeadon, A. F. Lopez, H. S. Ramshaw, H. Iland, S. Bamford, M. Barnden, M. DeWitte, R. Bassler und A. W. Roberts (2015). "A Phase 1 study of the safety, pharmacokinetics und anti-leukemic activity of the anti-CD123 monoclonal antibody CSL360 in relapsed, refractory or high-risk acute myeloid leukemia." Leuk Lymphoma **56**(5): 1406-1415.

Hofmann, S., M. L. Schubert, L. Wang, B. He, B. Neuber, P. Dreger, C. Muller-Tidow und M. Schmitt (2019). "Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cell Therapy in Acute Myeloid Leukemia (AML)." J Clin Med **8**(2).

Hospital, M. A., A. S. Green, T. T. Maciel, I. C. Moura, A. Y. Leung, D. Bouscary und J. Tamburini (2017). "FLT3 inhibitors: clinical potential in acute myeloid leukemia." Onco Targets Ther **10**: 607-615.

Houot, R., L. M. Schultz, A. Marabelle und H. Kohrt (2015). "T-cell-based Immunotherapy: Adoptive Cell Transfer und Checkpoint Inhibition." Cancer Immunol Res **3**(10): 1115-1122.

Howatson, A. F. und G. F. Whitmore (1962). "The development und structure of vesicular stomatitis virus." Virology **16**: 466-478.

Huang, A. S., J. W. Greenawalt und R. R. Wagner (1966). "Defective T particles of vesicular stomatitis virus. I. Preparation, morphology, und some biologic properties." Virology **30**(2): 161-172.

Isidori, A., F. Loscocco, M. Ciciarello, G. Corradi, M. Lecciso, D. Ocadlikova, S. Parisi, V. Salvestrini, S. Amadori, G. Visani und A. Curti (2018). "Immunosenescence und Immunotherapy in Elderly Acute Myeloid Leukemia Patients: Time for a Biology-Driven Approach." Cancers (Basel) **10**(7).

Ismail, M. M. und N. A. B. Abdulateef (2017). "Bone marrow T-cell percentage: A novel prognostic indicator in acute myeloid leukemia." Int J Hematol **105**(4): 453-464.

Johnson, L. A., R. A. Morgan, M. E. Dudley, L. Cassard, J. C. Yang, M. S. Hughes, U. S. Kammula, R. E. Royal, R. M. Sherry, J. R. Wunderlich, C. C. Lee, N. P. Restifo, S. L. Schwarz, A. P. Cogdill, R. J. Bishop, H. Kim, C. C. Brewer, S. F. Rudy, C. VanWaes, J. L. Davis, A. Mathur, R. T. Ripley, D. A. Nathan, C. M. Laurencot und S. A. Rosenberg (2009). "Gene therapy with human und mouse T-cell receptors mediates cancer regression und targets normal tissues expressing cognate antigen." Blood **114**(3): 535-546.

Jordan, C. T., D. Upchurch, S. J. Szilvassy, M. L. Guzman, D. S. Howard, A. L. Pettigrew, T. Meyerrose, R. Rossi, B. Grimes, D. A. Rizzieri, S. M. Luger und G. L. Phillips (2000). "The interleukin-3 receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells." Leukemia **14**(10): 1777-1784.

Kallies, A. (2008). "Distinct regulation of effector und memory T-cell differentiation." Immunol Cell Biol **86**(4): 325-332.

Kaluza, K. M., J. M. Thompson, T. J. Kottke, H. C. Flynn Gilmer, D. L. Knutson und R. G. Vile (2012). "Adoptive T cell therapy promotes the emergence of genomically altered tumor escape variants." Int J Cancer **131**(4): 844-854.

Kamta, J., M. Chaar, A. Ande, D. A. Altomare und S. Ait-Oudhia (2017). "Advancing Cancer Therapy with Present und Emerging Immuno-Oncology Approaches." Front Oncol **7**: 64.

Kanakry, C. G., A. D. Hess, C. D. Gocke, C. Thoburn, F. Kos, C. Meyer, J. Briel, L. Luznik, B. D. Smith, H. Levitsky und J. E. Karp (2011). "Early lymphocyte recovery after intensive timed sequential chemotherapy for acute myelogenous leukemia: peripheral oligoclonal expansion of regulatory T cells." Blood **117**(2): 608-617.

Kelly, E. und S. J. Russell (2007). "History of oncolytic viruses: genesis to genetic engineering." Mol Ther **15**(4): 651-659.

Kim, M., G. J. Madlambayan, M. M. Rahman, S. E. Smallwood, A. M. Meacham, K. Hosaka, E. W. Scott, C. R. Cogle und G. McFadden (2009). "Myxoma virus targets primary human leukemic stem und progenitor cells while sparing normal hematopoietic stem und progenitor cells." Leukemia **23**(12): 2313-2317.

Klar, R., S. Schober, M. Rami, S. Mall, J. Merl, S. M. Hauck, M. Ueffing, A. Admon, J. Slotta-Huspenina, M. Schwaiger, S. Stevanovic, R. A. Oostendorp, D. H. Busch, C. Peschel und A. M. Krackhardt (2014). "Therapeutic targeting of naturally presented myeloperoxidase-derived HLA peptide ligands on myeloid leukemia cells by TCR-transgenic T cells." Leukemia **28**(12): 2355-2366.

Knudson, D. L. (1973). "Rhabdoviruses." J Gen Virol **20**: Suppl:105-130.

Kopecky, S. A., M. C. Willingham und D. S. Lyles (2001). "Matrix protein und another viral component contribute to induction of apoptosis in cells infected with vesicular stomatitis virus." J Virol **75**(24): 12169-12181.

Koszinowski, U. H., M. J. Reddehase und S. Jonjic (1991). "The role of CD4 und CD8 T cells in viral infections." Curr Opin Immunol **3**(4): 471-475.

Kraywinkel, K. und C. Spix (2017). "Epidemiologie akuter Leukämien in Deutschland." Der Onkologe **23**(7): 499-503.

Lamble, A. J. und E. F. Lind (2018). "Targeting the Immune Microenvironment in Acute Myeloid Leukemia: A Focus on T Cell Immunity." Front Oncol **8**: 213.

Lamers, C. H., S. Sleijfer, S. van Steenbergen, P. van Elzakker, B. van Krimpen, C. Groot, A. Vulto, M. den Bakker, E. Oosterwijk, R. Debets und J. W. Gratama (2013). "Treatment of metastatic renal cell carcinoma with CAIX CAR-engineered T cells: clinical evaluation und management of on-target toxicity." Mol Ther **21**(4): 904-912.

Laurent, S., G. L. Palmisano, A. M. Martelli, T. Kato, P. L. Tazzari, I. Pierri, M. Clavio, B. Dozin, G. Balbi, M. Megna, A. Morabito, T. Lamparelli, A. Bacigalupo, M. Gobbi und M. P. Pistillo (2007). "CTLA-4 expressed by chemoresistant, as well as untreated, myeloid leukaemia cells can be targeted with ligands to induce apoptosis." Br J Haematol **136**(4): 597-608.

Le Dieu, R., D. C. Taussig, A. G. Ramsay, R. Mitter, F. Miraki-Moud, R. Fatah, A. M. Lee, T. A. Lister und J. G. Gribben (2009). "Peripheral blood T cells in acute myeloid leukemia (AML) patients at diagnosis have abnormal phenotype und genotype und form defective immune synapses with AML blasts." Blood **114**(18): 3909-3916.

Le Tourneau, C., J. J. Lee und L. L. Siu (2009). "Dose escalation methods in phase I cancer clinical trials." J Natl Cancer Inst **101**(10): 708-720.

LeBlanc, A. K., S. Naik, G. D. Galyon, N. Jenks, M. Steele, K. W. Peng, M. J. Federspiel, R. Donnell und S. J. Russell (2013). "Safety studies on intravenous administration of oncolytic recombinant vesicular stomatitis virus in purpose-bred beagle dogs." Hum Gene Ther Clin Dev **24**(4): 174-181.

Li, G., X. Li, H. Wu, X. Yang, Y. Zhang, L. Chen, X. Wu, L. Cui, L. Wu, J. Luo und X. Y. Liu (2014). "CD123 targeting oncolytic adenoviruses suppress acute myeloid leukemia cell proliferation in vitro und in vivo." Blood Cancer J **4**: e194.

Li, H. und Y. Zhao (2017). "Increasing the safety und efficacy of chimeric antigen receptor T cell therapy." Protein Cell **8**(8): 573-589.

Lion, E., Y. Willemen, Z. N. Berneman, V. F. Van Tendeloo und E. L. Smits (2012). "Natural killer cell immune escape in acute myeloid leukemia." Leukemia **26**(9): 2019-2026.

Liu, L., J. Ma, L. Qin, X. Shi, H. Si und Y. Wei (2019). "Interleukin-24 enhancing antitumor activity of chimeric oncolytic adenovirus for treating acute promyelocytic leukemia cell." Medicine (Baltimore) **98**(22): e15875.

Madlambayan, G. J., E. Bartee, M. Kim, M. M. Rahman, A. Meacham, E. W. Scott, G. McFadden und C. R. Cogle (2012). "Acute myeloid leukemia targeting by myxoma virus in vivo depends on cell binding but not permissiveness to infection in vitro." Leuk Res **36**(5): 619-624.

Mall, S., N. Yusufi, R. Wagner, R. Klar, H. Bianchi, K. Steiger, M. Straub, S. Audehm, I. Laitinen, M. Aichler, C. Peschel, S. Ziegler, M. Mustafa, M. Schwaiger, C. D'Alessandria und A. M. Krackhardt (2016). "Immuno-PET Imaging of Engineered Human T Cells in Tumors." Cancer Res.

Mansour, I., R. A. Zayed, F. Said und L. A. Latif (2016). "Indoleamine 2,3-dioxygenase und regulatory T cells in acute myeloid leukemia." Hematology **21**(8): 447-453.

Mardiros, A., C. Dos Santos, T. McDonald, C. E. Brown, X. Wang, L. E. Budde, L. Hoffman, B. Aguilar, W. C. Chang, W. Bretzlaff, B. Chang, M. Jonnalagadda, R. Starr, J. R. Ostberg, M. C. Jensen, R. Bhatia und S. J. Forman (2013). "T cells expressing CD123-specific chimeric antigen receptors exhibit specific cytolytic effector functions und antitumor effects against human acute myeloid leukemia." Blood **122**(18): 3138-3148.

Marelli, G., A. Howells, N. R. Lemoine und Y. Wang (2018). "Oncolytic Viral Therapy und the Immune System: A Double-Edged Sword Against Cancer." Front Immunol **9**: 866.

Matlin, K. S., H. Reggio, A. Helenius und K. Simons (1982). "Pathway of vesicular stomatitis virus entry leading to infection." J Mol Biol **156**(3): 609-631.

Melzer, M. K., A. Lopez-Martinez und J. Altomonte (2017). "Oncolytic Vesicular Stomatitis Virus as a Viro-Immunotherapy: Defeating Cancer with a "Hammer" und "Anvil"." Biomedicines **5**(1).

Melzer, M. K., L. Zeitlinger, S. Mall, K. Steiger, A. Krackhardt, O. Ebert und J. Altomonte (2018). "Abstract B14: TCR transgenic T cells improve the anticancer potential of oncolytic vesicular stomatitis virus as cell carriers und as synergistic therapeutics." Cancer Immunology Research **6**(9 Supplement): B14-B14.

Melzer, M. K., L. Zeitlinger, S. Mall, K. Steiger, R. M. Schmid, O. Ebert, A. Krackhardt und J. Altomonte (2019). "Enhanced Safety und Efficacy of Oncolytic VSV Therapy by Combination with T Cell Receptor Transgenic T Cells as Carriers." Mol Ther Oncolytics **12**: 26-40.

Menter, T., B. Kuzmanic, C. Bucher, M. Medinger, J. Halter, S. Dirnhofer und A. Tzankov (2017). "Beneficial role of increased FOXP3(+) regulatory T-cells in acute myeloid leukaemia therapy response." Br J Haematol.

Mo, Z., P. Du, G. Wang und Y. Wang (2017). "The Multi-Purpose Tool of Tumor Immunotherapy: Gene-Engineered T Cells." J Cancer **8**(9): 1690-1703.

Moerdyk-Schauwecker, M., N. R. Shah, A. M. Murphy, E. Hastie, P. Mukherjee und V. Z. Grdzlishvili (2013). "Resistance of pancreatic cancer cells to oncolytic vesicular stomatitis virus: role of type I interferon signaling." Virology **436**(1): 221-234.

Morgan, R. A., J. C. Yang, M. Kitano, M. E. Dudley, C. M. Laurencot und S. A. Rosenberg (2010). "Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2." Mol Ther **18**(4): 843-851.

Müller, L. M. E., M. Holmes, J. L. Michael, G. B. Scott, E. J. West, K. J. Scott, C. Parrish, K. Hall, S. Stable, V. A. Jennings, M. Cullen, S. McConnell, C. Langton, E. L. Tidswell, D. Shafren, A.



Samson, K. J. Harrington, H. Pandha, C. Ralph, R. J. Kelly, G. Cook, A. A. Melcher und F. Errington-Mais (2019). "Plasmacytoid dendritic cells orchestrate innate and adaptive anti-tumor immunity induced by oncolytic coxsackievirus A21." J Immunother Cancer **7**(1): 164.

Munoz-Alvarez, K. A., J. Altomonte, I. Laitinen, S. Ziegler, K. Steiger, I. Esposito, R. M. Schmid und O. Ebert (2015). "PET imaging of oncolytic VSV expressing the mutant HSV-1 thymidine kinase transgene in a preclinical HCC rat model." Mol Ther **23**(4): 728-736.

Mussai, F., C. De Santo, I. Abu-Dayyeh, S. Booth, L. Quek, R. M. McEwen-Smith, A. Qureshi, F. Dazzi, P. Vyas und V. Cerundolo (2013). "Acute myeloid leukemia creates an arginase-dependent immunosuppressive microenvironment." Blood **122**(5): 749-758.

Negrin, R. S. (2015). "Graft-versus-host disease versus graft-versus-leukemia." Hematology Am Soc Hematol Educ Program **2015**: 225-230.

O'Donnell, M. R., M. S. Tallman, C. N. Abboud, J. K. Altman, F. R. Appelbaum, D. A. Arber, V. Bhatt, D. Bixby, W. Blum, S. E. Coutre, M. De Lima, A. T. Fathi, M. Fiorella, J. M. Foran, S. D. Gore, A. C. Hall, P. Kropf, J. Lancet, L. J. Maness, G. Marcucci, M. G. Martin, J. O. Moore, R. Olin, D. Peker, D. A. Pollyea, K. Pratz, F. Ravandi, P. J. Shami, R. M. Stone, S. A. Strickland, E. S. Wang, M. Wieduwilt, K. Gregory und N. Ogba (2017). "Acute Myeloid Leukemia, Version 3.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology." J Natl Compr Canc Netw **15**(7): 926-957.

O'Reilly, M., A. Shipp, E. Rosenthal, R. Jambou, T. Shih, M. Montgomery, L. Gargiulo, A. Patterson und J. Corrigan-Curay (2012). "NIH oversight of human gene transfer research involving retroviral, lentiviral, und adeno-associated virus vectors und the role of the NIH recombinant DNA advisory committee." Methods Enzymol **507**: 313-335.

Oh, S. B., S. W. Park, J. S. Chung, W. S. Lee, H. S. Lee, S. H. Cho, Y. S. Choi, S. N. Lim, H. J. Shin und g. Hematology Association of South-East Korea study (2017). "Therapeutic decision-making in elderly patients with acute myeloid leukemia: conventional intensive chemotherapy versus hypomethylating agent therapy." Ann Hematol.

Oliere, S., M. Arguello, T. Mesplede, V. Tumilasci, P. Nakhaei, D. Stojdl, N. Sonenberg, J. Bell und J. Hiscott (2008). "Vesicular stomatitis virus oncolysis of T lymphocytes requires cell cycle entry und translation initiation." J Virol **82**(12): 5735-5749.

Orlando, E. J., X. Han, C. Tribouley, P. A. Wood, R. J. Leary, M. Riester, J. E. Levine, M. Qayed, S. A. Grupp, M. Boyer, B. De Moerloose, E. R. Nemecek, H. Bittencourt, H. Hiramatsu, J. Buechner, S. M. Davies, M. R. Verneris, K. Nguyen, J. L. Brogdon, H. Bitter, M. Morrissey, P. Pierog, S. Pantano, J. A. Engelman und W. Winckler (2018). "Genetic mechanisms of target antigen loss in CAR19 therapy of acute lymphoblastic leukemia." Nat Med **24**(10): 1504-1506.

Patel, M. R., B. A. Jacobson, Y. Ji, J. Drees, S. Tang, K. Xiong, H. Wang, J. E. Prigge, A. S. Dash, A. K. Kratzke, E. Mesev, R. Etchison, M. J. Federspiel, S. J. Russell und R. A. Kratzke (2015). "Vesicular stomatitis virus expressing interferon-beta is oncolytic und promotes antitumor

immune responses in a syngeneic murine model of non-small cell lung cancer." Oncotarget **6**(32): 33165-33177.

Peng, J., S. Wang, W. Fan, S. Li, Y. Wu, X. Mou, J. Wang und X. Tong (2018). "Synergistic suppression effect on tumor growth of acute myeloid leukemia by combining cytarabine with an engineered oncolytic vaccinia virus." Onco Targets Ther **11**: 6887-6900.

Petrov, J. C., M. Wada, K. G. Pinz, L. E. Yan, K. H. Chen, X. Shuai, H. Liu, X. Chen, L. H. Leung, H. Salman, N. Hagag, F. Liu, X. Jiang und Y. Ma (2018). "Compound CAR T-cells as a double-pronged approach for treating acute myeloid leukemia." Leukemia **32**(6): 1317-1326.

Ping, Y., C. Liu und Y. Zhang (2018). "T-cell receptor-engineered T cells for cancer treatment: current status und future directions." Protein Cell **9**(3): 254-266.

Pistillo, M. P., P. L. Tazzari, G. L. Palmisano, I. Pierri, A. Bolognesi, F. Ferlito, P. Capanni, L. Polito, M. Ratta, S. Pileri, M. Piccioli, G. Basso, L. Rissotto, R. Conte, M. Gobbi, F. Stirpe und G. B. Ferrara (2003). "CTLA-4 is not restricted to the lymphoid cell lineage und can function as a target molecule for apoptosis induction of leukemic cells." Blood **101**(1): 202-209.

Pol, J., G. Kroemer und L. Galluzzi (2016). "First oncolytic virus approved for melanoma immunotherapy." Oncoimmunology **5**(1): e1115641.

Prevec, L. und G. F. Whitmore (1963). "Purification of Vesicular Stomatitis Virus und the Analysis of P32-Labeled Viral Components." Virology **20**: 464-471.

Pyzer, A. R., D. Stroopinsky, H. Rajabi, A. Washington, A. Tagde, M. Coll, J. Fung, M. P. Bryant, L. Cole, K. Palmer, P. Somaiya, R. Karp Leaf, M. Nahas, A. Apel, S. Jain, M. McMasters, L. Mendez, J. Levine, R. Joyce, J. Arnason, P. P. Pandolfi, D. Kufe, J. Rosenblatt und D. Avigan (2017). "MUC1-mediated induction of myeloid-derived suppressor cells in patients with acute myeloid leukemia." Blood **129**(13): 1791-1801.

Qiao, J., T. Kottke, C. Willmon, F. Galivo, P. Wongthida, R. M. Diaz, J. Thompson, P. Ryno, G. N. Barber, J. Chester, P. Selby, K. Harrington, A. Melcher und R. G. Vile (2008). "Purging metastases in lymphoid organs using a combination of antigen-nonspecific adoptive T cell therapy, oncolytic virotherapy und immunotherapy." Nat Med **14**(1): 37-44.

Qiao, J., H. Wang, T. Kottke, R. M. Diaz, C. Willmon, A. Hudacek, J. Thompson, K. Parato, J. Bell, J. Naik, J. Chester, P. Selby, K. Harrington, A. Melcher und R. G. Vile (2008). "Loading of oncolytic vesicular stomatitis virus onto antigen-specific T cells enhances the efficacy of adoptive T-cell therapy of tumors." Gene Ther **15**(8): 604-616.

Quiroz, E., N. Moreno, P. H. Peralta und R. B. Tesh (1988). "A human case of encephalitis associated with vesicular stomatitis virus (Indiana serotype) infection." Am J Trop Med Hyg **39**(3): 312-314.

Reed, L. J. und H. Muench (1938). "A SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER CENT ENDPOINTS12." American Journal of Epidemiology **27**(3): 493-497.

Ritchie, D. S., P. J. Neeson, A. Khot, S. Peinert, T. Tai, K. Tainton, K. Chen, M. Shin, D. M. Wall, D. Honemann, P. Gambell, D. A. Westerman, J. Haurat, J. A. Westwood, A. M. Scott, L.

Kravets, M. Dickinson, J. A. Trapani, M. J. Smyth, P. K. Darcy, M. H. Kershaw und H. M. Prince (2013). "Persistence und efficacy of second generation CAR T cell against the LeY antigen in acute myeloid leukemia." Mol Ther **21**(11): 2122-2129.

Rommelfanger, D. M., P. Wongthida, R. M. Diaz, K. M. Kaluza, J. M. Thompson, T. J. Kottke und R. G. Vile (2012). "Systemic combination virotherapy for melanoma with tumor antigen-expressing vesicular stomatitis virus und adoptive T-cell transfer." Cancer Res **72**(18): 4753-4764.

Rosenblat, T. L., M. R. McDevitt, D. A. Mulford, N. Pandit-Taskar, C. R. Divgi, K. S. Panageas, M. L. Heaney, S. Chanel, A. Morgenstern, G. Sgouros, S. M. Larson, D. A. Scheinberg und J. G. Jurcic (2010). "Sequential cytarabine und alpha-particle immunotherapy with bismuth-213-lintuzumab (HuM195) for acute myeloid leukemia." Clin Cancer Res **16**(21): 5303-5311.

Rudiger, T., E. Geissinger und H. K. Muller-Hermelink (2006). "'Normal counterparts' of nodal peripheral T-cell lymphoma." Hematol Oncol **24**(4): 175-180.

Russell, S. J., K. W. Peng und J. C. Bell (2012). "Oncolytic virotherapy." Nat Biotechnol **30**(7): 658-670.

Samudio, I., K. Rezvani, H. Shaim, E. Hofs, M. Ngom, L. Bu, G. Liu, J. T. Lee, S. Imren, V. Lam, G. F. Poon, M. Ghaedi, F. Takei, K. Humphries, W. Jia und G. Krystal (2016). "UV-inactivated HSV-1 potently activates NK cell killing of leukemic cells." Blood **127**(21): 2575-2586.

Shah, A., T. M. Andersson, B. Racht, M. Bjorkholm und P. C. Lambert (2013). "Survival und cure of acute myeloid leukaemia in England, 1971-2006: a population-based study." Br J Haematol **162**(4): 509-516.

Shen, M., Y. C. Linn und E. C. Ren (2016). "KIR-HLA profiling shows presence of higher frequencies of strong inhibitory KIR-ligands among prognostically poor risk AML patients." Immunogenetics **68**(2): 133-144.

Shen, W., M. M. Patnaik, A. Ruiz, S. J. Russell und K. W. Peng (2016). "Immunovirotherapy with vesicular stomatitis virus und PD-L1 blockade enhances therapeutic outcome in murine acute myeloid leukemia." Blood **127**(11): 1449-1458.

Shenghui, Z., H. Yixiang, W. Jianbo, Y. Kang, B. Laixi, Z. Yan und X. Xi (2011). "Elevated frequencies of CD4(+) CD25(+) CD127lo regulatory T cells is associated to poor prognosis in patients with acute myeloid leukemia." Int J Cancer **129**(6): 1373-1381.

Shimabukuro-Vornhagen, A., P. Godel, M. Subklewe, H. J. Stemmler, H. A. Schlosser, M. Schlaak, M. Kochanek, B. Boll und M. S. von Bergwelt-Baildon (2018). "Cytokine release syndrome." J Immunother Cancer **6**(1): 56.

Shinozaki, K., O. Ebert, A. Suriawinata, S. N. Thung und S. L. Woo (2005). "Prophylactic alpha interferon treatment increases the therapeutic index of oncolytic vesicular stomatitis virus virotherapy for advanced hepatocellular carcinoma in immune-competent rats." J Virol **79**(21): 13705-13713.

Sommermeier, D., M. Hudecek, P. L. Kosasih, T. Gogishvili, D. G. Maloney, C. J. Turtle und S. R. Riddell (2016). "Chimeric antigen receptor-modified T cells derived from defined CD8(+) und CD4(+) subsets confer superior antitumor reactivity in vivo." Leukemia **30**(2): 492-500.

Song, X., Y. Peng, X. Wang, Y. Chen, L. Jin, T. Yang, M. Qian, W. Ni, X. Tong und J. Lan (2018). "Incidence, Survival, und Risk Factors for Adults with Acute Myeloid Leukemia Not Otherwise Specified und Acute Myeloid Leukemia with Recurrent Genetic Abnormalities: Analysis of the Surveillance, Epidemiology, und End Results (SEER) Database, 2001-2013." Acta Haematol **139**(2): 115-127.

Stojdl, D. F., B. Lichty, S. Knowles, R. Marius, H. Atkins, N. Sonenberg und J. C. Bell (2000). "Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus." Nat Med **6**(7): 821-825.

Stone, R. M., S. J. Mandrekar, B. L. Sanford, K. Laumann, S. Geyer, C. D. Bloomfield, C. Thiede, T. W. Prior, K. Dohner, G. Marcucci, F. Lo-Coco, R. B. Klisovic, A. Wei, J. Sierra, M. A. Sanz, J. M. Brandwein, T. de Witte, D. Niederwieser, F. R. Appelbaum, B. C. Medeiros, M. S. Tallman, J. Krauter, R. F. Schlenk, A. Ganser, H. Serve, G. Ehninger, S. Amadori, R. A. Larson und H. Dohner (2017). "Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation." N Engl J Med **377**(5): 454-464.

Superti, F., L. Seganti, F. M. Ruggeri, A. Tinari, G. Donelli und N. Orsi (1987). "Entry pathway of vesicular stomatitis virus into different host cells." J Gen Virol **68 ( Pt 2)**: 387-399.

Szczepanski, M. J., M. Szajnik, M. Czystowska, M. Mandapathil, L. Strauss, A. Welsh, K. A. Foon, T. L. Whiteside und M. Boyiadzis (2009). "Increased frequency und suppression by regulatory T cells in patients with acute myelogenous leukemia." Clin Cancer Res **15**(10): 3325-3332.

Tan, H., J. Derrick, J. Hong, C. Sanda, W. M. Grosse, H. J. Edenberg, M. Taylor, S. Seiwert und L. M. Blatt (2005). "Global transcriptional profiling demonstrates the combination of type I und type II interferon enhances antiviral und immune responses at clinically relevant doses." J Interferon Cytokine Res **25**(10): 632-649.

Tan, J., S. Chen, Y. Lu, D. Yao, L. Xu, Y. Zhang, L. Yang, J. Chen, J. Lai, Z. Yu, K. Zhu und Y. Li (2017). "Higher PD-1 expression concurrent with exhausted CD8+ T cells in patients with de novo acute myeloid leukemia." Chin J Cancer Res **29**(5): 463-470.

Tasian, S. K. (2018). "Acute myeloid leukemia chimeric antigen receptor T-cell immunotherapy: how far up the road have we traveled?" Ther Adv Hematol **9**(6): 135-148.

Tasian, S. K., S. S. Kenderian, F. Shen, M. Ruella, O. Shestova, M. Kozlowski, Y. Li, A. Schrank-Hacker, J. J. D. Morrisette, M. Carroll, C. H. June, S. A. Grupp und S. Gill (2017). "Optimized depletion of chimeric antigen receptor T cells in murine xenograft models of human acute myeloid leukemia." Blood **129**(17): 2395-2407.

Tawara, I., S. Kageyama, Y. Miyahara, H. Fujiwara, T. Nishida, Y. Akatsuka, H. Ikeda, K. Tanimoto, S. Terakura, M. Murata, Y. Inaguma, M. Masuya, N. Inoue, T. Kidokoro, S. Okamoto, D. Tomura, H. Chono, I. Nukaya, J. Mineno, T. Naoe, N. Emi, M. Yasukawa, N.

Katayama und H. Shiku (2017). "Safety und persistence of WT1-specific T-cell receptor gene-transduced lymphocytes in patients with AML und MDS." Blood **130**(18): 1985-1994.

Tong, Y., L. You, H. Liu, L. Li, H. Meng, Q. Qian und W. Qian (2013). "Potent antitumor activity of oncolytic adenovirus expressing Beclin-1 via induction of autophagic cell death in leukemia." Oncotarget **4**(6): 860-874.

Van Tendeloo, V. F., A. Van de Velde, A. Van Driessche, N. Cools, S. Anguille, K. Ladell, E. Gostick, K. Vermeulen, K. Pieters, G. Nijs, B. Stein, E. L. Smits, W. A. Schroyens, A. P. Gadisseur, I. Vrelust, P. G. Jorens, H. Goossens, I. J. de Vries, D. A. Price, Y. Oji, Y. Oka, H. Sugiyama und Z. N. Berneman (2010). "Induction of complete und molecular remissions in acute myeloid leukemia by Wilms' tumor 1 antigen-targeted dendritic cell vaccination." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(31): 13824-13829.

VanSeggelen, H., D. G. Tantalò, A. Afsahi, J. A. Hammill und J. L. Bramson (2015). "Chimeric antigen receptor-engineered T cells as oncolytic virus carriers." Mol Ther Oncolytics **2**: 15014.

Villadangos, J. A. (2016). "Antigen-specific impairment of adoptive T-cell therapy against cancer: players, mechanisms, solutions und a hypothesis." Immunol Rev **272**(1): 169-182.

Visani, G., F. Ferrara, F. Di Raimondo, F. Loscocco, F. Fuligni, S. Paolini, V. Zammit, E. Spina, M. Rocchi, A. Visani, P. P. Piccaluga und A. Isidori (2017). "Low-dose lenalidomide plus cytarabine in very elderly, unfit acute myeloid leukemia patients: Final result of a phase II study." Leuk Res **62**: 77-83.

Wang, Q. S., Y. Wang, H. Y. Lv, Q. W. Han, H. Fan, B. Guo, L. L. Wang und W. D. Han (2015). "Treatment of CD33-directed chimeric antigen receptor-modified T cells in one patient with relapsed und refractory acute myeloid leukemia." Mol Ther **23**(1): 184-191.

Wei, X., L. Liu, G. Wang, W. Li, K. Xu, H. Qi, H. Liu, J. Shen, Z. Li und J. Shao (2015). "Potent antitumor activity of the Ad5/11 chimeric oncolytic adenovirus combined with interleukin-24 for acute myeloid leukemia via induction of apoptosis." Oncol Rep **33**(1): 111-118.

Weisberg, E., C. Boulton, L. M. Kelly, P. Manley, D. Fabbro, T. Meyer, D. G. Gilliland und J. D. Griffin (2002). "Inhibition of mutant FLT3 receptors in leukemia cells by the small molecule tyrosine kinase inhibitor PKC412." Cancer Cell **1**(5): 433-443.

Wongthida, P., R. M. Diaz, C. Pulido, D. Rommelfanger, F. Galivo, K. Kaluza, T. Kottke, J. Thompson, A. Melcher und R. Vile (2011). "Activating systemic T-cell immunity against self tumor antigens to support oncolytic virotherapy with vesicular stomatitis virus." Hum Gene Ther **22**(11): 1343-1353.

Wu, L., T. G. Huang, M. Meseck, J. Altomonte, O. Ebert, K. Shinozaki, A. Garcia-Sastre, J. Fallon, J. Mandeli und S. L. Woo (2008). "rVSV(M Delta 51)-M3 is an effective und safe oncolytic virus for cancer therapy." Hum Gene Ther **19**(6): 635-647.

Xue, S. A., L. Gao, S. Thomas, D. P. Hart, J. Z. Xue, R. Gillmore, R. H. Voss, E. Morris und H. J. Stauss (2010). "Development of a Wilms' tumor antigen-specific T-cell receptor for clinical

trials: engineered patient's T cells can eliminate autologous leukemia blasts in NOD/SCID mice." Haematologica **95**(1): 126-134.

Yang, D., X. Zhang, X. Zhang und Y. Xu (2017). "The progress und current status of immunotherapy in acute myeloid leukemia." Ann Hematol **96**(12): 1965-1982.

Yang, H., C. Bueso-Ramos, C. DiNardo, M. R. Estecio, M. Davanlou, Q. R. Geng, Z. Fang, M. Nguyen, S. Pierce, Y. Wei, S. Parmar, J. Cortes, H. Kantarjian und G. Garcia-Manero (2014). "Expression of PD-L1, PD-L2, PD-1 und CTLA4 in myelodysplastic syndromes is enhanced by treatment with hypomethylating agents." Leukemia **28**(6): 1280-1288.

Yusufi, N., S. Mall, H. O. Bianchi, K. Steiger, S. Reder, R. Klar, S. Audehm, M. Mustafa, S. Nekolla, C. Peschel, M. Schwaiger, A. M. Krackhardt und C. D'Alessandria (2017). "In-depth Characterization of a TCR-specific Tracer for Sensitive Detection of Tumor-directed Transgenic T Cells by Immuno-PET." Theranostics **7**(9): 2402-2416.

Zhang, B. L., D. Y. Qin, Z. M. Mo, Y. Li, W. Wei, Y. S. Wang, W. Wang und Y. Q. Wei (2016). "Hurdles of CAR-T cell-based cancer immunotherapy directed against solid tumors." Sci China Life Sci **59**(4): 340-348.

## 9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich noch bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen der Dissertation beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Oliver Ebert, der erst ermöglichte, dass ich dieses großartige Projekt bearbeiten konnte. Ich möchte PD Dr. rer. nat. Jennifer Altomonte nennen, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Weiterhin gilt Univ.-Prof. Dr. med. Angela Krackhardt mein besonderer Dank für stets konstruktive Kritik und gute Ratschläge für Verbesserungen. Allen drei genannten Personen danke ich für die Konzeption und Supervision dieses Projektes.

Univ.-Prof. Dr. med. Roland Schmid gilt mein Dank dafür, dass ich die Arbeit in seiner Abteilung durchführen durfte.

Dr. rer. nat. Sabine Mall gilt besonderer Dank für die fortwährende Unterstützung des T-Zell-Teiles der Arbeit. Dr. med. Lisa Zeitlinger gilt es, für all die geleisteten Vorarbeiten zu erwähnen.

Mein Dank geht auch an Henrique Bianchi, der sich stets kompetent um die Mausezüchtung gekümmert hat.

Weiter geht mein Dank an meinen Kollegen und Freund Arturo Lopez-Martinez für stete Unterstützung und gute Gespräche. Ein weiterer Dank geht an meine Kolleginnen Teresa Krabbe und Melanie Jäkel aus der AG Altomonte für ihre Unterstützung.

Ein großer Dank geht an Dr. rer. nat. Bastian Höchst, der sich stets bereit erklärte mir beim T-Zell-Sorting mit seinem Sony-Sorter zu helfen. Ein weiterer Dank geht an Markus Utzt und Univ.-Prof. Dr. med. Ruland aus der AG Ruland, die mir ebenfalls beim T-Zell-Sorting halfen. Auch PD Dr. Martina Anton war von großer Hilfe bei der Benutzung eines Plattenlesegerätes. Ebenso unterstützte mich Andreas Blaschke bei der Einweisung in sein Plattenlesegerät.

Ein ganz großer Dank gilt all den Blutspendern, die sich bereitwillig zur Verfügung gestellt haben, dieses Projekt mit ihrem Blut zu unterstützen.

Auch all meinen Freunden, besonders Anna Fichtl und Markus Perl, die mir stets mit einem guten Rat zur Seite standen, möchte ich danken.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie und besonders meinen Eltern dafür danken, dass sie mich stark unterstützt haben und mir das Durchführen dieser Arbeit überhaupt erst ermöglichten.