

Wahr sind nur die Gedanken, die sich selber nicht verstehen.

(Theodor W. Adorno)

**T-Zellen mit rekombinanten Immunrezeptoren
lysieren autologe Tumorzellen
und eliminieren Tumore
durch gezielte Eradikation von Tumorstammzellen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Patrick Schmidt aus Wolmirstedt

Köln, August 2008

Berichterstatter: Prof. Dr. Jonathan Howard

Prof. Dr. Hinrich Abken

Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. Siegfried Roth

Tag der Disputation: 15. Oktober 2008

Abstract

Adoptive immunotherapy of cancer by redirected T cells makes use of retroviral expression of recombinant T cell receptors (immunoreceptors) which bind to “tumor associated antigens” and activate engineered T cells. The concept is based on the assumption that T cells of the cancer patient can be specifically activated whereas progression of the disease is frequently associated with increasing anergy of the T cell compartment. We here challenged the hypothesis using B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) as model, a disease which still is incurable and is associated with high risk of relapse. We here demonstrate that anergy of naive cytolytic T cells from B-CLL patients can be overcome by expression of an antibody-derived immunoreceptor which targets CD19 on CLL cells and activates T cells by CD3 ζ signaling. Tumor cell lysis is executed by granzyme/perforin independently of Fas or TNF- α . Specific T cell activation, but not the cytolytic capacity, is increased by CD28 costimulation provided by a combined CD28-CD3 ζ signaling immunoreceptor. Data demonstrate that naive T cells from patients even in advanced stages of the disease can be induced to break tumor tolerance and to eliminate autologous B-CLL cells. These and nearly all other current strategies in cancer therapy, however, operate under the assumption that all cancer cells have equal malignant capacities. The “cancer stem cell” (CSC) hypothesis is presently the appealing paradigm to explain tumor growth driven by a minority of cells, the CSC pool, which has acquired self-renewing capacities, differentiation into phenotypically heterogeneous, although aberrant, progeny cells, and the ability to form metastases. Using melanoma as a model we here identified a small subpopulation of melanoma originating cells which fulfill the criteria of self-renewal and induction of heterogeneous melanomas upon serial transplantation. Targeted selective elimination of these cells from the tumor cell pool by redirected cytolytic T cells eradicates established melanoma lesions in vivo although these cells constitute less than 0.1% of melanoma cells. Upon CSC elimination, the mass of tumor cells subsequently enters apoptosis by a so far not identified mechanism. While these findings establish that targeted elimination of the small number of CSCs eradicates cancer, they moreover suggest to re-examine current therapeutic strategies and drug development paradigms in the treatment of cancer.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Die Tumorstammzellhypothese.....	2
1.2 Die adoptive Immuntherapie.....	3
1.3 Rekombinante Immunrezeptoren: Strategie, Struktur und Anwendung.....	6
1.4 Zielsetzung.....	11
2 Material & Methoden.....	12
2.1 Materialien.....	12
2.1.1 Stammlösungen und Puffer.....	12
2.1.2 Lösungen und Puffer für die Gelelektrophorese.....	12
2.1.3 Größenmarker für die DNA-Gelelektrophorese.....	13
2.1.4 Puffer und Säulen für den Auto-MACS™.....	13
2.1.5 Medien für Bakterienkultur und Medienzusätze.....	14
2.1.6 Bakterienstämme.....	14
2.1.7 Zelllinien und primäre Zellen.....	15
2.1.8 Medien für die Zellkultur und Medienzusätze.....	17
2.1.9 Antikörper, Antikörpercocktails, Antiseren und Zytokine.....	18
2.1.9.1 Primärantikörper.....	18
2.1.9.2 Konjugierte Sekundärantikörper.....	19
2.1.10 Auto-MACS™ Antikörpercocktails.....	22
2.1.11 Antiseren.....	22
2.1.12 Sonstige Proteine und Reagenzien.....	22
2.1.13 Restriktionsendonukleasen und Restriktionspuffer.....	23
2.1.14 Oligonukleotide.....	24

2.1.15 Vektoren.....	25
2.2 Methoden	26
2.2.1 Präparation von Plasmid-DNA.....	26
2.2.1.1 Midi-Präparation von Plasmid DNA durch Bindung an eine Anionenaustauscher-Säule	26
2.2.1.2 Schnellpräparation von Plasmid-DNA nach der Koch(boiling)- Methode.....	27
2.2.1.3 Ethanolfällung.....	28
2.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	28
2.2.2.1 Photometrische Bestimmung.....	28
2.2.2.2 Mengenabschätzung im Agarosegel im Vergleich zu Markerbanden.....	29
2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	29
2.2.4 DNA-Sequenzierung nach der Kettenabbruch-Methode.....	31
2.2.5 Native Agarose-Gelelektrophorese.....	32
2.2.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose durch Bindung an Siliciumpartikel.....	32
2.2.7 Enzymatische Reaktionen mit doppelsträngiger DNA.....	34
2.2.7.1 Spaltung der doppelsträngigen DNA durch Restriktionsendonukleasen.....	34
2.2.7.2 Ligation von DNA-Doppelsträngen mit überlappenden kohäsiven Enden durch T4-DNA-Ligase.....	34
2.2.8 Bakterienkultur.....	35
2.2.8.1 Herstellung kompetenter E.coli DH5 α Bakterien.....	35
2.2.8.2 Transformation chemokompetenter E.coli Bakterien.....	36
2.2.9 Zellkultur.....	36
2.2.9.1 Allgemeine Kulturbedingungen.....	36
2.2.9.2 „Splitten“ adhärenter Zellkulturen.....	37
2.2.9.3 Separation von peripheren Blutlymphozyten (PBL) mittels Dichtezentrifugation.....	37
2.2.9.4 Anreicherung verschiedener humaner Zellen mittels	

magnetischer Zellsortierung (MACS®).....	38
2.2.9.4.1 Selektion humaner HMW-MAA ⁺ Melanomzellen.....	38
2.2.9.4.2 Depletion humaner CD3 ⁺ T-Lymphozyten.....	39
2.2.10 Retroviraler Gentransfer.....	40
2.2.10.1 Aktivierung humaner T-Lymphozyten.....	40
2.2.10.2 Ko-Transfektion von 293T-Zellen.....	40
2.2.10.3 Retrovirale Transduktion humaner T-Zellen.....	41
2.2.11 Antigen-spezifische Aktivierung der mit rekombinanten Rezeptoren ausgestatteten T-Zellen.....	42
2.2.12 Enzym-gekoppelter Immunadsorbanttest (ELISA).....	42
2.2.13 XTT-basierender Zytotoxizitätstest	44
2.2.14 Immunfluoreszenz (FACS)-Analysen.....	45
2.2.15 Kryokonservierung von Zellen.....	46
2.2.16 Mäusversuche.....	46
2.2.17 Tumorpräparationen.....	46
2.2.18 Herstellung von Gewebeschnitten.....	47
2.2.19 Immunfluoreszenz.....	47
3 Ergebnisse.....	49
3.1 Generierung der Immunrezeptoren mit Spezifität für CD19	49
3.1.1 Klonierung des rekombinanten Immunrezeptors #941.....	49
3.1.2 Klonierung des rekombinanten Immunrezeptors #942.....	51
3.2 Funktionelle Charakterisierung der Immunrezeptoren mit Spezifität für CD19	53
3.2.1 Expression der Immunrezeptoren #941 und #942 in T-Zellen eines CLL-Patienten.....	53
3.2.2 Aktivierung humaner T-Lymphozyten mit anti-CD19 spezifischen Immunrezeptoren durch CD19 ⁺ -Zelllinien.....	56
3.2.3 Spezifische Aktivierung von anti-CD19 T-Lymphozyten durch CLL- Zellen.....	59
3.2.4 Spezifische Aktivierung von T-Lymphozyten mit anti-CD19	

Immunrezeptor gegen autologe CLL-Zellen.....	61
3.2.5 T-Lymphozyten mit anti-CD19 Immunrezeptor lysieren ihre Zielzellen durch Granzym / Perforin.....	63
3.3 Funktionelle Charakterisierung der anti-Melanom Immunrezeptoren #570 und #579 in vitro.....	65
3.3.1 Expression der anti-Melanom Immunrezeptoren in T-Lymphozyten von Melanom-Patienten.....	65
3.3.2 Analyse der Expression der Antigene HMW-MAA und p97 auf Melanomzellen.....	67
3.3.3 Spezifische Aktivierung von T-Lymphozyten mit rekombinanten Immunrezeptoren gegen allogene, primäre Melanomzellen.....	69
3.3.4 Spezifische Aktivierung von rekombinanten T-Lymphozyten gegen autologe, primäre Melanomzellen.....	71
3.3.5 Inhibition von XIAP sensitiviert Melanomzellen für die T-Zell vermittelte Lyse.....	74
3.4 Funktionelle Charakterisierung der rekombinanten Immunrezeptoren #570 und #579 in vivo.....	76
3.4.1 Eliminierung von primären Melanomzellen in vivo durch allogene T- Lymphozyten mit anti-Melanom Immunrezeptoren.....	76
3.4.2 Eliminierung von primären Melanomzellen in vivo durch autologe T- Lymphozyten mit anti-Melanom Immunrezeptoren.....	79
3.5 Identifikation von HMW-MAA+ Melanomzellen als Fraktion mit Tumorstammzellen.....	81
3.5.1 HMW-MAA ⁺ Melanomzellen exprimieren Tumorstammzell-Marker	81
3.5.2 Aufgereinigte HMW-MAA ⁺ -Melanomzellen induzieren Tumore mit heterogener HMW-MAA Expression nach serieller Transplantation.....	84
3.6 Spezifische Aktivierung von T-Lymphozyten mit rekombinanten Immunrezeptoren gegen Tumorstammzellen.....	87

3.6.1 Apoptose-Induktion in HMW-MAA- Tumorzellen nach Eliminierung von HMW-MAA ⁺ Melanomzellen.....	87
3.6.2 Generierung des CD20-spezifischen Immunrezeptor pBullet-Leu16scFv-hFc-CD3 ζ (#1115).....	90
3.6.3 Spezifische Aktivierung des Immunrezeptors #1115 gegen CD20-positive Zelllinien.....	92
3.6.4 Eliminierung von Melanomstammzellen führt zur Reduktion der Tumormasse.....	94
4 Diskussion.....	96
5 Zusammenfassung.....	107
6 Anhang.....	109
6.1 Sequenz des Immunrezeptors pBullet-antiCD19scFv-hFc-CD3 ζ (#941).....	109
6.2 Sequenz des Immunrezeptors pBullet-antiCD19scFv-hFc-CD28-CD3 ζ (#942).....	111
6.3 Sequenz des Immunrezeptors pBullet-antiCD20scFv-hFc-CD3 ζ (#1115).....	113
7 Abkürzungsverzeichnis.....	116
8 Literaturverzeichnis.....	119

1 Einleitung

Die steigende Inzidenz maligner Tumorerkrankungen sowie das häufige Versagen etablierter Behandlungsschemata bei Rezidiven machen es notwendig, grundlegend neue Therapieformen zu entwickeln.

Dieses wird besonders deutlich bei der Behandlung der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL), die häufigste Leukämieform der westlichen Hemisphäre mit beständig steigender Inzidenz. Die CLL ist bisher nicht heilbar. Der Therapie im frühen Stadium (Binet A) der Krankheit beschränkt sich wegen des langsamen progredienten Verlaufs der Leukämie auf ein kontrolliertes Abwarten („watch and wait“). In späteren Stadien finden Zytostatikakombinationen, therapeutische Antikörpergaben und Knochenmarkstransplantationen Anwendung (Wierda *et al.* 2005; Montillo *et al.* 2006; Eichhorst *et al.* 2006). Durch diese Therapien kann in den Patienten eine partielle Remission erreicht und die Lebensqualität der Patienten deutlich erhöht werden. Nichtsdestotrotz ist das Risiko eines Rezidivs sogar in Patienten mit kompletter Remission sehr hoch (Zenz *et al.* 2006).

Ein weiteres Beispiel ist die Behandlung des malignen Melanoms. Sie erfolgt primär durch die Exzision des Tumorgewebes und benachbarter Lymphknoten, gefolgt von immunstimulierenden Medikamenten wie Interferon alpha. Das Melanom ist der Chemotherapie schlecht zugänglich, da es eine hohe Resistenz gegen viele zytostatische Medikamente aufweist (Schadendorf *et al.*, 1994), was möglicherweise auf intrazelluläre Resistenzmechanismen bei der Apoptoseregulation zurückzuführen ist (Serrone and Hersey, 1999). Die Metastasierung erfolgt oft in frühen Stadien und kann noch 10-40 Jahre nach Exzision des Primärtumors zum Rezidiv der Krankheit führen. Grund dafür sind möglicherweise sogenannte „schlafende Tumorzellen“, die als Mikrometastasen im Körper persistieren, aber noch nicht zu nachweisbaren Metastasen herangewachsen sind. Mikrometastasen von Melanomen sind schlecht

vaskularisiert und haben eine niedrige Proliferations- und Apoptoserate (Barnhill *et al.* 1998), was eine lange Persistenz dieser Zellen ohne erkennbares Tumorwachstum für lange Zeit ermöglicht.

1.1 Die Tumorstammzellhypothese

Die derzeitigen Therapieoptionen beruhen auf der Annahme, dass sich ein Tumor aus einer homogenen Masse von malignen Zellen zusammensetzt. Im Vordergrund steht die Vernichtung möglichst aller Zellen. Das Auftreten von Rezidiven nach kompletter Remission und das Vorhandensein von Zytostatika- und Strahlentherapie-resistenten Tumorzellen, aus denen erneut homogene Metastasen entstehen können, spricht für die Annahme, dass das Tumorwachstum von einer kleinen Subpopulation von Zellen, den sogenannten Tumorstammzellen, ausgeht. Erstmals beschrieben von Bonet & Dick (1995) für die akute myeloische Leukämie, gibt es mittlerweile viele Hinweise für die Existenz von Tumorstammzellen auch in soliden Tumoren. Für das maligne Melanom (Fang *et al.* 2005), das Mammakarzinom (Al-Hajj *et al.* 2003), das Pankreaskarzinom (Hermann *et al.* 2007) und im Neuroblastom (Singh *et al.* 2003) wurden tumor-initiiierende Stammzellen identifiziert. Diese Zellen sind charakterisiert durch die Möglichkeit der Selbsterneuerung (self-renewal) und der Differenzierung in heterogene Zelltypen durch asymmetrische Teilung. Sie können in geringer Zahl in immundefizienten Mäusen Tumore auslösen (Reya *et al.* 2001). Ferner sind die Tumorstammzellen weitgehend resistent gegenüber Zytostika und Strahlentherapie.

Für die Eliminierung eines Tumors ist es möglicherweise notwendig, die Tumorstammzellen zu zerstören. Vermutlich steuern diese Zellen das Tumorwachstum und die Vaskularisierung durch Differenzierung in entsprechende Vorläuferzellen. Es wird angenommen, dass nach Vernichtung der Tumorstammzellen, die übrigen Tumorzellen keine extrinsischen oder intrinsischen Überlebenssignale mehr bekommen und in Folge dessen nachfolgend absterben. Mathematische Modelle sagen der Behandlung von

Tumorstammzellen eine größere therapeutische Effizienz voraus als bisherige, konservative Therapiemethoden (Dingli & Michor, 2006). Ein experimenteller Nachweis dieser Annahmen ist bislang aber nicht unternommen worden.

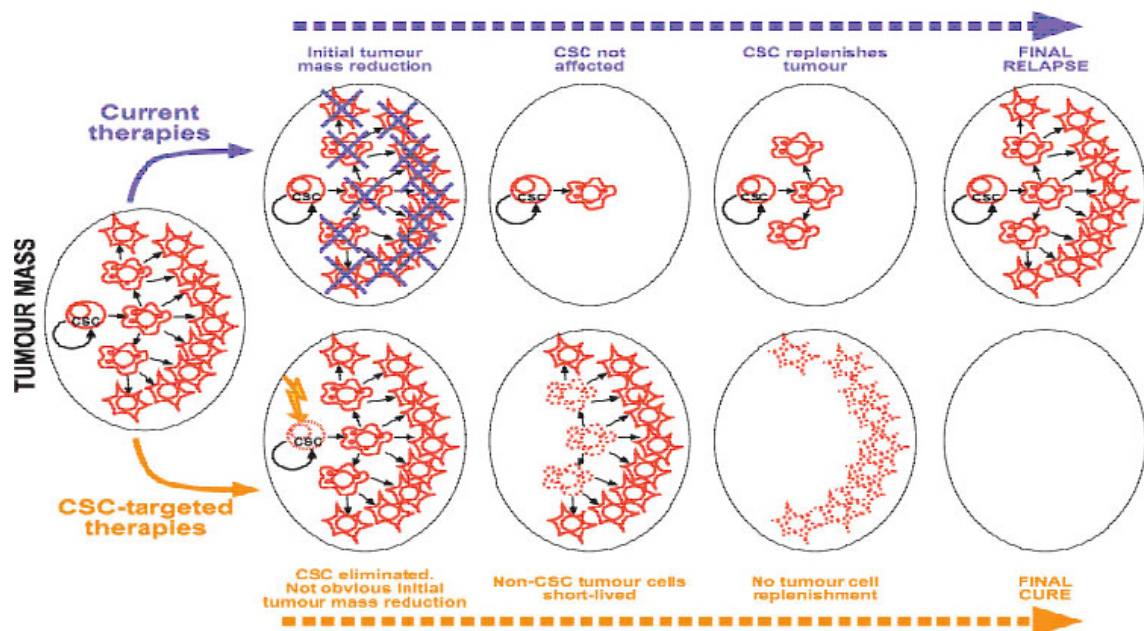


Abbildung 1: Vergleichende Strategien zur Tumorthherapie nach Reya et al. (2001)

Bisherige Therapien fokussieren auf die Vernichtung der homogenen Tumormasse, betreffen aber nicht die Tumorstammzellen, die nachfolgend ein erneutes Tumorstadium initiieren (obere Reihe). Die spezifische Eliminierung von Tumorstammzellen führt in erster Linie nicht zu einer sichtbaren Reduktion der Tumormasse, aber nachfolgend zum dauerhaften Absterben der Tumorzellen aufgrund fehlender Überlebenssignale (untere Reihe).

1.2 Die adoptive Immuntherapie

Aufgrund fortschreitender Erkenntnisse und technischer Möglichkeiten in der Immunologie und Onkologie werden für die Therapie von Tumorerkrankungen zunehmend adoptive Immuntherapiestrategien entwickelt. Ziel der adoptiven Immuntherapie ist es, den T-Zellen von Patienten Spezifität für ein

Tumorantigen zur Auslösung einer spezifischen Immunantwort zu verleihen. Hierbei werden Mechanismen des Immunsystems zur Eliminierung von definierten Zielzellen ausgenutzt. Antikörper basierte Ansätze sind dabei von Strategien, die auf der Verwendung antigenspezifischer T-Lymphozyten basieren, zu unterscheiden.

Mit der Entwicklung der Hybridomtechnik wurde die Herstellung monoklonaler Antikörper in großem Maßstab ermöglicht. Diese bieten gegenüber chemotherapeutischen Therapieformen den Vorteil, dass sie Antigene spezifisch binden und dadurch selektiv gegen eine definierte Zielstruktur gerichtet sind. Werden einige monoklonale Antikörper gegen Tumor-assoziierte Antigene gerichtet, tragen sie zur Zerstörung von Tumorzellen durch endogene Mechanismen des Immunsystems bei. Dieses ist jedoch auf bisher wenige Antikörper beschränkt (Ceze et al. 2007). Eingesetzt werden monoklonale Antikörper als therapeutisch wirksame Agenzien oder als Trägermoleküle, die zytotoxisch wirksame Substanzen, z.B. eine Strahlenquelle oder Toxine, gezielt zu malignen Zellen transportieren. Die therapeutische Anwendung monoklonaler Antikörper in vivo ist jedoch limitiert durch geringe Halbwertszeit, unzureichende Gewebepenetration, zu schwache Immunstimulierung und die häufige Reaktivität mit Normalgewebe (Pavoni et al., 2006).

Aus Tumorgeweben gewonnene Tumor infiltrierende Lymphozyten (TIL) besitzen im Gegensatz zu monoklonalen Antikörpern die Fähigkeit der aktiven Gewebepenetration. Nach adoptivem Transfer in den Tumorpatienten können autologe TIL eine anti-Tumor Reaktion unterhalten, die zu einer lang andauernden Induktion einer komplexen Immunreaktion mit zytolytischer Aktivität gegenüber Tumorzellen führt (Rosenberg et al., 1996, 2008)

Der therapeutische Einsatz von TIL ist jedoch begrenzt aufgrund der aufwändigen Präparation aus Tumorbiopsien, der meist geringen Zellausbeute und der geringen zytolytischen Aktivität der gewonnenen T-Zellen. Protokolle für Stimulation und Kultivierung von tumorspezifischen TIL wurden stetig verbessert (Dudley et al., 2003). In einer klinischen Studie führte die Kombinationstherapie von TIL mit hoch dosiertem IL-2 bei über 50% der

Patienten mit metastasierendem Myelom nach Chemotherapie bedingter Lymphodepletion zu partieller oder vollständiger Rückbildung des Tumors (Dudley et al., 2005). Die dabei verabreichten TIL besaßen unbekannte Spezifitäten gegen den Tumor. Wünschenswert wären jedoch T-Zellen mit definierter Spezifität um eine unerwünschte Auto-Reaktivität der applizierten T-Zellen zu vermeiden.

Die Spezifität der T-Zelle wird durch den T-Zell Rezeptor vermittelt, DNA Transfertechniken ermöglichen die transgene Expression eines rekombinanten T-Zell Rezeptors in T-Lymphozyten, so dass diese Rezeptoren mit Spezifität für ein definiertes Tumorantigen exprimieren. So wurde aus den TIL von Patienten mit NY-ESO-1+ Tumoren DNA isoliert, welche die TCR α und β Kette mit Spezifität für das NY-ESO-1 Antigen kodiert. Mit dieser DNA transduzierte T-Zellen exprimieren den rekombinanten TCR, binden NY-ESO-1 und sind in vitro gegen Tumorzellen mit MHC präsentem NY-ESO-1 zytolytisch wirksam (Zhao et al., 2005). Bei dieser Strategie aber können Heterodimere aus den endogenen α, β TCR-Ketten mit den transgenen α, β TCR-Ketten entstehen, so dass ungewünschte oder irrelevante Spezifitäten der genetisch veränderten T-Zellen sowie eine mögliche Autoaggression auftreten können (Willemsen et al., 2000). Ein Nachteil dieses Verfahrens ist ferner das zeitintensive und doch nicht immer erfolgreiche Auffinden von anti-Tumor reaktiven TIL mit definierter Spezifität (Yazdi et al., 2006).

Ein grundsätzliches Problem bei der Verwendung von TCR basierten Rezeptoren stellt die MHC Abhängigkeit des T-Zell Rezeptors in der Antigenerkennung dar. In Tumorzellen ist die MHC Präsentation oft dysreguliert, z.B. durch Defekte in der Antigen-Prozessierung oder in Transportproteinen (Seliger *et al.* 1997). Tumorzellen können deshalb durch TCR modifizierte T-Zellen häufig nicht erkannt werden (Garcia-Lora et al., 2003). Zahlreiche Tumorzellen exprimieren Kohlenhydrat- und Glykolipidstrukturen, die nicht über MHC Komplexe präsentiert werden und somit ebenfalls von TCR basierten Rezeptoren nicht als Zielstrukturen erkannt werden.

Ein viel versprechender Ansatz der Lösung dieser Beschränkung ist der Einsatz Antikörper basierter Immunrezeptoren zur Generierung von T-Zellen definierter Spezifität.

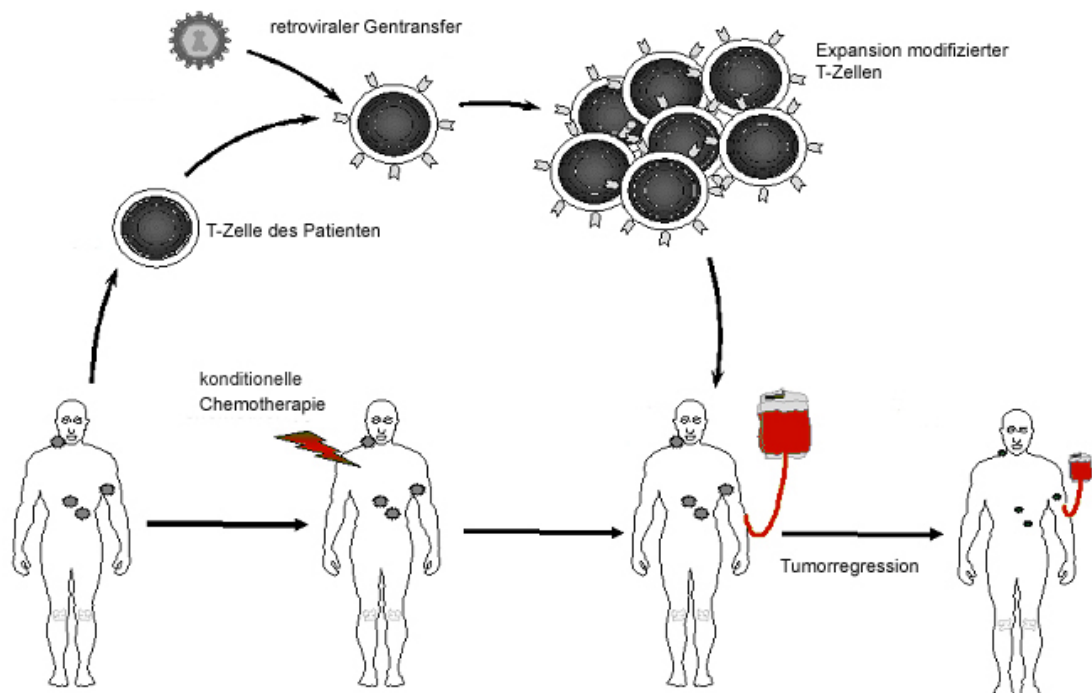


Abbildung 2: Das Prinzip der adoptiven Immuntherapie im Überblick. T-Zellen aus Tumorpatienten soll mittels retroviralem Gentransfer eine Spezifität gegen autologe Tumorzellen verliehen werden. Nach konditionierender Chemotherapie sollen die re-infundierten, modifizierten T-Zellen im Patienten zu einer Tumorregression führen.

1.3 Rekombinante Immunrezeptoren: Strategie, Struktur und Anwendung

Zur Überwindung der beschriebenen Nachteile der TCR basierten Strategien wurde ein Konzept zur Ausstattung von T-Zellen mit Antikörper-abgeleiteten, MHC unabhängigen rekombinanten Immunrezeptoren entwickelt. Genutzt wird dabei die Eigenschaft eines monoklonalen Antikörpers zur spezifischen Bindung eines definierten Epitops verbunden mit Funktionen der intrazellulären

(ko)stimulatorischen Signalkette(n) von T-Zellen zur Induktion und Modulation einer effizienten Immunantwort. Solche Antikörper basierten rekombinanten Immunrezeptoren bestehen aus einer Antigen bindenden Domäne aus dem Einzelkettenfragment (scFv) eines monoklonalen Antikörpers, die über eine extrazelluläre „Spacer“-Region mit der intrazellulären Signaldomäne, meist der CD3 ζ -Signalkette, verbunden ist (Abb. 3). Die CD3 ζ Signalkette kann mit einer kostimulatorischen Signaldomäne verknüpft werden, so dass nach Antigenbindung sowohl das CD3 ζ als auch das kostimulatorische Signal erfolgt. Nach diesem Schema wurde eine Vielzahl von rekombinanten Immunrezeptoren konstruiert, deren Funktionalität *in vitro* nachgewiesen wurde (Hombach *et al.* 2002).

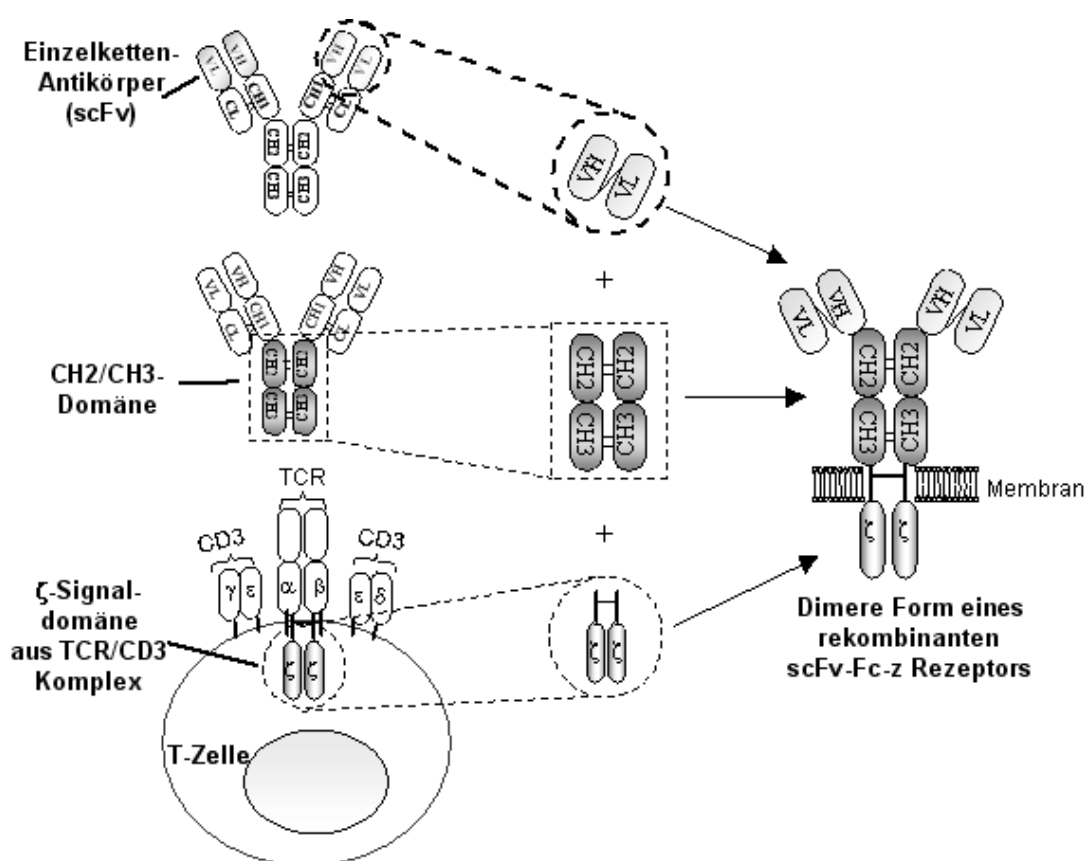


Abbildung 3: Schematischer Aufbau eines rekombinanten Antikörper basierten Immunrezeptors. Die Antigen bindende Domäne des Rezeptors besteht aus dem rekombinanten Einzelkettenfragment (scFv) eines monoklonalen Antikörpers mit Spezifität für

ein Tumor assoziiertes Antigen. Diese ist durch den stabilisierenden konstanten Fc-Teil (CH2/CH3) eines humanen IgG1 mit der transmembranen und intrazellulären CD3 ζ Kette des TCR/CD3 Komplexes verbunden.

Zur Generierung rekombinanter Immunrezeptoren mit MHC unabhängiger Antigenerkennung werden TAA spezifische Einzelkettenfragmente aus variablen Regionen der schweren (VH) und der leichten (VL) Kette eines monoklonalen Antikörpers verwendet, die durch einen flexiblen Gly4Ser3-Linker verbunden sind. Mit Hilfe von phage-display Bibliotheken wurde eine Reihe dieser TAA spezifischen Antikörperfragmente isoliert. Das Einfügen einer konstanten IgG1-(CH2/CH3)-Gelenkregion zwischen Antigen bindendem scFv und Signaldomäne führt zu stabilerer Expression des Immunrezeptors auf der Zelloberfläche und stärkeren Signalgenerierung durch Rezeptorquervernetzung (Moritz und Groner, 1995; Hombach et al., 2000). Zudem verleiht dieser „Spacer“ dem Rezeptormolekül eine höhere Flexibilität zur Bindung der jeweiligen Epitope. Die IgG1 Domäne ist außerdem zur Detektion der Rezeptoren auf der Zelloberfläche verwendbar.

Bindung des Rezeptors an Antigen resultiert in intrazellulärer Aktivierung der T-Zelle, deren Ausmaß unmittelbar von der Signaltransduktionskette des Rezeptors abhängt (Haynes et al., 2001). Vorzugsweise wird die endogene CD3 ζ Kette des TCR Komplexes als Aktivierungsdomäne eingesetzt, da sie über drei immunoreceptor tyrosine-based activation motifs (ITAMs) verfügt. Die zur Src-Familie gehörenden Rezeptor assoziierten Proteintyrosinkinasen Lck und Fyn führen zu ersten Phosphorylierungsreaktionen an den ITAMs. Zugleich wird das ZAP-70 Protein rekrutiert und in die phosphorylierte und somit katalytische aktive Form umgewandelt. Aktiviertes ZAP70 phosphoryliert die Adaptorproteine LAT und SLP-76. Hiernach können verschiedene Signalwege ausgelöst werden, die alle in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und Gentranskription im Nukleus enden. Proteintyrosinkinasen werden ebenfalls als Signaldomänen von Immunrezeptoren eingesetzt (Fitzer-Attas et al., 1998).

Ein wichtiger Signalweg verläuft über die Bindung von SLP-76 an Phospholipase C- γ (PLC- γ), die dadurch Phosphatidylinositribisphosphat (PIP₂) in Diacylglycerin (DAG) und Inositrtrisphosphat (IP₃) spaltet. DAG zusammen mit Ca²⁺ aktiviert die Proteinkinase C (PKC), welche schließlich den Transkriptionsfaktor NF- κ B aktiviert. IP₃ aktiviert nach Erhöhung der Ca²⁺ Konzentration in der Zelle die Phosphatase Calcineurin, welche den Transkriptionsfaktor NFAT (nuclear factor of activated T cells) aktiviert. SLP-76 kann weiterhin Tec-Kinasen und GEFs (guanin-nucleotide-exchange factors) aktivieren. GEFs aktivieren daraufhin das kleine G-Protein Ras, worauf eine Kaskade von MAP-Kinasen aktiviert wird. Diese MAPK-Kaskade induziert schließlich Fos, ein Element des Transkriptionsfaktors AP-1, der so aktiviert wird. Die Transkriptionsfaktoren NF- κ B, NFAT und AP-1 induzieren dann Gentranskriptionen, aus denen die Effektorfunktionen aktivierter T-Zellen resultieren.

Grundsätzlich wird zur vollständigen T-Zell Aktivierung zusätzlich zur Bindung des TCR an den Peptid-MHC Komplex ein kostimulatorisches Signal benötigt. Ohne dieses Signal würde die T-Zelle trotz gebildetem TCR-MHC-Peptid Komplexes im Zustand der Anergie verbleiben. Der Kostimulus kann durch ein Mitglied der CD28-Familie, z.B. CD28, OX40 oder 4-1BB, geliefert werden. Auf diese Weise wird Schutz vor naiven, autoreaktiven T-Zellen, die Autoantigene auf Gewebezellen binden, geboten. Humane T-Lymphozyten mit einem rekombinanten Immunrezeptor mit CEA spezifischer Bindedomäne und einer CD3 ζ Signaldomäne werden nach Kreuzvernetzung durch Bindung an CEA+ Tumorzellen zu IFN- γ Sekretion und antigenspezifischer Lyse der Tumorzellen aktiviert. Im Vergleich dazu werden T-Zellen mit rekombinanten Immunrezeptor mit intrazellulärer kombinierter CD28-CD3 ζ Signalkette nach Bindung an Antigen-positive Tumorzellen stärker aktiviert, resultierend in zusätzlicher IL-2 Sekretion und verstärkter IFN- γ Sekretion (Hombach et al., 2001b). Dabei ist eine extrazelluläre Bindung von CD28 an B7.1 oder B7.2 nicht erforderlich. Die Effizienz der rezeptorvermittelten zytolytischen Aktivität ist nicht abhängig von CD28 Kostimulation. Eine weitere Folge der CD28 Kostimulation ist die Transkription von bcl-2 und bcl-xL, deren Produkte den programmierten Zelltod

der T-Lymphozyten verhindern. Auf diese Weise trägt die Einführung der CD28 Signaldomäne in das Rezeptormolekül zur Optimierung der rezeptorvermittelten T-Zell Aktivierung bei.

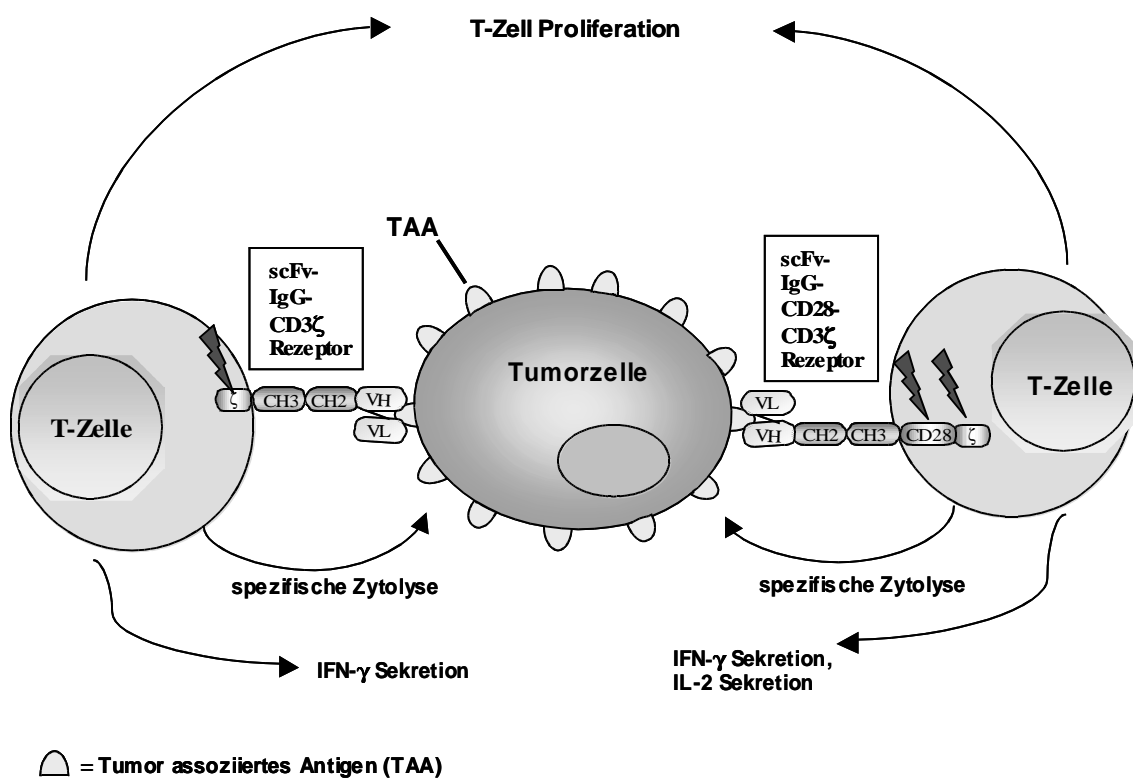


Abbildung 4: MHC unabhängige und antigenspezifische T-Zell Aktivierung durch rekombinante Immunrezeptoren. Die spezifische Aktivierung der T-Zellen führt zu zytolytischer Aktivität, Zytokinsekretion und Proliferation. Die kostimulatorische CD28 Domäne in der intrazellulären Signalkette verstärkt die IFN-γ Sekretion und induziert die IL-2 Sekretion.

1.4 Zielsetzung

Bisherige Strategien der Tumorthherapie gehen davon aus, dass alle Tumorzellen das gleiche Potential zur Tumorinduktion haben und somit bei einer erfolgreichen Therapie alle Tumorzellen eliminiert werden müssen. Dagegen postuliert die Tumorstammzellhypothese, dass das Tumorstammzellwachstum nur von einer kleinen Subpopulation pluripotenter, resistenter Stammzellen ausgeht. Es ist bislang unklar, ob die spezifische Eliminierung der Tumorstammzellen zu einer gesamten Eradikation des Tumors führt. Die Immunrezeptor-Strategie bietet durch ihre hohe Spezifität für tumor-assoziierte Antigene einen idealen Ansatzpunkt, um Tumorstammzellen gezielt und selektiv therapeutisch zugänglich zu machen. Im Rahmen dieser Arbeit sollen am Beispiel des malignen Melanoms Tumorstammzellen identifiziert und potentielle Tumorstammzell-spezifische Immunrezeptoren *in vitro* und *in vivo* evaluiert werden. Im Hinblick auf eine mögliche klinische Applikation der Immunrezeptor-Strategie soll diese Evaluierung in allogenen wie autologen Systemen durchgeführt werden.

Im Vergleich dazu soll untersucht werden, ob das Prinzip der adoptiven Immuntherapie mit Immunrezeptoren auch anwendbar ist für Tumorpatienten, die eine große Anzahl uniformer Tumorzellen aufweisen. Als Modell dient hier die chronisch lymphatische Leukämie, deren Erscheinungsbild auf einer Expansion homogener, maligner B-Zellen beruht. Patienten mit diesem Krankheitsbild haben aufgrund der hohen Tumorzelllast nur ein eingeschränkt funktionstüchtiges Immunsystem. In autologen Systemen sollen neu generierte Immunrezeptoren auf ihre Fähigkeit geprüft werden, T-Zellen des Patienten gegenüber autologen CLL-Zellen zu aktivieren. Weiterhin soll der Mechanismus der T-Zell vermittelten Lyse der Tumorzellen aufgeklärt werden.

Diese Untersuchungen sollen dazu beitragen, die Tumorstammzellhypothese in einem therapeutisch relevanten Punkt zu hinterfragen und zugleich die Anwendbarkeit der Immunrezeptorstrategie für Patienten-T-Zellen zur Erkennung der autologen Tumorzellen zu prüfen.

2 Material & Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Stammlösungen und Puffer

PBS

8,0g/l NaCl; 0,2g/l KCl; 1,15g/l Na₂HPO₄; 0,2g/l KH₂PO₄; pH 7,4

PBS/T

PBS mit 0,% (v/v) Tween[®]-20 (Merck, Darmstadt)

RNase-Stammlösung

100U/ml RNase A und 8000U/ml RNase T1 werden für 15min bei 100°C in 15mM NaCl; 10mM Tris-HCl, pH 7,5 inkubiert

Tris-HCl

10 mM Tris-Base, eingestellt mit 37%-igen HCl-Säure auf pH 8,4

2.1.2 Lösungen und Puffer für die Gelelektrophorese

50 x TAE-Puffer

2M Tris-HCl; 57,1ml/l Eisessig; 50mM EDTA, pH 8,5

Ethidiumbromid

Stammlösung: 10mg/ml in ddH₂O angesetzt.

6x Gel-Beladungspuffer für native Agarosegele

0,25% (w/v) Bromphenolblau; 0,25% (w/v) Xylencyanol; 40% (w/v) Saccharose

2.1.3 Größenmarker für die DNA-Gelelektrophorese

Größenstandard	dsDNA Fragmentgröße (bp)
1 kb DNA-ladder	12216, 11198, 10180, 9162, 7126, 6108, 5090, 4072, 3054, 2036, 1636, 1018, 506/517, 396, 344, 298, 220, 201, 154, 134, 75
100 bp DNA-ladder	2072, 1500, 1400, 1300, 1200, 1100, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100

2.1.4 Puffer und Säulen für den Auto-MACS™

MACS®-Waschpuffer

PBS (1x), pH 7,4 supplementiert mit FCS 1,0% (v/v) und EDTA 2mM

MACS®-Trennpuffer

PBS (1x), pH 7,4 supplementiert mit EDTA 2 mM

„Auto-MACS™ column“ (Trennsäulen)

(Product code: 130-021-101, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach)

2.1.5 Medien für Bakterienkultur und Medienzusätze

Alle Nährmedien wurden vor dem Gebrauch 20 min autoklaviert. Hitzelabile Zusätze (z.B. Antibiotika) wurden steril filtriert und dem Medium erst nach dem Autoklavieren zugegeben.

LB-Medium

10g/l Trypton; 5g/l Hefe-Extrakt; 10g/l NaCl

LB-Agar

1l LB-Medium; 15g Bacto-Agar

Ampicillin- und Kanamycin-Stammlösung

100 mg/ml Ampicillin (Merck, Darmstadt) in H₂O, sterilfiltriert. Die eingesetzte Ampicillin-Konzentration zur Selektion Ampicillin-resistenter Bakterienstämme in LB-Medium betrug 100µg/ml.

50 mg/ml Kanamycin (Merck, Darmstadt) in H₂O, sterilfiltriert. Die eingesetzte Kanamycin-Konzentration zur Selektion Kanamycin-resistenter Bakterienstämme in LB-Medium betrug 50µg/ml.

2.1.6 Bakterienstämme

***E.coli* DH5α** (Invitrogen, Paisley, GB)

F⁻, end A1, hsd R17 (r_K⁻, m_K⁻) sup E44, thi-1, lambda⁻, recA1, gyrA96, Φ 80 d lacZ δ M15

2.1.7 Zelllinien und primäre Zellen

293T (Pear, 1993)

Derivat von 293-Zellen, die das „SV40 large T-Antigen“ exprimieren. Die Zellen werden in RPMI 1640 Medium (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen), 10% (v/v) FCS kultiviert.

Mec-1 (Stacchini, 1999)

Humane B-Zelllinie, die das CD19 Antigen exprimiert. Die Zellen werden in RPMI 1640 Medium, 10 % (v/v) FCS kultiviert.

Daudi (ATCC-CCL 213)

Humane B-Zelllinie, die das CD20 Antigen exprimiert. Die Zellen werden in RPMI 1640 Medium, 10% (v/v) FCS kultiviert.

MeWo (ATCC-HTB-65)

HMW-MAA und p97 exprimierende Melanomzelllinie. Die Zellen werden in RPMI 1640 Medium, 10% (v/v) FCS kultiviert.

Jurkat (ATCC-TIB-152)

Humane T-Zelllinie, die das CD30 Antigen exprimiert. Die Zellen werden in RPMI 1640 Medium, 10% (v/v) FCS kultiviert.

M001

Isolierte Melanomzellen aus der Metastase einer Patientin der Klinik für Dermatologie und Venerologie, Universität zu Köln. Die Zellen werden in RPMI 1640 Medium, 10% (v/v) FCS kultiviert.

HOM01

Isolierte Melanomzellen aus der Metastase eines Patienten der Klinik für Dermatologie und Venerologie, Universität des Saarlandes. Die Zellen werden in RPMI 1640 Medium, 10% (v/v) FCS kultiviert.

Humane periphere Blutlymphozyten (PBL)

Die humanen T-Lymphozyten wurden aus „buffy coats“ gewonnen und stammen von gesunden, zufällig ausgesuchten Spendern der Blutbank der Universität zu Köln. Die isolierten Lymphozyten werden in RPMI 1640 Medium, 10% (v/v) FCS, IL-2 (1000U/ml) kultiviert.

Humane B-CLL Zellen

Die humanen Lymphozyten wurden aus 9 ml Blut von B-CLL Patienten der Klinik I für Innere Medizin, Universität zu Köln, isoliert. Die isolierten Lymphozyten wurden in RPMI 1640 Medium, 10% (v/v) FCS kultiviert.

2.1.8 Medien für die Zellkultur und Medienzusätze

RPMI 1640 Medium mit GlutaMAX™ für Kultivierung von Zelllinien und primären humanen Zellen

(Product Code 61870-010, GibcoBRL, Eggenheim). Formulierung mit GlutaMAX™ und:

Kalziumnitrat ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0,424 mM
Magnesiumsulfat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,407 mM
Kaliumchlorid (KCl)	5,33 mM
Natriumbikarbonat (NaHCO_3)	23,81 mM
Natriumchlorid (NaCl)	103,45 mM
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) Anhydrat	5,63 mM

Fetales Kälberserum (FCS)

(Biochrom KG, Berlin)

L-Glutamin

(Product Code 25030-081, GibcoBRL, Eggenheim)

Natrium-Pyruvat

(Product Code 11360-039, GibcoBRL)

Nicht-essentielle Aminosäuren

(Product Code 11140-035, GibcoBRL)

Ciprofloxacin

(Ciprobay, Bayer AG, Leverkusen)

Eingesetzte Konzentration: 4µg/ml

Penicillin-Streptomycin

(GibcoBRL, Eggenheim)

Eingesetzte Konzentration: 50IE/ml Penicillin, 50µg/ml Streptomycin

2.1.9 Antikörper, Antikörpercocktails, Antiseren und Zytokine

2.1.9.1 Primärantikörper

Human IgG Isotyp-Kontrolle

(Southern Biotechnology), polyklonales Serum

Maus anti-human Interferon-γ Antikörper

(PharMingen, Hamburg), Klon-Nr.: NB42

Muriner monoklonaler Antikörper gegen humanes Interferon-γ.

Maus anti-human Interleukin-2 Antikörper

(PharMingen), Klon-Nr.: 5344-111

Muriner monoklonaler Antikörper gegen humanes Interleukin-2.

OKT3 monoklonaler Antikörper

(ATCC, Rockville, USA)

Muriner monoklonaler Antikörper gegen humanes CD3.

Maus anti-human Tyrosinase Antikörper

(DAKO, Glostrup, Dänemark), Klon-Nr.: T311

Maus anti-human S100 Antikörper

(DAKO), Klon-Nr.: 6G10

Maus anti-human MelanA Antikörper

(DAKO), Klon-Nr.: A103

Kaninchen anti-human aktivierte Caspase3 Antikörper

(Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) Klon-Nr.: Asp175 5A1

Maus anti-human CD95L Antikörper

(BD Biosciences), Klon-Nr.: NOK-1

Maus anti-human TNF α Antikörper

(BD Biosciences), Klon-Nr.: MAb1

2.1.9.2 Konjugierte Sekundärantikörper

APC gekoppelter Maus anti-human CD30 Antikörper

(BD Biosciences), Klon-Nr.: Ber-H83

APC gekoppelter Maus anti-human CD5 Antikörper

(BD Biosciences), Klon-Nr.: 53-7.3

PE gekoppelter Maus anti-human CD3 Antikörper

(DAKO, Glostrup, Dänemark), polyklonales Serum

R-PE gekoppelter Ziege anti-human IgG

(Southern Biotechnology), polyklonales Serum

R-PE gekoppelter Maus anti-HMW-MAA Antikörper

(Miltenyi-Biotech, Bergisch-Gladbach), Klon-Nr.: EP-1

FITC gekoppelter Kaninchen anti-human CD3 Antikörper

(DAKO), Klon-Nr.: UCHT1

FITC gekoppelter Maus anti-human CD19 Antikörper

(BD Biosciences), Klon-Nr.: 4G7

FITC gekoppelter Maus anti-human CD20 Antikörper

(BD Biosciences), Klon-Nr.: L27

FITC gekoppelter Maus anti-human CD24 Antikörper

(BD Biosciences), Klon-Nr.: ML5

FITC gekoppelter Maus anti-human CD34 Antikörper

(BD Biosciences), Klon-Nr.: 8G12

FITC gekoppelter Maus anti-human CD44 Antikörper

(BD Biosciences), Klon-Nr.: G44-26

FITC gekoppelter Maus anti-human CD61 Antikörper

(BD Biosciences), Klon-Nr.: RUU-PL7F12

FITC gekoppelter Maus anti-human GranzymB Antikörper

(BD Biosciences), Klon-Nr.: GB11

Cy5.5 gekoppelter Maus anti-human AnnexinV Antikörper

(BD Biosciences), polyklonales Serum

Biotin gekoppelter Ziege F(ab')₂ anti-human IgG Antikörper

(Southern Biotechnology), Klon-Nr.: N/A

Biotin gekoppelter Maus anti-human Interferon- γ Antikörper

(PharMingen, Hamburg), monoklonaler Antikörper, Klon-Nr.: 4S.B3.

Biotin gekoppelter Kaninchen anti-human IL-2 Antikörper

(Biosource), monoklonaler Antikörper, Klon-Nr.: B33-2.

PacificBlue® gekoppelter anti-Kaninchen IgG Antikörper

(Invitrogen, Eugene OR, USA), polyklonales Serum

2.1.10 Auto-MACS™ Antikörpercocktails

Negative Anreicherung von humanen CD3⁺ T-Zellen

(Pan T cell isolation kit, Product code: 130-090-861, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach)

Positive Anreicherung von humanen HMW-MAA⁺ Zellen

(anti PE MicroBeads, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach)

2.1.11 Antiseren

Mausserum

(DAKO)

Ziegenserum

(DAKO)

2.1.12 Sonstige Proteine und Reagenzien

Streptavidin POD

(Roche, Mannheim)

Streptavidin-Alexa488®

(Invitrogen)

Avidin/Biotin Blocking System

(DAKO)

Accutase® Lösung

(PAA GmbH, Pasching)

Rekombinantes humanes IFN- γ

(PharMingen, Hamburg), Kat.-Bez.: R-IFNG-50

Molekulargewicht: 15,5kDa; produziert in *E.coli*.

Rekombinantes humanes IL-2

(Chiron GmbH, Ratingen)

Molekulargewicht: 15,3kDa; produziert in *E.coli*.

EGTA (Ethylenglycol bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure)

(Genaxxon Bioscience, Biberach)

2.1.13 Restriktionsendonukleasen und Restriktionspuffer

Name des Enzyms (Roche Diagnostics)	Schnittsequenz	Inkubationspuffer
BamHI	5'-G↓GATCC-3'	A oder M
BglII	5'-A↓GATCT-3'	A, M oder H
NcoI	5'-C↓CATGG-3'	H
XbaI	5'-T↓CTAGA-3'	A oder H
XhoI	5'-C↓TCGAG-3'	H

Puffer A: 33mM Tris-Acetat; 10mM Mg-Acetat; 66mM K-Acetat; 0,5mM DTT; pH 7,9

Puffer H: 10mM MgCl₂, 100mM NaCl; 1mM DTE; pH 7,5

Puffer M: 10 mM Tris-HCL; 10mM MgCl₂; 100 mM NaCl; 1mM DTE; pH 7,5

Das Temperaturoptimum für die Restriktionsreaktion liegt bei 37°C.

2.1.14 Oligonukleotide

(MWG-Biotech AG, Ebersberg)

Name	Sequenz	Verwendungszweck	
		Sequenz.	Klon.
CD19scFv-S	5'-GCCGCCATGGGCCGCCACCATGCTTCTCCT-3'		X
CD19scFv-AS	5'- CGGCAGATCTGCTACTGAGGAGACGGTGACGGTG ACTGA-3'		X
S-LKappa- aCD20	5'TACGTACCATGGATTTTCAGGTGCAGATTTTCAGC TTCCTGCTAATCAGTGCCTCAGTCATAATGTCTAGAA TGGCCCAGGTCAAACACTACAGGAGTCA-3'		X
AS-aCD20	5'- ACTATAGCACTGATCAGCGGCCGCCGTTTTATTTT CAACTT-3'		X
pBullet-5'	5'-TTACACAGTCCTGCTGACCA-3'	X	
pBullet-3'	5-CGTA CTATAGGCTTCAGCTGGTGATAT TG-3'	X	

2.1.15 Vektoren

pCOLT-GALV (#392)

R.L. Bolhuis, Rotterdam, NL (Weijtens et al., 1998)

Retrovirales Helferplasmid, enthält die Expressionskassette für das GALV Env Protein.

pHIT 60 (#393)

R.L. Bolhuis, Rotterdam, NL (Weijtens et al., 1998)

Retrovirales Helferplasmid, enthält die Expressionskassetten für das MLV Gag und MLV Pol Protein.

pBullet-Lk-HRS3scFv-Fc-CD3 ζ (#523)

(unpubliziert)

Das Plasmid #523 enthält die Expressionskassette für den CD30 spezifischen Immunrezeptor HRS3scFv-Fc-CD3 ζ .

pBullet-Lk-61scFv-hFc-CD3 ζ (#570)

(unpubliziert)

Das Plasmid #570 enthält die Expressionskassette für den HMW-MAA spezifischen Immunrezeptor 61scFv-Fc-CD3 ζ .

pBullet-Lk-L49scFv-hFc-CD3 ζ (#579)

(unpubliziert)

Das Plasmid #579 enthält die Expressionskassette für den p97 spezifischen Immunrezeptor L49scFv-Fc-CD3 ζ .

pBullet-Lk-BW431/26scFv-hFc-CD28-CD3 ζ (#607)

(Hombach et al., 2001)

Das Plasmid #607 enthält die Expressionskassette für den CEA spezifischen Rezeptor BW431/26-hFc-CD28-CD3 ζ .

pBullet-Lk-BW431/26scFv-hFc-CD3 ζ (#700)

(nicht publiziert)

Das Plasmid enthält die Expressionskassette für den CEA spezifischen Immunrezeptor BW431/26scFv-hFc-CD3 ζ .

CD19R/HyTK-pMG

(Laurence et al., 2003)

pL-scFv(Leu-16)-zeta-SN

(Müller et al., 2006)

2.2 Methoden

2.2.1 Präparation von Plasmid-DNA

2.2.1.1 Midi-Präparation von Plasmid DNA durch Bindung an eine Anionenaustauscher-Säule

(QiaFilter Midi Kit, Qiagen, Hilden)

Eine 30ml Bakterien-Übernachtskultur wurde 15 Minuten bei 1100 x g sedimentiert und in 8ml Puffer P1 (50mM Tris-HCl, pH 8; 10mM EDTA; 100 μ g/ml RNase A) resuspendiert. Die Lyse der Bakterien erfolgte durch

Zugabe von 8ml Puffer P2 (200mM NaOH; 1 % SDS). Nach 5 minütiger Inkubation bei RT wurde die Lösung mit 8ml eiskaltem Puffer P3 (3M Kaliumacetat, pH 5,5) neutralisiert. Das Lysat wurde für 10 Minuten bei RT inkubiert. Die Anionenaustauscher-Säule (Qiagen-tip 500) wurde mit 10ml Puffer QBT (750mM NaCl; 50mM MOPS, pH 7; 15% (v/v) EtOH; 0,15% (v/v) Triti-X-100) äquibriert. Das Zelllysate wurde durch Filtration (Qiafilter) von Bakterientrümmern, Proteinen und genomischer DNA befreit und dann auf die Anionenaustauschersäule gegeben. Die beladene Säule wurde zweimal mit je 30ml Puffer QC (1M NaCl; 50mM MOPS, pH 7; 15% (v/v) Isopropanol) gewaschen. Die Elution der Plasmid DNA erfolgte mit 15ml Puffer QF (1,25M NaCl; 50mM Tris-HCl, pH 8,5; 15% (v/v) Isopropanol). Danach wurde die Plasmid DNA durch Zugabe von 10,5ml Isopropanol und Zentrifugation für 30 Minuten bei 15.000 x g, 4 °C präzipitiert, mit 2,5ml 70%-igem (v/v) EtOH gewaschen und erneut wie vorher zentrifugiert. Die sedimentierte Plasmid DNA wurde bei RT getrocknet und schließlich in 200µl 10mM Tris-HCl, pH 8,4 resuspendiert. Aufbewahrt wurde die DNA entweder kurzfristig bei 4°C oder längerfristig bei -20°C.

2.2.1.2 Schnellpräparation von Plasmid-DNA nach der Koch(boiling)-Methode

Eine 1,5ml Bakterien-Übernachtskultur wurde 3 Minuten bei 1100 x g sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zell-Sediment in 400µl STET-Lösung (10mM Tris-HCl, pH 8; 1mM EDTA; 5% (v/v) Triton-X-100; 0,1M NaCl) resuspendiert. Die Suspension wurde mit 25µl Lysozym-Lösung (10mg/ml) durchmischt, für 30 Sekunden gekocht und anschließend für 10 Minuten bei 13.000 x g bei RT zentrifugiert. Die Plasmid DNA im Überstand wurde durch Zugabe von 40µl 3M NaAc, pH 5,2 und 420µl Isopropanol präzipitiert und durch Zentrifugation für 15 Minuten bei 13.000 x g bei RT sedimentiert. Nach zweimaligem Waschen mit je 1ml 70%-igem EtOH wurde die DNA an der Luft getrocknet und in 20µl 10mM Tris-HCl, pH 8,4

resuspendiert. Noch verbliebene RNA wurde durch Zugabe von 10% (v/v) RNase degradiert.

2.2.1.3 Ethanolabsfällung

Zur Fällung wurde die DNA-Lösung mit

0,1 Vol. 3M Na-Acetat, pH 5,2

2,5 Vol. Ethanol_{abs}

versetzt, gründlich gemischt und 30min bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ g efällt. Die DNA wurde durch 30-minütige Zentrifugation bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $10.000 \times g$ sedimentiert, mit 70%-igem EtOH gewaschen und 15min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $10.000 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde in beiden Fällen verworfen. Anschließend wurde das DNA Sediment bei RT getrocknet und in 10mM Tris-HCl, pH 8,4 resuspendiert.

2.2.2 **Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

2.2.2.1 Photometrische Bestimmung

(Gene Quant RNS/DNS Calculator, Pharmacia, Freiburg)

Zur Bestimmung der Konzentration einer wässrigen Nukleinsäurelösung wurde mittels eines Photospektrometers die Extinktion bei 260 nm und 280 nm gegen Tris-HCl als Leerwert gemessen. Der Reinheitsgrad der Lösung wurde durch den Extinktions-koeffizienten E_{260}/E_{280} abgeschätzt. Reine DNA-Lösungen besitzen einen Quotienten von 1,8. Bei 1 cm Strahlengang entspricht eine $OD_{260} = 1$ einer doppelsträngigen Nukleinsäure-Konzentration von $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ dsDNA.

2.2.2.2 Mengenabschätzung im Agarosegel im Vergleich zu Markerbanden

(Low DNA mass™ ladder, Gibco BRL/Invitrogen, Eggenheim)

Bei dieser Methode ist nur eine ungefähre Mengenabschätzung möglich. Die zirkuläre DNA wurde durch Restriktionsendonukleasen linearisiert und auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen. Anschließend erfolgte die elektrophoretische Auftrennung. Unter dem UV-Licht (245 nm) wurden die DNA Banden mit Marker-DNA Banden gleicher Größe und bekannter Konzentration verglichen (siehe 2.1.3).

2.2.3 **Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Das Prinzip der PCR beruht auf einer zyklischen Wiederholung von drei Reaktionsschritten, die im selben Ansatz bei unterschiedlichen Temperaturen ablaufen. Im ersten Schritt werden die zu amplifizierenden DNA Moleküle denaturiert. Im folgenden Schritt hybridisieren unter geeigneten Temperaturbedingungen zwei DNA-Oligonukleotide (Primer) mit je einem der beiden DNA Einzelstränge. Im dritten Schritt erfolgt die Verlängerung dieser Startermoleküle entlang der einzelsträngigen Matrize durch eine thermostabile *Taq* oder *Pwo* DNA-Polymerase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim).

Die PCR-Reaktionen wurden in einem programmierbaren Heizblock (*UNO II*, Biometra®) durchgeführt.

Zur Amplifikation von DNA Fragmenten wurde folgender Standardansatz verwendet:

x µl Matrizen-DNA (10-100 ng)

5 µl 10 x Taq-Puffer

1 µl dNTPs (je 2 mM)

1 µl Primer I (100 ng)

1 µl Primer II (100 ng)

x µl *aqua bidest.*

1 µl *Taq*- oder *Pwo*-Polymerase (2,5 Units)

Σ 50 µl

Zur Amplifikation der DNA Fragmente wurde beispielsweise folgendes Temperatur-profil verwendet:

- | | |
|-------------------------------------------|-------------------|
| 1.) Hitzedenaturierung: | 95 °C 60 Sekunden |
| Pause (Zugabe der <i>Taq</i> -Polymerase) | |
| 2.) Hitzedenaturierung: | 95 °C 60 Sekunden |
| 3.) Anlagerung der Oligonukleotide: | 55 °C 20 Sekunden |
| 4.) Polymerisation | 72 °C 60 Sekunden |
| 30 Reaktionszyklen (2. - 4.) | |
| 5.) Einmalige Endpolymerisation | 72 °C 4 Minuten |
| 6.) Kühlung | 4 °C |

Die individuellen Hybridisierungstemperaturen (T_D) für Oligonukleotide mit einer Länge von weniger als 25 Basen wurde nach der "Wallace-Regel" in Annäherung bestimmt:

$$T_D = 4 \times (C+G) + 2 \times (A+T)$$

2.2.4 DNA-Sequenzierung nach der Kettenabbruch-Methode

(ABI Prism® Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, ABI-Prism Sequencer, Applied Biosystems, Warrington, GB)

Die DNA Sequenzierung wurde nach der Didesoxy-Kettenabbruch Methode (Sanger *et al.*, 1977) durchgeführt. Das Prinzip dieses enzymatischen Verfahrens beruht auf dem Einbau von fluoreszenzmarkierten 2', 3' Didesoxy-Nukleotiden (ddNTPs) in einen durch die DNA-Polymerase I neu synthetisierten DNA-Strang. Dies führt zum Abbruch der Synthese, da die für die Kettenverlängerung benötigte 3'-Hydroxylgruppe im Didesoxy-Nukleotid fehlt. Auf diese Weise wird die Polymerisierung selektiv bei A, C, G oder T terminiert. Es entsteht eine Vielzahl von unterschiedlich langen DNA Fragmenten, die sich durch ein fixes 5'-Ende und ein variables, basenspezifisches 3'-Ende auszeichnen. Durch den Einsatz von vier unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen (A: di-chloro [R6G]; C [ROX]; G di-chloro [R100]; T di-chloro [TAMRA] können alle vier enzymatischen Sequenzier-Reaktionen gleichzeitig in einem Reaktionsgefäß durchgeführt werden. Durch Gel-Elektrophorese in einem denaturierenden Polyacryl-amid-Gel werden die DNA Fragmente getrennt.

Reaktionsansatz für die Sequenzreaktion:

1 µl	Matrizen-DNA (100-200 ng)
1 µl	Sequenzierungs-Oligonukleotide (3,2 pmol)
8 µl	Terminator-Ready-Reaction-Mix (<i>ABI-Prism</i>)
10 µl	H ₂ O

∑ 20 µl

Dieser Reaktionsansatz wurde nach folgendem PCR-Programm amplifiziert. Es wurden 30 Zyklen mit einem spezifischen Temperaturprofil in einem programmierbaren Heizblock (*UNO II*, Biometra®) durchgeführt:

1. 96 °C 30 Sekunden
2. 50 °C 15 Sekunden
3. 60 °C 4 Minuten

Die Sequenzierungen wurden vom ZMMK-Servicelabor, Institut für Biochemie der Medizinischen Einrichtungen der Universität zu Köln, auf einem ABI Prism™ 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer/ Applied Biosystems) oder (ab 2005) auf einem ABI Prism™ 3730 DNA Sequencer (Perkin Elmer/ Applied Biosystems) im Institut für Genetik der Universität zu Köln durchgeführt.

2.2.5 Native Agarose-Gelelektrophorese

Zur analytischen und präparativen Auftrennung der DNA wurden horizontale Agarosegele verwendet. Die Gelelektrophorese wurde 30min bis 1,5h bei 50-100V durchgeführt. Zur Anfärbung der DNA wurde der Agarose Ethidiumbromid (0,5µg/ml) zugesetzt. Die Analyse erfolgte unter UV-Licht (245nm) durch Vergleich mit den oben beschriebenen Größenstandards.

2.2.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose durch Bindung an Siliciumpartikel

(*Qiaex II Gel Extraction Kit (150)*, Qiagen, Hilden, 1999)

Nach Auftrennung der DNA-Fragmente durch Agarose-Gelelektrophorese wurde die gewünschte DNA Bande unter UV-Licht (245nm) ausgeschnitten und

das Gewicht des Gelstücks bestimmt. Abhängig von der Größe des im Agarosegel gefangenen DNA-Fragments wurde entsprechendes Volumen des Lösungspuffers QX1 (Qiagen) hinzugegeben:

Größe des DNA-Fragmentes	Zugabe von QX1, x-faches Volumen des Gel-Gewichtes	Zugabe von H ₂ O, x-faches Volumen des Gel-Gewichtes
< 100bp	6-faches Volumen	-
100bp – 4kb	3-faches Volumen	-
> 4kb	3-faches Volumen	2-faches Volumen

QIAEX II-Lösung (Qiagen) wurde resuspendiert und abhängig von der eingesetzten DNA Menge hinzugefügt:

DNA-Menge	Zugabe von QIAEX II
≤ 2µg DNA	10 µl
2-10 µg DNA	30 µl

Unter mehrmaligem Mischen wurde das gelöste Agarosestück mit der DNA-Bande 10 Minuten bei 50°C inkubiert. Dabei wurde kontrolliert, dass der pH-Wert der Lösung im optimalen pH-Bereich (pH ≤ 7,5) liegt, angezeigt durch einen pH-Indikator, um eine maximale Adsorption der DNA durch die Säulenpartikel zu erreichen. Bei einem unerwünschten Farbumschlag wurde nach Bedarf mit 1-10µl einer 3M Na-Acetat-Lösung, pH 5,0 gegengesteuert, um den optimalen pH-Bereich einzustellen. Danach wurde das Eppendorf-Gefäß mit der geschmolzenen Gelmatrix für 30 Sekunden bei 10.000 x g, RT zentrifugiert und das Sediment in 500µl Puffer QX1 (Qiagen) resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (30 Sekunden; 10.000 x g; RT) wurde das Sediment zweimal mit Puffer PE (Qiagen) gewaschen und 30-60 Minuten bei RT getrocknet. Die DNA wurde in 20µl 10mM Tris-HCl, pH 8,4 resuspendiert und, um die Elutions-Effizienz zu steigern, unter folgenden Bedingungen inkubiert:

Größe des DNA-Fragments	Inkubation
≤ 4kb	RT, 5 Minuten
4kb – 10kb	50°C, 5 Minuten

Anschließend wurde die Lösung für 30 Sekunden bei 10.000 x *g* zentrifugiert. Um zu verhindern, dass nicht dennoch Agaroserückstände im Eppendorf-Gefäß mitgenommen werden, die die weitere Klonierungsarbeit stören, wurde die Lösung zweimal für 30 Sekunden bei 10.000 x *g* zentrifugiert und jeweils in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt.

2.2.7 Enzymatische Reaktionen mit doppelsträngiger DNA

2.2.7.1 Spaltung der doppelsträngigen DNA durch Restriktionsendonukleasen

Die verwendeten Enzyme (Roche Diagnostics, Mannheim) spalten die DNA an definierten Schnittstellen, bei denen die DNA-Erkennungssequenz der Spaltstelle entspricht. Pro μg DNA wurden 1-3 Units Restriktionsenzym eingesetzt. Eine Enzymeinheit (Unit) entspricht dabei der definierten Menge an Enzym, die in einer Stunde $1\mu\text{g}$ DNA, bei der vorgegebenen Temperatur (meist 37°C), in einem Gesamtvolumen von $10\mu\text{l}$ spaltet. Um optimale Reaktionsbedingungen für die verschiedenen Restriktionsenzyme zu schaffen, wurden die vom Hersteller mitgelieferten 10x Puffer verwendet. Die DNA wurde nur dann mit zwei verschiedenen Restriktions-Endonukleasen gleichzeitig geschnitten, wenn die geforderten optimalen Pufferbedingungen erfüllt waren. Ansonsten wurde nacheinander geschnitten, wobei nach jedem Restriktionsverdau eine EtOH-Fällung durchgeführt wurde.

2.2.7.2 Ligation von DNA-Doppelsträngen mit überlappenden kohäsiven Enden durch T4-DNA-Ligase

Isolierte DNA-Fragmente wurden in einem 4-fach molaren Überschuss mit linearisierter Vektor DNA gemischt. Nach der Zugabe von $1\text{U}/\mu\text{l}$ T4-DNA-Ligase (Roche Diagnostics, Mannheim) und 1/10 Vol. 10 x Inkubationspuffer wurde der

Reaktionsansatz über Nacht bei 14 °C inkubiert und anschließend zur Transformation von kompetenten Bakterien eingesetzt.

10 x Ligationspuffer

660mM Tris-HCl, 50mM MgCl₂, 50mM DTT, 10mM ATP, pH 7,5

Ligationsansatz:

Komponenten	verwendetes Volumen
DNA-Gesamtmenge 100ng (ein 5:1 molares Verhältnis der Vektor-DNA zur Insertions-DNA)	2 - 4µl
10 x Ligationspuffer	1µl
T4 DNA Ligase (1U/µl)	1µl
H ₂ O	4 – 6µl
Gesamtvolumen	Σ 10µl
Inkubation	ü.N. bei 14°C

2.2.8 Bakterienkultur

2.2.8.1 Herstellung kompetenter *E.coli* DH5α Bakterien

(modifiziert nach Hanahan, 1983)

Eine stationäre *E.coli*-Kultur des Stammes DH5α (500µl) wurde in einem Verhältnis von 1:100 mit vorgewärmten 2 x YT-Medium verdünnt und bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600} \approx 0,50$) bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Bakterienkultur wurde sofort unter gelegentlichem Schwenken für 10 Minuten auf Eis abgekühlt und 5 Minuten bei 4.000 x g und 4°C zentrifugiert. Die Bakterien wurden in eiskaltem TFB I Puffer (30mM

Kaliumacetat; 50mM MgCl₂; 100mM NaCl; 10mM CaCl₂; 15% (v/v) Glycerin; pH 5,8) resuspendiert, 10 Minuten auf Eis inkubiert, erneut sedimentiert (5 Minuten, 4.000 x g; 4°C) und in 2ml eiskalten TFB II Puffer (10mM MOPS, pH 7,5; 75mM CaCl₂; 10mM NaCl; 15% (v/v) Glycerin) resuspendiert. In jedes Eppendorf-Gefäß wurden 200µl der Lösung mit den kompetenten Bakterien gegeben und sofort im flüssigen Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurden die Bakterien bei -80 °C gelagert.

2.2.8.2 Transformation chemokompetenter *E.coli* Bakterien

(Hanahan, 1983)

Bei -80 °C gelagerte chemokompetente Bakterien (100 µl/Eppendorf-Gefäß) wurden auf Eis aufgetaut und mit 1 bis 100ng Plasmid DNA gemischt. Anschließend wurden die Bakterien 20 Minuten auf Eis und für 90 Sekunden bei 42°C inkubiert. Danach wurden die Bakterien für 2 Minuten auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 800µl LB-Medium wurden die Bakterien zum Erwerb der Resistenzeigenschaft für 1h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde aus jedem Eppendorf-Gefäß das Gesamtvolumen entnommen und auf Antibiotika-haltige LB-Agarplatten mit dem „Drigalsky“-Spatel ausgestrichen, wobei der Spatel nach jedem Ausstrich im 70% Ethanol eingetaucht und abgesengt wurde.

2.2.9 Zellkultur

2.2.9.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Alle Zellkulturarbeiten wurden in Laboren der Sicherheitsstufe I oder II unter einer Sterilbank der Sicherheitsklasse II (Heraeus Biotech, Hanau)

durchgeführt. Die Zellen wurden in Inkubatoren (Heraeus) unter 5% CO₂-Versorgung bei 37°C und 95 bis 100 %-iger Luftfeuchtigkeit kultiviert. Medien, Zusätze und Lösungen wurden nach dem Autoklavieren oder Sterilfiltrieren unter sterilen Bedingungen gehandhabt. Vor Gebrauch wurden die verwendeten Medien, sowie Wasch- und andere Lösungen auf 37°C vorgewärmt oder auf 4°C abgekühlt.

2.2.9.2 „Splitten“ adhärenter Zellkulturen

Nach Abnahme des Zellkulturüberstandes wurden die Zellen einmal mit Ca²⁺-freiem PBS gewaschen, mit 1 ml einer Accutase-Lösung (PAA, Pasching) für 3-5 Minuten bei 37° C inkubiert und von der Kulturschalenoberfläche abgelöst. Anschließend wurden die gelösten Zellen in geeignetem Medium resuspendiert, wodurch die Trypsin-Aktivität blockiert wurde, und einmal mit Medium gewaschen. Nach Bedarf wird eine gewisse Anzahl Zellen in die Zellkulturschale zurückgegeben und im frischen Medium aufgenommen.

2.2.9.3 Separation von peripheren Blutlymphozyten (PBL) mittels Dichtezentrifugation

(*Ficoll-Paque*, Pharmacia Biotech, Freiburg)

Von der Blut-Entnahme bis zur Bereitstellung der „buffy-coats“-Konserven (Blutbank der Universität zu Köln) vergingen in der Regel 4 bis 6 Stunden. Humane T-Lymphozyten wurden mittels Dichtezentrifugation aus „buffy-coats“-Konserven separiert. Dieses Verfahren macht sich die unterschiedliche Dichte der verschiedenen Zellen des humanen Blutes zunutze. Dabei wird das Blut über eine hochmolekulare Flüssigkeit geschichtet, in welcher sich Blutzellen nach der Zentrifugation in verschiedene, dichteabhängige Phasen aufteilen.

Hierfür wurden 15ml des Blutes eines gesunden Spenders 1:2 mit PBS verdünnt und auf 15ml *Ficoll Paque*, geschichtet. Anschließend wurde der Ansatz für 30min bei 400 x g und 2 °C zentrifugiert, wobei die Bremse des Gerätes ausgeschaltet war. Nach der Zentrifugation wurde die obere Phase verworfen. Die Interphase mit den mononukleären Zellen wurde vorsichtig abgenommen, mit 20ml PBS gewaschen und bei 400 x g, 10min, bei 20°C zentrifugiert, wobei die Bremse des Gerätes wieder eingeschaltet war. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in PBS resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde noch einmal wiederholt. Anschließend wurden die Zellen in 30ml FCS-freiem RPMI 1640 Medium aufgenommen und erneut bei 400 x g zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde einmal wiederholt. Das Zellsediment wurde in 50ml RPMI 1640 Medium, 10% (v/v) FCS resuspendiert und die Zellen mit 1µl IL-2 (1000 U/ml) und 50µl OKT-3 (100ng/ml) stimuliert. Die separierten T-Lymphozyten wurden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

2.2.9.4 Anreicherung verschiedener humaner Zellen mittels magnetischer Zellsortierung (MACS®)

Prinzipiell unterscheidet man bei Anreicherungsverfahren für Zellsubpopulationen zwischen Positivanreicherung (Selektion) und Negativanreicherung (Depletion).

2.2.9.4.1 Selektion humaner HMW-MAA⁺ Melanomzellen

(antiPE-MicroBeads, *Product code*: 130-048-801, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach)

Die primären Melanomzellen werden nach Anweisung des Herstellers mit 10µl pro 10^7 Zellen des PE gekoppelten antiHMW-MAA Antikörpers in MACS[®] Waschpuffer inkubiert und gewaschen. Anschließend wird die Zellsuspension nach Anweisung des Herstellers mit PE spezifischen Antikörpern, an die Magnetkügelchen (Beads) gekoppelt sind, im MACS[®] Waschpuffer inkubiert, gewaschen, im entsprechenden Volumen des MACS[®] Trennpuffers in einem Falcon-Röhrchen resuspendiert und für die Trennung mittels AutoMACS[®] Gerät bereitgestellt. Die Zellsuspension wird durch eine Saugvorrichtung zur ferromagnetischen Trennsäule des AutoMACS Geräts geleitet. Zellen, an die Beads-gekoppelte anti-CD8 Antikörper gebunden sind, werden im magnetischen Feld zurückgehalten. Die Fraktion der restlichen, CD8⁻ Zellen wird beim Waschen der Säule entfernt und in einem Sammelgefäß aufgefangen. Das erzeugte Magnetfeld wird ausgeschaltet und die Fraktion der CD8⁺ Zellen wird beim erneuten Waschen aus der Säule entfernt und durch eine andere Öffnung zum Sammelgefäß geleitet. Die Überprüfung der Reinheit von sortierten Zellpopulationen erfolgt mit Hilfe der Durchflusszytometrie.

2.2.9.4.2 Depletion humaner CD3⁺ T-Lymphozyten

(„Pan T cell isolation kit“, *Product code*: 130-090-861, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach)

Das hier verwendete „Pan T cell isolation kit“ beruht auf einem indirekten Verfahren bei dem anti-Biotin MicroBeads an Biotin-konjugierte Antikörper binden, die spezifische Antigene auf der Zelloberfläche von Zellen erkennen. Zellen, die indirekt markiert werden, können in der ferromagnetischen Trennsäule des AutoMACS[®] Geräts bei eingeschaltetem Magnetfeld zurückgehalten werden. Durch negative Selektion werden CD45R⁺, CD49b⁺, CD11b⁺ und Ter-119⁺ Zellen von CD3⁺ Zellen getrennt. Die Fraktion der CD3⁺ Zellen passiert das Magnetfeld ohne angehalten zu werden und wird depletiert.

Die Vorbereitung und die Durchführung der Negativanreicherung am AutoMACS[®] Gerät erfolgt analog der Positivanreicherung.

2.2.10 Retroviraler Gentransfer

2.2.10.1 Aktivierung humaner T-Lymphozyten

Humane PBL oder separierte CD3⁺ T-Zellen ($0,5 \times 10^6$ Zellen/ml) wurden in RPMI 1640 Medium, 10% (v/v) FCS mit IL-2 (1000U/ml) und dem agonistischen anti-CD3 Antikörper OKT-3 (100ng/ml) kultiviert. Nach etwa 48 bis 72 Stunden befanden sich die meisten Zellen in aktiver Teilungsphase, was eine Voraussetzung für die weitere Verwendung zum retroviralen Gentransfer ist.

2.2.10.2 Ko-Transfektion von 293T-Zellen

(PolyFect[®] Transfection Reagent, Qiagen GmbH, Hilden)

Fein verzweigte Trägermoleküle des PolyFect[®] Reagenz mit positiv geladenen Amino-Gruppen bilden mit DNA Komplexe, so dass deren Eintritt in die Zelle erleichtert wird. Die positiv geladenen Komplexe binden an negativ geladene Glykoproteine auf der Oberfläche eukaryotischer Zellen, wodurch die Endozytose in ein membranumhülltes Endosom ermöglicht wird. Innerhalb der Zelle wirkt PolyFect als Puffersubstanz. Der pH-Wert des Endosoms wird erhöht, dadurch werden lysosomale Endonukleasen inhibiert, die Stabilität der PolyFect-DNA-Komplexe wird sichergestellt und die DNA kann in den Nukleus transportiert werden.

Auf 6-well Platten oder alternativ 10cm Zellkulturschalen wurden Zellen der Linie 293T in RPMI1640 Medium, 10% (v/v) FCS ausplattiert. Nach ca. 24-30 Stunden waren die Zellen auf dem Boden der Kulturschale angewachsen, zu

etwa 60-80 % konfluent und somit im optimalen Stadium, um kotransfiziert zu werden.

Hierzu wurden äquimolare DNA Konzentrationen der Helferplasmide pColt, kodierend für das GALV (*Gibbon Ape Leukemia Virus*) env Gen, und pHit60, kodierend für MuLV (*Molony murine Leukemia Virus*) gag und pol Gene, zusammen mit der gewünschten retroviralen Vektor-DNA in DMEM Medium ohne Zusätze in einem Eppendorffgefäß verdünnt und die entsprechende Menge an PolyFect Reagenz hinzugegeben. Die Verpackungsgene stehen unter Kontrolle des CMV Promotors/Enhancers (Weijtens *et al.*, 1996). Während einer 10-minütigen Inkubation bei RT erfolgte die DNA-PolyFect-Komplexbildung. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Medium mit 10% (v/v) FCS gestoppt, die gesamte Lösung wurde tropfenweise auf die Kulturschalen mit den angewachsenen 293T Zellen gegeben, welche dann 20 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ inkubierten.

	Anzahl ausge-säter 293T Zellen	Vol. des Mediums für 293T [µl]	Menge DNA #392 und #393 [µg]	Menge Vektor DNA [µg]	Vol. serumfreies Medium mit gesamter DNA [µl]	Vol. Polyfect [µl]	Vol. zugefügten Mediums mit FCS [µl]
6-well Platte	1,2 x 10 ⁵	3	je 1	1	100	20	600
10 cm Platte	1,5 x 10 ⁶	8	je 3	3	300	80	1000

2.2.10.3 Retrovirale Transduktion humaner T-Zellen

Aktivierete Lymphozyten wurden zentrifugiert (250 x g, 10min) und in vorgewärmtem frischem RPMI 1640 Medium, 10% (v/v) FCS, mit IL-2 (1000U/ml) aufgenommen. Für die Transduktionen auf 6-well Platten wurden je 1,5 x 10⁶ T-Zellen in je 6ml Medium mit IL-2 (1000U/ml) resuspendiert, für Transduktionen auf 10cm Schalen wurden je 3 x 10⁶ bis 4 x 10⁶ T-Zellen in je 15ml Medium mit IL-2 (1000U/ml) resuspendiert.

Das Medium der am Vortag ko-transfizierten 293T Zellen wurde abgenommen und die aktivierten T-Zellen mit den transfizierten 293T Zellen für 48 bis 72 Stunden kokultiviert, wobei die Viruspartikel die T-Zellen transduzierten. Anschließend wurden T-Zellen abgenommen und die Effizienz der Rezeptorexpression mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

2.2.11 Antigen-spezifische Aktivierung der mit rekombinanten Rezeptoren ausgestatteten T-Zellen

Lymphozyten mit oder ohne Immunrezeptor wurden nach der Transduktion 10 min bei 300 x g, RT zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde dreimal durchgeführt, um vorhandenes IL-2 zu entfernen. Anschließend wurden die Lymphozyten in frischem RPMI 1640 Medium, 10 % (v/v) FCS resuspendiert. Die T-Zellen wurden dann einen Tag ohne weitere Stimulation inkubiert, bevor sie antigen-spezifisch aktiviert wurden.

Die spezifische Aktivierung zur Bestimmung der zytolytischen Aktivität erfolgte durch Koinkubation der T-Effektorzellen (normiert auf rezeptortragende T-Zellen) mit Antigen-positiven oder zum Vergleich mit Antigen-negativen Tumorzellen in einem Gesamtvolumen von 200ml/well auf 96-well „round-bottom“ Zellkulturplatten, jeweils in Dreifachansätzen. Nach 48 Stunden wurde mit den kokultivierten Zellen ein XTT Test durchgeführt, die Überstände wurden zur Durchführung von Zytokin-ELISA-Tests verwendet.

2.2.12 Enzym-gekoppelter Immunadsorbanztest (ELISA)

Zur Bestimmung der Konzentration von Zytokinen im Kulturüberstand wurden ELISA Tests durchgeführt, wobei Mikrotiterplatten als Festphase in einer bestimmten Abfolge mit spezifischen Antikörpern beschichtet wurden. Im

Folgenden handelt es sich um die Bestimmung von IFN- γ und IL-2 unter Verwendung der entsprechenden Antikörper.

Es wurden 96-well Mikrotiterplatten (MaxiSorbTM, Nunc GmbH, Wiesbaden) verwendet. Diese wurden mit je 50 μ l/well des entsprechenden Fangantikörpers („capture“ Antikörper, s.Tab) in Beschichtungspuffer (1,7ml 0,2M Na₂CO₃, 0,8ml 0,2M NaHCO₃, ad 10ml H₂O_{dest}) beschichtet. Die Reaktion erfolgte ÜN bei 4°C. Anschließend wurden die Platten zur Absättigung der freien Bindungsstellen für mindestens 2 Std. bei RT mit BSA (Albumin aus Rinderserum, Sigma Aldrich, Seelze) inkubiert. Danach wurden die Platten viermal mit je 200 μ l/well PBS-T gewaschen.

Auf die so vorbereiteten Platten wurden die zu analysierenden Zellkulturüberstände sowie eine bekannte Konzentrationsreihe des jeweiligen Zytokin-Standards zur quantitativen Auswertung gegeben. Zum Nachweis von IFN- γ und IL-2 wurden je 50 μ l Überstand/well eingesetzt. Die Inkubation der Überstände erfolgte meist ü.N. bei 4°C unter Schütteln, mindestens jedoch 2 Std. bei RT unter Schütteln. In den Überstand sezerniertes Zytokin wurde hierbei an den Festphase gebundenen anti-Zytokin Antikörper gebunden. Nach Inkubation der Überstände wurden die Platten viermal mit PBS-T gewaschen. Anschließend erfolgte zur Detektion eine Inkubation mit dem Biotin-gekoppelten anti-Zytokin Antikörper (Tab.) für 1 Stunde bei RT unter Schütteln. Danach wurden die Platten gewaschen (viermal mit PBS-T). Unter den gleichen Bedingungen wurden die Proben dann 30 Minuten mit Streptavidin-Peroxidase Konjugat (500U/ml; 1:10.000 Verdünnung in PBS; Roche Diagnostics, je 50 μ l/well) inkubiert, anschließend wurden die Platten gewaschen (viermal mit PBS-T). Zur Visualisierung wurde eine ABTS-Substratlösung (1mg/ml ABTS in ABTS-Puffer[®], Roche Diagnostics, Mannheim, je 50 μ l/well) verwendet und bei RT unter Schütteln entwickelt. Die Absorption bei einer Wellenlänge von 405nm mit einer Referenzwellenlänge von 490nm (OD_{405} - OD_{490}) wurde photometrisch bestimmt (ELISA-Reader: EMax[®] microplate reader, Molecular Devices,

Ismaning). Die quantitative Auswertung erfolgte durch Abgleich mit Zytokinstandard, anhand dessen eine Regressionsgerade erstellt wurde.

2.2.13 XTT-basierender Zytotoxizitätstest

(*Cell proliferation Kit II (XTT)*, Roche Diagnostics, Mannheim)

(Jost und Kirkwood, 1992)

Die Zytolyse von Tumorzellen wurde mit Hilfe eines XTT-basierenden Zytotoxizitäts-Test bestimmt. Hierbei wurde der Umsatz des durch mitochondriale Dehydrogenasen metabolisierten XTT (Natrium 3'-[1-phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro) Benzen-Sulfonsäure-hydrat] zu einem wasserlöslichen Formazan-Salz photometrisch bestimmt. Die Höhe des Umsatzes hängt direkt von der Viabilität der kultivierten Zellen ab.

Es wurden jeweils 50µl/Vertiefung XTT-Markierungslösung (1mg/ml XTT; 1,25mM PMS, Roche Diagnostics, Mannheim) zu 50µl Medium/Vertiefung gegeben, der Ansatz bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und die Extinktion alle 30min photometrisch bei einer Wellenlänge von 450nm mit 650nm Referenzwellenlänge (OD₄₅₀₋₆₅₀) bestimmt. Der maximale Umsatz von XTT wurde in den Vertiefungen, die nur Tumorzellen enthielten gemessen. Zudem wurde die OD der Vertiefungen bestimmt, die nur RPMI 1640 Medium mit 10% (v/v) FCS. Ebenso wurde der Anteil am Gesamtumsatz des XTT-Substrates durch die Effektorzellen bestimmt. Hierfür wurde die gleiche Anzahl T-Zellen wie auch im Versuchansatz in RPMI 1640 Medium, 10% (v/v) FCS ausplattiert und die OD-Messung dieser Vertiefungen nach Zugabe von XTT gemessen.

Die Anzahl der lebenden Tumorzellen [%] wurde wie folgt bestimmt:

$$\text{Viabilität [\%]} = \frac{\text{OD}_{\text{Vertiefung des Versuchansatzes}} - \text{OD}_{\text{Effektorzellen alleine}}}{\text{OD}_{\text{Tumorzellen alleine}} - \text{OD}_{\text{Medium}}} \times 100$$

2.2.14 Immunfluoreszenz (FACS)-Analysen

Die Zellen werden zweimal mit PBS (4°C) gewaschen, adhärent wachsende Zellen trypsinisiert und in 10ml Medium (RPMI 1640, 10% (v/v) FCS) resuspendiert. Etwa 2×10^5 Zellen werden in ein FACS-Röhrchen überführt. Die Zellen werden 3min bei $400 \times g$ zentrifugiert. Das Zellsediment wird in 2ml PBS resuspendiert. Dieser Waschschrift wird insgesamt dreimal wiederholt. Nach dem letzten Waschschrift wird der Überstand erneut verworfen und die Zellen in etwa 100µl PBS resuspendiert. Ein Detektions-Antikörper (Endkonzentration 5µg/ml) wird zugegeben und die Probe 30min auf Eis inkubiert. Ab diesem Schritt werden die Proben vor direkten Lichteinstrahlung geschützt. Danach werden die Zellen zweimal mit 2ml eiskaltem PBS gewaschen und bei $400 \times g$ zentrifugiert, wobei der Überstand jeweils verworfen wird. Anschließend wird das Zellsediment in 500µl PBS resuspendiert und 1µl Propidiumjodid (0,5mg/ml, Sigma, Deisenhofen) hinzugegeben, um tote Zellen zu markieren.

Für den FACS-basierten Zytotoxizitäts werden Zellen aus der Ko-Kultur (2.2.11) entnommen, wie oben beschrieben gewaschen und mit Zelltyp spezifischen, verschiedenen Fluorochrom gekoppelten Antikörpern inkubiert. Zur Bestimmung der Viabilität wird die Gesamtzellpopulation mit 7-AAD gefärbt und ein Zählstandard (*SPHERO™ Particels*, BD Biosciences) hinzugegeben. Im Rahmen der Auswertung werden die Zielzellen anhand der spezifischen Antikörper identifiziert und die Aufnahme von 7-AAD prozentual an der Gesamtanzahl eingesetzter Zellen bestimmt.

Die Auswertung der Immunfluoreszenz-Tests erfolgt mit Hilfe eines FACSCalibur™ oder FACSCanto™ Durchflusszytometers (Becton Dickinson, Heidelberg).

2.2.15 Kryokonservierung von Zellen

Etwa 5×10^6 Zellen wurden mit Accutase behandelt, in Medium überführt und durch Zentrifugation bei $500 \times g$ für 5min bei RT sedimentiert. Das Zellsediment wurde in $900 \mu\text{l}$ Einfriermedium mit 10% (v/v) DMSO resuspendiert. Diese Zellsuspensionen wurden zügig in Gefrier-Ampullen überführt und sofort auf Eis gelagert. Zunächst wurden die Zellen bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren und nach 48h zur langfristigen Lagerung in flüssiges N_2 überführt.

2.2.16 Mausversuche

Für alle Mausversuche lag die Genehmigung der Bezirksregierung Köln vor. Für alle Experimente wurden ca. 8 bis 12 Wochen junge Mäuse der immundefizienten Stämme $\text{CD1}^{-/-} \text{ nu/nu}$ (CrI:CD-1®-Foxn1⁻) oder NIHIII (CrI:NIH-Lyst^{bg} Foxn1^{nu} Btk^{xid}) (Charles River, Sulzfeld) verwendet. Jeweils drei bis sechs Tiere pro Käfig wurden unter SPF Bedingungen gehalten. Im Tierstall wurden die Tiere bei konstant 20°C gehalten. Ein künstlicher Tag/Nacht-Zyklus von je 12 Stunden wurde erzeugt.

Tumorzellen wurden subkutan injiziert, die Injektion von Effektorzellen erfolgte subkutan oder intravenös in die rechte Schwanzvene.

2.2.17 Tumorpräparationen

Die humanen Tumore und Metastasen wurden aus der Klinik für Dermatologie der Universität zu Köln und der Universität des Saarlandes erhalten.

Die Versuchstiere wurden durch zervikale Dislokation getötet, wenn das Tumolvolumen 200mm^3 überschritt.

Die Tumore wurden von umliegenden Fett- und Hautgewebe befreit und longitudinal zerteilt. Eine Tumorthälfte wurde in Gefriermedium (*TissueTek*[®], Sakura) eingebettet und bei -80°C kryo-konserviert. Die zweite Gewebehälfte wurde zerkleinert und in 1ml CollagenaseA-Lösung (1mg/ml) bei 37°C im Schüttelwasserbad für mindestens 4h inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension filtriert (30µm Porenfilter), zweimal mit PBS gewaschen und in Kulturmedium überführt.

2.2.18 Herstellung von Gewebeschnitten

Kryo-konservierte Tumore wurden mittels Kryomikrotom (Leica, Wetzlar) in Scheiben von 5µm Dicke geschnitten und auf Objektträger überführt. Anschließend wurden die Schnitte in eiskaltem Aceton für 10min fixiert. Die fixierten Gewebeschnitte wurden bei -20°C gelagert.

2.2.19 Immunfluoreszenz

Fixierte Gewebeschnitte wurden für 5min in PBS rehydriert. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Inkubation mit 1% BSA in PBS für 3h bei RT geblockt. Nach dreimaligem Waschen (jeweils 5min) in PBS wurde endogenes Biotin mittels *Biotin Blocking System* (DAKO) nach Anweisung des Herstellers blockiert. Anschließend folgte ein erneuter Waschschrift. Die primären Antikörper (siehe Tabelle) wurden in einer Endkonzentration von 5µg/ml in einem Volumen von 100µl für 1h bei RT hinzugegeben. Nach dreimaligem Waschen der Objektträger erfolgte die Inkubation im Dunkeln mit den Fluochrom-konjugierten Sekundäantikörpern oder dem Fluorochrom-gekoppelten Streptavidin. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte durch Einbettung in DAPI-haltigem Einbettmedium (*Vectashield*[®], Vector Laboratories Inc. Burlingame, CA, USA). Die mikroskopische Auswertung erfolgte an einem

Zeiss-Axiophot Mikroskop; die aufgenommenen Bilder wurden mit Hilfe der Software Adobe Photoshop™ übereinander gelegt.

Primärer Antikörper	Sekundärer Antikörper	Detektionskonjugat
PE-konjugierter anti-HMW-MAA Antikörper	-	-
Maus anti-human CD20 Antikörper	Biotin-konjugierter Ziege anti-murin IgG Antikörper	Streptavidin-Alexa488®
Maus anti-human Tyrosinase Antikörper	Biotin-konjugierter Ziege anti-murin IgG Antikörper	Streptavidin-Alexa488®
Biotin-konjugierter Ziege anti-human IgG1 Antikörper	-	Streptavidin-Alexa488®
Kaninchen anti-human aktivierte Caspase3 Antikörper	PacificBlue®-konjugierter anti-Kaninchen IgG Antikörper	-

3 Ergebnisse

3.1 Generierung der Immunrezeptoren mit Spezifität für CD19

3.1.1 Klonierung des rekombinanten Immunrezeptors #941

Um den rekombinanten Immunrezeptor pBullet-antiCD19scFv-hFc-CD3 ζ zu generieren, wurde die DNA kodierend für das anti-CD19 single chain Fragment variabler Antikörper Regionen (scFv) aus dem Plasmid #940 (aCD19R/hspKEN) mittels PCR unter Einsatz der Oligonukleotide CD19BgIII-AS und L-kappa-S amplifiziert. Mit Hilfe dieses Verfahrens wurden Schnittstellen für die Restriktionsendonucleasen *NcoI* und *BgIII* an die Enden des scFv angefügt. Anschließend wurde das erhaltene PCR-Produkt mit den oben genannten Restriktionsenzymen geschnitten um überhängende, kohäsive DNA Enden zu erhalten. Aus dem Vektor pBullet-BW431/26scFv-hFc-CD3 ζ wurde die DNA kodierend für das anti-CEA-scFv mittels enzymatischen Verdaus mit den Restriktionsendonucleasen *NcoI* und *BamHI* entfernt und ebenfalls überhängende, kohäsive Enden generiert. Das Amplifikat und die Vektor-DNA wurden anschließend elektrophoretisch isoliert, gereinigt und im molaren Verhältnis von 1:5 durch Einsatz der T4-Ligase ligiert. Die erhaltene DNA wurde mittels Hitzeschocktransformation in Bakterien eingebracht. Zur Überprüfung des gewünschten Ligationsproduktes wurde die rekombinierte Plasmid-DNA mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *XhoI* geschnitten, elektrophoretisch aufgetrennt und Banden der Größe 6600 bp und 2100 bp, wie erwartet, erhalten. Die erhaltene DNA kodierend für den rekombinanten Immunrezeptor pBullet-antiCD19scFv-hFc-CD3 ζ (#941) wurde unter Verwendung der Oligonukleotide Seq-Fc-AS, pBullet5'seqneu und 5SeqFc-end sequenziert. Die vollständige Sequenz ist im Anhang angegeben.

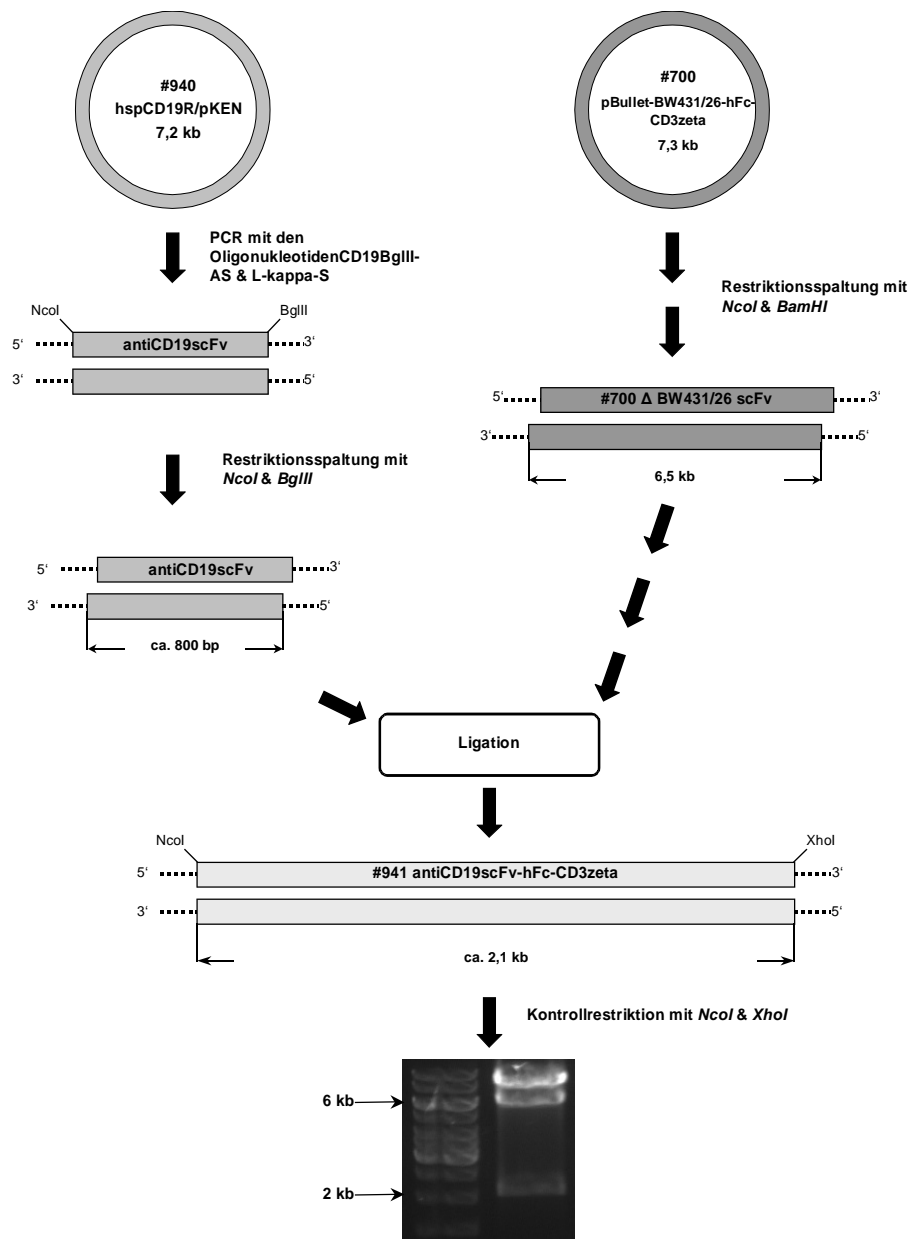


Abbildung 5: Klonierungsschema des rekombinanten Immunrezeptors #941

3.1.2 Klonierung des rekombinanten Immunrezeptors #942

Um den rekombinanten Immunrezeptor pBullet-antiCD19scFv-hFc-CD28-CD3 ζ zu generieren, wurde die DNA kodierend für das anti-CD19 single chain Fragment variabler Antikörper Regionen (scFv) aus dem Plasmid #940 (aCD19R/hspKEN) mittels PCR unter Einsatz der Oligonukleotide CD19BgIII-AS und L-kappa-S amplifiziert. Mit Hilfe dieses Verfahrens wurden Schnittstellen für die Restriktionsendonucleasen *NcoI* und *BgIII* an die Enden des scFv angefügt. Anschließend wurde das erhaltene PCR-Produkt mit den oben genannten Restriktionsenzymen geschnitten um überhängende, kohäsive DNA Enden zu erhalten. Aus dem Vektor pBullet-BW431/26scFv-hFc-CD28-CD3 ζ wurde die DNA kodierend für das anti-CEA-scFv mittels enzymatischen Verdaus mit den Restriktionsendonucleasen *NcoI* und *BamHI* entfernt und ebenfalls überhängende, kohäsive Enden generiert. Das Amplifikat und die Vektor-DNA wurden anschließend elektrophoretisch isoliert, gereinigt und im molaren Verhältnis von 1:5 durch Einsatz der T4-Ligase ligiert. Die erhaltene DNA wurde mittels Hitzeschocktransformation in Bakterien eingebracht. Zur Überprüfung des gewünschten Ligationsproduktes wurde die rekombinierte Plasmid-DNA mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *XhoI* geschnitten, elektrophoretisch aufgetrennt und Banden der Größe 6600 bp und 2100 bp, wie erwartet, erhalten. Die erhaltene DNA kodierend für den rekombinanten Immunrezeptor pBullet-antiCD19scFv-hFc-CD28-CD3 ζ (#942) wurde unter Verwendung der Oligonukleotide Seq-Fc-AS, pBullet5'seqneu und 5SeqFc-end sequenziert. Die vollständige Sequenz ist im Anhang angegeben.

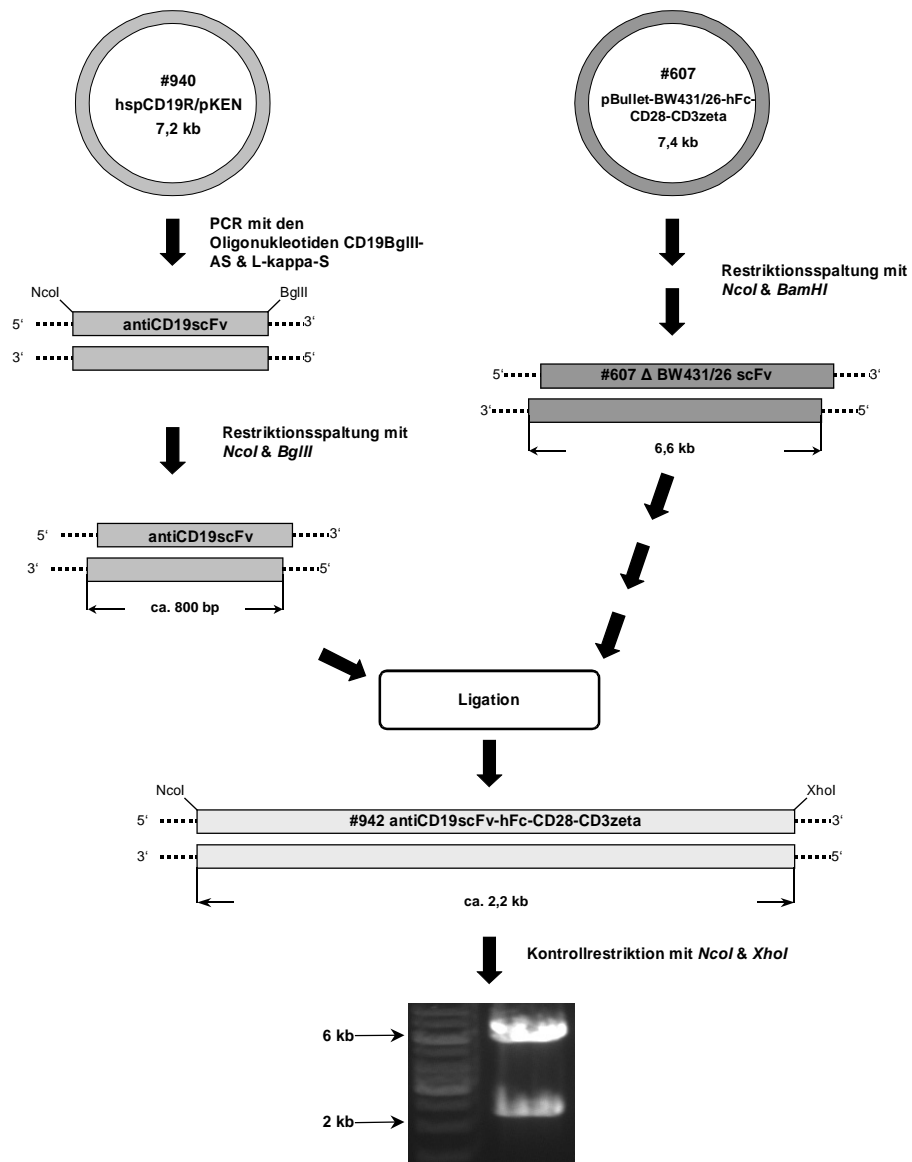


Abbildung 6: Klonierungsschema des rekombinanten Immunrezeptors #942

3.2 Funktionelle Charakterisierung der Immunrezeptoren mit Spezifität für CD19

In diesem Abschnitt der Arbeit soll untersucht werden, ob die neu generierten, rekombinanten T-Zell Rezeptoren T-Zellen von Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie (CLL) Spezifität für CD19 verleihen. Weiterhin wird untersucht ob die Einfügung einer ko-stimulatorischen CD28-Signaldomäne die Effektorfunktion der T-Zellen beeinflusst. Desweiteren wird versucht, den Mechanismus der lytischen Aktivität zu klären.

3.2.1 Expression der Immunrezeptoren #941 und #942 in T-Zellen eines CLL-Patienten

Periphere Blutlymphozyten wurden aus dem Blut eines gesunden Spenders und von CLL Patienten (n=6) isoliert und durch Stimulation mit dem agonistischen anti-CD3 Antikörper OKT3 (1µg/ml) und IL2 (1000U/ml) bis zu einer Gesamtzellzahl von 10^7 T-Zellen kultiviert. Die so erhaltenen T-Zellen wurden dann retroviral mit den Vektoren für die Rezeptoren antiCD19scFv-hFc-CD3 ζ und antiCD19scFv-hFc-CD28-CD3 ζ transduziert. Dazu wurden die Retroviren in Zellen der Linie 293T durch Transfektion mit der Vektor DNA und den Verpackungsplasmiden pHIT (#392) und pCOLT (#393) produziert. Die humanen CD3⁺ T-Zellen wurden anschließend mit den ecotrophen Retroviren infiziert. Nach 48h Ko-Kultivierung in Gegenwart von IL2 (400U/ml) wurde die Expression der rekombinanten Immunrezeptoren mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung des FITC-konjugierten anti-CD3 Antikörper UCHT1 und des PE-konjugierten anti-human-IgG1 Antikörper bestimmt. Als Vergleich dienten Zellen, die mit dem Vektor für den Rezeptor HRS3scFv-hFc-CD3 ζ (#523) transduziert wurden und CD3⁺-Lymphozyten, die nicht transduziert wurden. In einem typischen Experiment wurden die Rezeptoren in etwa 20% der T-Zellen exprimiert (Abb.7).

Die Frequenz und Expressionsstärke des Immunrezeptors mit der CD28-CD3 ζ ko-stimulatorischen Signaldomäne (#942) unterschieden sich nicht signifikant von der Expressionsstärke des Immunrezeptors mit CD3 ζ Signaldomäne (#941). Weiterhin konnten T-Zellen von CLL-Patienten mit annähernd derselben Effizienz transduziert werden, wie T-Lymphozyten eines gesunden Spenders.

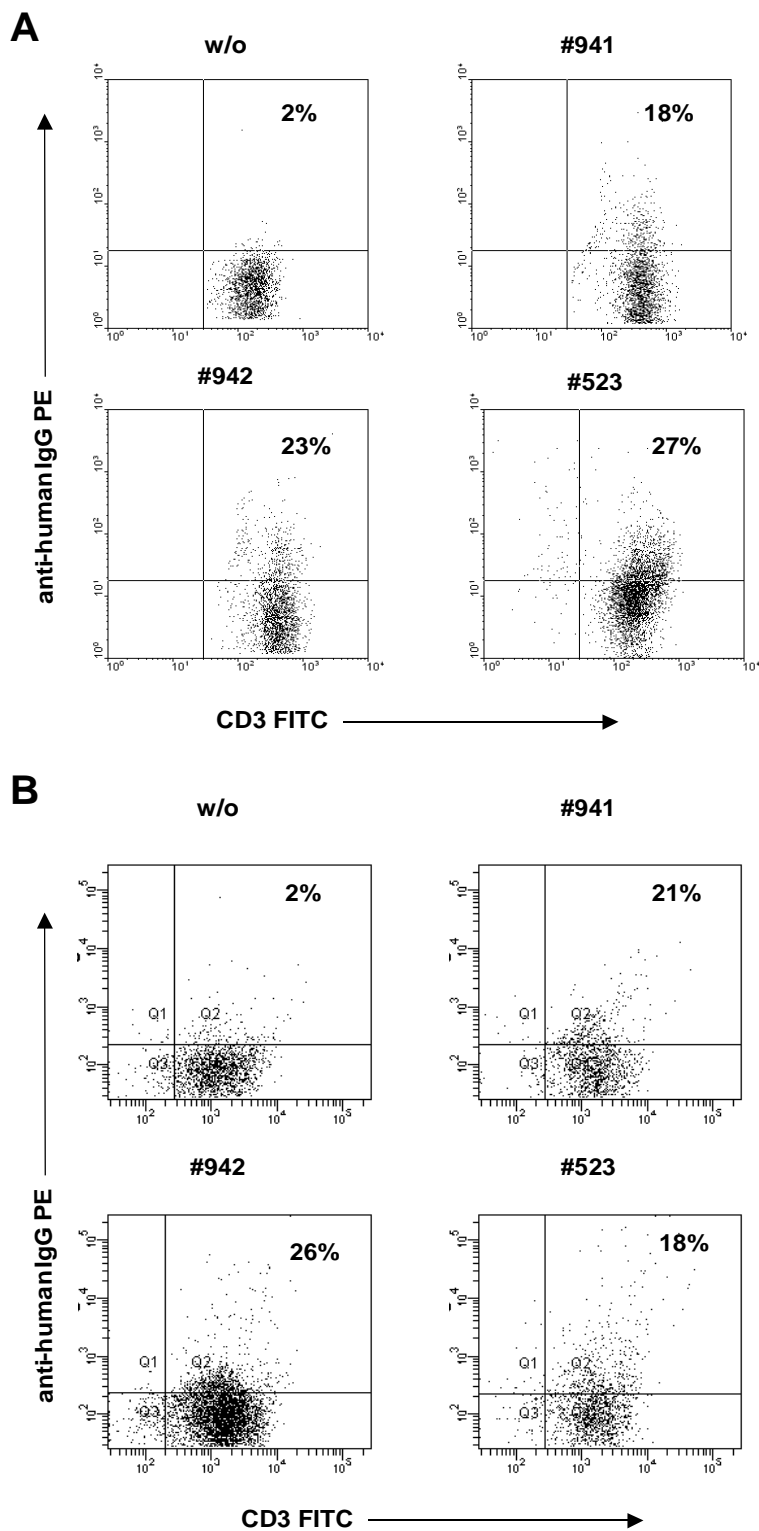


Abbildung 7: FACS-Analyse zum Nachweis der Expression der anti-CD19 Immunrezeptoren in humanen T-Zellen. Je 1×10^6 CD3⁺-Zellen aus einem gesunden Spender [A] oder eines CLL Patienten [B] wurden mit den Expressionsvektoren für die Immunrezeptoren

antiCD19scFv-hFc-CD3 ζ (#941), antiCD19scFv-hFc-CD28-CD3 ζ (#942) und HRS3scFv-hFc-CD3 ζ (#523) retroviral transduziert. Nach 48h wurde die Expression der rekombinanten Rezeptoren auf der Oberfläche der T-Zellen analysiert. Dazu wurden transduzierte und im Vergleich nicht transduzierte T-Lymphozyten (w/o) eines CLL Patienten und eines gesunden Spenders mit dem PE-konjugierten anti-human-IgG Antikörper, der an die humane Fc-Domäne des Rezeptors bindet, und dem FITC-konjugierten anti-CD3 Antikörper inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. Die Prozentzahl gibt den Anteil der T-Zellen, die den Immunrezeptor auf der Oberfläche exprimieren, von der Gesamtzahl der T-Zellen an.

3.2.2 Aktivierung humaner T-Lymphozyten mit anti-CD19 spezifischen Immunrezeptoren durch CD19⁺-Zelllinien

Da die rekombinanten Immunrezeptoren antiCD19scFv-hFc-CD3 ζ (#941), antiCD19scFv-hFc-CD28-CD3 ζ (#942) und HRS3scFv-hFc-CD3 ζ (#523) mit hoher Frequenz auf humanen T-Lymphozyten exprimiert werden, sollte die Immunrezeptor vermittelte Aktivierung der transduzierten T-Zellen gegenüber Zelllinien, die das CD19 Antigen exprimieren, gezeigt werden. Als Maß der Aktivierung wurde die Sezernierung von IFN γ in den Ko-Kulturüberstand und die Lyse der Zielzellen bestimmt.

Die zelluläre Aktivierung von T-Zellen durch die rekombinanten Immunrezeptoren #941, #942 und #523 wurde dadurch induziert, dass die retroviral transduzierten CD3⁺ Lymphozyten mit Zellen der Linie MEC-1, die CD19 sehr stark und CD30 nur schwach exprimieren ko-kultiviert wurden. Zur Spezifitätskontrolle wurden die transduzierten T-Zellen mit Zellen der Linie Jurkat ko-kultiviert, welche CD19 schwach und CD 30 sehr stark exprimieren. Nach 24h wurde die Konzentration des sezernierten IFN γ im Kulturüberstand mittels ELISA bestimmt.

Im Kulturüberstand von CD3⁺ Zellen mit CD19 spezifischen Immunrezeptoren (#941 und #942) wurde nach Kultivierung mit MEC-1 Zellen signifikant mehr IFN γ detektiert als im Überstand von CD3⁺ Zellen ohne rekombinante Spezifität oder mit Spezifität gegen CD30 (#523). Im Gegensatz dazu wurde eine erhöhte

Konzentration von IFN γ nach Kultivierung mit Jurkat Zellen nur im Kulturüberstand von T-Zellen mit Spezifität gegen CD30 festgestellt. Weiterhin konnte gesehen werden, dass T-Zellen, die einen Immunrezeptor mit eingefügter CD28-Signaldomäne tragen nicht mehr IFN γ sezernieren als T-Zellen, die mit einem Rezeptor mit einfacher Signaldomäne versehen wurden (Abb.8A).

Die T-Zell vermittelte Lyse der Zielzellen wurde durchflusszytometrisch, bestimmt. Dazu wurden die T-Zellen mit dem PE-konjugierten CD3 Antikörper identifiziert, die Tumorzellen mit dem APC-konjugierten CD30 Antikörper und dem FITC-konjugierten CD19 Antikörper. Lebende Zellen wurden durch den Vitalitätsfarbstoff 7-AAD identifiziert. Bei der Analyse wurde die Anzahl lebender CD19⁺ Zellen mit Hilfe eines eingesetzten Zählstandards bestimmt.

Rekombinante T-Zellen, die einen CD19 spezifischen Rezeptor exprimieren, lysieren MEC-1 Zellen nicht jedoch Jurkat Zellen. Wohingegen Jurkat Zellen nur von T-Zellen lysiert werden, die mit einem Immunrezeptor mit Spezifität gegen CD30 transduziert wurden, nicht jedoch durch T-Zellen, die den CD19 Immunrezeptor exprimieren. Es besteht kein Unterschied in der lytischen Aktivität bei T-Zellen mit CD28-CD3 ζ Immunrezeptor (#942) gegenüber T-Zellen mit CD3 ζ Immunrezeptor (#941).

Daraus wird geschlossen, dass die neu generierten anti-CD19 Immunrezeptoren eine Spezifität gegen CD19 besitzen und T-Zellen, die mit diesen Rezeptoren ausgestattet wurden, spezifisch zur Aktivierung gegenüber CD19⁺ Zellen angeregt werden. Die zusätzliche Einführung einer CD28 ko-stimulatorischen Signaldomäne hat keinen Einfluss auf die lytische Aktivität transduzierter T-Zellen gegenüber CD19⁺ Zelllinien.

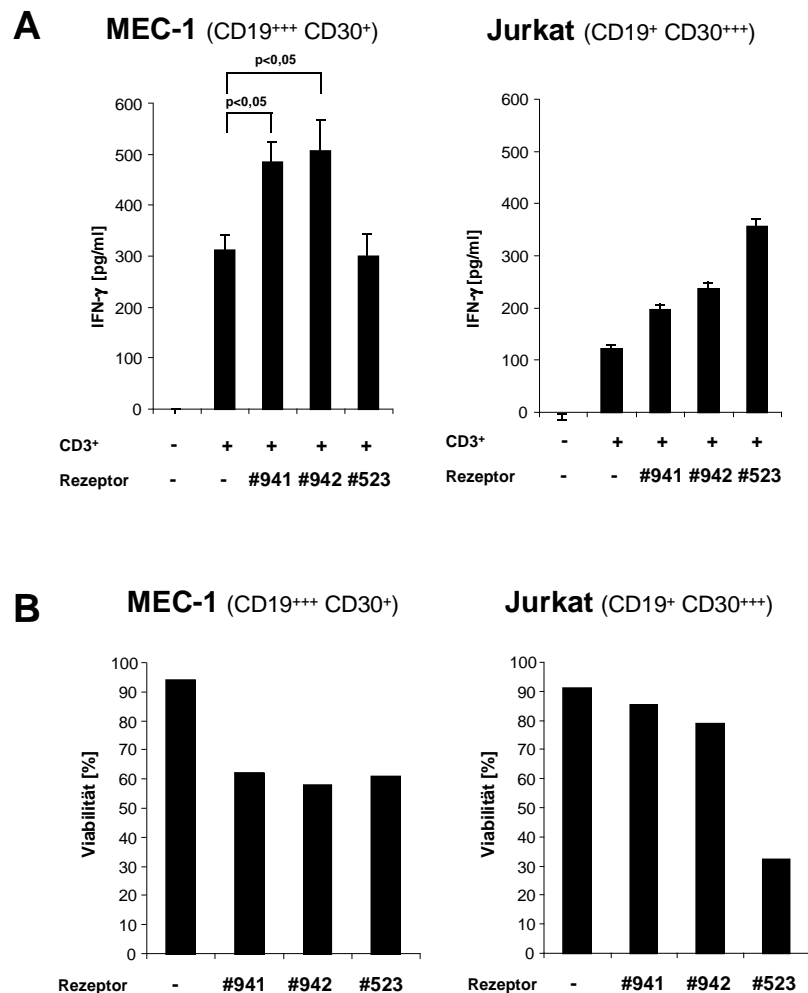


Abbildung 8: Spezifische Aktivierung Immunrezeptor tragender T-Zellen gegenüber CD19⁺ Zelllinien. CD3⁺ Lymphozyten eines gesunden Spenders wurden durch retroviralen Gentransfer mit den rekombinanten Immunrezeptoren antiCD19scFv-hFc-CD3 ζ (#941), antiCD19scFv-hFc-CD28-CD3 ζ (#942) und HRS3scFv-hFc-CD3 ζ (#523) versehen. Jeweils 1×10^5 Rezeptor tragende T-Zellen wurden mit 1×10^5 Zellen der Linie MEC-1 oder Jurkat in einer Mikrotiterplatte ko-kultiviert. Nach 24h wurde im Kulturüberstand die IFN γ Konzentration mittels ELISA bestimmt [A]. Desweiteren wurden die ko-kultivierten Zellen mit dem PE-konjugierten CD3 Antikörper, dem APC-konjugierten CD30 Antikörper, dem FITC-konjugierten CD19 Antikörper und 7-AAD inkubiert und durchflusszytometrisch die Viabilität der Zellen durch die Aufnahme von 7-AAD in CD19⁺ oder CD30⁺ Zellen bestimmt [B].

3.2.3 Spezifische Aktivierung von anti-CD19 T-Lymphozyten durch CLL-Zellen

Im vorigen Kapitel wurde gezeigt, dass T-Zellen mit einem CD19 spezifischen Immunrezeptor spezifisch gegen CD19⁺ etablierte Zelllinien aktiviert werden. Hier soll nun geklärt werden, ob derartige rekombinante T-Zellen gegen Tumorzellen aus Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie (CLL) aktiviert werden.

Dazu wurden CD3⁺ Lymphozyten aus dem Blut eines gesunden Spenders isoliert und mittels retroviralem Gentransfer mit den Immunrezeptoren antiCD19scFv-hFc-CD3 ζ (#941) und antiCD19scFv-hFc-CD28-CD3 ζ (#942) ausgestattet. Die so transduzierten T-Zellen wurden mit isolierten CLL-Zellen für 24h ko-kultiviert. Die zelluläre Aktivierung wurde anhand der Konzentration der sezernierten Zytokine IFN γ und IL2 mittels ELISA gemessen, die Viabilität der CLL-Zellen durchflusszytometrisch, wie oben beschrieben, bestimmt. (Abb.9).

T-Zellen, die mit den antiCD19-Immunrezeptoren transduziert wurden, sezernieren dosisabhängig nach Ko-Kultur mit CLL-Zellen, IFN γ in den Kulturüberstand im Vergleich zu nicht transduzierten T-Zellen ohne Immunrezeptor. Lymphozyten, die mit dem CD28-CD3 ζ Signaldomänen Rezeptor ausgestattet wurden, zeigen keine erhöhte IFN γ Sekretion im Vergleich zu T-Zellen mit CD3 ζ Signaldomänen Rezeptor.

T-Zellen, die einen Rezeptor mit einer zusätzlichen CD28-Signaldomäne exprimieren, sezernieren nach Inkubation mit CLL-Zellen IL2 in den Überstand. Dieser Effekt wird allerdings nur im Effektor – Target Verhältnis von 5:1 beobachtet (Abb.9 A) .

CD19-spezifische T-Lymphozyten lysieren nach Ko-Kultur CLL-Zellen. Dieses wurde nur in einem Effektor- : Targetzellverhältnis von 5:1 beobachtet. T-Zellen, die mit dem ko-stimulatorischen Rezeptor (#942) ausgestattet wurden weisen hier eine stärkere Lyse von CLL-Zellen auf.

Daraus wird geschlossen, dass die spezifische Aktivierung von T-Zellen, die die antiCD19-Immunrezeptoren exprimieren, durch Tumorzellen eines Patienten ausgelöst werden. Zusätzlich sezernieren Lymphozyten mit dem antiCD19scFv-hFc-CD28-CD3 ζ Immunrezeptor nach Kontakt mit CLL-Zellen IL2.

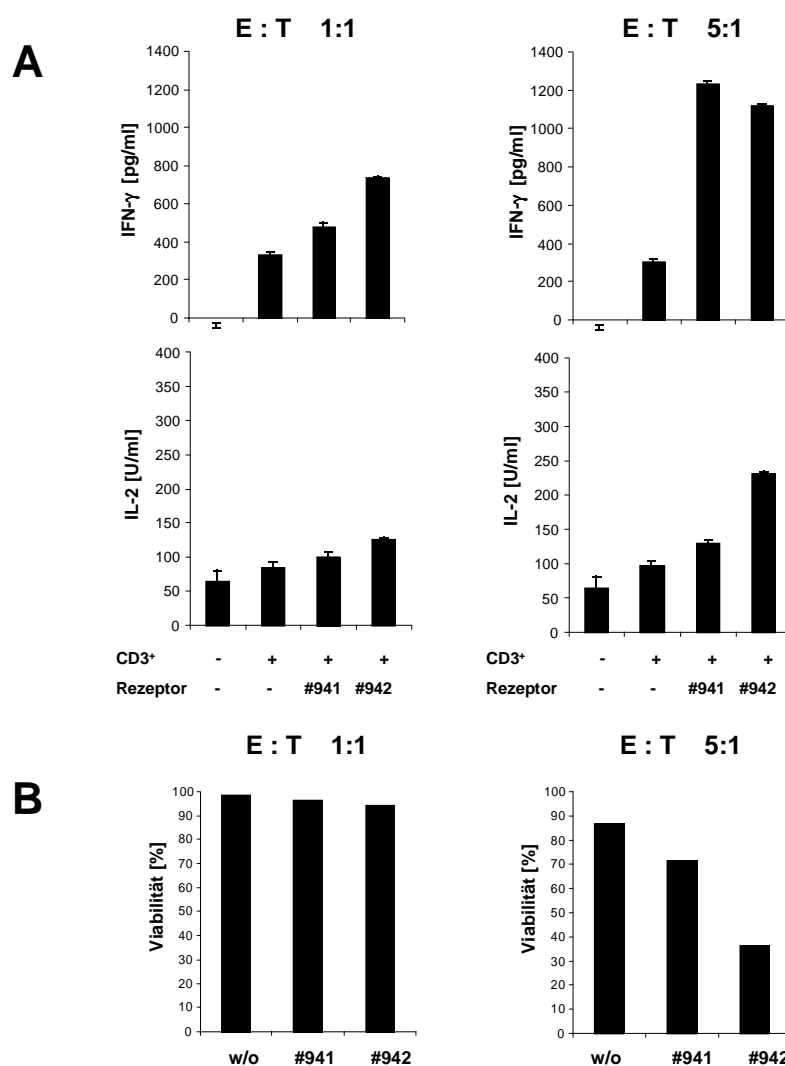


Abbildung 9: Aktivierung von T-Zellen mit CD19 spezifischen Immunrezeptoren gegenüber CLL-Zellen. CD3⁺ Lymphozyten eines gesunden Spenders wurden durch retroviralen Gentransfer mit den rekombinanten Immunrezeptoren antiCD19scFv-hFc-CD3 ζ (#941), oder antiCD19scFv-hFc-CD28-CD3 ζ (#942) versehen. Jeweils 1×10^5 Rezeptor tragende T-Zellen wurden mit 1×10^5 isolierten CLL Zellen in einer Mikrotiterplatte ko-kultiviert. Nach 24h

wurde im Kulturüberstand die IFN γ und IL2 Konzentration mittels ELISA bestimmt [A]. Desweiteren wurden die ko-kultivierten Zellen mit dem PE-konjugierten CD3 Antikörper, dem APC-konjugierten CD5 Antikörper, dem FITC-konjugierten CD19 Antikörper und 7-AAD inkubiert und durchflusszytometrisch die Viabilität der Zellen durch die Aufnahme von 7-AAD in CD19⁺ CD5⁺ Zellen bestimmt [B] (E:T = Effektor- : Targetzellverhältnis.)

3.2.4 Spezifische Aktivierung von T-Lymphozyten mit anti-CD19 Immunrezeptor gegen autologe CLL-Zellen

T-Zellen von Tumorpatienten zeigen häufig eine Anergie, was zur mangelnden Aktivierung gegenüber autologen Tumorzellen führt. Im folgenden Abschnitt soll nun untersucht werden, ob T-Zellen von CLL Patienten durch Expression eines CD19 Immunrezeptors spezifisch gegen autologe CLL Zellen aktiviert werden.

Dazu wurden CD3⁺ Lymphozyten aus dem Blut von CLL-Patienten (n=3) isoliert und mittels retroviralem Gentransfer mit den Immunrezeptoren antiCD19scFv-hFc-CD3 ζ (#941) oder antiCD19scFv-hFc-CD28-CD3 ζ (#942) ausgestattet. Die T-Zellen mit Immunrezeptor wurden mit isolierten, autologen CLL-Zellen ko-kultiviert. Die zelluläre Aktivierung wurde bestimmt, indem die Konzentration der sezernierten Zytokine IFN γ und IL2 mittels ELISA gemessen , sowie die Viabilität der CLL-Zellen durchflusszytometrisch, wie oben beschrieben, analysiert wurde.

Patienten T-Zellen, die den antiCD19 Immunrezeptor exprimieren wurden, können effektiv autologe CLL Tumorzellen lysieren (Abb. 10A). Es besteht kein Unterschied bezüglich der lytischen Aktivität zwischen den Immunrezeptoren #941 und #942 .

Nach Ko-Kultur mit autologen CLL-Zellen sezernieren T-Lymphozyten, die den Rezeptor mit der CD28-Signaldomäne exprimieren, dosisabhängig IL2 in den Überstand. Die IFN γ Konzentration ist jedoch unverändert (Abb. 10B).

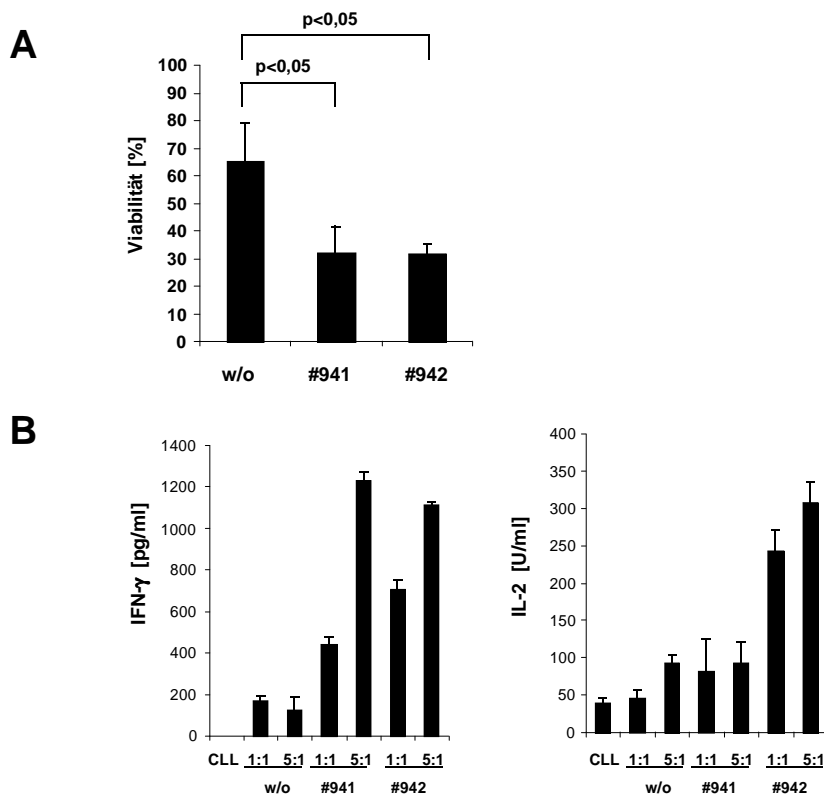


Abbildung 10: Spezifische Aktivierung Immunrezeptor tragender T-Zellen gegenüber autologen CLL-Zellen. CD3⁺ Lymphozyten, aus CLL-Patienten (n=3) wurden durch retroviralen Gentransfer mit den rekombinanten Immunrezeptoren antiCD19scFv-hFc-CD3 ζ (#941) oder antiCD19scFv-hFc-CD28-CD3 ζ (#942) versehen. Jeweils 1×10^5 Rezeptor tragende T-Zellen wurden mit 1×10^5 autologen CLL-Zellen in einer Mikrotiterplatte ko-kultiviert. Nach 24h wurde der Kulturüberstand entnommen und die IFN γ Konzentration mittels ELISA bestimmt [A]. Desweiteren wurden die ko-kultivierten Zellen mit dem PE-konjugierten CD3 Antikörper, dem APC-konjugierten CD5 Antikörper, dem FITC-konjugierten CD19 Antikörper und 7-AAD inkubiert und durchflusszytometrisch die Viabilität der Zellen durch die Aufnahme von 7-AAD in CD19⁺ CD5⁺ Zellen bestimmt [B] (E:T = Effektor- : Targetzellverhältnis.)

3.2.5 T-Lymphozyten mit anti-CD19 Immunrezeptor lysieren ihre Zielzellen durch Granzym / Perforin

In den vorherigen Versuchen wurde gezeigt, dass T-Zellen mit rekombinanten anti-CD19 Immunrezeptoren eine Immunantwort gegen autologe Tumorzellen aus CLL Patienten auslösen. T-Zellen können über verschiedene Apoptose einleitende Wege ihre Zielzellen lysieren, z.B. über TNF α , FasLigand oder Granzym / Perforin (Chowdhury & Lieberman, 2008). Im folgenden soll untersucht werden, welcher Mechanismus der Lyse durch die rekombinant veränderten T-Zellen gegenüber CLL-Zellen benutzt wird.

Dafür wurden CD3⁺ Lymphozyten aus dem Blut eines CLL-Patienten isoliert und mittels retroviralem Gentransfer mit dem Immunrezeptor antiCD19scFv-hFc-CD3 ζ (#941) ausgestattet. Die so modifizierten T-Zellen wurden im Effektor – Target Verhältnis von 5:1 mit autologen CLL-Zellen unter Zugabe des neutralisierenden antiTNF α Antikörper, des neutralisierenden antiFasL Antikörper oder EGTA für ko-kultiviert. Die Viabilität der CLL-Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt, der Mittelwert von drei Experimenten bestimmt und die Standardabweichung berechnet.

Es wurde beobachtet, dass T-Zellen mit dem rekombinanten Immunrezeptor #941, die zusammen mit dem monoklonalen antiTNF α oder antiFasL Antikörper und CLL-Zellen inkubiert wurden, die autologen Tumorzellen mit derselben Effizienz lysieren wie in Abwesenheit der blockierenden Antikörper. EGTA hingegen blockiert die Lyse der Zielzellen durch Effektorzellen. EGTA verhindert die Vesikelbildung in T-Zellen und damit die Abgabe von Granzym B und Perforin in die immunologische Synapse. Daraus wird geschlossen, dass T-Lymphozyten, die mit rekombinanten Immunrezeptoren ausgestattet wurden, Zielzellen über Granzym / Perforin lysieren.

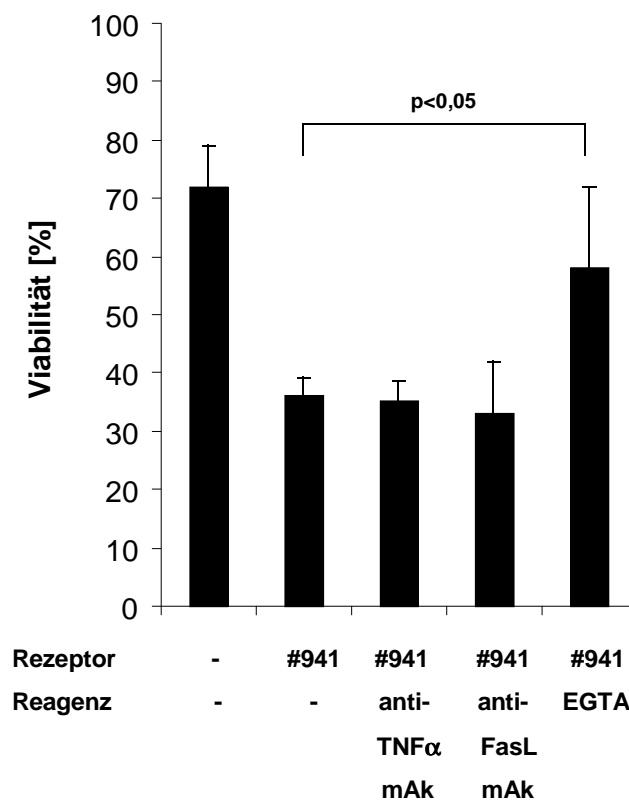


Abbildung 11: Spezifische Aktivierung Immunrezeptor tragender T-Zellen gegenüber autologen CLL-Zellen wird durch EGTA blockiert. CD3⁺ Lymphozyten, aus einem CLL-Patienten wurden durch retroviralen Gentransfer mit dem rekombinanten Immunrezeptor antiCD19scFv-hFc-CD3 ζ (#941) versehen. Jeweils 1×10^5 Rezeptor tragende T-Zellen wurden mit 1×10^5 autologen CLL-Zellen unter Zugabe des antiTNF α Antikörper (10ng/ml), des antiFasL Antikörper (2ng/ml) oder EGTA (2mM) in einer Mikrotiterplatte ko-kultiviert. Nach 24h wurden die ko-kultivierten Zellen mit dem PE-konjugierten CD3 Antikörper, dem APC-konjugierten CD5 Antikörper, dem FITC-konjugierten CD19 Antikörper und 7-AAD inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. Die Viabilität der Zellen wurde durch die prozentuale Aufnahme von 7-AAD in CD19⁺ CD5⁺ Zellen bestimmt.

3.3 Funktionelle Charakterisierung der anti-Melanom Immunrezeptoren #570 und #579 *in vitro*

In den bisherigen Kapiteln wurde der Frage nachgegangen, ob T-Lymphozyten, mit rekombinanten Immunrezeptoren autologe Tumorzellen aus hämatologischen Tumoren lysieren. In den nächsten Versuchen soll geklärt werden, ob diese rekombinanten T-Zellen auch gegen autologe Zellen aus soliden Tumoren aktiviert werden. Als Beispiel wurden Zellen aus dem malignen Melanom gewählt.

3.3.1 Expression der anti-Melanom Immunrezeptoren in T-Lymphozyten von Melanom-Patienten

Periphere Blutlymphozyten wurden aus dem Blut eines Melanom-Patienten isoliert und durch Stimulation mit dem agonistischen anti-CD3 Antikörper OKT3 (1µg/ml) und IL2 (1000U/ml) bis zu einer Gesamtzellzahl von 10^7 T-Zellen kultiviert. Die so stimulierten T-Zellen wurden dann mit den Vektoren für die Rezeptoren antiHMW-MAAscFv-hFc-CD3ζ (#570) und antip97scFv-hFc-CD3ζ (#579) retroviral transduziert. Dazu wurden die Retroviren in Zellen der Linie 293T durch Transfektion mit der Vektor DNA und den Verpackungsplasmiden pHIT (#392) und pCOLT (#393) produziert. Die humanen CD3⁺ T-Zellen wurden anschließend mit den ecotrophen Retroviren infiziert. Nach 48h der Ko-Kultivierung in IL2-haltigem Kulturmedium wurde die Expression der rekombinanten Immunrezeptoren mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung des FITC-konjugierten anti-CD3 Antikörper UCHT1 und des PE-konjugierten anti-human-IgG1 Antikörper. Als Vergleich dienten CD3⁺-Lymphozyten, die nicht transduziert wurden.

Beide Immunrezeptoren werden auf der Oberfläche von T-Lymphozyten eines Melanom-Patienten exprimiert. Die Expressionsstärke der Immunrezeptoren #570 und #579 sind annähernd gleich (Abb.12).

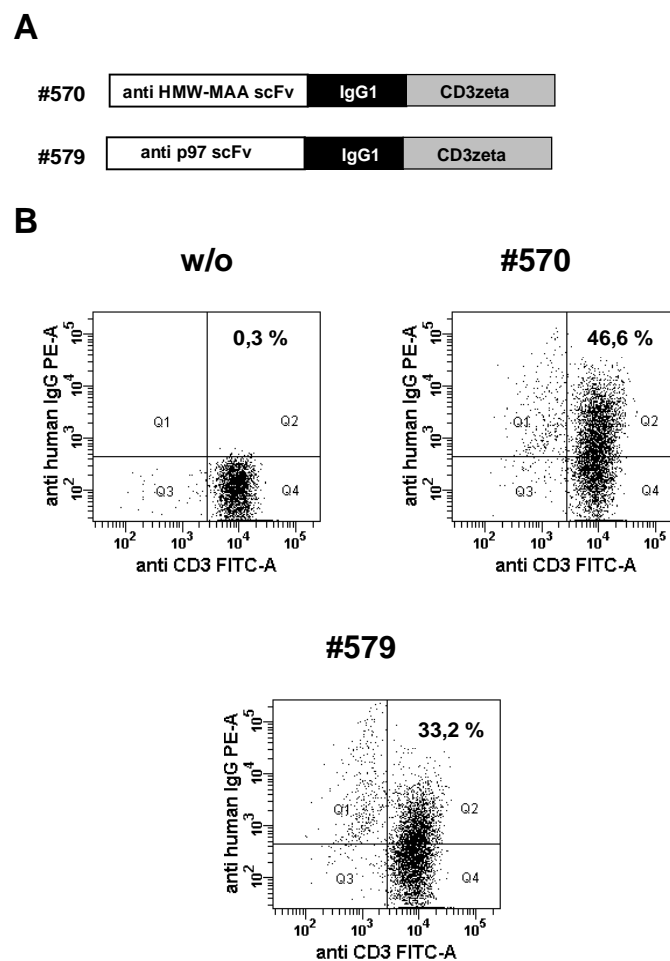


Abbildung 12: Nachweis der Expression der anti-Melanom Immunrezeptoren in humanen T-Zellen. [A] Schematische Darstellung der anti-Melanom Immunrezeptoren. [B] Je 1×10^6 CD3⁺ Zellen aus einem Melanom-Patienten wurden mit den Expressionsvektoren für die Immunrezeptoren antiHMW-MAAscFv-hFc-CD3 ζ (#570) und anti p97scFv-hFc-CD3 ζ (#579) retroviral transduziert. Nach 48h wurde die Expression der rekombinanten Rezeptoren auf der Oberfläche der T-Zellen analysiert. Dazu wurden transduzierte und im Vergleich nicht transduzierte T-Lymphozyten mit dem PE-konjugierten anti-human-IgG Antikörper, der an die humane Fc-Domäne des Rezeptors bindet, und dem FITC-konjugierten anti-CD3 Antikörper inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Die Prozentzahl gibt den Anteil der T-Zellen, die den Immunrezeptor auf der Oberfläche exprimieren, von der Gesamtzahl der T-Zellen an.

3.3.2 Analyse der Expression der Antigene HMW-MAA und p97 auf Melanomzellen

In diesem Ansatz wurde die Expression der melanomassoziierten Proteine HMW-MAA und p97 (Melanotransferrin) auf Zellen, die aus Primärtumoren und Metastasen von Patienten stammen, durchflusszytometrisch untersucht. Die Zellen wurden aus Tumorgeweben der Tumorbank der Klinik für Dermatologie isoliert und kultiviert.

Primärzellen HOM01 und M001 sowie als Kontrolle 293T-Zellen wurden jeweils mit Kulturüberstand von 293T-Zellen, die nach stabiler Transfektion die Fusionsproteine anti-HMW-MAA-Fc (#550) und anti-p97-Fc (#554) in den Kulturüberstand sezernieren, inkubiert. Als Negativkontrolle wurden die jeweiligen Zellen mit PBS inkubiert.

Anschließend erfolgte eine weitere Inkubation aller Zellen mit einem PE-konjugierten anti-human-IgG₁ Antikörper, der an die Fc-Domäne der Fusionsproteine bindet. Mit Hilfe eines Durchflusszytometers wurden die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) bestimmt. (Abb.13)

Tumorzellen HOM01 und M001 exprimieren die Proteine p97 und HMW-MAA in unterschiedlicher Dichte auf ihrer Oberfläche. Zellen der Linie 293T zeigen hingegen keine Expression dieser Proteine.

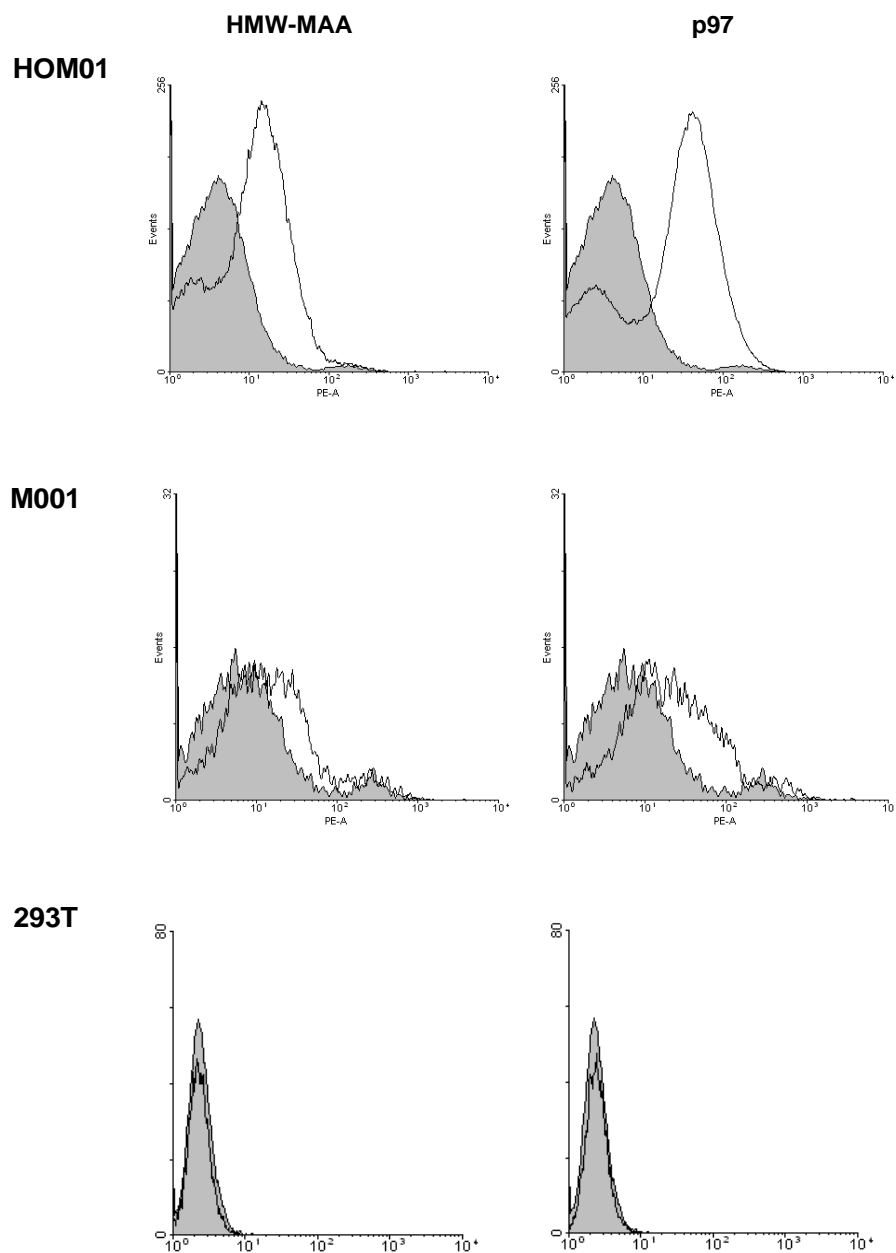


Abbildung 13: Expression der Antigene HMW-MAA und p97 auf Tumorzellen. Primäre Zellen HOM01, M001 und Zellen der Linie 293T wurden mit dem anti-HMW-MAA-Fc Fusionsprotein und mit dem anti-p97-Fc Fusionsprotein, sowie PBS als Kontrolle, inkubiert. Die Detektion erfolgte mit einem PE-konjugierten anti-human-IgG₁-Antikörper. Die Zellen wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert und die Histogramme der Fluoreszenzintensitäten übereinander gelegt.

3.3.3 Spezifische Aktivierung von T-Lymphozyten mit rekombinanten Immunrezeptoren gegen allogene, primäre Melanomzellen

In diesem Ansatz wurde mit Hilfe von *in-vitro*-Zytotoxizitätstests und einem Zytokin-ELISA untersucht, ob T-Lymphozyten mit rekombinanten anti-HMW-MAA-hFc-CD3- ζ -Rezeptor (#570) und anti-p97-hFc-CD3- ζ -Rezeptor (#579) gegen Melanomzellen spezifisch aktiviert werden und primäre, allogene Melanomzellen lysieren.

Hierfür wurden T-Lymphozyten eines gesunden Spenders retroviral zur Expression der Rezeptoren anti-HMW-MAA-hFc-CD3- ζ (#570) und anti-p97-hFc-CD3- ζ (#579) transduziert. Die Expression der Rezeptoren wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Die Gesamtzahl Rezeptor tragender Zellen betrug in einem typischen Experiment etwa 40% (siehe Abb.12). Rezeptor tragende Effektorzellen wurden in einer Verdünnungsreihe (5×10^4 – $6,25 \times 10^3$ Effektorzellen/Vertiefung) mit Melanomzellen des Patienten M001 und als Vergleich Zellen der Linie 293T (jeweils 5×10^4 Zellen/Vertiefung) auf einer Mikrotiterplatte ko-inkubiert. Als Kontrolle wurden nicht transduzierte Lymphozyten verwendet. Die Messung der Zellviabilität erfolgte nach 48h mittels XTT-Reagenz, wie im Methodenteil beschrieben. Die Sezernierung von IFN γ in den Kulturüberstand als Maß der Aktivierung wurde mit Hilfe eines ELISA gemessen (Abb.14).

T-Lymphozyten eines gesunden Spenders, die mit den Melanom-spezifischen Rezeptoren anti-HMW-MAA-hFc-CD3- ζ (#570) und anti-p97-hFc-CD3- ζ (#579) transduziert wurden, zeigen nach Ko-Kultivierung mit primären Melanomzellen zytolytische Aktivität gegen diese Tumorzellen. Die Zellen mit dem anti-p97-hFc-CD3- ζ Rezeptor erreichen bei einem geringeren Verhältnis von Effektorzellen zu Targetzellen eine Lyse von 50% der Tumorzellen im Vergleich zu Lymphozyten mit dem anti-HMW-MAA-hFc-CD3- ζ Immunrezeptor.

Transduzierte T-Zellen, die die Rezeptoren anti-HMW-MAA-hFc-CD3- ζ (#570) und anti-p97-hFc-CD3- ζ (#579) auf ihrer Oberfläche exprimieren, werden nach Inkubation mit allogenen Melanomzellen dosisabhängig zu einer IFN γ -Sekretion

angeregt. T-Zellen mit dem anti-p97-hFc-CD3- ζ Rezeptor verursachen eine höhere IFN γ -Produktion als T-Zellen mit dem anti-HMW-MAA-hFc-CD3- ζ Rezeptor. Nicht transduzierte T-Lymphozyten sezernieren kein IFN γ in den Kulturüberstand.

Nach Ko-Kultur mit Zellen der Linie 293T werden transduzierte T-Lymphozyten nicht aktiviert und zeigen keine Lyse der Zielzellen.

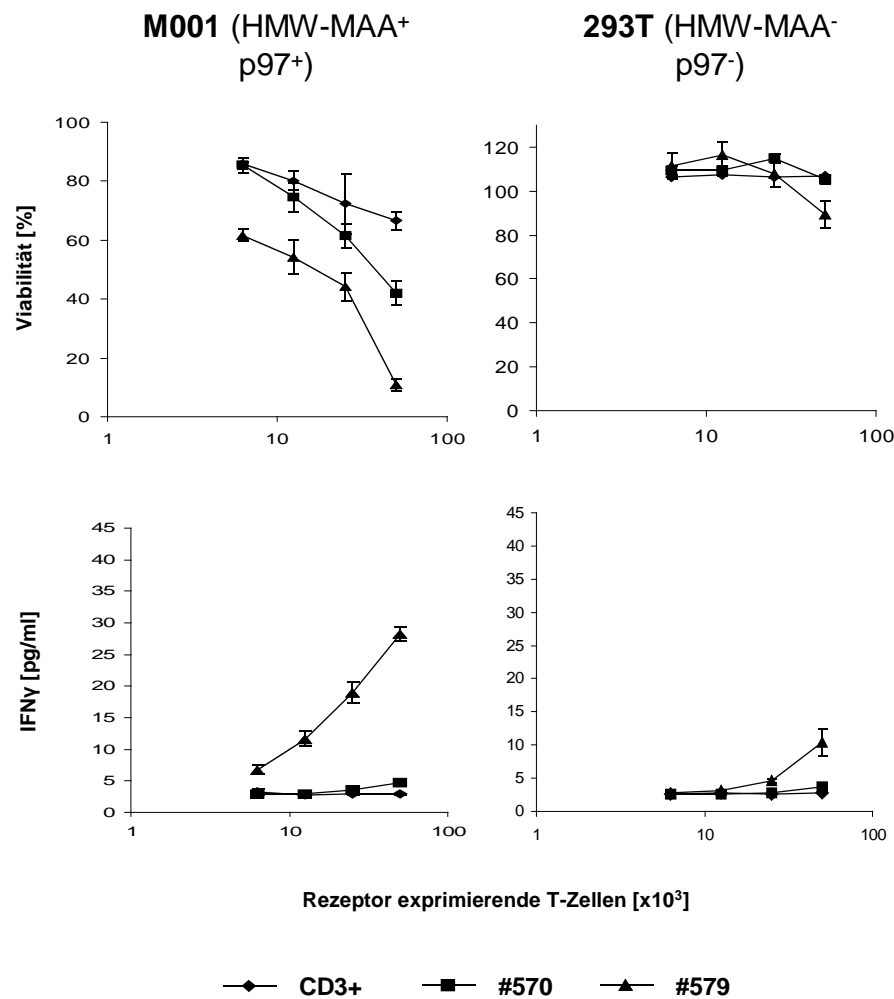


Abbildung 14: Aktivierung von T-Lymphozyten mit anti-Melanom-Immurrezeptoren nach Ko-Kultur mit Tumorzellen. Die T-Zellen eines gesunden Spenders wurden retroviral zur Expression der anti-Melanom-Rezeptoren #570 und #579 transduziert. Die Expression der rekombinanten Rezeptoren auf der Oberfläche der Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Die Anzahl der eingesetzten T-Lymphozyten wurde auf die Zahl Rezeptor tragender

Effektorzellen (5×10^4 – $6,25 \times 10^3$ Effektorzellen/Vertiefung) normiert und mit primären Tumorzellen aus der Biopsie M001 (je 5×10^4 Tumorzellen/Vertiefung), im Vergleich zu Zellen der Linie 293T für 48h ko-kultiviert. Die Zytotoxizität wurde mit Hilfe des XTT-Tests nachgewiesen. Die Konzentration des sezernierten IFN γ wurde mittels ELISA bestimmt. Die Tests wurden als Dreifachbestimmung durchgeführt, der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt.

3.3.4 Spezifische Aktivierung von rekombinanten T-Lymphozyten gegen autologe, primäre Melanomzellen

In diesem Ansatz wurde mit Hilfe von *in-vitro*-Zytotoxizitätstests und einem Zytokin-ELISA untersucht, ob T-Lymphozyten von Melanopatienten mit rekombinanten anti-HMW-MAA-hFc-CD3- ζ -Rezeptor (#570) und anti-p97-hFc-CD3- ζ -Rezeptor (#579) durch Ko-Kultivierung mit autologen, Antigen-positiven Tumorzellen spezifisch zur Zytolyse der Melanomzellen aktiviert werden.

Hierfür wurden T-Lymphozyten zweier Melanopatienten jeweils retroviral zur Expression der Rezeptoren anti-HMW-MAA-hFc-CD3- ζ (#570) und anti-p97-hFc-CD3- ζ (#579) transduziert. Die Expressionsrate der Rezeptoren wurde durchflusszytometrisch bestimmt und die Gesamtzahl Rezeptor tragender Zellen berechnet (siehe Abb.12). Die Anzahl der Rezeptor tragenden Effektorzellen wurde eingestellt und in einer Verdünnungsreihe (5×10^4 – $6,25 \times 10^3$ Effektorzellen/Vertiefung) mit den korrespondierenden Melanomzellen und als Vergleich Zellen der HMWMAA p97 Linie 293T (jeweils 5×10^4 Zellen/Vertiefung) ko-inkubiert. Als Kontrolle wurden nicht transduzierte Lymphozyten verwendet. Die Messung der Zellviabilität erfolgte nach 48h mittels XTT-Reagenz, wie im Methodenteil beschrieben. Die Sezernierung von IFN γ in den Kulturüberstand als Maß der T-Zell Aktivierung wurde mit Hilfe eines ELISA gemessen (Abb.15).

Patienten T-Zellen mit den Rezeptoren anti-HMW-MAA-hFc-CD3- ζ (#570) und anti-p97-hFc-CD3- ζ (#579) werden nach Inkubation mit autologen Melanomzellen dosisabhängig zur IFN γ -Sekretion aktiviert. T-Zellen mit dem

anti-p97-hFc-CD3- ζ Rezeptor verursachen eine höhere IFN γ -Produktion als T-Zellen mit dem anti-HMW-MAA-hFc-CD3- ζ Rezeptor. Nicht transduzierte T-Lymphozyten hingegen zeigen keine IFN γ -Sekretion.

T-Lymphozyten von Melanompatienten mit den Melanom-spezifischen Rezeptoren anti-HMW-MAA-hFc-CD3- ζ (#570) und anti-p97-hFc-CD3- ζ (#579) zeigen nach Ko-Kultivierung mit autologen, primären Melanomzellen zytolytische Aktivität gegen diese Tumorzellen. Die Zellen mit dem anti-p97-hFc-CD3- ζ Rezeptor erreichen jeweils bei einem geringeren Verhältnis von Effektorzellen zu Targetzellen eine 50% Lyse, als Lymphozyten, die mit dem anti-HMW-MAA-hFc-CD3- ζ Rezeptor transduziert wurden.

Nach Ko-Kultur mit Zellen der Linie 293T werden transduzierte T-Lymphozyten von Melanompatienten nicht aktiviert und zeigen keine Lyse der Zielzellen.

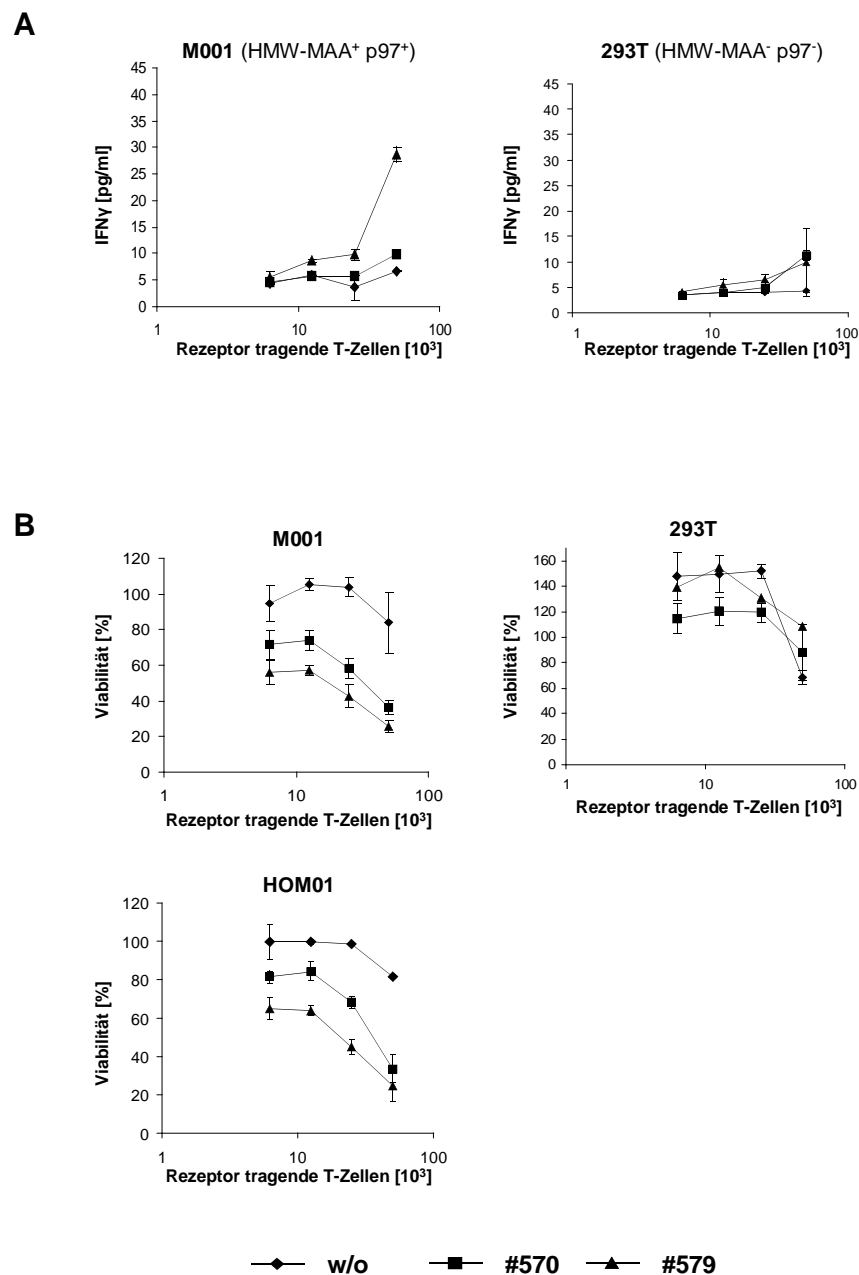


Abbildung 15: Aktivierung von T-Lymphozyten mit anti-Melanom-Immunezeptoren nach Ko-Kultur mit autologen Tumorzellen. Die T-Zellen von Melanompatienten wurden retroviral mit der DNA für anti-Melanom-Rezeptoren #570 und #579 transduziert. Die Expression der rekombinanten Rezeptoren auf der Oberfläche der Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Die Anzahl der eingesetzten T-Lymphozyten wurde auf die Zahl Rezeptor tragender Effektorzellen (5×10^4 – $6,25 \times 10^3$ Effektorzellen/Vertiefung) normiert und mit den korrespondierenden, primären Tumorzellen aus Biopsien M001 und HOM01 (je 5×10^4 Tumorzellen/Vertiefung) für 48h ko-kultiviert. Die Zytotoxizität wurde mit Hilfe des XTT-Tests

nachgewiesen. Die IFN γ Konzentration wurde mittels ELISA bestimmt. Die Tests wurden als Dreifachbestimmung durchgeführt, der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt.

3.3.5 Inhibition von XIAP sensitiviert Melanomzellen für die T-Zell vermittelte Lyse

Bisher wurde gezeigt, dass T-Lymphozyten, die mit anti-Melanom Immunrezeptoren transduziert wurden, spezifisch autologe Tumorzellen lysieren. Weiterhin wurde in den vorhergehenden Kapiteln beschrieben, dass die Lyse durch Freisetzung der zytotoxischen Moleküle Perforin und Granzym B verursacht wird. Es ist bekannt, dass Granzym B in Zielzellen durch Aktivierung von Caspase 3 die Apoptose auslöst (Chowdhury & Lieberman, 2008). In vielen Tumorzellen wird die endogene Aktivierung von Caspase 3 durch IAPs (Inhibitoren der Apoptose) blockiert. In Melanomzellen geschieht dies durch Expression des Moleküls XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis)(Kluger *et al.* 2007).

Im folgenden Experiment sollte untersucht werden, ob Melanomzellen, in denen die Expression von XIAP durch Einbringen einer spezifischen siRNA supprimiert wurde, eine höhere Sensitivität gegenüber T-Lymphozyten mit rekombinanten anti-Melanom Rezeptoren zeigen.

Hierfür wurden T-Lymphozyten eines gesunden Spenders retroviral zur Expression der Rezeptoren anti-HMW-MAA-hFc-CD3- ζ (#570) und anti-p97-hFc-CD3- ζ (#579) transduziert. Die Expressionsrate der Rezeptoren betrug etwa 40%. Rezeptor tragende Effektorzellen wurden in einer Verdünnungsreihe (5×10^4 – $6,25 \times 10^3$ Effektorzellen/Vertiefung) mit Zellen der Linie MeWo, die mit der siRNA c2 oder c27 transfiziert wurden und als Vergleich Zellen der Linie MeWo, die mit der src siRNA transfiziert wurden. (jeweils 5×10^4 Zellen/Vertiefung) ko-kultiviert. Als Kontrolle wurden nicht transduzierte Lymphozyten verwendet. Die Messung der Zellviabilität erfolgte nach 48h mittels XTT-Reagenz, wie im Methodenteil beschrieben (Abb.16).

Melanomzellen, die mit der siRNA c2 transfiziert worden waren, zeigen in der geringsten Konzentration von ko-kultivierten anti-Melanom T-Lymphozyten eine 50% Lyse. MeWo c27-siRNA Zellen und MeWo-Zellen, die mit siRNA zufälliger Sequenz (src) transduziert wurden, werden erst bei einer höheren Anzahl eingesetzter rekombinanter T-Lymphozyten lysiert. Daraus wird geschlossen, dass die c2 siRNA die Expression von XIAP stärker supprimiert als die c27 siRNA.

Desweiteren zeigte sich, dass T-Zellen, die mit dem Immunrezeptor anti-HMW-MAA-hFc-CD3- ζ (#570) transduziert wurden, siRNA transfizierte MeWo-Zellen in ähnlicher, dosisabhängiger Effizienz lysieren, wie T-Zellen, die mit dem anti-p97-hFc-CD3- ζ (#579) Rezeptor transduziert wurden.

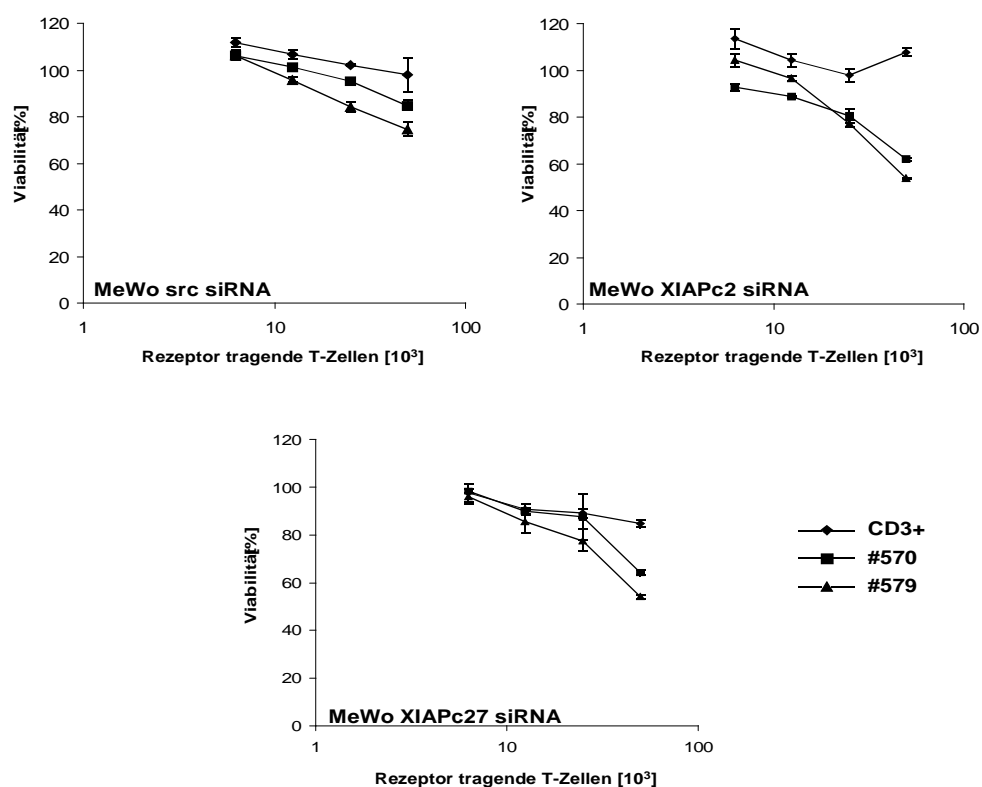


Abbildung 16: Verstärkung der anti-Tumor Antwort durch Inhibition von XIAP. T-Zellen eines gesunden Spenders wurden retroviral mit der DNA für anti-Melanom-Rezeptoren #570 und #579 transduziert. Die Anzahl der eingesetzten T-Lymphozyten wurde auf die Zahl Rezeptor tragender Effektorzellen (5×10^4 – $6,25 \times 10^3$ Effektorzellen/Vertiefung) normiert und mit

Zellen der Linie MeWo, die mit der siRNA c2, c27 oder src stabil transfiziert wurden, (je 5×10^4 Tumorzellen/Vertiefung) für 48h ko-kultiviert. Die Zytotoxizität wurde mit Hilfe des XTT-Tests nachgewiesen. Der Test wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt, der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt.

3.4 Funktionelle Charakterisierung der rekombinanten Immunrezeptoren #570 und #579 *in vivo*

In den vorherigen Kapiteln wurden die rekombinanten Immunrezeptoren hinsichtlich der T-Zell Aktivierung *in vitro* charakterisiert. Dieses Kapitel beschäftigt sich mit der Prüfung der anti-Tumor Aktivität *in vivo*. Dazu wurden primäre Melanomzellen, die in immundefiziente CD1^{-/-} nu/nu Mäuse transplantiert wurden, verwendet. Wegen der zweifelhaften klinischen Relevanz wurde auf etablierte Melanomzelllinien als Transplantat verzichtet.

3.4.1 Eliminierung von primären Melanomzellen *in vivo* durch allogene T-Lymphozyten mit anti-Melanom Immunrezeptoren

Primäre Melanomzellen M001 (1×10^6 Zellen) wurden zusammen mit CD3⁺ Lymphozyten eines gesunden Spenders, ausgestattet durch retroviralen Gentransfer mit den Immunrezeptoren anti-HMW-MAA-hFc-CD3- ζ (#570) und anti-p97-hFc-CD3- ζ (#579) (1×10^6 transduzierte Zellen), in CD1^{-/-} nu/nu Mäuse subkutan ko-injiziert. Tumorzellen M001 und nicht transduzierte humane CD3⁺ Lymphozyten wurden als Kontrolle ko-injiziert.

Das Tumolvolumen der Versuchstiere wurde in den drei Gruppen gemessen und als Kurvenschar mit Angabe des mittleren Tumorstadiums gezeigt. (Abb.17A). Das Überleben der Versuchstiere in Abhängigkeit der Zeit wird im Kaplan-Meier Plot dargestellt (**Abb.17 B**).

In allen CD1^{-/-} nu/nu Mäusen (6/6) der Kontrollgruppe entwickelten sich nach subkutaner Ko-Injektion von M001 Zellen und T-Lymphozyten ohne Immunrezeptor Tumore.

Nach Ko-Injektion von Melanomzellen und CD3⁺ Lymphozyten mit dem Immunrezeptor anti-HMW-MAA-hFc-CD3- ζ (#570) entwickelten sich nach einem Beobachtungszeitraum von 34 Tagen in 50% (3/6) der Versuchstiere Tumore.

In 84 % (1/6) aller Mäuse wurde das Tumorwachstum verhindert, nachdem sie mit Melanomzellen M001 und T-Lymphozyten, die den Immunrezeptor anti-p97-hFc-CD3- ζ (#579) exprimieren, subkutan ko-injiziert wurden.

Daraus wird geschlossen, dass die Aktivierung von rekombinanten T-Zellen durch Ko-Kultur mit allogenen Melanomzellen *in vivo* im Vergleich zur T-Zell Aktivierung *in vitro* ähnlich effizient ist.

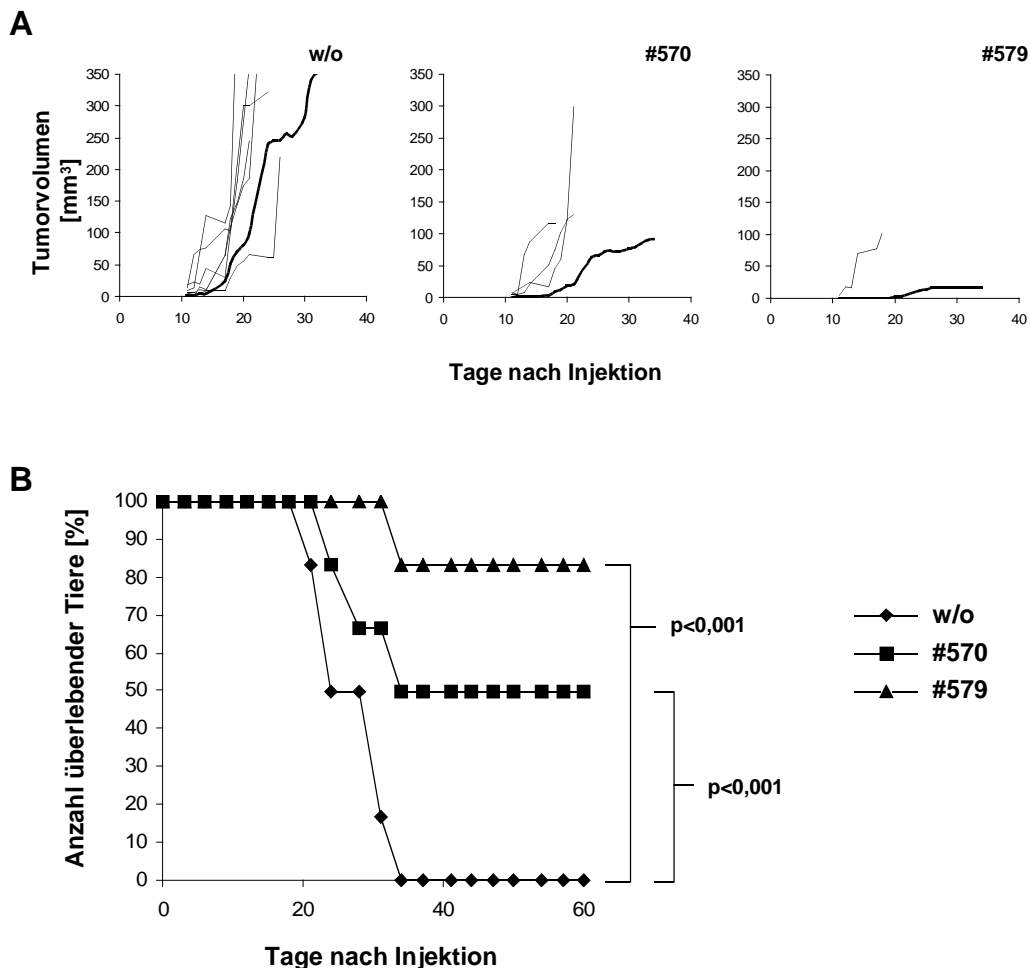


Abbildung 17: Wachstum der induzierten Tumore in CD1 nu/nu Mäusen nach Ko-Injektion von Melanomzellen mit Melanom spezifischen T-Zellen. Es wurden jeweils 6 Tiere mit Melanomzellen und T-Lymphozyten aus einem gesunden Spender, die den Immunrezeptor anti-HMW-MAA-hFc-CD3- ζ (#570) oder anti-p97-hFc-CD3- ζ (#579) exprimieren, subkutan ko-injiziert (1×10^6 Tumorzellen und 1×10^6 transduzierte T-Zellen). Als Kontrolle wurden Melanomzellen mit nicht transduzierten T-Zellen ko-injiziert. **[A]** Das Tumorzvolumen wurde innerhalb von 34 Tagen gemessen und als Kurvenschar der einzelnen Tiere (dünne Linie) mit Mittelwert (dicke Linie) dargestellt. Aus diesen Daten wurde die Anzahl überlebender Tiere von der Gesamtzahl der Tiere **[B]** in Abhängigkeit von der Zeit nach Kaplan-Meier bestimmt.

3.4.2 Eliminierung von primären Melanomzellen *in vivo* durch autologe T-Lymphozyten mit anti-Melanom Immunrezeptoren

Primäre Melanomzellen M001 (1×10^6 Zellen) und korrespondierende CD3⁺ Lymphozyten desselben Patienten, ausgestattet durch retroviralen Gentransfer mit den Immunrezeptoren anti-HMW-MAA-hFc-CD3- ζ (#570) oder anti-p97-hFc-CD3- ζ (#579) (1×10^6 transduzierte Zellen), wurden CD1^{-/-} nu/nu Mäusen subkutan ko-injiziert. Tumorzellen M001 und nicht transduzierte humane CD3⁺ Lymphozyten wurden weiteren sechs Versuchstieren als Kontrolle ko-injiziert.

Das Tumolvolumen der Versuchstiere wurde in den drei Gruppen gemessen und als Kurvenschar mit Angabe des mittleren Tumorwachstums gezeigt. (Abb.18A). Das Überleben der Versuchstiere in Abhängigkeit der Zeit wird im Kaplan-Meier Plot dargestellt (Abb.18B).

In 5 von 6 Mäusen der Kontrollgruppe entwickelten sich nach subkutaner Ko-Injektion von M001 Zellen und nicht modifizierten T-Lymphozyten Tumore.

Nach Ko-Injektion von Melanomzellen und autologen CD3⁺ Lymphozyten, mit dem Immunrezeptor anti-HMW-MAA-hFc-CD3- ζ (#570) entwickelte sich nach einem Beobachtungszeitraum von 52 Tagen in 1/6 der Versuchstiere ein Tumor.

In keinem Versuchstier (0/6) bildeten sich nach 52 Tagen Tumore, nachdem sie mit Melanomzellen M001 und autologen T-Lymphozyten, die den Immunrezeptor anti-p97-hFc-CD3- ζ (#579) exprimieren, subkutan ko-injiziert wurden.

Hieraus wird geschlossen, dass in einem autologen System die *in vivo* T-Zell Aktivierung durch den Immunrezeptor anti-HMW-MAA-hFc-CD3- ζ (#570) stärker ausfällt als *in vitro*. Die Verhinderung des Tumorwachstums ist in etwa so effizient wie die durch T-Zellen mit dem anti-p97-hFc-CD3- ζ (#579) Immunrezeptor.

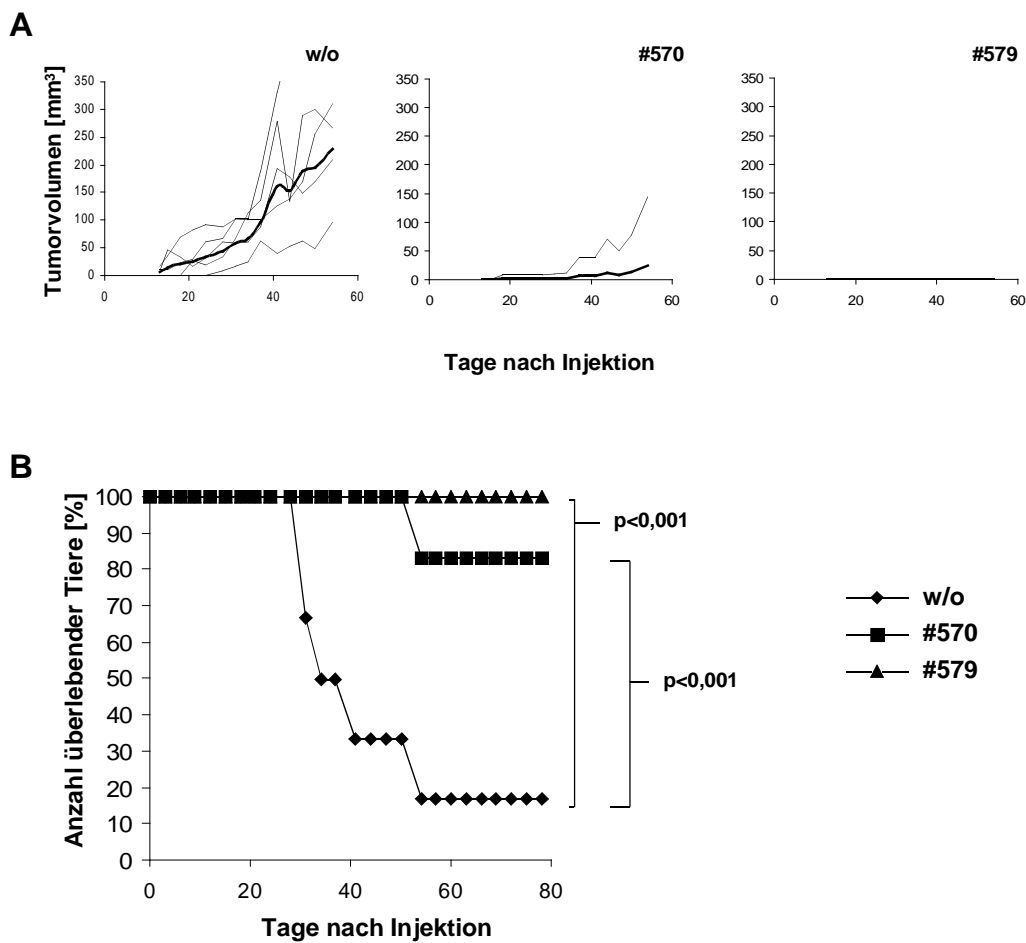


Abbildung 18: Wachstum der transplantierten, primären Melanomzellen in CD1^{-/-} nu/nu Mäusen nach Ko-Injektion mit Melanom spezifischen T-Zellen. Es wurden jeweils 6 Tiere mit Melanomzellen und autologen T-Lymphozyten, die retroviral mit den Immunrezeptoren anti-HMW-MAA-hFc-CD3- ζ (#570) oder anti-p97-hFc-CD3- ζ (#579) ausgestattet wurden, subkutan ko-injiziert (1×10^6 Tumorzellen und 1×10^6 transduzierte T-Zellen). Als Kontrolle wurden Melanomzellen mit nicht transduzierten T-Zellen ko-injiziert. **[A]** Das Tumolvolumen wurde innerhalb von 52 Tagen gemessen und als Kurvenschar der einzelnen Tiere (dünne Linie) mit Mittelwert (dicke Linie) dargestellt. Aus diesen Daten wurde die Anzahl überlebender Tiere von der Gesamtzahl der Tiere **[B]** in Abhängigkeit von der Zeit nach Kaplan-Meier bestimmt.

3.5 Identifikation von HMW-MAA⁺ Melanomzellen als Fraktion mit Tumorstammzellen

In den vorangegangenen Experimenten wurde gezeigt, dass sich *in vivo* die anti-Tumor Aktivität von T-Lymphozyten, die mit dem anti-HMW-MAA-hFc-CD3- ζ Immunrezeptor ausgestattet wurden, ähnlich der von T-Lymphozyten ist, die mit den anti-p97-hFc-CD3- ζ Immunrezeptor exprimieren, obwohl HMW-MAA in einer geringeren Anzahl von Tumorzellen exprimiert wird als p97. Deswegen wird angenommen, dass HMW-MAA⁺ Tumorzellen Stammzellen des Melanoms enthalten. Die Tumorstammzellhypothese besagt, dass eine sehr kleine Fraktion von Tumorzellen, die die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung besitzt, der Ursprung für das Tumorwachstum und dessen Heterogenität ist. Ein Postulat dieser Hypothese ist, dass eine Eliminierung dieser Fraktion zum Absterben der restlichen Tumormasse führen sollte (Reya *et al.* 2001).

Aufgrund unserer bestehenden Daten soll im folgenden untersucht werden, ob die HMW-MAA⁺ Melanomzellen Tumorstammzellen beinhalten.

3.5.1 HMW-MAA⁺ Melanomzellen exprimieren Tumorstammzell-Marker

In diesem Versuch wurden primäre Melanomzellen hinsichtlich der Expression von HMW-MAA und bekannter Tumorstammzell-assoziiertes Marker untersucht.

Dafür wurden primäre Melanomzellen aus Tumorgewebe isoliert (n=5) und bis zu einer Anzahl von 1×10^7 propagiert. Die kultivierten Tumorzellen wurden hinsichtlich HMW-MAA Expression mit Hilfe des monoklonalen, PE-konjugierten anti-HMW-MAA Antikörper und hinsichtlich der Expression der Melanommarker mit entweder dem primären anti-Tyrosinase Antikörper, dem primären anti-S100 Antikörper oder dem primären anti-MelanA Antikörper, gefolgt von der Inkubation mit dem jeweils spezies-abhängigen, FITC-konjugierten

Sekundärantikörper untersucht. Als Kontrolle wurden die Zellen mit dem FITC- oder PE-konjugierten anti-Isotyp Antikörper inkubiert (Abb.19A).

Die Expression des Antigens HMW-MAA ist auf primären Tumorzellen aus Melanombiopsien detektierbar. Die Frequenz der HMW-MAA exprimierenden Zellen ist, abhängig vom Melanomtyp und -stadium unterschiedlich ausgeprägt. Sie reicht von 7,3% aller Zellen bis 41,3% aller Zellen. Alle primären Melanomzellen exprimieren ein oder mehrere Melanom-assoziierte Antigene.

Desweiteren wurden M001 Melanomzellen mit dem monoklonalen, PE-konjugierten anti-HMW-MAA Antikörper und den FITC-konjugierten Antikörpern gegen die bekannten Tumorstammzellmarker CD20, CD24, CD34, CD44 und CD61, sowie mit dem FITC-konjugierten anti-Tyrosinase Antikörper ko-inkubiert. Als Kontrolle wurden die Zellen mit dem FITC-konjugierten anti-Isotyp Antikörper markiert und durchflusszytometrisch analysiert. Die mittleren Fluoreszenzintensitäten der Kontrollen und HMW-MAA-positiven oder -negativen Zellen wurden im Histogramm übereinander gelegt (Abb.19B).

HMW-MAA⁺ primäre Melanomzellen exprimieren in sehr geringer Frequenz CD20 jedoch in hoher Frequenz die Antigene CD24, CD44 und CD61. Das Antigen CD34 wird nicht von HMW-MAA⁺ Melanomzellen exprimiert. HMW-MAA⁻ primäre Melanomzellen exprimieren keine Tumorstammzell-assoziierten Antigene. Zellen beider Fraktionen exprimieren Tyrosinase.

Es wurden Gewebeschnitte aus einer Metastase des Patienten M001 angefertigt, fixiert und mit dem PE-konjugierten anti-HMW-MAA Antikörper, dem primären Maus anti-CD20 Antikörper, gefolgt von dem sekundären, Biotin-gekoppelten anti-murinIgG Antikörper und Alexa488®-Streptavidin, oder dem dem primären Maus anti-Tyrosinase Antikörper, gefolgt von dem sekundären, Biotin-gekoppelten anti-murinIgG Antikörper und Alexa488®-Streptavidin, inkubiert. Die Gewebeschnitte wurden in DAPI-haltigem Medium eingebettet und am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet (Abb.19C).

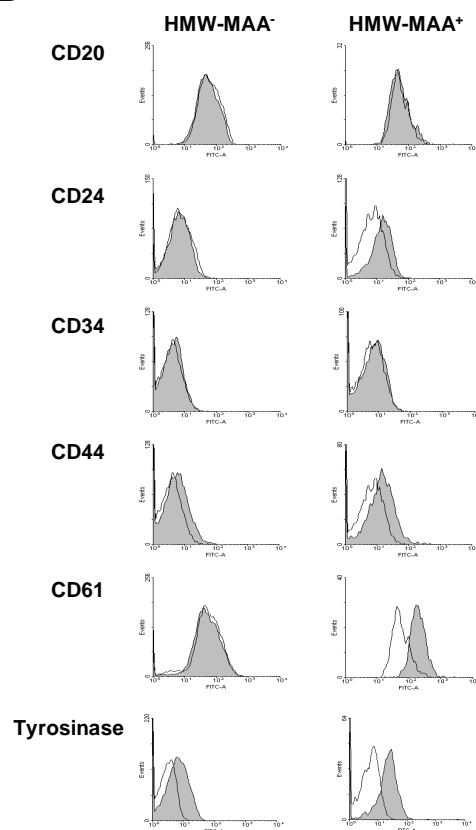
Auf Gewebeschnitten eines Melanompatienten ist die heterogene Verteilungsbreite von HMW-MAA⁺ und HMW-MAA⁻ Zellen erkennbar. Das

Antigen CD20 ist nur auf sehr wenigen Zellen im Gewebe detektierbar.
Tyrosinase wird homogen von Melanomzellen exprimiert.

A

Pat. Nr.	Typ	AJCC-Stadium	Therapie	Zellen der Melanom Biopsie			
				HMW-MAA+	Tyrosinase+	S100+	MelanA+
1	NMM	IIB		37,6%	53,9%	15,4%	21,9%
2	NMM	IIIb		7,5%	28,8%	41,1%	53,2%
3	NMM	Ila	IFN α	12,5%	31,6%	<0,1%	37,5%
4	UCM	IV		30,6%	<0,1%	1,3%	15,9%
5	SSM	IV	Taxol/Cisplatin	41,3%	43,7%	5,9%	46,8%

B



C

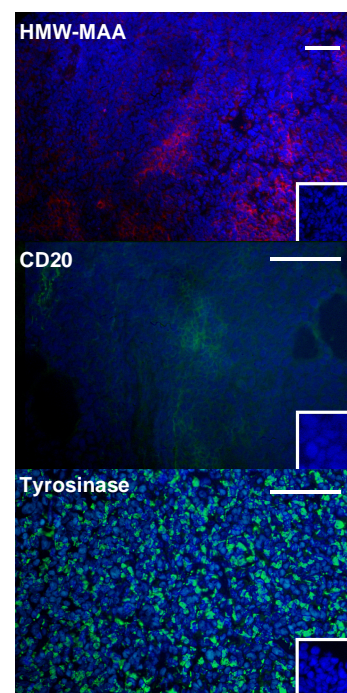


Abbildung 19: Expression der Tumorstammzellmarker auf HMW-MAA⁺ Melanomzellen.

[A] Primäre Melanomzellen von Patienten aus unterschiedlichen Stadien und mit verschiedenen Melanomtypen wurden isoliert und jeweils 1×10^6 Zellen mit dem PE-konjugierten anti-HMW-MAA Antikörper inkubiert. Es folgte eine weitere Inkubation mit den primären

melanomspezifischen Maus-Antikörpern anti-Tyrosinase, anti-S100 oder anti-Melan-A, gefolgt von dem FITC-konjugierten anti-Isotyp Antikörper. Die Auswertung erfolgte durchflusszytometrisch, die Anzahl der Antigen-positiven Zellen ist in der Tabelle dargestellt. (NMM = noduläres malignes Melanom; SSM = oberflächlich spreitendes Melanom; UCM = unklassifiziertes Melanom) **[B]** 1×10^6 primäre Melanomzellen wurden mit dem PE-konjugierten anti-HMW-MAA Antikörper und dem FITC-konjugierten anti-CD20, anti-CD24, anti-CD34, anti-CD44, anti-CD61 oder anti-Tyrosinase Antikörper ko-inkubiert, als Negativkontrolle wurden die Zellen mit dem PE- oder FITC-konjugierten anti-murinIgG2 α Antikörper inkubiert. Die mittleren Fluoreszenzintensitäten wurden ermittelt und im Histogramm übereinander gelegt. **[C]** Es wurden Gewebeschnitte aus einer Metastase eines Melanompatienten angefertigt und mit dem PE-konjugierten anti-HMW-MAA Antikörper, dem primären Maus anti-CD20 Antikörper, gefolgt von dem sekundären, Biotin- gekoppelten anti-murinIgG Antikörper und Alexa488®-Streptavidin, oder dem dem primären Maus anti-Tyrosinase Antikörper, gefolgt von dem sekundären, Biotin- gekoppelten anti-murinIgG Antikörper und Alexa488®-Streptavidin, inkubiert. Die Gewebeschnitte wurden in DAPI-haltigem Medium eingebettet und am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Balken \triangleq 20 μ m, Isotypkontrolle ist im Bild unten rechts eingefügt.

3.5.2 Aufgereinigte HMW-MAA⁺-Melanomzellen induzieren Tumore mit heterogener HMW-MAA Expression nach serieller Transplantation

Kultivierte, primäre Melanomzellen des Patienten M001 wurden in eine HMW-MAA⁺ und HMW-MAA⁻ Fraktion mittels MACS-Zellsortierung aufgereinigt. Dafür wurden 5×10^7 Zellen mit dem PE-konjugierten anti-HMW-MAA Antikörper gefolgt von anti-PE MicroBeads® inkubiert und zu einer Reinheit von >96% aufgetrennt. Anschließend wurden jeweils 1×10^6 gereinigte HMW-MAA⁺ und HMW-MAA⁻ Zellen subkutan in immundefiziente Mäuse des Stammes NIHIII injiziert (n=5). Als Kontrolle wurden jeweils 1×10^6 unfraktionierte Zellen in NIHIII-Mäuse injiziert. Das Tumolvolumen wurde bestimmt und als Tumorfrees Überleben im Kaplan-Meier Plot dargestellt (Abb.20A). Nach 53 Tagen wurden die Tumore aus den Mäusen explantiert, aus einem Teil des Tumors Gewebeschnitte angefertigt und aus dem anderen Teil Tumorzellen isoliert. Die

Gewebeschnitte wurden fixiert und mit dem PE-konjugierten anti-HMW-MAA Antikörper, oder dem primären anti-Tyrosinase Antikörper, gefolgt von dem sekundären, Biotin-gekoppelten anti-murinIgG Antikörper und Alexa488®-Streptavidin, inkubiert in DAPI-haltigem Medium eingebettet und am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Die isolierten Tumorzellen aus dem induzierten Tumor wurden anschließend wiederum mit dem oben beschriebenen Verfahren in HMW-MAA⁺ und HMW-MAA⁻ Fraktionen aufgetrennt und in NIHIII Mäuse injiziert. Die entstandenen Tumore der zweiten Transplantation wurden hinsichtlich der Expression von HMW-MAA und Tyrosinase am Fluoreszenzmikroskop analysiert, wie oben beschrieben (Abb.20B).

Die Tumorinduktion durch HMW-MAA⁺ Zellen verläuft in NIHIII-Mäusen langsamer und weniger effizient als durch unfraktionierte Melanomzellen. Zellen, die das Antigen HMW-MAA nicht exprimieren induzieren keine Tumore in NIHIII-Mäusen.

Gereinigte HMW-MAA⁺ Zellen induzieren nach erster und zweiter Transplantation Tumore, die eine heterogene Expression des Antigens HMW-MAA aufweisen. Die HMW-MAA Expression ist in den Tumoren nach erster Transplantation genauso hoch wie in den Tumoren nach zweiter Transplantation. Alle induzierten Tumore exprimieren hingegen homogen Tyrosinase.

Daraus wird geschlossen, dass ausschließlich die HMW-MAA⁺ Zellfraktion die Tumorstammzellwachstum auslösende Fraktion ist. Weiterhin teilen sich diese Zellen hinsichtlich des Antigens HMW-MAA asymmetrisch, d.h. sie weisen das Potential zur Selbsterneuerung und Differentiation auf. Damit erfüllen HMW-MAA⁺ Zellen zwei Kriterien der Tumorstammzellhypothese.

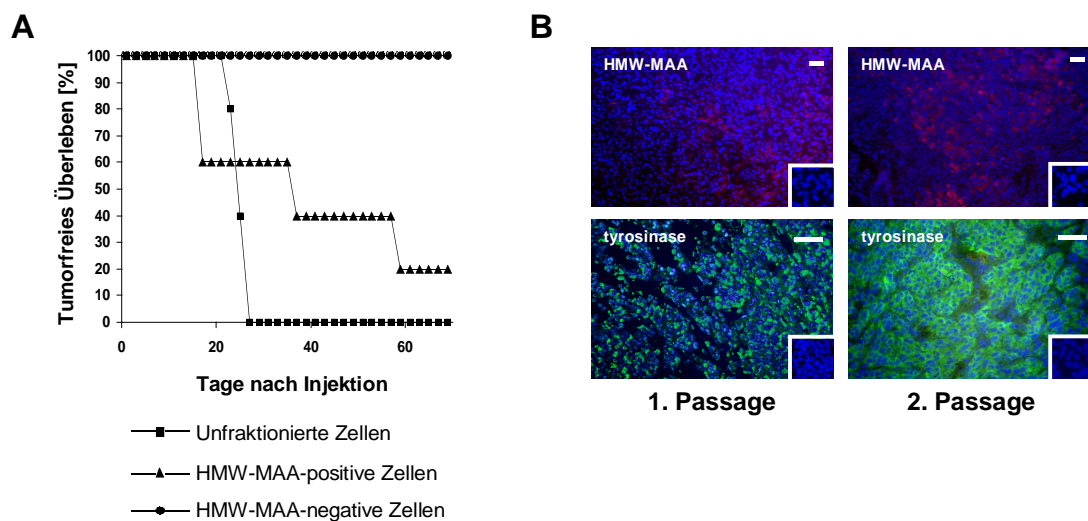


Abbildung 20: Tumorinduktion in immundefizienten Mäusen durch gereinigte HMW-MAA⁺ Zellen. [A] 5×10^7 isolierte primäre Melanomzellen wurden mit dem PE-konjugierten anti-HMW-MAA Antikörper gefolgt von anti-PE MicroBeads® inkubiert und zu einer Reinheit von >96% aufgetrennt. Anschließend wurden jeweils 1×10^6 aufgereinigte HMW-MAA⁺ und HMW-MAA⁻ Zellen subkutan in Mäuse des Stammes NIHIII injiziert (n=5). Als Kontrolle wurden in 5 NIHIII-Mäuse jeweils 1×10^6 unfraktionierte Zellen injiziert. Das Tumorstadium wurde bestimmt und als tumorfreies Überleben im Kaplan-Meier Plot dargestellt. [B] Die nach der ersten und zweiten Transplantation induzierten Tumore wurden explantiert und immunhistologisch hinsichtlich der Expression von HMW-MAA und Tyrosinase untersucht. Sie wurden mit dem PE-konjugierten anti-HMW-MAA Antikörper, oder dem primären Maus anti-Tyrosinase Antikörper, gefolgt von dem sekundären, Biotin-gekoppelten anti-murine IgG Antikörper und Alexa488®-Streptavidin inkubiert, in DAPI-haltigem Medium eingebettet und am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Balken \triangleq 20µm, Isotypkontrolle im Bild unten rechts eingefügt.

3.6 Spezifische Aktivierung von T-Lymphozyten mit rekombinanten Immunrezeptoren gegen Tumorstammzellen

In den vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass T-Lymphozyten, die mit rekombinanten Immunrezeptoren ausgestattet wurden, in der Lage sind, gegen Tumorzellen mit homogener und heterogener Expression von Ziel-Antigenen aktiviert zu werden und diese zu lysieren. Es soll nun untersucht werden, ob die Eliminierung der kleinen HMW-MAA⁺ CD20⁺ Tumorstammzellpopulation zur Reduktion der Tumormasse führt.

3.6.1 Apoptose-Induktion in HMW-MAA⁻ Tumorzellen nach Eliminierung von HMW-MAA⁺ Melanomzellen

In diesem Ansatz wurden T-Lymphozyten eines gesunden Spenders retroviral zur Expression des Rezeptors anti-HMW-MAA-hFc-CD3- ζ (#570) transduziert. Die Anzahl der Rezeptor tragenden Effektorzellen wurde eingestellt und 5×10^4 Zellen pro Vertiefung auf einer Mikrotiterplatte ausgesät als Kontrolle wurden nicht transduzierte T-Lymphozyten verwendet. Anschließend erfolgte die Zugabe von Melanomzellen des Patienten M001 (5×10^4 Zellen/Vertiefung). Nach 14, 28 und 42 Stunden der Ko-Kultur wurden die Melanomzellen entnommen und mit dem PE-konjugierten anti-HMW-MAA Antikörper, dem FITC-konjugierten anti-GranzymB Antikörper, dem APC-konjugierten AnnexinV Antikörper und 7-AAD inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert (Abb.21A).

Nach 14, 28 und 42 Stunden Ko-Kultur mit Immunrezeptor-tragenden T-Lymphozyten ist in HMW-MAA⁺ Melanomzellen die Aufnahme des zytotoxischen Moleküls GranzymB nachweisbar. Diese Zellen exprimieren ebenfalls den Apoptose-Marker AnnexinV und nehmen 7-AAD auf. In Melanomzellen, die mit

untransduzierten T-Lymphozyten ko-kultiviert wurden sind diese Moleküle nicht nachweisbar.

HMW-MAA⁻ Melanomzellen zeigen zu keinem Zeitpunkt nach der Ko-Kultur mit Rezeptor-tragenden T-Zellen eine Aufnahme von GranzymB. Jedoch sind beginnend ab 28 Stunden und in zunehmendem Maße AnnexinV und die Aufnahme von 7-AAD nachweisbar.

Desweiteren wurden 1×10^6 M001 Melanomzellen in Mäuse des Stammes CD1^{-/-} nu/nu subkutan injiziert. Nach 20 Tagen folgte die intratumorale Injektion von 1×10^6 Immunrezeptor-tragender (#570) T-Lymphozyten. Nach weiteren 48 Stunden wurden die Tumore explantiert und Gewebeschnitte angefertigt. Die Gewebeschnitte wurden mit dem PE-konjugierten anti-HMW-MAA Antikörper, dem primären, Biotin-konjugierten anti-humanIgG1 Antikörper gefolgt von Streptavidin-Alexa488® und dem primären anti-aktivierte-Caspase3 Antikörper gefolgt von dem PacificBlue®-konjugierten anti-rabbitIgG Antikörper inkubiert. Anschließend wurden die Gewebeschnitte eingebettet und am Fluoreszenzmikroskop analysiert (Abb.21B).

48 Stunden nach intratumoraler Injektion in etablierte Maustumore sind im Tumorgewebe Immunrezeptor-tragende T-Lymphozyten zu detektieren. In der Umgebung der transduzierten T-Zellen sind HMW-MAA-positive und -negative Melanomzellen sichtbar, die den Apoptose-Marker aktivierte Caspase 3 exprimieren.

Daraus wird geschlossen, dass die direkte Zytolyse von HMW-MAA⁺ Zellen durch T-Zellen mit rekombinanten Immunrezeptor *in vitro* und *in vivo* zu einer Induktion der Apoptose in HMW-MAA⁻ Zellen führt, die unabhängig von den modifizierten T-Lymphozyten ausgelöst wird.

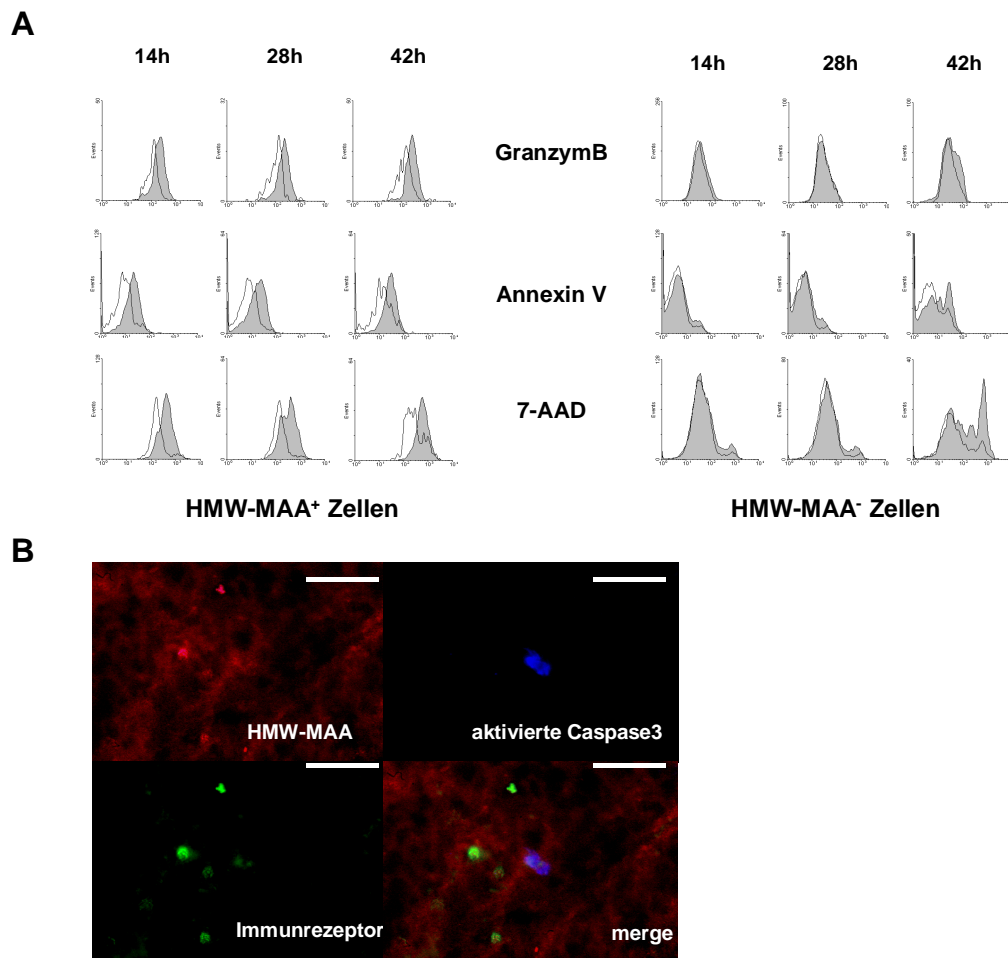


Abbildung 21: Apoptose Induktion in HMW-MAA⁻ Melanomzellen nach Eliminierung von HMW-MAA⁺ Tumorzellen. [A] 5×10^4 transduzierte T-Zellen wurden auf einer Mikrotiterplatte ausgesät, als Kontrolle wurden nicht transduzierte T-Lymphozyten verwendet. Anschließend erfolgte die Zugabe von Melanomzellen des Patienten M001 (5×10^4 Zellen/Vertiefung). Nach 14, 28 und 42 Stunden der Ko-Kultur wurden die Melanomzellen entnommen und mit dem PE-konjugierten anti-HMW-MAA Antikörper, dem FITC-konjugierten anti-GranzymB Antikörper, dem APC-konjugierten AnnexinV Antikörper und 7-AAD inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. Die Histogramme der Fluoreszenzintensitäten wurden übereinander gelegt. **[B]** 1×10^6 M001 Melanomzellen wurden in Mäuse des Stammes CD1^{-/-} nu/nu subkutan injiziert. Nach 20 Tagen folgte die intratumorale Injektion von 1×10^6 T-Lymphozyten mit dem Immunrezeptor #570. Nach weiteren 48 Stunden wurden die Tumore explantiert und Gewebeschnitte angefertigt. Die Gewebeschnitte wurden mit dem PE-konjugierten anti-HMW-MAA Antikörper, dem primären, Biotin-konjugierten anti-humanIgG1 Antikörper gefolgt von Streptavidin-Alexa488® und dem primären anti-aktivierte-Caspase3 Antikörper gefolgt von dem

PacificBlue®-konjugierten anti-rabbitIgG Antikörper inkubiert. Anschließend wurden die Gewebeschnitte eingebettet und am Fluoreszenzmikroskop analysiert, Balken \triangleq 20 μ m.

3.6.2 Generierung des CD20-spezifischen Immunrezeptor pBullet-Leu16scFv-hFc-CD3 ζ (#1115)

Da bekannt ist, dass Melanomstammzellen das B-Zell Antigen CD20 exprimieren (Fang *et al.* 2005), soll ein Immunrezeptor mit Spezifität CD20 generiert und charakterisiert werden.

Um den rekombinanten Immunrezeptor pBullet-Leu16scFv-hFc-CD3 ζ zu generieren, wurde die DNA kodierend für das Leu16 single chain Fragment variabler Regionen (scFv) aus dem Plasmid #1104 (pL-scFv(Leu16)-zeta-SN) mittels PCR unter Einsatz der Oligonukleotide CD20BgIII-AS und L-kappa-S amplifiziert. Mit Hilfe dieses Verfahrens wurden Schnittstellen für die Restriktionsendonucleasen NcoI und BgIII an die Enden des scFv angefügt. Anschließend wurde das erhaltene PCR-Produkt mit den oben genannten Restriktionsenzymen geschnitten um überhängende, kohäsive DNA Enden zu erhalten. Aus dem Vektor pBullet-BW431/26scFv-hFc-CD3 ζ wurde die DNA kodierend für das anti-CEA-scFv mittels enzymatischen Verdaus mit den Restriktionsendonucleasen NcoI und BamHI entfernt und ebenfalls überhängende, kohäsive Enden generiert. Das Amplifikat und die Vektor-DNA wurden anschließend elektrophoretisch isoliert, gereinigt und im molaren Verhältnis von 1:5 durch Einsatz der T4-Ligase ligiert. Die erhaltene DNA wurde mittels Hitzeschocktransformation in Bakterien eingebracht. Zur Kontrolle wurde die rekombinierte Plasmid-DNA mit den Restriktionsenzymen NcoI und XhoI geschnitten, elektrophoretisch aufgetrennt und Banden der Größe 6600 bp und 2100 bp, wie erwartet, erhalten. Die erhaltene DNA kodierend für den rekombinanten Immunrezeptor pBullet-Leu16scFv-hFc-CD3 ζ wurde unter Verwendung der Oligonukleotide Seq-Fc-AS, pBullet5'seqneu und 5SeqFc-end sequenziert. Die vollständige Sequenz ist im Anhang angegeben.

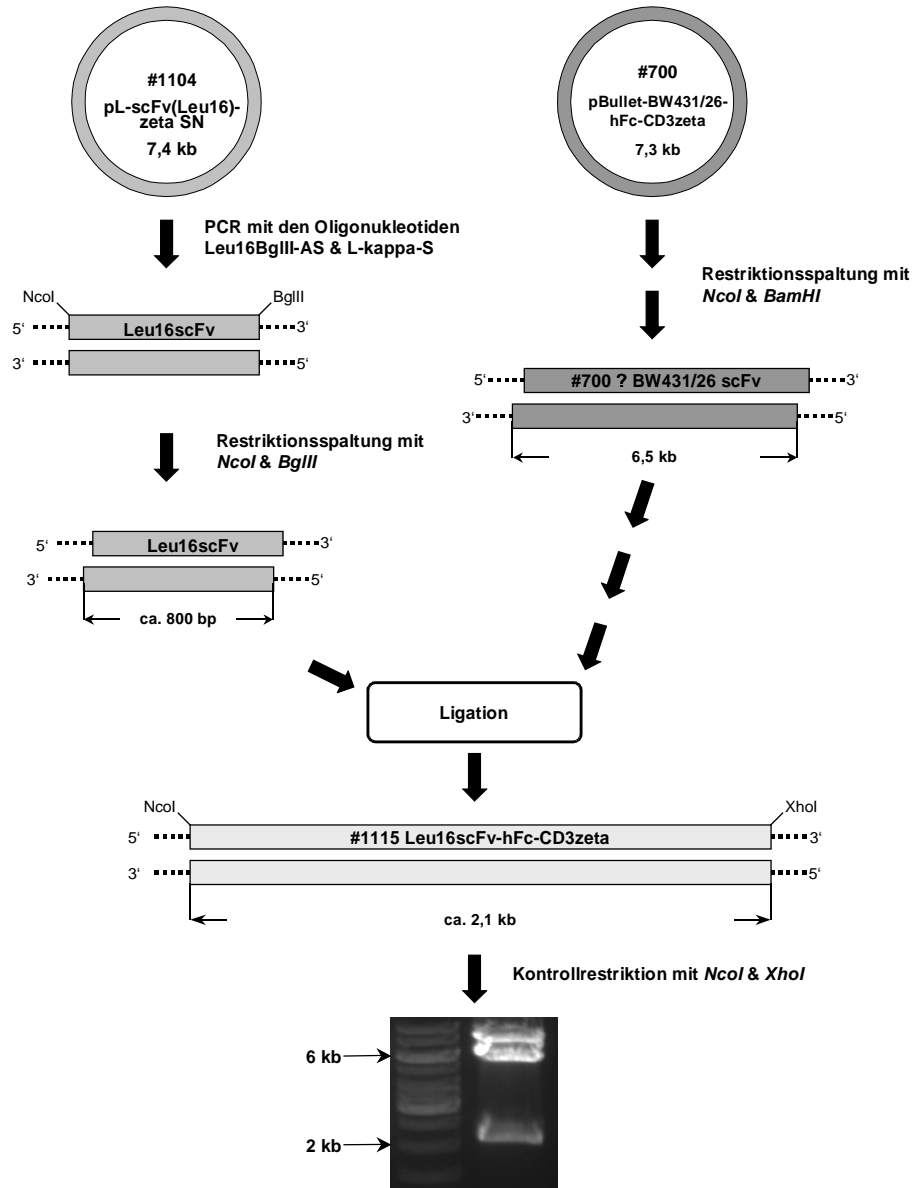


Abbildung 22: Klonierungsschema des Immunrezeptors #1115

3.6.3 Spezifische Aktivierung des Immunrezeptors #1115 gegen CD20-positive Zelllinien

In diesem Ansatz wurden T-Lymphozyten eines gesunden Spenders retroviral zur Expression der Rezeptoren anti-CD20-hFc-CD3- ζ (#1115) anti-HMW-MAA-hFc-CD3- ζ (#570) und anti-CD19-hFc-CD3- ζ (#941) transduziert (Abb.23A). Die Anzahl der Rezeptor tragenden Effektorzellen wurde eingestellt und in einer Verdünnungsreihe (5×10^4 – $6,25 \times 10^3$ Effektorzellen/Vertiefung) in einer Mikrotiterplatte zusammen mit Zellen der Linie Daudi (CD20⁺ CD19⁺ HMW-MAA⁻) und als Vergleich Zellen der Linie MeWo (CD20⁻ CD19⁻ HMW-MAA⁺) (jeweils 5×10^4 Zellen/Vertiefung) ko-kultiviert. Die Zellen wurden 48h ko-inkubiert. Die Konzentration von IFN γ im Kulturüberstand als Maß der Aktivierung wurde mit Hilfe eines ELISA gemessen (Abb.23B).

Es zeigte sich, dass T-Zellen, die den anti-CD20 Immunrezeptor #1115 oder den anti-CD19 Immunrezeptor #941 exprimieren, dosisabhängig nach Ko-Kultur mit Daudi-Zellen das Zytokin IFN γ in den Kulturüberstand sezernieren, nicht jedoch nach Ko-Kultur mit MeWo-Zellen. *Vice versa* sezernieren T-Lymphozyten, die mit dem anti-HMW-MAA Immunrezeptor #570 ausgestattet wurden, nach Ko-Kultur mit MeWo-Zellen, nicht jedoch nach Ko-Kultur mit Daudi-Zellen, IFN γ in den Kulturüberstand.

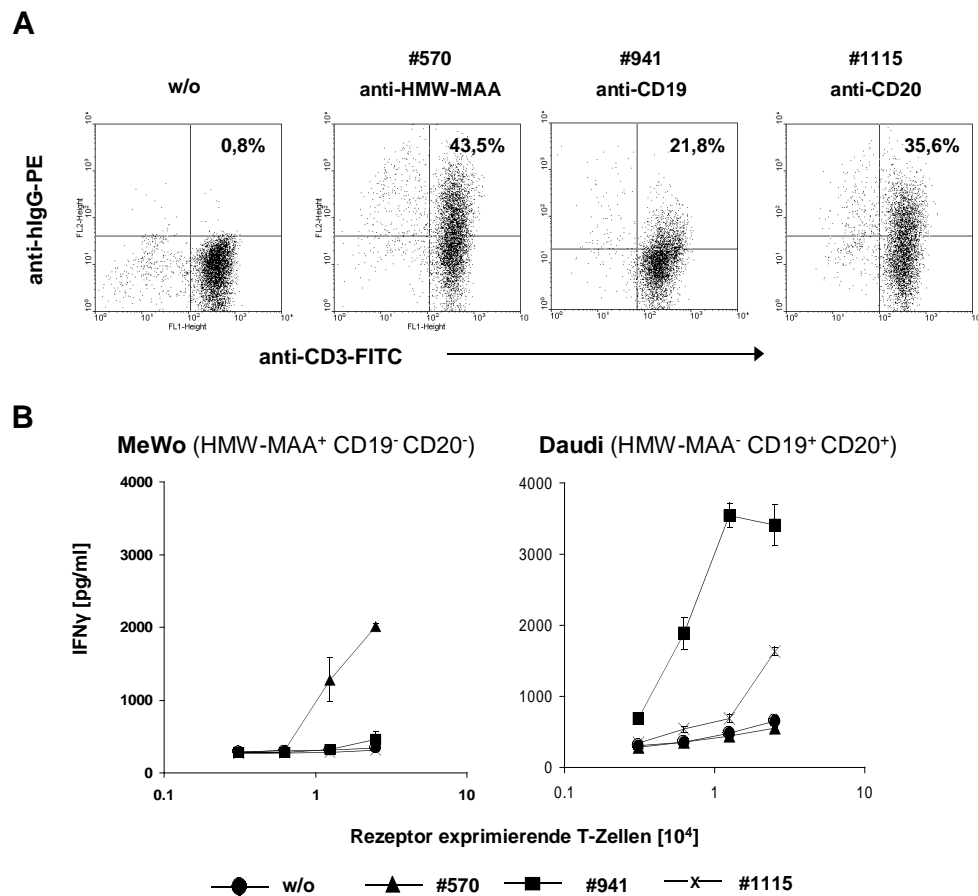


Abbildung 23: Spezifische Aktivierung des anti-CD20 Immunrezeptors #1115 gegen CD20⁺ Zelllinien. [A] Je 1×10^6 CD3⁺-Zellen eines gesunden Spenders wurden mit den Expressionsvektoren für die Immunrezeptoren #570, #941 und #1115 retroviral transduziert. Die Expression der rekombinanten Rezeptoren auf der Oberfläche der T-Zellen wurde mit Hilfe des PE-konjugierten anti-human-IgG Antikörpers, der an die humane Fc-Domäne des Rezeptors bindet, und des FITC-konjugierten anti-CD3 Antikörpers durchflusszytometrisch analysiert. Die ermittelte Prozentzahl gibt den Anteil der T-Zellen, die den Immunrezeptor auf der Oberfläche exprimieren, von der Gesamtzahl der T-Zellen an. [B] Die Anzahl der eingesetzten T-Lymphozyten wurde auf die Zahl Rezeptor tragender Effektorzellen (5×10^4 – $6,25 \times 10^3$ Effektorzellen/Vertiefung) normiert und mit Zellen der Linien Daudi und MeWo (je 5×10^4 Tumorzellen/Vertiefung) für 48h ko-kultiviert. Die Konzentration des sezernierten IFN γ wurde mittels ELISA bestimmt. Die Tests wurden als Dreifachbestimmung durchgeführt, der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt.

3.6.4 Eliminierung von Melanomstammzellen führt zur Reduktion der Tumormasse

Bisher wurde gezeigt, dass T-Zellen mit rekombinanten anti-Melanom Immunrezeptoren ein Tumorwachstum *in vivo* verhindern können. Weiterhin wurde die HMW-MAA⁺ Zellfraktion als Melanomstammzell-beinhaltende Fraktion identifiziert. Es soll im folgenden Ansatz geklärt werden, ob die Eliminierung der kleinen Subpopulation von Melanomstammzellen innerhalb eines etablierten Tumors zur Reduktion der Tumormasse führt.

Dafür wurden T-Lymphozyten eines gesunden Spenders retroviral zur Expression der Immunrezeptoren anti-CD20-hFc-CD3- ζ (#1115) anti-HMW-MAA-hFc-CD3- ζ (#570) und anti-CD19-hFc-CD3- ζ (#941) transduziert. Desweiteren wurden in immundefiziente Mäuse des Stammes NIHIII je 1×10^6 primäre Melanomzellen subkutan injiziert. Das Tumolvolumen wurde bestimmt und bei einer Tumorgröße von $\sim 15 \text{mm}^3$ wurden dreimal in zweitägigem Abstand je 1×10^6 transduzierte T-Lymphozyten intravenös in die Versuchstiere injiziert. Zur Kontrolle erfolgte die Injektion von T-Lymphozyten ohne Immunrezeptor. Das Tumolvolumen wurde 21 Tage nach der letzten Injektion gemessen (Abb.24A) und das tumorfreie Überleben statistisch ausgewertet (Abb.24B).

Die Injektion von nicht transduzierten T-Zellen führt zu einem rapiden Wachstum der Melanome in 5 von 5 Mäusen. Ein ähnlich starkes Tumorwachstum wird in Mäusen beobachtet, die mit T-Zellen mit dem unspezifischen anti-CD19 Immunrezeptor behandelt wurden.

In 6 von 8 Mäusen führte die Behandlung mit T-Lymphozyten, die mit dem anti-HMW-MAA Immunrezeptor modifiziert wurden, zur Eliminierung des etablierten Melanoms. In 2 von 8 Mäusen führte diese Behandlung zu einem verlangsamten Tumorwachstum.

In allen Mäusen, in denen T-Zellen mit CD20 spezifischem Immunrezeptor injiziert wurden, wurde das Melanom eliminiert.

Aus diesen Ergebnissen wird geschlossen, dass eine spezifische Eliminierung der kleinen Population von Melanomstammzellen in etablierten Tumoren zu einer Reduktion der Tumormasse und zur Eradikation des Tumors führt.

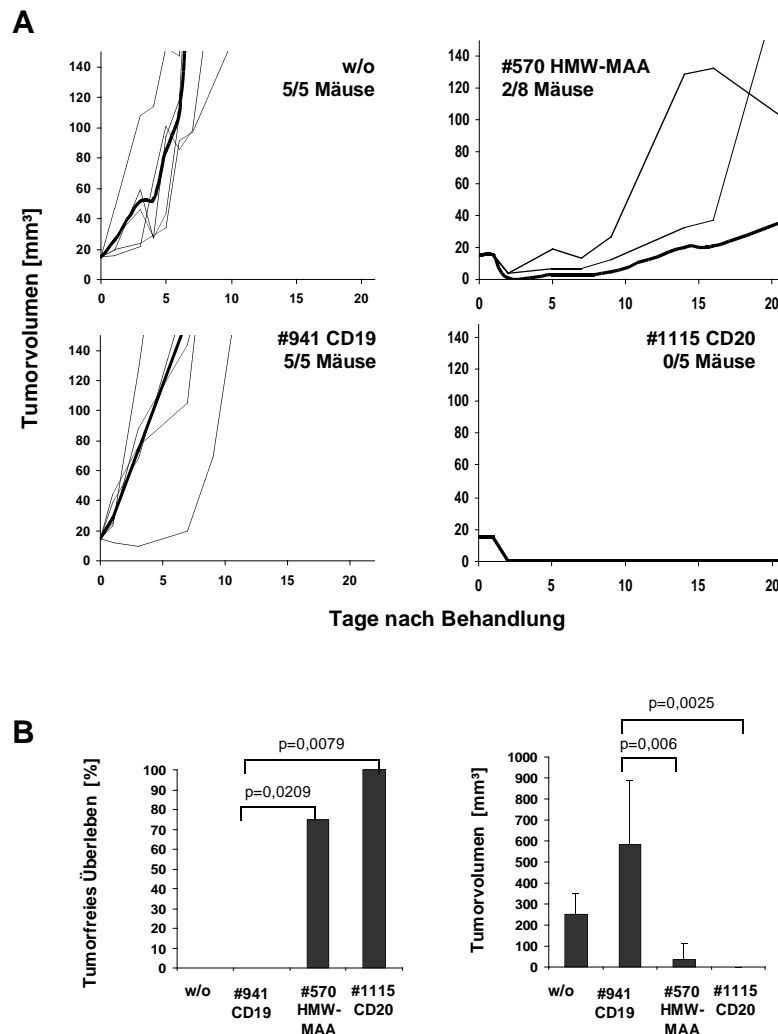


Abbildung 24: *In vivo* Eliminierung von etablierten Melanomen. [A] 1×10^6 primäre Melanomzellen wurden in Mäuse des Stammes NIHIII subkutan injiziert. Bei einer Tumorgöße von etwa 15 mm^3 wurden T-Lymphozyten, die die Immunrezeptoren #570, #1115 oder #941 exprimieren an den Tagen -4, -2 und 0 intravenös injiziert. Anschließend wurde für 21 Tage das Tumorzellen bestimmt und das tumorfreie Überleben aufgezeichnet. [B] Die statistische Auswertung des tumorfreien Überlebens und des mittleren Tumorzellen nach 21 Tagen erfolgte mittels Fisher's Exact Test und dem Student'schen T-Test.

4 Diskussion

Die adoptive Immuntherapie mit Tumor-spezifischen T-Zellen stellt einen neuen Ansatz in der Behandlung maligner Neoplasien dar. Hierbei soll die Anergie der Immunzellen von Tumorpatienten überwunden und ihnen Spezifität gegen das Tumorgewebe verliehen werden. Durch *ex vivo* Selektion, Expansion und Re-Infusion von tumorinfiltrierenden T-Zellen wurden erste klinische Erfolge verzeichnet (Dudley *et al.* 2002). In unserer Arbeitsgruppe wurden T-Zellen definierte Spezifität verliehen durch Expression von rekombinanten T-Zell Rezeptoren, die durch ihren modularen Aufbau, bestehend aus einer Antikörperbindedomäne (scFv) und einer T-Zell Rezeptor Signaldomäne (CD3 ζ), T-Zellen eine MHC-unabhängige Spezifität gegen verschiedene maligne Zellen verleihen (Hombach *et al.* 2002). Bislang war es unklar, ob auch T-Zellen aus Patienten mit einer malignen, hämatologischen Neoplasie mit den rekombinanten Immunrezeptoren modifiziert werden können und ob die modifizierten T-Zellen eine Spezifität gegen autologe CLL Zellen besitzen. Im ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit sollte diese Frage, sowie der potentielle Mechanismus der Aktivierung geklärt werden.

Zellen der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) sind durch die hohe Ko-Expression des T-Zell Antigens CD5 in Verbindung mit dem B-Zell Antigen CD19 charakterisiert. Die homogene Expression von CD19 auf allen CLL Zellen macht dieses Antigen zu einer guten Zielstruktur für den immuntherapeutischen Ansatz. Aus diesem Grund wurden neue antiCD19 Immunrezeptoren generiert und mit Hilfe des retroviralen Gentransfersystems pHIT, pCOLT, pBullet exprimiert. Dafür wurde die Antikörperbindedomäne antiCD19scFv in Vektoren vom Typ pBullet kloniert, die Expressionskassetten für Immunrezeptoren mit CD3 ζ oder kombinierter CD28-CD3 ζ Signaldomäne enthalten. Die neu generierten Vektoren wurden mittels Restriktionsspaltung analysiert (Abb.5&6).

Die meisten Untersuchungen mit rekombinanten Immunrezeptoren wurden bislang an T-Zellen gesunder Spender durchgeführt. Für einen möglichen

klinischen Einsatz ist es jedoch notwendig, zu überprüfen, ob auch Patienten T-Zellen mit den Immunrezeptoren modifiziert werden können. Nach retroviralem Gentransfer der neu generierten antiCD19 Immunrezeptoren in isolierte T-Lymphozyten von CLL-Patienten wurde kein signifikanter Unterschied in der Expressionshöhe und Transduktionsfrequenz im Vergleich zu T-Lymphozyten gesunder Spender gefunden. Desweiteren werden Immunrezeptoren mit kombinierter CD28-CD3 ζ Signaldomäne in ähnlichem Maße von T-Zellen exprimiert wie Rezeptoren mit CD3 ζ Signaldomäne (Abb.7). Diese Daten decken sich mit den Ergebnissen aus Untersuchungen zur Transduktion von T-Zellen aus Patienten mit Tumoren, die nicht das blutbildende System betreffen (Hombach *et al.* 2006).

Die Spezifität der neu generierten Immunrezeptoren wurde in einem nachfolgenden Experiment festgestellt. T-Zellen eines gesunden Spenders wurden mit den Immunrezeptoren antiCD19scFv-hFc-CD3 ζ (#941) und antiCD19scFv-hFc-CD28-CD3 ζ (#942) transduziert und mit Zellen der CLL Zelllinie MEC-1 und der T-Zell Leukämie Zelllinie Jurkat ko-kultiviert. Diese Zelllinien exprimieren CD19 unterschiedlich stark auf ihrer Oberfläche. Es zeigte sich, dass die Antigendichte auf den Zielzellen entscheidend ist für das Maß der Aktivierung der T-Lymphozyten. Eine höhere Antigendichte führte zur stärkeren Aktivierung der modifizierten T-Zellen. Weiterhin wurde festgestellt, dass die Einfügung einer kostimulatorischen CD28-CD3 ζ Signaldomäne in den Immunrezeptor nicht zu einer erhöhten IFN γ -Sekretion gegenüber etablierter CD19⁺ Zelllinien führt. Dies steht im Gegensatz zu bisher publizierten Ergebnissen (Hombach *et al.* 2001).

Etablierte Zelllinien besitzen in Hinblick auf einen möglichen klinischen Einsatz der Immunrezeptorstrategie nur eine mangelnde Aussagekraft. Bei der Verwendung von primären CLL-Zellen wurde festgestellt, dass eine deutlich höhere Konzentration von modifizierten Effektorzellen eingesetzt werden musste (Effektor- : Targetzellverhältnis 5:1), um eine spezifische Aktivierung und daraus resultierende Lyse von CLL-Zellen zu erreichen. Unter diesen Bedingungen wurde ebenfalls beobachtet, dass der Immunrezeptor mit der kostimulatorischen CD28-CD3 ζ Signaldomäne T-Zellen zur Sekretion des

Zytokins IL2, dass essentiell für die Proliferation von T-Zellen ist, induziert. T-Lymphozyten, die diesen Rezeptor exprimieren, lysieren CLL Zellen stärker als T-Lymphozyten mit CD3 ζ Signaldomäne ohne CD28 Kostimulation (Abb.9). Die CD28 Kostimulation führt zur Expression der anti-apoptotischen Proteine bcl-2 und bcl-xL, die ihrerseits die T-Zellen vor dem „Aktivierungs-induziertem-Zelltod“ schützt (Boise *et al.* 1995). Die Kombination aus verstärkter Proliferation und verlängerter Lebensdauer der CD28-modifizierten T-Zellen könnte zur erhöhten Effizienz der Eliminierung der CLL-Zellen beitragen.

Untersuchungen von Cantwell *et al.* (1997) kamen zu dem Schluss, dass aktivierte T-Zellen von CLL Patienten direkt von den CLL-Zellen in die Anergie geführt werden und somit zur allgemeinen Immundefizienz der Patienten beitragen. Es ist bisher ungeklärt, ob diese Anergie durch Einfügen von rekombinanten Immunrezeptoren überwunden werden kann. Aus Abbildung 10 ist ersichtlich, dass Immunrezeptor modifizierte T-Zellen aus CLL Patienten die autologen Tumorzellen genauso effizient lysieren wie allogene T-Zellen. Sie sezernieren nach spezifischer Aktivierung in hoher Konzentration IFN γ in den Kulturüberstand. Obwohl die Einfügung der Ko-Stimulatorischen CD28-CD3 ζ Signaldomäne in den Immunrezeptor auch im autologen System zu einer Sekretion des Zytokins IL2 führt, ist eine verstärkte Lyse der CLL-Zellen nicht zu beobachten. Vielmehr scheint die Modifikation mit dem CD3 ζ Signal ausreichend, die Anergie der Patienten T-Zellen zu überwinden und eine Zytotoxizitätsrate von 70% zu erreichen. In einem klinischen Einsatz würde die Reduzierung der Tumorlast in diesen Größenordnungen einer partiellen Remission entsprechen.

Bislang war es ungeklärt, auf welchem Wege T-Lymphozyten mit rekombinanten Immunrezeptoren ihre Zielzellen lysieren. Unmodifizierte T-Zellen nutzen dafür drei verschiedene Wege. Zum einen sezernieren sie nach Kontakt mit der Zielzelle die zytotoxischen Moleküle GranzymA/B und Perforin mittels Exozytose aus den zytosolischen Granulae in die immunologische Synapse. Zum anderen benutzen T-Zellen die Signalwege über die Todesrezeptoren Fas/FasLigand und TNF α /TNF α -Rezeptor (Ashton-Rickardt, 2005). Um den Mechanismus aufzuklären, mit dem antiCD19 T-Zellen CLL-

Zellen lysieren, wurden zu den Ko-Kulturen neutralisierende Antikörper gegen FasLigand oder TNF α sowie EGTA, das die Exozytose von cytosolischen Granulae blockiert, hinzugegeben. Nur die Gabe von EGTA zur Ko-Kultur hatte einen signifikanten Einfluss auf die Lyse von CLL-Zellen, in diesem Ansatz erreichten die CLL-Zellen eine Viabilität von 70%, die der Viabilität von CLL-Zellen unter normalen Kulturbedingungen nach 24h entspricht (Abb.11). Daraus wird geschlossen, dass T-Zellen mit Immunrezeptoren ihre zytotoxische Aktivität primär über den Granzym/Perforin Weg vermitteln.

Ein mögliches Problem in einem klinischen Einsatz der Immunrezeptoren stellt die immunsupprimierende Wirkung von regulatorischen T-Zellen (FoxP3⁺ CD4⁺ CD25⁺) dar. Im Rahmen der natürlichen Regulierung der T-Zell Antwort und bei der Vermittlung der Anergie gegenüber Tumorzellen sind regulatorische T-Zellen beteiligt. Angenommen wird, dass ihre Entstehung aus CD4⁺ Helfer T-Zellen durch hohe Konzentrationen von IL2 induziert wird. Diese Zellen wiederum produzieren die immunsuppressiven Proteine TGF β und IL10, die die Effektorfunktion von T-Zellen supprimieren (Vignali *et al.* 2008). Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe (Koehler *et al.* 2007) konnten jedoch zeigen, daß modifizierte T-Zellen, die einen Immunrezeptor mit kostimulatorischer CD28-CD3 ζ Signaldomäne exprimieren, nicht von TGF β und IL10 beeinflusst werden und weiterhin zytolytisch gegenüber Tumorzellen sind.

Eine weitere Beschränkung bezüglich einer klinischen Applikation der antiCD19 Immunrezeptoren könnte die Zielstruktur darstellen. CD19 wird in derselben Frequenz auf gesunden wie auf malignen B-Zellen exprimiert, eine Gabe von CD19 spezifischen T-Zellen könnte somit zur ungewollten Lyse von gesunden B-Zellen führen. Bei Patienten die sich in fortgeschrittenen Stadien der CLL befinden (Binet C) spielt dies allerdings eine untergeordnete Rolle, da diese Situation therapeutisch beherrschbar ist und bei ihnen der Anteil an malignen B-Zellen an der Gesamtlymphozytenzahl bei ~98% liegt (Binet *et al.* 1981). Eine Behandlung mit modifizierten T-Zellen könnte hier primär zur Verringerung der Tumorlast beitragen. Desweiteren haben Untersuchungen von Hirst und Mitarbeitern (2003) ergeben, dass naive B-Zellen in geringem Maße das Schutzmolekül SERPINB9 (PI-9) exprimieren, CLL-Zellen hingegen nicht.

SERPINB9 ist ein Protease-Inhibitor der spezifisch GranzymB inhibiert. Es wird bevorzugt von Effektor T-Zellen und NK-Zellen als Schutzmechanismus vor der Apoptose durch selbstexprimiertes GranzymB produziert. Nicht maligne B-Zellen in CLL-Patienten könnten somit der zytotoxischen Aktivität von CD19 spezifischen T-Zellen entgehen.

Bisherige Therapieschemata maligner Transformationen beruhen auf der Annahme, dass der Tumor aus einer homogenen Masse von Zellen mit maligner Kapazität besteht. Dementsprechend zielen heutige chemo- und strahlentherapeutische Ansätze auf die Eradikation aller Tumorzellen, verbunden mit therapiebedingten, toxischen Nebenwirkungen, ab. Die Tumorstammzellhypothese hingegen, erstmals aufgestellt von Bonet & Dick für die akute myeloische Leukämie (1995), beschreibt die Tumorentwicklung als hierarchischen Prozess, ausgehend von einer kleinen Subpopulation hoch maligner Zellen. Die Tumorstammzellen besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, zur Differenzierung in heterogene Tumorzellen und zur Tumorinduktion in sehr niedrigen Dosen. In den letzten Jahren konnten zahlreiche Beweise für die Existenz von Tumorstammzellen auch in soliden Tumoren erbracht werden (Hermann *et al.* 2007; Fang *et al.* 2005; Al-Hajj *et al.* 2002). Die Tumorstammzellhypothese sagt voraus, dass die gezielte Eliminierung der kleinen Subpopulation von Tumorstammzellen zur Reduktion der Tumormasse führen soll. Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte dieses Konzept mit Hilfe des immuntherapeutischen Ansatzes in einem Mausmodell überprüft werden.

Es wurden zwei Immunrezeptoren *in vitro* und *in vivo* charakterisiert, die gegen Zellen aus einem soliden Tumor, hier aus dem malignen Melanom, gerichtet sind. Es wurden Tumorzellen verwendet, die aus Melanombiopsien gewonnen wurden. Diese primären Zellen exprimieren die Zielantigen HMW-MAA und p97 in unterschiedlicher Dichte auf ihrer Oberfläche. Melanotransferrin wird von den Melanomzellen homogener exprimiert als HMW-MAA (Abb.13). Vorherige Arbeiten aus unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass eine Kreuzvernetzung der

rekombinanten Immunrezeptoren zur Aktivierung der modifizierten T-Zellen notwendig ist und dass diese Kreuzvernetzung von einer hohen Antigendichte auf der Oberfläche der Zielzellen begünstigt wird (Hombach *et al.* 2001). *In vitro* Daten aus einer allogenen Ko-Kultur von T-Lymphozyten mit den rekombinanten Immunrezeptoren anti-HMW-MAA-hFc-CD3- ζ (#570) und anti-p97-hFc-CD3- ζ (#579) bestätigen diese Hypothese (Abb.14). Modifizierte T-Zellen, die Spezifität für Melanotransferrin besitzen, lysieren Melanomzellen signifikant stärker als T-Zellen mit dem Immunrezeptor gegen HMW-MAA. Diese Ergebnisse korrelieren, wie erwartet, mit der Expressionsstärke von Melanotransferrin auf der Oberfläche von Melanomzellen. Bezüglich des autologen Systems lässt sich feststellen, dass T-Lymphozyten aus Melanompatienten mit rekombinanten Immunrezeptoren transduzierbar sind (Abb.13) und dass die spezifische Lyse der korrespondierenden Melanomzellen etwas höher als im allogenen System ist (Abb.15). Erklärbar ist dieser Effekt dadurch, dass die spezifische Sekretion von IFN γ durch die modifizierten T-Lymphozyten die Anergie der nicht-transduzierten T-Zellen überwinden kann und sie somit zur Lyse der Melanomzellen über den naiven T-Zell Rezeptor aktiviert werden.

Da die Immunrezeptor-vermittelte Lyse von Zielzellen trotz effizienter Bindung des Zielantigens auf Melanomzellen *in vitro* nur eine ineffiziente Lyse der Melanomzellen induziert, sollte untersucht werden, ob intrinsische Mechanismen der Melanomzellen zu einer Resistenz gegenüber zytolytischen T-Zellen führen. Dieses könnte durch Inhibition von anti-apoptotischen Faktoren überwunden werden. Hierfür wurden Zellen der Linie MeWo verwendet, die in hohem Maße und sehr homogen die Antigene HMW-MAA und p97 exprimieren. In parallelen Untersuchungen zum Hodgkin Lymphom wurde gezeigt, dass die Inhibition des X-gekoppelten Inhibitors der Apoptose (XIAP) durch spezifische siRNA Transfektion HRS-Zellen in die Apoptose führt (Kashkar *et al.* 2007). Analog dazu wurden Zellen der Linie MeWo in der Arbeitsgruppe Kashkar stabil mit der XIAP-spezifischen siRNA c2 und c27 sowie mit siRNA zufälliger Sequenz transfiziert. Nach Ko-Kultur mit den Melanom-spezifischen T-Lymphozyten wurde in MeWo Zellen mit der anti-XIAP siRNA eine um 30%

erhöhte Lyse der Zellen im Vergleich zu MeWo Zellen mit siRNA zufälliger Sequenz nachgewiesen. Desweiteren wurde eine Erhöhung der lytischen Aktivität des anti-HMW-MAA Immunrezeptors gefunden, die eine Effizienz des anti-p97 Rezeptors erreicht. Vermutlich kann die Induktion der Zytolyse über die GranzymB und XIAP abhängige Aktivierung von Caspase9 hinaus nicht weiter gesteigert werden. Die erlangten Resultate decken sich mit bisherigen Ergebnissen (Kashkar *et al.* 2006), die zeigten, dass eine Inhibierung von XIAP eine positive Wirkung auf die zytolytische Aktivität von modifizierten T-Zellen hat. Dies stellt eine Möglichkeit zur Unterstützung der adoptiven Immuntherapie, beispielsweise durch Einbringung der anti-XIAP siRNA in die Tumorzellen mittels geeigneter Vektoren, dar.

Bislang wurde das Konzept der melanomspezifischen T-Zellen nur in *in vitro* Ansätzen untersucht. Für einen möglichen klinischen Einsatz ist es aber unerlässlich, die Funktionalität der modifizierten T-Zellen auch *in vivo* nachzuweisen. In den vorliegenden Untersuchungen wurden immundefiziente Mäuse verwendet, um die Entwicklung humaner Tumore *in vivo* zu beobachten. Um festzustellen ob die rekombinanten Immunrezeptoren in Mäusen eine Aktivität zeigen, wurden primäre Melanomzellen mit modifizierten T-Lymphozyten in einem Verhältnis von 1:1 im allogenen und autologen Setting ko-injiziert. Bezüglich des allogenen Systems wurden die *in vitro* erhaltenen Daten bestätigt. Auch in *in vivo* zeigt der anti-p97 Immunrezeptor eine stärkere Tumorzell-Eliminierung als der anti-HMW-MAA Immunrezeptor. Nur 16% der Mäuse entwickelten einen Tumor nach der Ko-Injektion von Melanomzellen und anti-p97 T-Zellen wohingegen in der Hälfte der Tiere Tumore zu beobachten waren, die Melanomzellen und anti-HMW-MAA T-Zellen ko-injiziert bekamen. Unbehandelte T-Lymphozyten hingegen haben keinen Einfluss auf das Tumorwachstum (Abb.17).

Überraschenderweise weichen die Ergebnisse aus autologen *in vivo* Versuchen von den allogenen Daten ab. Bei gleichbleibenden Bedingungen bezüglich der injizierten Zellzahl und Effektor- : Targetzellverhältnissen wurde eine verstärkte Aktivität des anti-HMW-MAA Immunrezeptors beobachtet. Nur 16% der Mäuse, denen die Melanomzellen zusammen mit autologen anti-HMW-MAA T-Zellen

injiziert wurden, entwickelten einen Tumor. Versuchstiere, denen Melanomzellen mit autologen anti-p97 T-Zellen ko-injiziert wurden, zeigten keinerlei Tumorwachstum (Abb.18). Eine Verstärkung der T-Zell Antwort gegen autologe Tumorzellen war zwar auch *in vitro* zu beobachten, die deutliche Steigerung der lytischen Aktivität des anti-HMW-MAA Immunrezeptors jedoch nicht.

Da die Expressionsdichte von HMW-MAA sich nicht unter den Kulturbedingungen verändert hat, müssen folglich auch Zellen, die kein HMW-MAA exprimieren, nach Ko-Injektion mit HMW-MAA spezifischen T-Lymphozyten in die Apoptose gehen. Um diesen Effekt nachzuweisen, wurden Zellen aus einer Melanombiopsie in einer Zeitreihe mit anti-HMW-MAA spezifischen T-Zellen ko-kultiviert und die Apoptose Induktion in HMW-MAA⁺ und HMW-MAA⁻ Zellen analysiert. Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie zeigen, dass mit Beginn der Immunantwort nach 14h HMW-MAA⁺ Zellen von den HMW-MAA spezifischen T-Zellen sezerniertes GranzymB aufnehmen und die Apoptose einleiten. Dieser Prozess ist mit zunehmender Inkubationszeit stärker nachweisbar. In HMW-MAA⁻ Zellen hingegen ist zu keinem Zeitpunkt das zytotoxische Molekül GranzymB nachweisbar. Trotzdem wird in ihnen nach 28h ebenfalls die Apoptose ausgelöst (Abb.21A). In einem *in vivo* Ansatz wurden in etablierte Tumore (~100mm³) HMW-MAA spezifische T-Zellen intratumoral injiziert und nach 24h immunhistologisch analysiert. Hier wurden ebenfalls apoptotische HMW-MAA⁻ Zellen festgestellt (Abb.21B). Daher fällt auf, dass HMW-MAA⁻ Melanomzellen absterben, nachdem HMW-MAA⁺ Zellen von modifizierten T-Zellen eliminiert werden. Der genaue Mechanismus dieses Effektes ist bislang unklar. Der fehlende Zell-Zell Kontakt oder die Abwesenheit anti-apoptotischer Moleküle, sezerniert von HMW-MAA⁺ Zellen, könnten dafür verantwortlich sein.

Die Tatsache, dass eine kleine Population von Tumorzellen notwendig ist, um die Masse an phänotypisch differierenden Tumorzellen vital zu halten unterstützt die Tumorstammzellhypothese in soliden Tumoren. Um festzustellen, ob die HMW-MAA⁺ Fraktion im Melanom eine Tumorstammzellpopulation umfasst, müssen die Koch'schen Postulate, die

ursprünglich für infektiöse Agenzien aufgestellt wurden, bewiesen werden. Diese besagen (modifiziert nach Fredricks & Relman, 1996), daß:

1. Die Population in jedem Patienten und jedem Stadium der Krankheit nachzuweisen ist
2. Die Population isoliert werden kann und nur die gereinigte Population das volle Krankheitsbild auslöst
3. Die Population aus induzierten Tumoren re-isoliert und aufgereinigt werden kann und nach serieller Transplantation wiederum denselben phänotypischen Tumor induziert.

Die Erfüllung des ersten Postulats ist aus Abbildung 19A ersichtlich. Durchflusszytometrische Analysen zeigen, dass die HMW-MAA⁺ Population mit einer Frequenz von 26±15,1% in Melanompatienten verschiedener Stadien zu finden ist. Desweiteren wurde gezeigt, dass ausschließlich die HMW-MAA⁺ Fraktion eine Ko-Expression der bekannten Stammzellmarker CD24, CD44 und CD61 aufweist (Hermann *et al.* 2007; Al-Hajj *et al.* 2002). Insbesondere korreliert die Expression des Melanomstammzellmarkers CD20 (Fang *et al.* 2005) mit der Expression von HMW-MAA. Dahingegen exprimieren sowohl die HMW-MAA⁺ als auch die HMW-MAA⁻ Fraktion den melanomspezifischen Marker Tyrosinase (Abb.19B). Auf Gewebeschnitten von Melanomen ist nur auf sehr wenigen Zellen CD20 nachweisbar, die heterogene Expression von HMW-MAA ist deutlich zu erkennen (Abb.19C).

Das 2. und 3. Koch-Postulat wurde geprüft, indem die HMW-MAA⁺ und HMW-MAA⁻ Fraktion mittels magnetischer Zellseparation zu 96%iger Reinheit isoliert wurde und im Vergleich zu unfraktionierten Melanomzellen in immundefiziente Mäuse injiziert wurde. Es zeigte sich, dass nur die Injektion der HMW-MAA⁺ Zellen einen Tumor auslösen kann, nicht dagegen HMW-MAA⁻ Zellen. Dies geschieht im Vergleich zu unfraktionierten Zellen, derselben Zellzahl jedoch weniger schnell und effizient (Abb.16A). Erklärt werden kann dies damit, dass potentielle Tumorstammzellen nicht logarithmisch wachsen wie die Gesamtpopulation von Tumorzellen, sondern sich zur Etablierung des heterogenen Tumors asymmetrisch teilen müssen. Diese Hypothese wird

gestärkt durch Abbildung 20B. Es ist zu erkennen, dass die gereinigten HMW-MAA⁺ Zellen Tumore induzieren, die bezüglich der HMW-MAA Expression heterogen sind. Dies ist auch nach der zweiten seriellen Transplantation der Fall. Aus diesen Experimenten kann also geschlossen werden, dass die HMW-MAA⁺ Fraktion Tumorstammzellen des Melanoms enthält. Zusammen mit bekannten Ergebnissen von Fang und Mitarbeitern wird postuliert, dass die HMW-MAA⁺/CD20⁺ Fraktion die Melanostammzellpopulation darstellt.

Bisherige Ansätze der adoptiven Immuntherapie zielten auf die Eliminierung einer möglichst großen Zahl uniformer Tumorzellen. Bezugnehmend auf die Tumorstammzellhypothese sollte hier untersucht werden, ob die Entfernung einer kleinen, definierten Zellfraktion innerhalb des Tumors zur Reduktion der Tumormasse führt. Aufgrund der oben beschriebenen Ergebnisse wurden dafür der bekannte anti-HMW-MAA Immunrezeptor und ein neu generierter und charakterisierter CD20 spezifischer Immunrezeptor (Abb.22 & 23) eingesetzt.

Zur Etablierung von Tumoren in immundefizienten Mäusen wurden primäre Melanomzellen subkutan in die Versuchstiere injiziert. Eine Behandlung wurde vorgenommen als die Tumorgöße in den einzelnen Tieren etwa 15mm³ betrug. Die Behandlung erfolgte dreimal in zweitägigem Abstand. Dafür wurden entweder T-Lymphozyten mit CD20 spezifischem, HMW-MAA spezifischem oder CD19 spezifischem Immunrezeptor intravenös appliziert und im weiteren Verlauf das Tumorwachstum aufgezeichnet. Es zeigte sich, dass die Behandlung mit nicht modifizierten T-Zellen und irrelevant (CD19) modifizierten T-Zellen das Tumorwachstum nicht inhibiert. Die Behandlung mit HMW-MAA spezifischen T-Lymphozyten führte in 75% der Versuchstiere zur vollständigen Eradikation des Tumors und in 25% der Mäuse zu einem deutlich verlangsamten Tumorwachstum. Eine Behandlung mit CD20 spezifischen T-Zellen hatte eine Eradikation des etablierten Tumors in allen Versuchstieren zur Folge. Es konnte hiermit erstmals gezeigt werden, dass eine spezifische Eliminierung der Tumorstammzellpopulation zum verlangsamten Tumorwachstum bzw. zur Vernichtung des Tumors *in vivo* führt.

Eine Einschränkung bezüglich der Behandlung mit modifizierten anti-Tumorstammzell Immunrezeptoren könnte das Gesamtvolumen des zu behandelnden Tumors darstellen. Es ist bekannt, dass die Größe der etablierten Tumore und die damit einhergehende Ausbildung eines Tumorstromas die Infiltration der rekombinanten T-Lymphozyten in das Tumorgewebe wesentlich negativ beeinflussen kann (Blankenstein, 2005). Da Tumorstammzellen innerhalb des eigentlichen Tumorgewebes zu finden sind, ist dem kombinatorischen Ansatz der anti-Stroma- / anti-Tumorstammzell-Therapie in nachfolgenden Untersuchungen große Bedeutung beizumessen.

5 Zusammenfassung

Die adoptive Immuntherapie maligner Tumore beruht darauf, T-Zellen durch retrovirale Expression eines rekombinanten Rezeptors (Immunrezeptor) Spezifität für ein Tumor-assoziiertes Antigen (TAA) zu verleihen und diese modifizierten T-Zellen zu aktivieren. Das Konzept basiert auf der Annahme, dass T-Zellen von Tumorpatienten spezifisch aktiviert werden können, obwohl ein progredienter Verlauf der Krankheit mit zunehmender Anergie der T-Lymphozyten assoziiert ist. Die Umsetzbarkeit der Hypothese wurde im Rahmen dieser Arbeit anhand der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL), einer bislang nicht heilbaren Form der hämatologischen Neoplasie mit hohen Rezidivraten, untersucht. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Anergie zytolytischer T-Zellen aus CLL-Patienten durch die Expression eines Immunrezeptors, der gegen CD19 auf CLL Zellen gerichtet ist, überwunden werden kann und diese T-Zellen durch ein CD3 ζ Signal aktiviert werden können. Die Zytolyse wird, unabhängig von Fas oder TNF- α , durch Granzym/Perforin ausgelöst. Die spezifische T-Zell Aktivierung, aber nicht die zytolytische Kapazität, wird durch einen kombinierten CD28-CD3 ζ kostimulatorischen Immunrezeptor erhöht. Die erhaltenen Resultate zeigen, dass naive T-Zellen sogar aus Patienten in fortgeschrittenen Stadien der Krankheit zu einer effizienten „Graft-versus-Leukemia“ Reaktion modifiziert werden können. Diese und nahezu alle anderen Strategien der Tumorthherapie beruhen auf der Annahme, dass alle Tumorzellen dieselben malignen Eigenschaften besitzen. Im Gegensatz dazu postuliert die Tumorstammzellhypothese, dass das Tumorstammzellwachstum von einer kleinen Population pluripotenter Zellen gesteuert wird. Diese Tumorstammzellen besitzen die Fähigkeit der Selbsterneuerung, der Differenzierung durch asymmetrische Teilung und der Möglichkeit zu metastasieren. Am Modell des malignen Melanoms wurde in dieser Arbeit eine kleine Subpopulation von Zellen identifiziert, die die Eigenschaften einer Tumorstammzellfraktion aufweist. Die selektive Eliminierung dieser Zellen durch modifizierte T-

Lymphozyten führte *in vivo* zu einer Eradikation des induzierten Tumors, obwohl die Population der Zellen nur 0,1% der gesamten Melanomzellen beinhaltet. Nach der Zerstörung der Tumorstammzellen wird in der Masse der Tumorzellen die Apoptose durch noch nicht näher definierte Mechanismen ausgelöst. Unsere Daten liefern einen Hinweis für die Anwendbarkeit der adoptiven Immuntherapie gegen Tumorstammzellen und regen dazu an, bisherige Behandlungsschemata zu überdenken.

6 Anhang

6.1 Sequenz des Immunrezeptors pBullet-antiCD19scFv-hFc-CD3 ζ (#941)

```

M L L L V T
ATGCTTCT CCTGGTGACA
TACGAAGA GGACCACTGT
S L L L C E L P H P A F L L I P D .
AGCCTTCTGC TCTGTGAGTT ACCACACCCA GCATTCCTCC TGATCCCAGA
TCGGAAGACG AGACACTCAA TGGTGTGGGT CGTAAGGAGG ACTAGGGTCT
· I Q M T Q T T S S L S A S L G D R ·
CATCCAGATG ACACAGACTA CATCCTCCCT GTCTGCCTCT CTGGGAGACA
GTAGGTCTAC TGTGTCTGAT GTAGGAGGGA CAGACGGAGA GACCCCTGTG
· V T I S C R A S Q D I S K Y L N
GAGTCACCAT CAGTTGCAGG GCAAGTCAGG ACATTAGTAA ATATTTAAAT
CTCAGTGGTA GTCAACGTCC CGTTCAGTCC TGTAATCATT TATAAATTTA
W Y Q Q K P D G T V K L L I Y H T ·
TGGTATCAGC AGAAACCAGA TGGAACTGTT AACTCCTGA TCTACCATAC
ACCATAGTCG TCTTTGGTCT ACCTTGACAA TTTGAGGACT AGATGGTATG
· S R L H S G V P S R F S G S G S G ·
ATCAAGATTA CACTCAGGAG TCCCATCAAG GTTCAGTGGC AGTGGGTCTG
TAGTTCTAAT GTGAGTCCTC AGGGTAGTTC CAAGTCACCG TCACCCAGAC
· T D Y S L T I S N L E Q E D I A
GAACAGATTA TTCTCTCACC ATTAGCAACC TGGAGCAAGA AGATATTGCC
CTTGTCTAAT AAGAGAGTGG TAATCGTTGG ACCTCGTTCT TCTATAACGG
T Y F C Q Q G N T L P Y T F G G G ·
ACTTACTTTTT GCCAACAGGG TAATACGCTT CCGTACACGT TCGGAGGGGG
TGAATGAAAA CGGTTGTCCC ATTATGCGAA GGCATGTGCA AGCCTCCCCC
· T K L E I T G S T S G S G K P G S ·
GACTAAGTTG GAAATAACAG GCTCCACCTC TGGATCCGGC AAGCCCCGAT
CTGATTCAAC CTTTATTGTC CGAGGTGGAG ACCTAGGCCG TTCGGGCCTA
· G E G S T K G E V K L Q E S G P
CTGGCGAGGG ATCCACCAAG GCGGAGGTGA AACTGCAGGA GTCAGGACCT
GACCCTCCC TAGGTGGTTC CCGCTCCACT TTGACGTCCT CAGTCCTGGA
G L V A P S Q S L S V T C T V S G ·
GGCTGGTGG CGCCTCACA GAGCCTGTCC GTCACATGCA CTGTCTCAGG
CCGGACCACC GCGGGAGTGT CTCGGACAGG CAGTGTACGT GACAGAGTCC
· V S L P D Y G V S W I R Q P P R K ·
GGTCTCATT CCGACTATG GTGTAAGCTG GATTCGCCAG CCTCCACGAA
CCAGAGTAAT GGGCTGATAC CACATTCGAC CTAAGCGGTC GGAGGTGCTT
· G L E W L G V I W G S E T T Y Y
AGGGTCTGGA GTGGCTGGGA GTAATATGGG GTAGTGAAAC CACATACTAT
TCCCAGACCT CACCGACCCT CATTATACCC CATCACTTTG GTGTATGATA
N S A L K S R L T I I K D N S K S ·
AATTCAGCTC TCAAATCCAG ACTGACCATC ATCAAGGACA ACTCCAAGAG
TTAAGTCGAG AGTTTAGGTC TGA CTGGTAG TAGTTCCTGT TGAGGTTCTC
· Q V F L K M N S L Q T D D T A I Y ·
CCAAAGTTTC TTAAAAATGA ACAGTCTGCA AACTGATGAC ACAGCCATTT
GGTTCAAAAG AATTTTACT TGT CAGACGT TTGACTACTG TGTCGGTAAA
· Y C A K H Y Y Y G G S Y A M D Y
ACTACTGTGC CAAACATTAT TACTACGGTG GTAGCTATGC TATGGACTAC
TGATGACACG GTTTGTAATA ATGATGCCAC CATCGATACG ATACCTGATG
W G Q G T S V T V S S V A D P A E ·
TGGGGTCAAG GAACCTCAGT CACCGTCTCC TCAGTAGCAG ATCCCGCCGA
ACCCAGTTT CTTGGAGTCA GTGGCAGAGG AGTCATCGTC TAGGGCGGCT

```

· P K S P D K T H T C P P C P A P E ·
 GCCCAAATCT CCTGACAAAA CTCACACATG CCCACCGTGC CCAGCACCTG
 CGGGTTTAGA GGACTGTTTT GAGTGTGTAC GGGTGGCACG GGTCGTGGAC
 · L L G G P S V F L F P P K P K D
 AACTCCTGGG GGGACCGTCA GTCTTCTCT TCCCCCAA ACCAAGGAC
 TTGAGGACCC CCCTGGCAGT CAGAAGGAGA AGGGGGTTTT TGGTTCCTG
 T L M I S R T P E V T C V V V D V ·
 ACCCTCATGA TCTCCGGAC CCCTGAGGTC ACATGCGTGG TGGTGGACGT
 TGGGAGTACT AGAGGGCCTG GGGACTCCAG GTTACGCACC ACCACCTGCA
 · S H E D P E V K F N W Y V D G V E ·
 GAGCCACGAA GACCCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG GACGGCGTGG
 CTCGGTGCTT CTGGGACTCC AGTTCAGTT GACCATGCAC CTGCCGCACC
 · V H N A K T K P R E E Q Y N S T
 AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCGCGGG AGGAGCAGTA CAACAGCACG
 TCCACGTATT ACGTTTCTGT TTCGGCGCCC TCCTCGTCAT GTTGTCTGTC
 Y R V V S V L T V L H Q D W L N G ·
 TACCGGGTGG TCAGCGTCTT CACCGTCTTG CACCAGGACT GGCTGAATGG
 ATGGCCACC AGTCGCAGGA GTGGCAGGAC GTGGTCTGA CCGACTTACC
 · K E Y K C K V S N K A L P A P I E ·
 CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCCA GCCCCATCG
 GTTCTCATG TTCACGTTCC AGAGTTGTT TCGGGAGGGT CGGGGGTAGC
 · K T I S K A K G Q P R E P Q V Y
 AGAAAACCAT CTCAAAGCC AAAGGGCAGC CCCGAGAACC ACAGGTGTAC
 TCTTTTGGTA GAGGTTTCGG TTTCCCGTCC GGGCTCTTGG TGTCACATG
 T L P P S R D E L T K N Q V S L T ·
 ACCCTGCCCC CATCCCGGGA TGAGCTGACC AAGAACCAGG TCAGCCTGAC
 TGGGACGGGG GTAGGGCCCT ACTCGACTGG TTCTTGGTCC AGTCGGACTG
 · C L V K G F Y P S D I A V E W E S ·
 CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA CATCGCCGTG GAGTGGGAGA
 GACGGACCAG TTTCCGAAGA TAGGGTCGCT GTAGCGGCAC CTCACCCTCT
 · N G Q P E N N Y K T T P P V L D
 GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCTCC CGTGTGGAC
 CGTTACCCGT CGGCCTCTTG TTGATGTTCT GGTGCGGAGG GCACGACCTG
 S D G S F F L Y S K L T V D K S R ·
 TCCGACGGCT CTTCTTCTTCT CTACAGCAAG CTCACCGTGG ACAAGAGCAG
 AGGCTGCCGA GGAAGAAGGA GATGTCGTTT GAGTGGCACC TGTTCTCGTC
 · W Q Q G N V F S C S V M H E A L H ·
 GTGGCAGCAG GGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGTATGAT GAGGCTCTGC
 CACCGTCGTC CCCTTGCAGA AGAGTACGAG GCACTACGTA CTCCGAGACG
 · N H Y T Q K S L S L S P G K K D
 ACAACCACTA CACGAGAAG AGCTCTCCC TGTCTCCGGG TAAAAAGAT
 TGTGGTGAT GTGCGTCTTC TCGGAGAGGG ACAGAGGCC ATTTTTTCTA
 P K L C Y L L D G I L F I Y G V I ·
 CCCAACTCT GCTACCTGCT GGATGGAATC CTCTTCTATCT ATGGTGTATC
 GGTTTGAGA CGATGGACGA CCTACCTTAG GAGAAGTAGA TACCACAGTA
 · L T A L F L R V K F S R S A D A P ·
 TCTCACTGCC TTGTTCTGA GAGTGAAGTT CAGCAGGAGC GCAGACGCCC
 AGAGTGACGG AACAAGGACT CTCACTTCAA GTCGTCCTCG CGTCTGCGGG
 · A Y Q Q G Q N Q L Y N E L N L G
 CCGCGTACCA GCAGGGCCAG AACCACTCT ATAACGAGCT CAATCTAGGA
 GGCGCATGGT CGTCCCGGTC TTGGTCGAGA TATTGCTCGA GTTAGATCCT
 R R E E Y D V L D K R R G R D P E ·
 CGAAGAGAGG AGTACGATGT TTTGGACAAG AGACGTGGCC GGGACCCTGA
 GCTTCTCTCC TCATGCTACA AAACCTGTTT TCTGCACCGG CCCTGGGACT
 · M G G K P R R K N P Q E G L Y N E ·
 GATGGGGGGA AAGCCGAGAA GGAAGAACC TCAGGAAGGC CTGTACAATG
 CTACCCCTT TTCGGCTCTT CCTTCTTGGG AGTCCTTCCG GACATGTTAC
 · L Q K D K M A E A Y S E I G M K
 AACTGCAGAA AGATAAGATG GCGGAGGCCT ACAGTGAGAT TGGGATGAAA
 TTGACGTCTT TCTATTCTAC CGCTCCGGA GTCACTCTA ACCCTACTTT
 G E R R R G K G H D G L Y Q G L S ·
 GCGGAGCGCC GGAGGGGCAA GGGGCACGAT GGCTTTACC AGGTCTCAG
 CCGCTCGCGG CCTCCCGTTC CCCCCTGCTA CCGGAAATGG TCCCAGAGTC

· T A T K D T Y D A L H M Q A L P P ·
TACAGCCACC AAGGACACCT ACGACGCCCT TCACATGCAG GCCCTGCCCC
ATGTCGGTGG TTCCTGTGGA TGCTGCGGGA AGTGTACGTC CGGGACGGGG

· R *
CTCGCTAA
GAGCGATT

6.2 Sequenz des Immunrezeptors pBullet-antiCD19scFv- hFc-CD28-CD3ζ (#942)

· M L L L V T ·
ATGCTTCT CCTGGTGACA
TACGAAGA GGACCACTGT
S L L L C E L P H P A F L L I P D ·
AGCCTTCTGC TCTGTGAGTT ACCACACCCA GCATTCTCTCC TGATCCCAGA
TCGGAAGACG AGACACTCAA TGGTGTGGGT CGTAAGGAGG ACTAGGGTCT
· I Q M T Q T T S S L S A S L G D R ·
CATCCAGATG ACACAGACTA CATCCTCCCT GTCTGCCTCT CTGGGAGACA
GTAGGTCTAC TGTGTCTGAT GTAGGAGGGA CAGACGGAGA GACCCCTCTGT
· V T I S C R A S Q D I S K Y L N ·
GAGTCACCAT CAGTTGCAGG GCAAGTCAGG ACATTAGTAA ATATTTAAAT
CTCAGTGGTA GTCAACGTCC CGTTCAGTCC TGTAATCATT TATAAATTTA
W Y Q Q K P D G T V K L L I Y H T ·
TGGTATCAGC AGAAACCAGA TGGAACTGTT AACTCCTGA TCTACCATAC
ACCATAGTCG TCTTTGGTCT ACCTTGACAA TTTGAGGACT AGATGGTATG
· S R L H S G V P S R F S G S G S G ·
ATCAAGATTA CACTCAGGAG TCCCATCAAG GTTCAGTGGC AGTGGGTCTG
TAGTTCTAAT GTGAGTCCTC AGGGTAGTTC CAAGTCACCG TCACCCAGAC
· T D Y S L T I S N L E Q E D I A ·
GAACAGATTA TTCTCTCACC ATTAGCAACC TGGAGCAAGA AGATATTGCC
CTTGCTAAT AAGAGAGTGG TAATCGTTGG ACCTCGTTCT TCTATAACGG
T Y F C Q Q G N T L P Y T F G G G ·
ACTTACTTTT GCCAACAGGG TAATACGCTT CCGTACACGT TCGGAGGGGG
TGAATGAAAA CGGTTGTCCC ATTATGCGAA GGCATGTGCA AGCCTCCCCC
BamHI
~~~~~  
· T K L E I T G S T S G S G K P G S ·  
GACTAAGTTG GAAATAACAG GCTCCACCTC TGGATCCGGC AAGCCCGGAT  
CTGATTCAAC CTTTATTGTC CGAGGTGGAG ACCTAGGCCG TTCGGGCCTA  
BamHI  
~~~~~  
· G E G S T K G E V K L Q E S G P ·
CTGGCGAGGG ATCCACCAAG GGCGAGGTGA AACTGCAGGA GTCAGGACCT
GACCGCTCCC TAGGTGGTTC CCGCTCCACT TTGACGTCCT CAGTCCTGGA
G L V A P S Q S L S V T C T V S G ·
GGCCTGGTGG CGCCCTCACA GAGCCTGTCC GTCACATGCA CTGTCTCAGG
CCGGACCACC GCGGGAGTGT CTCGGACAGG CAGTGTACGT GACAGAGTCC
· V S L P D Y G V S W I R Q P P R K ·
GGTCTCATTG CCCGACTATG GTGTAAGCTG GATTCGCCAG CCTCCACGAA
CCAGAGTAAT GGGCTGATAC CACATTCGAC CTAAGCGGTC GGAGGTGCTT
· G L E W L G V I W G S E T T Y Y ·
AGGGTCTGGA GTGGCTGGGA GTAATATGGG GTAGTGAAAC CACATACTAT
TCCAGACCT CACCGACCCT CATTATACCC CATCACTTTG GTGTATGATA

N S A L K S R L T I I K D N S K S .
 AATTCAGCTC TCAAATCCAG ACTGACCATC ATCAAGGACA ACTCCAAGAG
 TTAAGTCGAG AGTTTAGGTC TGACTGGTAG TAGTTCCTGT TGAGGTTCTC
 · Q V F L K M N S L Q T D D T A I Y .
 CCAAGTTTTT TAAAAATGA ACAGTCTGCA AACTGATGAC ACAGCCATTT
 GGTTCAAAAG AATTTTTACT TGTCAGACGT TTGACTACTG TGTCGGTAAA
 · Y C A K H Y Y Y G G S Y A M D Y
 ACTACTGTGC CAAACATTAT TACTACGGTG GTAGCTATGC TATGGACTAC
 TGATGACACG GTTGTGAATA ATGATGCCAC CATCGATACG ATACCTGATG
 W G Q G T S V T V S S V A D P A E .
 TGGGGTCAAG GAACCTCAGT CACCGTCTCC TCAGTAGCAG ATCCCGCCGA
 ACCCCAGTTC CTTGGAGTCA GTGGCAGAGG AGTCATCGTC TAGGGCGGCT
 · P K S P D K T H T C P P C P A P E .
 GCCCAAATCT CCTGACAAAA CTCACACATG CCCACCGTGC CCAGCACCTG
 CGGGTTTAGA GGACTGTTTT GAGTGTGTAC GGGTGGCAGC GGTTCGTGGAC
 · L L G G P S V F L F P P K P K D
 AACTCCTGGG GGGACCGTCA GTCTTCCTCT TCCCCCAAAA ACCCAAGGAC
 TTGAGGACCC CCCTGGCAGT CAGAAGGAGA AGGGGGGTTT TGGGTTCTGT
 T L M I S R T P E V T C V V V D V .
 ACCCTCATGA TCTCCCGAC CCCTGAGGTC ACATGCGTGG TGGTGGACGT
 TGGGAGTACT AGAGGGCCTG GGGACTCCAG TGTACGCACC ACCACCTGCA
 · S H E D P E V K F N W Y V D G V E .
 GAGCCACGAA GACCCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG GACGGCGTGG
 CTCGGTGTCT CTGGGACTCC AGTTCAAGTT GACCATGCAC CTGCCACACC
 · V H N A K T K P R E E Q Y N S T
 AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCGCGGG AGGAGCAGTA CAACAGCACG
 TCCACGTATT ACGGTTCTGT TTCGGCGCCC TCCTCGTCAT GTTGTCTGTG
 Y R V V S V L T V L H Q D W L N G .
 TACCGGGTGG TCAGCGTCTC CACCGTCTCG CACCAGGACT GGCTGAATGG
 ATGGCCACC AGTCGCAGGA GTGGCAGGAC GTGGTCTGA CCGACTTACC
 · K E Y K C K V S N K A L P A P I E .
 CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCCA GCCCCCATCG
 GTTCTCATG TTCACGTTCC AGAGGTTGTT TCGGGAGGGT CGGGGGTAGC
 · K T I S K A K G Q P R E P Q V Y
 AGAAAACCAT CTCAAAGCC AAAGGGCAGC CCCGAGAACC ACAGGTGTAC
 TCTTTTGGTA GAGGTTTCGG TTTCCCGTCG GGGCTCTTGG TGTCACATG

XmaI

~~~~~

T L P P S R D E L T K N Q V S L T .  
 ACCCTGCCCC CATCCCGGGA TGAGCTGACC AAGAACCAGG TCAGCCTGAC  
 TGGGACGGGG GTAGGGCCCT ACTCGACTGG TTCTTGGTCC AGTCGGACTG  
 · C L V K G F Y P S D I A V E W E S .  
 CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCAGCGA CATCGCCGTG GAGTGGGAGA  
 GACGGACCAG TTTCCGAAGA TAGGGTCGCT GTAGCGGCAC CTCACCCTCT  
 · N G Q P E N N Y K T T P P V L D  
 GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCTCC CGTGCTGGAC  
 CGTTACCCGT CGGCCTCTTG TTGATGTTCT GGTGCGGAGG GCACGACCTG  
 S D G S F F L Y S K L T V D K S R .  
 TCCGACGGCT CTTCTTCTCT CTACAGCAAG CTCACCGTGG ACAAGAGCAG  
 AGGCTGCCGA GGAAGAAGGA GATGTCGTTT GAGTGGCACC TGTCTCTGTC  
 · W Q Q G N V F S C S V M H E A L H .  
 GTGGCAGCAG GGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT GAGGCTCTGC  
 CACCGTCGTC CCCTTGCAGA AGAGTACGAG GCACTACGTA CTCCGAGACG  
 · N H Y T Q K S L S L S P G K K D  
 ACAACCACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGCTCCGGG TAAAAAAGAT  
 TGTGGTGAT GTGCGTCTTC TCGGAGAGGG ACAGAGGCCC ATTTTTTCTA  
 P K F W V L V V V G G V L A C Y S .  
 CCCAAATTTT GGGTGTGGT GGTGGTTGGT GGAGTCTGG CTGTCTATAG  
 GGGTTTAAAA CCCACGACCA CCACCAACCA CCTCAGGACC GAACGATATC  
 · L L V T V A F I I F W V R S K R S .  
 CTTGCTAGTA ACAGTGGCCT TTATTATTTT CTGGGTGAGG AGTAAGAGGA  
 GAACGATCAT TGTACCGGA AATAATAAAA GACCCACTCC TCATTCTCCT

XmaI  
~~~~~

· R L L H S D Y M N M T P R R P G
GCAGGCTCCT GCACAGTGAC TACATGAACA TGACTCCCCG CCGCCCCGGG
CGTCCGAGGA CGTGTCACTG ATGTACTTGT ACTGAGGGGC GCGGGGGCCC
P T R K H Y Q P Y A P P R D F A A ·
CCCACCCGCA AGCATTACCA GCCCTATGCC CCCCACGCG ACTTCGCAGC
GGGTGGGCGT TCGTAATGGT CGGGATACGG GGGGGTGCGC TGAAGCGTCG
· Y R S L R V K F S R S A D A P A Y ·
CTATCGCTCC CTGAGAGTGA AGTTCAGCAG GAGCGCAGAC GCCCCCCGCT
GATAGCGAGG GACTCTCACT TCAAGTCGTC CTCGCGTCTG CGGGGGCGCA
· Q Q G Q N Q L Y N E L N L G R R
ACCAGCAGGG CCAGAACCAG CTCTATAACG AGCTCAATCT AGGACGAAGA
TGGTCGTCCC GGTCTTGGTC GAGATATTGC TCGAGTTAGA TCCTGCTTCT
E E Y D V L D K R R G R D P E M G ·
GAGGAGTACG ATGTTTTGGA CAAGAGACGT GGCCGGGACC CTGAGATGGG
CTCCTCATGC TACAAAACCT GTTCTCTGCA CCGGCCCTGG GACTCTACCC
· G K P R R K N P Q E G L Y N E L Q ·
GGGAAAGCCG AGAAGGAAGA ACCCTCAGGA AGGCCTGTAC AATGAACTGC
CCCTTTCGGC TCTTCCTTCT TGGGAGTCCT TCCGGACATG TTACTIONGAGC
· K D K M A E A Y S E I G M K G E
AGAAAGATAA GATGGCGGAG GCCTACAGTG AGATTGGGAT GAAAGGCGAG
TCTTCTATT CTACCGCCTC CGGATGTCAC TCTAACCTA CTTTCCGCTC
R R R G K G H D G L Y Q G L S T A ·
CGCCGGAGGG GCAAGGGGCA CGATGGCCTT TACCAGGGTC TCAGTACAGC
GCGGCCTCCC CGTTCCTCCG GCTACCGGAA ATGGTCCAG AGTCATGTCG
· T K D T Y D A L H M Q A L P P R * ·
CACCAAGGAC ACCTACGACG CCCTTCACAT GCAGGCCCTG CCCCTCGCT
GTGTTCTCTG TGGATGCTGC GGAAGTGTA CTTCCGGGAC GGGGGAGCGA

XhoI
~~~~~

· S S  
AATCCTCGAG  
TTAGGAGCTC

### 6.3 Sequenz des Immunrezeptors pBullet-antiCD20scFv-hFc-CD3ζ (#1115)

NcoI  
~~~~~

M D F Q V Q I F S F L ·
AT GGATTTTCAG GTGCAGATTT TCAGCTTCTC
TA CCTAAAAGTC CACGTCTAAA AGTCGAAGGA

XbaI
~~~~~

· L I S A S V I M S R M A Q V K L Q ·  
GCTAATCAGT GCCTCAGTCA TAATGTCTAG AATGGCCCAG GTCAAACACTAC  
CGATTAGTCA CGGAGTCAGT ATTACAGATC TTACCGGGTC CAGTTTGATG  
· E S G A E L V K P G A S V K M S  
AGGAGTCAGG GGCTGAGCTG GTGAAGCCTG GGGCCTCAGT GAAGATGTCC  
TCCTCAGTCC CCGACTCGAC CACTTCGGAC CCCGGAGTCA CTTCTACAGG  
C K A S G Y T F T S Y N M H W V K ·  
TGCAAGGCTT CTGGCTACAC ATTTACCAGT TACAATATGC ACTGGGTAAA  
ACGTTCCGAA GACCGATGTG TAAATGGTCA ATGTTATACG TGACCCATTT  
· Q T P G Q G L E W I G A I Y P G N ·  
GCAGACACCT GGACAGGGCC TGGAAATGGAT TGGAGCTATT TATCCAGGAA  
CGTCTGTGGA CCTGTCCCGG ACCTTACCTA ACCTCGATAA ATAGGTCTCT

· G D T S Y N Q K F K G K A T L T  
 ATGGTGATAC TTCCTACAAT CAGAAGTTCA AAGGCAAGGC CACATTGACT  
 TACCACTATG AAGGATGTTA GTCTTCAAGT TTCCGTTCCG GTGTAAGTGA  
 A D K A S S S T A Y M Q L S S L T S ·  
 GCAGACAAAT CCTCCAGCAC AGCCTACATG CAGCTCAGCA GCCTGACATC  
 CGTCTGTTTA GGAGGTCGTG TCGGATGTAC GTCGAGTCGT CGGACTGTAG

BglII

~~~~~

· E D S A D Y Y C A R S N Y Y G S S ·
 TGAGGACTCT GCGGACTATT ACTGTGCAAG ATCTAATTAT TACGGTAGTA
 ACTCCTGAGA CGCCTGATAA TGACACGTTT TAGATTAATA ATGCCATCAT
 · Y W F F D V W G Q G T T V T V S
 GCTACTGGTT CTTCGATGTC TGGGGCCAAG GGACCACGGT CACCGTCTCC
 CGATGACCAA GAAGCTACAG ACCCCGGTTC CCTGGTGCCA GTGGCAGAGG
 S G G G G S G G G G S G G G G S D ·
 TCAGGTGGAG GCGGTTGAG CGGAGGTGGC TCTGGCGGTG GCGGATCGGA
 AGTCCACCTC CGCCAAGTCC GCCTCCACCG AGACCGCCAC CGCCTAGCCT
 · I E L T Q S P T I L S A S P G E K ·
 CATCGAGCTC ACTCAGTCTC CAACAATCCT GTCTGCATCT CCAGGGGAGA
 GTAGCTCGAG TGAGTCAGAG GTTGTTAGGA CAGACGTAGA GGTCCCCTCT
 · V T M T C R A S S S V N Y M D W
 AGTTCACAAT GACTTGCAGG GCCAGCTCAA GTGTAAATTA CATGGACTGG
 TCCAGTGTTA CTGAACGTCC CGGTCGAGTT CACATTTAAT GTACCTGACC

BamHI

~~~~~

Y Q K K P G S S P K P W I Y A T S ·  
 TACCAGAAGA AGCCAGGATC CTCCCCAAA CCCTGGATTT ATGCCACATC  
 ATGGTCTTCT TCGGTCCTAG GAGGGGTTT GGGACCTAAA TACGGTGTAG  
 · N L A S G V P A R F S G S G S G T ·  
 CAACCTGGCT TCTGGAGTCC CTGCTCGCTT CAGTGGCAGT GGGTCTGGGA  
 GTTGGACCA AGACCTCAGG GACGAGCGAA GTCACCGTCA CCCAGACCTT  
 · S Y S L T I S R V E A E D A A T  
 CCTCTTACTC TCTCACAATC AGCAGAGTGG AGGCTGAAGA TGCTGCCACT  
 GGAGAATGAG AGAGTGTTAG TCGTCTCACC TCCGACTTCT ACGACGGTGA  
 Y Y C Q Q W S F N P P T F G G G T ·  
 TATTACTGCC AGCAGTGGAG TTTTAATCCA CCCACGTTTC GAGGGGGGAC  
 ATAATGACGG TCGTCACCTC AAAATTAGGT GGGTGCAAGC CTCCCCCTG

NotI

~~~~~

· K L E I K R A A A D P A E P K S P ·
 AAAGTTGGAA ATAAAACGGG CGGCCGCTGA TCCCGCGAG CCCAAATCTC
 TTCAACCTT TATTTGCCC GCCGGCGACT AGGGCGGCTC GGGTTTAGAG
 · D K T H T C P P C P A P E L L G
 CTGACAAAAC TCACACATGC CCACCGTGCC CAGCACCTGA ACTCCTGGGG
 GACTGTTTTG AGTGTGTACG GGTGGCACGG GTCGTGGACT TGAGGACCCC
 G P S V F L F P P K P K D T L M I ·
 GGACCGTCAG TCTTCTCTT CCCCCAAA CCAAGGACA CCCTCATGAT
 CCTGGCAGTC AGAAGGAGAA GGGGGTTTT GGGTTCTGT GGGAGTACTA
 · S R T P E V T C V V V D V S H E D ·
 CTCCCGGACC CCTGAGGTCA CATGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG
 GAGGCCTGG GGACTCCAGT GTACGCACCA CCACCTGCAC TCGGTGCTTC
 · P E V K F N W Y V D G V E V H N
 ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC TGGTACGTGG ACGGCGTGG GGTGCATAAT
 TGGGACTCCA GTTCAAGTTG ACCATGCACC TGCCGCACCT CCACGTATTA
 A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V ·
 GCCAAGACAA AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC AACAGCACGT ACCGGGTGGT
 CGGTTCTGTT TCGGCGCCCT CCTCGTCATG TTGTCGTGCA TGGCCCACCA
 · S V L T V L H Q D W L N G K E Y K ·
 CAGCGTCTC ACCGTCCTGC ACCAGGACTG GCTGAATGGC AAGGAGTACA
 GTCGCAGGAG TGGCAGGACG TGGTCTGAC CGACTTACCG TTCCTCATGT
 · C K V S N K A L P A P I E K T I
 AGTCAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCAG CCCCATCGA GAAAACCATC
 TCACGTTCCA GAGGTTGTTT CGGGAGGGTC GGGGGTAGCT CTTTTGGTAG

S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P .
 TCCAAAGCCA AAGGGCAGCC CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCCCCC
 AGGTTTCGGT TTCCCGTCGG GGCTCTTGGT GTCCACATGT GGGACGGGGG
 · S R D E L T K N Q V S L T C L V K ·
 ATCCCGGGAT GAGCTGACCA AGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCCTGGTCA
 TAGGGCCCTA CTCGACTGGT TCTTGGTCCA GTCGGACTGG ACGGACCAGT
 · G F Y P S D I A V E W E S N G Q
 AAGGCTTCTA TCCCAGCGAC ATCGCCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCAG
 TTCCGAAGAT AGGGTCGCTG TAGCGGCACC TCACCCTCTC GTTACCCGTC
 P E N N Y K T T P P V L D S D G S ·
 CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCCTCCC GTGCTGGACT CCGACGGCTC
 GGCTCTTGT TGATGTTCTG GTGCGGAGGG CACGACCTGA GGCTGCCGAG
 · F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G ·
 CTTCTTCTC TACAGCAAGC TCACCGTGGG CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG
 GAAGAAGGAG ATGTCGTTTC AGTGGCACCT GTTCTCGTCC ACCGTCGTCC
 · N V F S C S V M H E A L H N H Y
 GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC
 CTTTGACAGAA GAGTACGAGG CACTACGTAC TCCGAGACGT GTTGGTGATG
 T Q K S L S L S P G K K D P K L C ·
 ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT AAAAAAGATC CCAAACCTCTG
 TGCGTCTTCT CGGAGAGGGA CAGAGGCCCA TTTTCTTAG GGTTTGAGAC
 · Y L L D G I L F I Y G V I L T A L ·
 CTACCTGCTG GATGGAATCC TCTTCATCTA TGGTGTCACT CTCACTGCCT
 GATGGACGAC CTACCTTAGG AGAAGTAGAT ACCACAGTAA GAGTGACGGA
 · F L R V K F S R S A D A P A Y Q
 TGTTCTGAG AGTGAAGTTC AGCAGGAGCG CAGACGCCCC CGCGTACCAG
 ACAAGGACTC TCACTTCAAG TCGTCCTCGC GTCTGCGGGG GCGCATGGTC
 Q G Q N Q L Y N E L N L G R R E E ·
 CAGGGCCAGA ACCAGCTCTA TAACGAGCTC AATCTAGGAC GAAGAGAGGA
 GTCCCGGTCT TGGTCGAGAT ATTGCTCGAG TTAGATCCTG CTTCTCTCCT
 · Y D V L D K R R G R D P E M G G K ·
 GTACGATGTT TTGGACAAGA GACGTGGCCG GGACCCTGAG ATGGGGGAA
 CATGCTACAA AACCTGTTCT CTGCACCGGC CCTGGGACTC TACCCCCCTT
 · P R R K N P Q E G L Y N E L Q K
 AGCCGAGAAG GAAGAACCCT CAGGAAGGCC TGTACAATGA ACTGCAGAAA
 TCGGCTCTTC CTTCTTGGGA GTCCTTCCGG ACATGTTACT TGACGTCTTT
 D K M A E A Y S E I G M K G E R R ·
 GATAAGATGG CGGAGGCCTA CAGTGAGATT GGGATGAAAG GCGAGCGCCG
 CTATTCTACC GCCTCCGGAT GTCACTCTAA CCCTACTTTC CGCTCGCGGC
 · R G K G H D G L Y Q G L S T A T K ·
 GAGGGCAAG GGGCACGATG GCCTTTACCA GGGTCTCAGT ACAGCCACCA
 CTCCCCGTTT CCGTGCTAC CGGAAATGGT CCCAGAGTCA TGTCGGTGGT
 · D T Y D A L H M Q A L P P R *
 AGGACACCTA CGACGCCCTT CACATGCAGG CCCTGCCCCC TCGCTAA
 TCCTGTGGAT GCTGCGGAA GTGTACGTCC GGGACGGGGG AGCGATT

7 Abkürzungsverzeichnis

Gebräuchliche Abkürzungen sowie physikalische SI-Basiseinheiten werden nicht gesondert aufgeführt.

7-AAD	7-Aminoactinomycin
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonsäure)
AK	Antikörper
AML	akute myeloische Leukämie
Amp	Ampicillin
APC	Allophycocyanin
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CEA	karzinoembryonales Antigen
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorbantest
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
Fab	Antigen bindendes Fragment

FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung
Fc	Kristallisierbares Fragment
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-5-isocyanat
Fv	variables Fragment
HMW-MAA	High Molecular Weight Melanoma Associated Antigen
H ₂ O _{dest}	doppelt destilliertes Wasser
Ig	Immunglobulin
IL-2	Interleukin-2
IL-10	Interleukin-10
IFN-γ	Interferon-gamma
ITAM	„immunoreceptor tyrosine-based activation motif“
LB	Luria-Broth-Vollmedium
MACS	magnetisch assoziierte Zellsortierung
mAK	monoklonaler Antikörper
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex („major histocompatibility Complex“)
NF-κB	„nuclear factor κB“
NFAT	„nuclear factor of activated T cells“
NK Zelle	Natürliche Killerzelle
OD	optische Dichte
PBL	periphere Blutlymphozyten
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
PI ₃ K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PMA	Phorbol 12-myristat 13-acetat
RT	Raumtemperatur
scFv	Einzelketten-Antikörper („single chain fragment of the variable region“)
TAA	Tumor assoziiertes Antigen
TAE	Tris-HCl/Acetate/EDTA-Puffer
TCR	T-Zell Rezeptor
TGF-β	„Transforming growth factor beta“
TIL	Tumor infiltrierende Lymphozyten
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
T _{reg} Zelle	regulatorische T-Zelle
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-Amonomethan-Hydrochlorid
ÜN	über Nacht
V _H	variable Domäne der schweren Kette
V _L	variable Domäne der leichten Kette
XIAP	X-linked Inhibitor of Apoptosis
XTT	Natrium 3`-[1-(phenylamino-carbonyl)-3,4,tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)benzen Sulfonsäure Hydrat

8 Literaturverzeichnis

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Apr 1;100(7):3983-8

Ashton-Rickardt PG. The granule pathway of programmed cell death. Crit Rev Immunol. 2005

Barnhill RL, Piepkorn MW, Alistair JC, Flynn E, Karaoli T, Folkman J. Tumor vascularity, proliferation and apoptosis in human melanoma micrometastases and macrometastases. Arch Dermatol. 1998; 134: 991-994

Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguet H, Goasguen J, Vaugier G, Potron G, Colona P, Oberling F, Thomas M, Tchernia G, Jacquillat C, Boivin P, Lesty C, Duault MT, Monconduit M, Belabbes S, Gremy F. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. Cancer. 1981 Jul 1;48(1):198-206

Blankenstein T. The role of tumor stroma in the interaction between tumor and immune system. Curr Opin Immunol. 2005 Apr;17(2):180-6

Boise LH, Noel PJ, Thompson CB. CD28 and apoptosis. Curr Opin Immunol. 1995 Oct;7(5):620-5

Bonnet, D. & Dick, J. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. Nat. Med. 1997; 3, 730 – 737

Cantwell M, Hua T, Pappas J, Kipps TJ. Acquired CD40-ligand deficiency in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Med.* 1997 Sep;3(9):984-9

Ceze N, Probst A, Lecomte T, Ohresser M, Paintaud G, Watier H. Target antigens for therapeutic antibodies in oncology: many candidates, few successes. *Bull Cancer.* 2007;94(7 Suppl):F129-36

Chowdhury D, Lieberman J. Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. *Annu Rev Immunol.* 2008;26:389-420

Dudley ME, Wunderlich JR, Shelton TE, Even J, Rosenberg SA. Generation of tumor-infiltrating lymphocyte cultures for use in adoptive transfer therapy for melanoma patients. *J Immunother* 2003;26:332-342.

Dudley ME, Wunderlich JR, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, Sherry RM, Marincola FM, Leitman SF, Seipp CA, Rogers-Freezer L, Morton KE, Nahvi A, Mavroukakis SA, White DE, Rosenberg SA. A phase I study of nonmyeloablative chemotherapy and adoptive transfer of autologous tumor antigen-specific T lymphocytes in patients with metastatic melanoma. *J Immunother.* 2002 May-Jun;25(3):243-51

Dudley ME, Wunderlich JR, Yang JC, Sherry RM, Topalian SL, Restifo NP, Royal RE, Kammula U, White DE, Mavroukakis SA, Rogers LJ, Gracia GJ, Jones SA, Mangiameli DP, Pelletier MM, Gea-Banacloche J, Robinson MR, Berman DM, Filie AC, Abati A, Rosenberg SA. Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2005;23:2346-2357.

Eichhorst BF, Busch R, Hopfinger G, Pasold R, Hensel M, Steinbrecher C, Fludarabine plus cyclophosphamide versus fludarabine alone in first-line therapy of younger patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2006;107:885-891.

Fang D, Nguyen TK, Leishear K, Finko R, Kulp AN, Hotz S, Van Belle PA, Xu X, Elder DE, Herlyn M. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res*. 2005 Oct 15;65(20):9328-37

Fitzer-Attas CJ, Schindler DG, Waks T, Eshhar Z. Harnessing Syk family tyrosine kinases as signaling domains for chimeric single chain of the variable domain receptors: optimal design for T cell activation. *J Immunol* 1998;160:145-154.

Fredricks D, Relman D. Sequence-Based Identification of Microbial Pathogens: a Reconsideration of Koch's Postulates. *Clinical Microbiology Reviews*, Jan. 1996, p. 18–33

Garcia-Lora A, Algarra I, Garrido F. MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. *J Cell Physiol* 2003;195:346-355.

Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 1983;166:557-580.

Haynes NM, Trapani JA, Teng MW, Jackson JT, Cerruti L, Jane SM, Kershaw MH, Smyth MJ, Darcy PK. Rejection of syngeneic colon carcinoma by CTLs expressing single-chain antibody receptors codelivering CD28 costimulation. *J Immunol* 2002;169:5780-5786.

Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, Bruns CJ and Heeschen C. Distinct Populations of Cancer Stem Cells Determine Tumor Growth and Metastatic Activity in Human Pancreatic Cancer. *Cell Stem Cell* 2007;1: 313–323

Hirst CE, Buzza MS, Bird CH, Warren HS, Cameron PU, Zhang M, Ashton-Rickardt PG, Bird PI. The intracellular granzyme B inhibitor, proteinase inhibitor 9, is up-regulated during accessory cell maturation and effector cell degranulation, and its overexpression enhances CTL potency. *J Immunol.* 2003 Jan 15;170(2):805-15

Hombach A, Abken H. Costimulation tunes tumor-specific activation of redirected T cells in adoptive immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2007;56:731-737.

Hombach A, Heuser C, Abken H. Simultaneous targeting of IL2 and IL12 to Hodgkin's lymphoma cells enhances activation of resting NK cells and tumor cell lysis. *Int J Cancer* 2005;115:241-247.

Hombach A, Heuser C, Gerken M, Fischer B, Lewalter K, Diehl V, Pohl C, Abken H. T cell activation by recombinant FcepsilonRI gamma-chain immune receptors: an extracellular spacer domain impairs antigen-dependent T cell activation but not antigen recognition. *Gene Ther* 2000a;7:1067-1075.

Hombach A, Heuser C, Sircar R, Tillmann T, Diehl V, Pohl C, Abken H. An anti-CD30 chimeric receptor that mediates CD3-zeta-independent T-cell activation against Hodgkin's lymphoma cells in the presence of soluble CD30. *Cancer Res* 1998a;58:1116-1119.

Hombach A, Koehler H, Rappl G, Abken H. Human CD4+ T cells lyse target cells via granzyme/perforin upon circumvention of MHC class II restriction by an antibody-like immunoreceptor. *J Immunol* 2006;177:5668-5675.

Hombach A, Schneider C, Sent D, Koch D, Willemsen RA, Diehl V, Kruis W, Bolhuis RL, Pohl C, Abken H. An entirely humanized CD3 zeta-chain signaling receptor that directs peripheral blood t cells to specific lysis of carcinoembryonic antigen-positive tumor cells. *Int J Cancer* 2000b;88:115-120.

Hombach A, Sent D, Schneider C, Heuser C, Koch D, Pohl C, Seliger B, Abken H. T-cell activation by recombinant receptors: CD28 costimulation is required for interleukin 2 secretion and receptor-mediated T-cell proliferation but does not affect receptor-mediated target cell lysis. *Cancer Res* 2001a;61:1976-1982.

Hombach A, Sircar R, Heuser C, Tillmann T, Diehl V, Kruis W, Pohl C, Abken H. Chimeric anti-TAG72 receptors with immunoglobulin constant Fc domains and gamma or zeta signalling chains. *Int J Mol Med* 1998b;2:99-103.

Hombach A, Wiczarkowicz A, Marquardt T, Heuser C, Usai L, Pohl C, Seliger B, Abken H. Tumor-specific T cell activation by recombinant immunoreceptors: CD3 zeta signaling and CD28 costimulation are simultaneously required for efficient IL-2 secretion and can be integrated into one combined CD28/CD3 zeta signaling receptor molecule. *J Immunol* 2001b;167:6123-6131.

Jost LM, Kirkwood JM, Whiteside TL. Improved short- and long-term XTT-based colorimetric cellular cytotoxicity assay for melanoma and other tumor cells. *J Immunol Methods* 1992;147:153-165.

Kashkar H, Deggerich A, Seeger JM, Yazdanpanah B, Wiegmann K, Haubert D, Pongratz C, Krönke M. NF-kappaB-independent down-regulation of XIAP by bortezomib sensitizes HL B cells against cytotoxic drugs. *Blood*. 2007 May 1;109(9):3982-8

Kashkar H, Seeger JM, Hombach A, Deggerich A, Yazdanpanah B, Utermohlen O, Heimlich G, Abken H, Kronke M. XIAP targeting sensitizes Hodgkin lymphoma cells for cytolytic T-cell attack. *Blood* 2006;108:3434-3440.

Kluger HM, McCarthy MM, Alvero AB, Sznol M, Ariyan S, Camp RL, Rimm DL, Mor G. The X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) is up-regulated in metastatic melanoma, and XIAP cleavage by Phenoxodiol is associated with Carboplatin sensitization. *J Transl Med*. 2007 Jan 26;5:6

Koehler H, Kofler D, Hombach A, Abken H. CD28 costimulation overcomes transforming growth factor-beta-mediated repression of proliferation of redirected human CD4+ and CD8+ T cells in an antitumor cell attack. *Cancer Res*. 2007 Mar 1;67(5):2265-73

Montillo M, Tedeschi A, Miqueleiz S, Veronese S, Cairoli R, Intrepido L, Alemtuzumab as consolidation after a response to fludarabine is effective in purging residual disease in patients with chronic lymphocytic leukemia.

Moritz D, Groner B. A spacer region between the single chain antibody- and the CD3 zeta-chain domain of chimeric T cell receptor components is required for efficient ligand binding and signaling activity. *Gene Ther* 1995;2:539-546.

Pavoni E, Flego M, Dupuis ML, Barca S, Petronzelli F, Anastasi AM, D'Alessio V, Pelliccia A, Vaccaro P, Monteriu G, Ascione A, De Santis R, Felici F, Cianfriglia M, Minenkova O. Selection, affinity maturation, and characterization of a human scFv antibody against CEA protein. *BMC Cancer* 2006;6:41.

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001 Nov 1;414(6859):105-11.

Rosenberg SA, Restifo NP, Yang JC, Morgan RA, Dudley ME. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2008;8:299-308.

Rosenberg SA. Development of cancer immunotherapies based on identification of the genes encoding cancer regression antigens. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:1635-1644.

Schadendorf D, Worm M, Algermissen B, Kohlmus CM, Czarnetzi BM Chemosensitivity testing of human melanoma cells: retrospective analysis of clinical response and in vitro drug sensitivity. *CancerRes*. 1994 73: 103-108

Seliger B, Maeurer MJ, Ferrone S. TAP off--tumors on. *Immunol Today*. 1997 Jun;18(6):292-9.

Serrone L, Hersey P. The chemoresistance of human malignant melanoma: an update. *Melanoma Res*. 1999; 9: 51-58

Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* 2003; 63(18):5821-8

Stacchini A, Aragno M, Vallario A, Alfarano A, Circosta P, Gottardi D, Faldella A, Rege-Cambrin G, Thunberg U, Nilsson K, Caligaris-Cappio F. MEC1 and MEC2: two new cell lines derived from B-chronic lymphocytic leukaemia in prolymphocytoid transformation. *Leuk Res.* 1999 Feb;23(2):127-36.

Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol.* 2008 Jul;8(7):523-32

Weijtens ME, Willemsen RA, Hart EH, Bolhuis RL. A retroviral vector system 'STITCH' in combination with an optimized single chain antibody chimeric receptor gene structure allows efficient gene transduction and expression in human T lymphocytes. *Gene Ther* 1998;5:1195-1203.

Wierda W, O'Brien S, Wen S, Faderl S, Garcia-Manero G, Thomas D, Chemoimmunotherapy with fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab for relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol.* 2005; 23:4070-4080.

Willemsen RA, Weijtens ME, Ronteltap C, Eshhar Z, Gratama JW, Chames P, Bolhuis RL. Grafting primary human T lymphocytes with cancer-specific chimeric single chain and two chain TCR. *Gene Ther* 2000;7:1369-1377.

Yazdi AS, Morstedt K, Puchta U, Ghoreschi K, Flaig MJ, Rocken M, Sander CA. Heterogeneity of T-cell clones infiltrating primary malignant melanomas. *J Invest Dermatol* 2006;126:393-398.

Zenz T, Ritgen M, Dreger P, Krober A, Barth TF, Schlenk R, Autologous graft versus host disease-like syndrome after an alemtuzumab containing conditioning regimen and autologous stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2006; [Epub ahead of print]

Zhao Y, Zheng Z, Robbins PF, Khong HT, Rosenberg SA, Morgan RA. Primary human lymphocytes transduced with NY-ESO-1 antigen-specific TCR genes recognize and kill diverse human tumor cell lines. *J Immunol* 2005;174:4415-4423.

Danksagung

Recht herzlich möchte ich mich bei Prof. Dr. Hinrich Abken bedanken, für die Möglichkeit der Erstellung dieser Arbeit. Seine ständige Bereitschaft, Ergebnisse, Probleme und neue Aspekte der Forschung zu diskutieren, haben mir sehr dabei geholfen aus den wissenschaftlichen Kinderschuhen zu entwachsen. Desweiteren bedanke ich mich bei Ihm für die Begutachtung dieser Dissertation.

Herrn Prof. Dr. Jonathan Howard danke ich für seine Bereitschaft die Betreuung dieser Arbeit an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät zu übernehmen und für die Übernahme des Koreferates.

Herrn Prof. Dr. Siegfried Roth möchte ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes danken.

Mein weiterer Dank gilt Frau Prof. Dr. Cornelia Mauch für die sehr gute Kooperation mit der Klinik für Dermatologie.

An dieser Stelle bedanke ich mich ganz herzlich bei allen Doktoranden und Mitarbeitern des Labors für Tumorgenetik für ein außergewöhnliches Arbeitsklima, das einen immer wieder neu motivieren kann. Wir hatten eine sehr schöne Zeit.

Nicht zuletzt geht ein liebes Dankeschön an meine Eltern, meinen Bruder und natürlich an Silke für stete moralische Unterstützung. Ohne Euch geht es nicht!

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Hinrich Abken und Prof. Dr. Jonathan Howard betreut worden.

Köln, den 19. August 2008

Patrick Schmidt

Teilpublikationen (submitted):

Naive T cells can be engineered to break tolerance and eliminate autologous chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells in a granzyme B-dependent fashion.

Patrick Schmidt, David Kofler, Max Topp, Andreas Hombach, Michael Hallek and Hinrich Abken

Targeted elimination of cancer stem cells eradicates melanoma.

Patrick Schmidt, Corinna Lösch, Klaudia Manista, Caroline Kopecky, Andreas Hombach, Steffi Löffek, Cornelia Mauch & Hinrich Abken

Lebenslauf

Name: Patrick Schmidt
Geburtsdatum: 21. Juli 1978
Geburtsort: Wolmirstedt
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: ledig
Adresse: Thielenstraße 6, 50825 Köln
email: patrick.schmidt@uni-koeln.de
Telefon: 0178/1691462

Schulische Ausbildung:

1985 – 1991 Polytechnische Oberschule in Wolmirstedt
1991 – 1997 Kurfürst-Joachim-Friedrich Gymnasium Wolmirstedt

Wehrdienst:

1997 – 1998 4./Panzerlehrbataillon 93 in Munster

Akademische Ausbildung:

1998 – 2005 Biologiestudium an der Universität zu Köln, Diplom
(Abschlussnote: Sehr gut)
2005 – Promotionsstudium am Institut für Genetik; externe
Doktorarbeit am Klinikum der Universität zu Köln, Klinik I für
Innere Medizin, Labor für Tumorgenetik, Univ.-Prof. Dr.
Hinrich Abken

Sonstiges:

- 2001 – 2003 Studentische Hilfskraft; Tutor im Praktikum der Biologie für Mediziner
- 2004 – 2005 Studentische Hilfskraft; Klinik für Dermatologie und Venerologie der Universität zu Köln; Anfertigung der Diplomarbeit
- 2008 – Vertreter der wissenschaftlichen Mitarbeiter im Vorstand des Zentrums für Molekulare Medizin Köln (ZMMK)

Köln, den 19.August 2008

Patrick Schmidt